



**HAL**  
open science

# Conception et études d'assemblages supramoléculaires conducteurs à base d'ADN G-quadruplexe contraint

Jonny Chan

► **To cite this version:**

Jonny Chan. Conception et études d'assemblages supramoléculaires conducteurs à base d'ADN G-quadruplexe contraint. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..]; Université catholique de Louvain (1970-..), 2021. Français. NNT : 2021GRALV009 . tel-03251330

**HAL Id: tel-03251330**

**<https://theses.hal.science/tel-03251330v1>**

Submitted on 7 Jun 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

**préparée dans le cadre d'une cotutelle entre**

**l'Université Grenoble Alpes et l'Université  
catholique de Louvain**

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : le 6 janvier 2005 – 25 mai 2016

Présentée par

**Jonny CHAN**

Thèse dirigée par **Éric DEFRANCQ** et  
codirigée par **Benjamin ELIAS**

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**  
dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

## **Conception et études d'assemblages supramoléculaires conducteurs à base d'ADN G-quadruplexe contraint**

Thèse soutenue publiquement le **24 Février 2021**,  
devant le jury composé de :

**Madame Frédérique LOISEAU**

Professeure, Université Grenoble Alpes, (Présidente du jury)

**Madame Geneviève PRATVIEL**

Directrice de recherche CNRS, Université de Toulouse (Rapporteur)

**Monsieur Alain BURGER**

Professeur, Université Côte d'Azur, rôle (Rapporteur)

**Monsieur Yann GARCIA**

Professeur, Université Catholique de Louvain, (Examineur)

**Monsieur Éric DEFRANCQ**

Professeur, Université Grenoble Alpes (Directeur de thèse)

**Monsieur Benjamin ELIAS**

Professeur, Université Catholique de Louvain (Co-directeur de thèse)





# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Éric et Benjamin de m'avoir accueilli pour ces trois ans de thèse. La cotutelle de thèse n'a pas été simple à réaliser mais cela m'a permis d'expérimenter deux laboratoires aux fonctionnements et au mode de vie différents.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse :  
Le Pr. Frédérique LOISEAU, de l'Université Grenoble Alpes,  
Le Dr. Geneviève PRATVIEL, Directrice de recherche CNRS de l'Université de Toulouse  
Le Pr. Alain BURGER, de l'Université Côte d'Azur  
Le Pr. Yann GARCIA, l'Université Catholique de Louvain

J'aimerais ensuite remercier le personnel administratif de Grenoble : Régine et de Louvain : Audrey, Corinne, Catherine et Stéphanie (que je considère comme personnel administratif). Sans elles, la partie administrative de la thèse (personne à contacter, procédure à suivre pour l'inscription, pour la demande de mission, commandes de produits, etc...) aurait pu être très laborieuse. S'en suit alors le personnel technique, notamment Laurent pour tout ce qui est appareillage HPLC.

Je remercie ensuite les « anciens » doctorant(e)s : Laureen et Carlos avec qui j'ai côtoyé que quelques mois mais qui ont laissé leurs traces au laboratoire, Benjamin avec ses blagues pas drôles et ses sauts d'humeurs, Laure et Estelle pour leur bonne humeur et leur côté « grande sœur », Alexandre pour toutes ses connaissances qu'il a partagées ainsi que sa volonté d'aider les autres, Biagio et François, les camarades de thèse qui ont commencé quasi en même temps que moi mais qui ont soutenu avant moi. Du côté de Louvain, je tiens aussi à remercier Justin, Simon et Robin pour leurs aides et conseils sur la chimie des complexes organométalliques.

Durant ces trois années de thèse, j'ai aussi côtoyé le personnel permanent du laboratoire. Je remercie Nicolas et Olivier de m'avoir donné l'occasion d'encadrer des TP de chimie organique, Rémy d'être disponible chaque fois qu'une machine tombe en panne et son aide pour trouver des solutions aux problèmes rencontrés, David de m'avoir accueilli dans son bureau alors que j'ai été chassé du bureau de rédaction, Jérôme de m'avoir invité à manger chez lui avec Laure et Martin, Frédérique et Pierre-Henri de m'avoir laissé utiliser leurs produits chimiques ainsi que leur appareil de mesure pour les complexes.

La vie au laboratoire sera beaucoup moins fun sans les collègues actuels de Grenoble : Pierre avec toutes ses questions et son penchant à foncer dans le tas, Yoann qui met de l'ambiance au labo avec ses remarques bien placées, Sean et Jordan les deux petits nouveaux qui découvrent petit à petit la vie d'un doctorant, Laura une camarade de galère, Silvia avec ses « fck U beach », Eugénie qui n'est pas si méchante/antisociale que Benjamin ou Romain l'ont si bien vendu, Coelio El Tecko, ainsi que les trois stagiaires M2 : Florenne, Rim et Oriane qui apportent une touche de féminité au labo. Du côté de Louvain, il y a un Martin Gillard que je tiens à remercier grandement pour sa très bonne humeur, son optimisme et ses blagues pas drôles, Michael qui ressemble à un jeune de 20 ans alors qu'il a 30 ans, Simon DK pour ses coups foireux, les deux anciens nouveaux doctorants Martin Junior et Milan pour leur gaieté et l'ambiance au labo.

Ces trois dernières années ont aussi été ponctuées par des rencontres de personnes dont le séjour a été encore plus court que le mien au labo, notamment le cas des post-docs : Yang et Romain, qui m'ont montré d'une façon ou d'une autre comment se passe la vie d'un post-doc ; des contractuels : Claire qui chante durant ses purif HPLC, Océane la princesse, Marion qui a essayé de réparer toutes les machines en panne.

Pour finir, j'aimerais bien sûr remercier ma famille et mes amis qui m'ont soutenu de près ou de loin durant ces trois dernières années.

# Sommaire

<b>Abréviations.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Introduction sur l'ADN.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1. L'ADN double brin .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1.1. La découverte des acides nucléiques .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.1.2. La structure de l'ADN .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.1.3. Le rôle biologique de l'ADN .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.2. L'ADN quadruples brins .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.2.1. Structures du G-Quadruplexe .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.2.2. Polymorphisme des G-quadruplexes .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.2.3. Rôles biologiques des G-quadruplexes.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2. Etudes des transferts de charges au sein de l'ADN duplexe.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.1. Transfert de charges au sein de l'ADN duplexe.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.2. Les études dans les cellules et sur électrodes .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.2.1. Les études en cellules.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.2.2. Les études sur électrodes .....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.3. Les études en solutions .....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.3.1. Les injecteurs de charges organiques .....</b>	<b>23</b>
<b>1.2.3.2. Les injecteurs de charges inorganiques .....</b>	<b>25</b>
<b>1.2.3.3. Les sondes utilisées.....</b>	<b>26</b>
<b>1.3. Les complexes organométalliques.....</b>	<b>30</b>
<b>1.3.1. Absorption de la lumière .....</b>	<b>31</b>
<b>1.3.1.1. La loi de Beer-Lambert .....</b>	<b>31</b>
<b>1.3.1.2. Les transitions électroniques .....</b>	<b>31</b>
<b>1.3.1.3. Les règles de sélection .....</b>	<b>32</b>
<b>1.3.2. Désexcitation de l'état excité/Retour à l'état fondamental .....</b>	<b>33</b>
<b>1.3.2.1. La désexcitation photophysique .....</b>	<b>33</b>
<b>1.3.2.2. Désexcitation photochimiques .....</b>	<b>35</b>
<b>1.3.3. Le cas des complexes bis-cyclométallés d'iridium (III).....</b>	<b>39</b>
<b>1.3.3.1. Structure .....</b>	<b>39</b>
<b>1.3.3.2. Versatilité des propriétés physicochimiques .....</b>	<b>40</b>
<b>1.3.3.3. Applications des complexes d'iridium (III).....</b>	<b>40</b>
<b>1.3.4. Les complexes d'iridium dans les études de transferts de charges dans l'ADN .....</b>	<b>42</b>
<b>1.4. Le transfert de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe.....</b>	<b>44</b>

<b>Chapitre 2 : Objectifs</b> .....	<b>47</b>
2.1. Stratégie .....	48
2.2. Objectifs de la thèse de doctorat .....	50
<b>Chapitre 3 : Synthèse et études de complexes d'iridium (III) comme injecteur de charges.</b>	<b>54</b>
3.1. Introduction .....	55
3.2. Objectifs .....	56
3.3. Résultats.....	56
3.3.1. Synthèse des complexes d'iridium (III) .....	56
3.3.2. Etudes des complexes d'iridium (III) .....	58
3.3.2.1. Propriétés de luminescence et d'absorption .....	58
3.3.2.2. Etudes électrochimiques .....	59
3.3.2.3. Etudes de photo-réactivité .....	60
3.3.3. Formation d'un motif triazole et comparaison des propriétés .....	63
3.3.3.1. Synthèse des « complexes triazolyles » .....	63
3.3.3.2. Comparaison des spectres d'absorption et d'émission .....	64
3.3.3.3. Détermination de l'origine de l'extinction de luminescence observée .....	66
3.4. Conclusion .....	70
3.5. Section expérimentale.....	71
3.5.1. Materials and methods .....	71
3.5.2. Synthetic protocols .....	71
3.5.3. Absorption and luminescence studies .....	76
3.5.4. Electrochemical studies .....	76
3.5.5. Luminescence titration .....	77
3.6. Supporting information .....	77
3.6.1. <sup>1</sup> H of PPIP ligand .....	77
3.6.2. <sup>1</sup> H and 2D NMR of Ir(III) complexes .....	78
3.6.3. HRMS spectra .....	84
3.6.4. Cyclic voltammograms for Ir(III) complexes .....	92
<b>Chapitre 4 : Synthèse des ADN duplexes et ADN G-quadruplexes</b> .....	<b>94</b>
4.1. Synthèse des systèmes ADN duplexe .....	95
4.1.1. Objectifs .....	95
4.1.2. Résultats.....	96
4.1.2.1. Généralité sur la synthèse des oligonucléotides .....	96
4.1.2.2. Synthèse de la sonde 5-cyclopropyl-2'-désoxyuridine 1 .....	98
4.1.2.3. Synthèse de la sonde 5-cyclopropylamine-2'-désoxyuridine 2 .....	99
4.1.2.4. Préparation du brin complémentaire portant l'injecteur de charge .....	106

<b>4.2.</b>	<b>Synthèse des systèmes G-quadruplexe .....</b>	<b>110</b>
4.2.1.	Objectifs .....	110
4.2.2.	Résultats.....	112
4.2.2.1.	Généralité sur la synthèse peptidique .....	112
4.2.2.2.	Synthèse des châssis peptidiques 9 et 10 .....	113
4.2.2.3.	Synthèse des oligonucléotides.....	117
4.2.2.4.	Assemblage des conjugués oligonucléotides-châssis peptidique .....	120
<b>4.3.</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>126</b>
4.3.1.	Partie ADN duplexe .....	126
4.3.2.	Partie ADN G-quadruplexe .....	127
<b>4.4.</b>	<b>Section expérimentale.....</b>	<b>127</b>
4.4.1.	Materials and methods .....	127
4.4.2.	Partie expérimentale de la partie ADN duplexe.....	128
4.4.2.1.	Synthetic protocols .....	128
4.4.3.	Partie expérimentale de la partie ADN G-quadruplexe .....	133
4.4.3.1.	General synthetic methods for peptides synthesis .....	133
4.4.3.2.	Experimental procedures .....	134
4.4.3.3.	General synthetic methods for oligonucleotides synthesis .....	137
4.4.3.4.	Experimental procedures .....	138
4.4.3.5.	Experimental procedures for the preparation of conjugates.....	139
<b>Chapitre 5 : Etudes des transferts de charges .....</b>		<b>143</b>
<b>5.1.</b>	<b>Transferts de charges au sein de l'ADN duplexe .....</b>	<b>144</b>
5.1.1.	Description des différents systèmes d'ADN duplexes .....	144
5.1.2.	Etudes de transferts de charges .....	146
<b>5.2.</b>	<b>Etudes des transferts de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe .....</b>	<b>147</b>
5.2.1.	Description des différents systèmes G-quadruplexes .....	148
5.2.2.	Détermination du temps de rétention des 2'-désoxynucléosides .....	151
5.2.3.	Etudes de transferts de charges positives.....	153
<b>5.3.</b>	<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>154</b>
5.3.1.	Conclusion sur la partie ADN duplexe .....	154
5.3.2.	Conclusion sur la partie G-quadruplexe .....	155
5.3.3.	Perspectives .....	156
<b>5.4.</b>	<b>Section expérimentale.....</b>	<b>156</b>
5.4.1.	DNA duplex irradiation experiment .....	156
5.4.2.	Circular dichroism experiment.....	157
5.4.3.	DNA G-quadruplex irradiation experiment.....	157

<b>Chapitre 6 : Conclusions et perspectives .....</b>	<b>158</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>164</b>

## Abréviations

2,2'-C <sup>AN</sup>	1-méthyl-[2,2'-bipyridin]-1-ium
A	Adénine
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
<i>Bcl-2</i>	B-cell lymphoma 2
BET	Back electron transfer
Biot	Biotine
Boc	<i>Tertio</i> -butyloxycarbonyle
bpy	2,2'-bipyridine
C	Cytosine
CD	Circular Dichroism
Co	Cobalt
COSY	Correlated spectroscopy
CPG	Controlled Pore Glass
CT	Charge transfer
Cu	Cuivre
CuAAC	Copper Catalyzed Alkyne-Azide Cycoaddition
$\delta$	Déplacement chimique
dA	2'-désoxyadénosine
dA <sup>CPA</sup>	6-cyclopropylamine-2'- désoxyadénosine
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
dC	2'-désoxycytidine
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
dC <sup>CPA</sup>	4-cyclopropylamine-2'- désoxycytidine
DCM	Dichlorométhane
Dde	1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohex-1- ylidene)éthyl
dG	2'-désoxyguanosine
dG <sup>CPA</sup>	2-cyclopropylamine-2'- désoxyguanosine
dGMP	2'-désoxyguanosine monophosphate
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DMTr	Diméthoxytrityle
dT	2'-désoxythymidine
dU	2'-désoxyuridine
dU <sup>Br</sup>	5-bromo-2'-désoxyuridine
dU <sup>CP</sup>	5-cyclopropyl-2'-désoxyuridine
dU <sup>CPA</sup>	5-cyclopropylamine-2'-désoxyuridine

$\epsilon$	Coefficient d'absorption molaire
eV	Electron volt
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Eei	1-éthoxyéthylidène
EPIP	2-(4-éthynylphényl)-1H-imidazo[4,5f][1,10]phénanthroline
ESI-MS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
ET	Electron transfer
Fmoc	9-fluorénylméthoxyxycarbonyl
FRET	Förster resonance energy transfer
G	Guanine
G4	G-quadruplexe
HBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique
HOMO	Highest occupied molecular orbital
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRMS	High resolution mass spectrometry
IC	Internal conversion
ISC	Intersystem crossing
ISAHC	Imidazole-1-sulfonyl acide hydrochloride
kr	Constant de désexcitation radiative
knr	Constant de désexcitation non radiative
kq	Constante de « quenching »
$\lambda$	Longueur d'onde
L	Ligand
LC	Ligand centered
LMCT	Ligand-to-metal charge transfer
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
M	Métal
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight
MC	Metal centered
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
MLCT	Metal-to-ligand charge transfer
MO	Molecular orbital
MS	Mass Spectrometry
NH <sub>4</sub> OAc	Acétate d'ammonium
NHE	Normal hydrogen electrode

NHS	N-hydroxysuccinimide
nm	Nanomètre
nmol	Nanomole
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
ns	Nanoseconde
ODN	Oligodésoxynucléotide
OLED	Organic Light-Emitting Diode
PET	Photoinduced electron transfer
phen	1,10-phénanthroline
$\phi$	Rendement quantique de luminescence
PPIP	2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phényl)-1H- imidazo[4,5-f][1,10]phénanthroline
ppy	2-phénylpyridine
ppyCF <sub>3</sub>	2-(3,5- bis(trifluorométhyl)phényl)pyridine
ps	Picoseconde
PyBOP	benzotriazol-1-yl- oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RP-HPLC	Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography
Rt	Temps de rétention
SCE	Saturated calomel electrode
SEC	Size Exclusion Chromatography
SPOS	Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis
SPPS	Solid-Phase Peptide Synthesis
$\tau$	Durée de vie de luminescence
T	Thymine
TASQ	Template Assembled Synthetic G- quadruplex
TBP	TATA-box binding protein
tBu	tert-butyl
TDS	Thermal Difference Spectrum
TE	Energy transfer
TEA	Triéthylamine
TEAA	Acétate de triéthylammonium
TFA	Acide Trifluoroacétique
TFE	Trifluoroéthanol
THF	Tétrahydrofurane
THPTA	Tris- (hydroxypropyltriazolylmethyl)amine

TIS	Triisopropylsilane
Tm	Température de dénaturation
UPLC-MS	Ultra Performance Liquid-Mass Spectrometry
UV	Ultraviolet
V	Volt
VR	Vibrational relaxation

# **Chapitre 1 : Introduction**

## 1.1. Introduction sur l'ADN

### 1.1.1. L'ADN double brin

Depuis plusieurs décennies, les acides nucléiques fascinent la communauté scientifique du monde entier. En effet, cette macromolécule joue le rôle de stockage du patrimoine génétique d'un individu et est à l'origine du développement, du fonctionnement et de la reproduction des êtres vivants.

Un nombre incalculable de recherches ont été menées afin d'exploiter cette macromolécule que la nature utilise pour stocker l'information génétique. Les scientifiques essaient de reproduire ce que la nature fait en essayant d'utiliser l'ADN pour stocker des données informatiques.<sup>1</sup> Plus récemment, le gouvernement américain a investi massivement dans le stockage de données dans l'ADN. Nous pouvons ainsi remarquer à quel point l'ADN est non seulement impliqué dans les processus biologiques mais aussi économiques et sociétaux.

#### 1.1.1.1. La découverte des acides nucléiques

La première découverte de l'ADN fut attribuée à F. Miescher en 1869, dans les laboratoires de l'Université de Tübingen dans le Sud-Ouest de l'Allemagne.<sup>2</sup> Ce jeune chercheur de vingt-trois ans rejoignit le laboratoire du biochimiste F. Hoppe-Seyler et commença à travailler sur la physiologie des cellules lymphatiques humaines. Ces cellules difficiles à extraire des ganglions lymphatiques, se trouvent en grande quantité dans le pus des infections, qu'il récolte sur des bandages de l'hôpital voisin. C'est en travaillant avec ce pus que Miescher isole différents types de protéines présentes dans la cellule et découvre une substance inconnue qu'il nomme « nucléine ». Ces travaux ont été publiés deux ans plus tard, après une optimisation de son protocole d'extraction, notamment en remplaçant le pus par du sperme de saumon.

En 1882, W. Flemming, biologiste allemand met en évidence les chromosomes ainsi que leur implication dans le processus de division cellulaire.<sup>3</sup> Quelques années plus tard, en 1889, un pathologiste et histologiste allemand, R. Altmann découvre une substance acide, extraite à partir de la nucléine pure issue du sperme de saumon. Il nomme cette substance « acide nucléique ». Dix ans plus tard, T. Boveri et W. Sutton proposent que l'information génétique soit portée par les chromosomes. En 1944, O. T. Avery démontre que l'ADN est une unité du support de l'information génétique capable d'induire une transformation au niveau du phénotype bactérien.<sup>4</sup> Cette découverte a suscité un engouement pour la recherche de la structure ainsi que le rôle biologique des acides nucléiques.

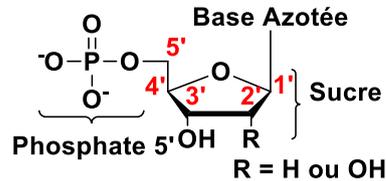
Deux jeunes chercheurs, G. F. Crick et J. Watson, publient dans Nature en 1953 un article décrivant la structure en double hélice de l'ADN.<sup>5</sup> Ces résultats, qui ont révolutionné le monde de la génétique ainsi que de la biologie moléculaire, sont basés sur les travaux de R. Franklin illustrant la structure de l'ADN par diffraction des rayons X<sup>6,7</sup> ainsi que les travaux de P. Levene qui a identifié que l'ADN était formé de briques élémentaires composés de quatre bases : adénine (A), cytosine (C), thymine (T) et guanine (G).<sup>8</sup> En se basant sur les résultats de E. Chargaff, G. F. Crick et J. Watson ont proposé d'apparier les bases de manière complémentaire deux à deux. L'adénine se lie à la thymine tandis que la cytosine se lie à la guanine pour former la double hélice. Le prix Nobel en médecine de 1962 leur a été décerné ainsi qu'à M. Wilkins. R. Franklin, décédée avant l'attribution du prix Nobel,

ne figure pas parmi les lauréats alors que sa contribution à cette découverte était plus que non négligeable.

### 1.1.1.2. La structure de l'ADN

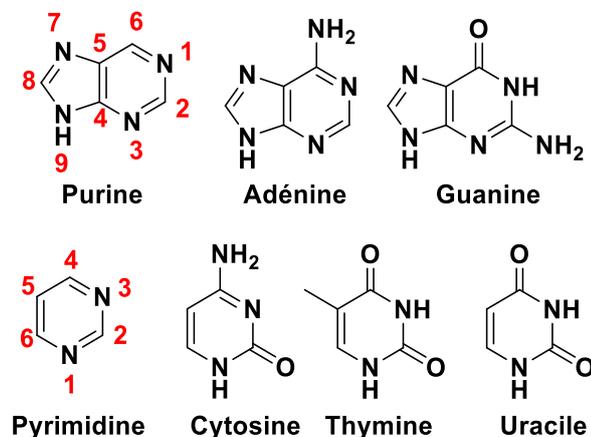
#### a. Les acides nucléiques

Les acides nucléiques résultent d'un enchainement de nucléotides, reliés entre eux par des liaisons phosphodiester. Ces nucléotides sont constitués de trois éléments : un dérivé saccharidique, un squelette phosphate et une base azotée (**Figure 1.1**).



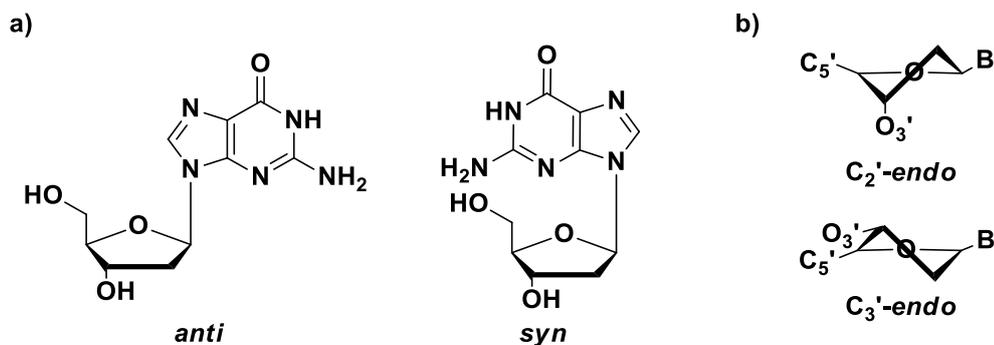
**Figure 1.1 :** Structure d'un nucléotide.

Le dérivé saccharidique est un sucre à cinq carbones dérivé du pentose. Dans le cas de l'ADN (acide désoxyribonucléique), il s'agit du 2-désoxy-D-ribose, tandis que dans l'ARN (acide ribonucléique, produit de la transcription de l'ADN), il s'agit du D-ribose. Le phosphate présent sur le carbone en position 5' du sucre permet de lier deux nucléotides entre eux grâce à une liaison phosphodiester sur le carbone de la position 3' du nucléotide suivant. Ainsi, les acides nucléiques présentent une architecture commune dont la seule différence se situe au niveau de la base azotée. Ces dernières sont classées en deux familles selon le type de cycle azoté dont les bases sont dérivées : les pyrimidines et les purines (**Figure 1.2**). La première famille regroupe la cytosine, la thymine et l'uracile (qui remplace pour l'ARN la thymine présente dans l'ADN) alors que la deuxième famille est composée de l'adénine et de la guanine. Chaque base est reliée à la partie saccharidique par une liaison N-glycosidique sur le carbone C1' du ribose et présente une anomérie de type  $\beta$ . Les pyrimidines sont liées par l'azote en position N1 ; quant aux purines, elles sont liées par l'azote en position N9.



**Figure 1.2 :** Structures des différentes bases azotées.

Comme les bases azotées peuvent adopter une conformation *anti* et *syn* par rapport au sucre (**Figure 1.3 a**) et que les sucres peuvent être de conformation  $\text{C}_2'$ -endo ou  $\text{C}_3'$ -endo (**Figure 1.3 b**), il en résulte une multitude d'arrangements secondaires pour les acides nucléiques.

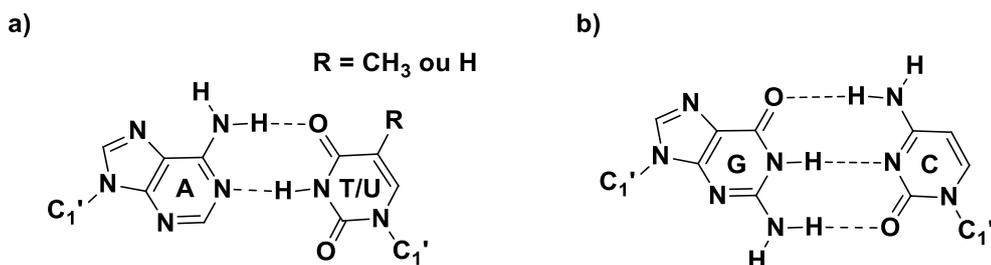


**Figure 1.3 :** a) Structure de la 2'-désoxyguanosine en conformation *anti* et *syn*, b) structure d'un sucre en conformation  $C_2'$ -*endo* ou  $C_3'$ -*endo*.

### b. Structures secondaires des acides nucléiques

Les acides nucléiques peuvent adopter différentes variétés de structures secondaires selon leur séquence ou les conditions environnantes. Ces structures secondaires résultent essentiellement de l'interaction des bases nucléiques entre elles par des liaisons hydrogènes, mais également par des phénomènes d'empilement appelés «  $\pi$ -stacking ».

La structure la plus connue de l'ADN est la double hélice dont la structure a été élucidée par J. Watson et F. Crick<sup>5</sup> en se basant sur les travaux de cristallographie des rayons X de R. Franklin.<sup>6</sup> Cette structure est formée par l'appariement de deux acides nucléiques complémentaires issu de la formation de liaison hydrogène entre les couples A:T (ou U) et G:C (**Figure 1.4**). La structure en double hélice de l'ADN s'accompagne de la présence de sillons. Ces derniers résultent de la position dissymétrique des deux brins par rapport à l'axe de la double hélice, formant ainsi deux sillons de tailles inégales mais de même profondeur, un grand sillon et un petit sillon (**Figure 1.5**).

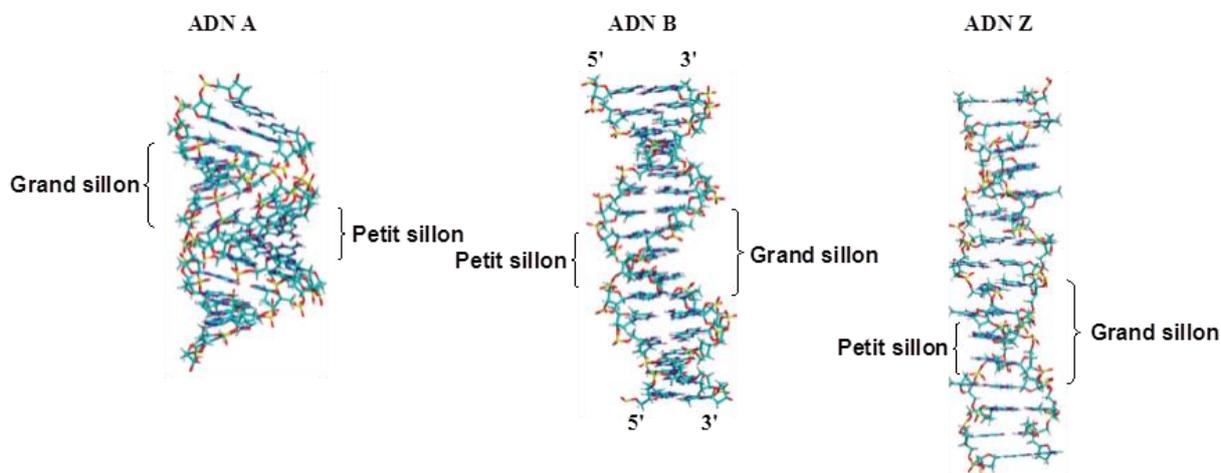


**Figure 1.4 :** Liaison de type Watson-Crick des bases azotées des couples A:T (ou U) et G:C.

L'ADN double brin peut adopter trois types d'hélice différents selon le degré d'hydratation, la séquence, le taux d'enroulement mais également la nature et la concentration des ions métalliques. Ces trois conformations diffèrent notamment par la taille et la profondeur des sillons.

La conformation la plus répandue est l'ADN-B (**Figure 1.5**), cristallisée pour la première fois en 1980.<sup>9</sup> Un tour d'hélice nécessite dix paires de bases. Dans cette conformation, les bases sont orientées en *anti* par rapport au sucre ( $C_2'$ -*endo*). L'ADN-A<sup>10</sup> (**Figure 1.5**) est moins répandu et apparait dans les échantillons d'ADN déshydraté et à haute force ionique. Cette forme est caractérisée par la conformation du sucre en  $C_3'$  *endo*, les bases sont toujours orientées en *anti*. Le tour d'hélice de l'ADN A est formé de onze paires de bases et le grand sillon est plus profond tandis que le petit ne l'est quasiment plus (**Figure 1.5**). La troisième forme commune d'ADN double brin est l'ADN-Z<sup>11</sup> (**Figure 1.5**). Cette forme, plus contrainte, a la particularité de former une hélice gauche et

est retrouvée dans des séquences riches en purines (bases G-C), sous de fortes conditions salines. Douze paires de bases forment le tour d'hélice, cette dernière est formée à partir des pyrimidines en conformation *anti* et les sucres qui les portent sont sous la conformation  $C_2'$ -*endo*. A l'inverse, les purines sont orientées en position *syn* et leurs sucres présentent la conformation  $C_3'$ -*endo*.



**Figure 1.5 :** Représentation des différentes conformations A, B et Z de l'ADN. Figure issue et modifiée de *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45 (7), 1980–1998.<sup>12</sup>

### 1.1.1.3. Le rôle biologique de l'ADN

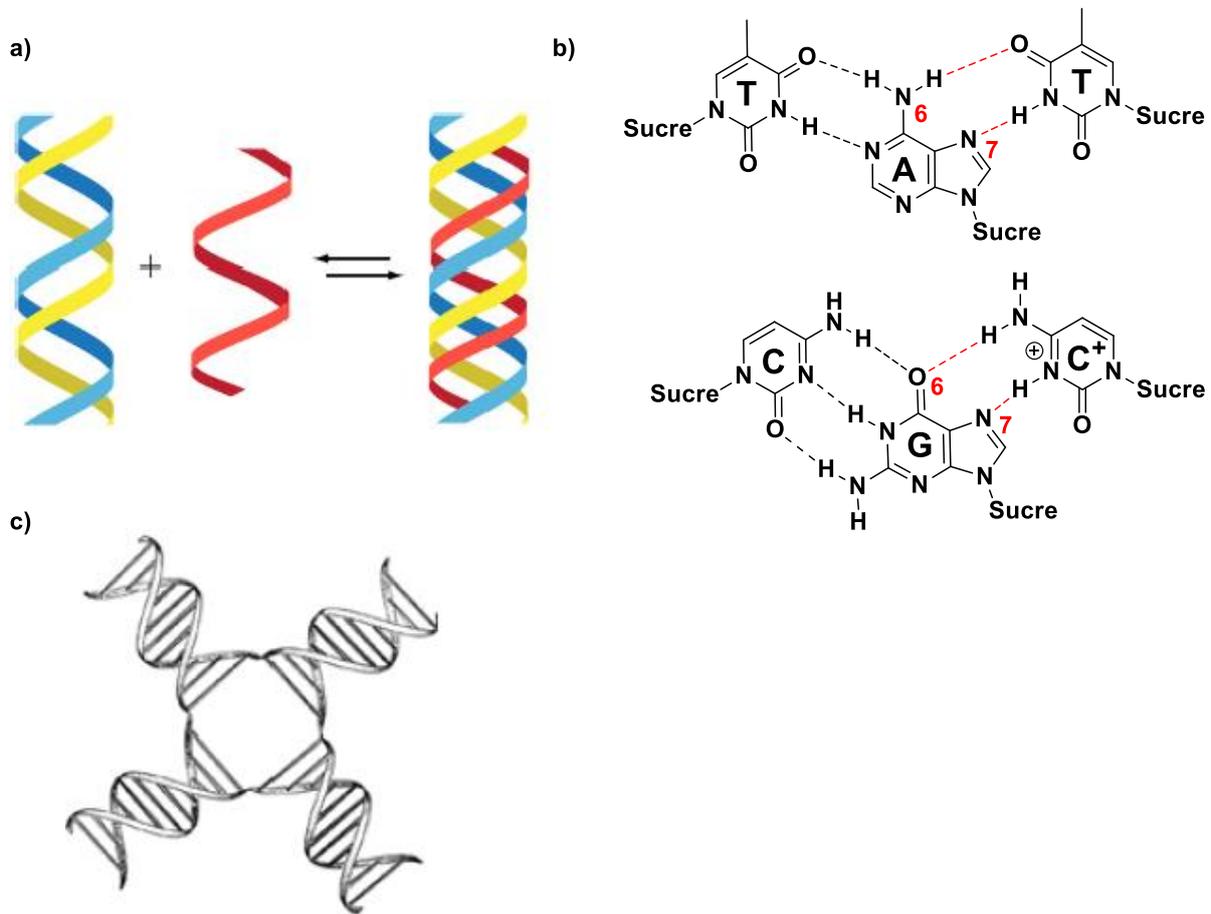
Depuis la découverte de la propriété de l'ADN d'induire une transformation au niveau du phénotype d'une bactérie par Avery<sup>4</sup>, l'ADN est reconnu comme support de l'information génétique.<sup>13</sup> L'ensemble de l'ADN d'une cellule constitue son génome. Le génome humain représente environ trois milliards de paires de bases réparties dans quarante-six chromosomes.<sup>14</sup> L'information génétique est portée par des segments d'ADN formant les gènes, l'ensemble de cette information est nommé génotype. L'expression des gènes permet de convertir un génotype en phénotype, c'est-à-dire un ensemble de caractéristiques propres à un individu. Ceci est rendu possible par des mécanismes biologiques tels que la réplication, la transcription et la traduction.

Il est à noter que la molécule d'ADN possède une directionnalité. En effet, cette dernière peut être caractérisée par l'extrémité 3' ou l'extrémité 5' (**Figure 1.5**). Pour une séquence d'ADN, l'extrémité 3' (ou 3'-OH) correspond à l'extrémité de la séquence terminée par le groupement hydroxyle OH porté par le carbone 3' du ribose (**Figure 1.1**). Tandis que pour le cas de l'extrémité 5', c'est le groupement phosphate porté par le carbone en position 5' du sucre qui est désigné (**Figure 1.1**). Cette directionnalité joue un rôle important lors de la réplication de l'ADN car l'élongation progresse toujours du sens 5' vers 3'. C'est le phosphate en position 5' du nucléotide qui est inséré sur la position 3' de la séquence complémentaire en croissance.<sup>15</sup>

### 1.1.2. L'ADN quadruples brins

En dehors de la structure classique en double hélice que peut adopter l'ADN, ce dernier est aussi capable de s'assembler sous d'autres formes. Nous pouvons citer l'exemple des structures triple hélices (**Figure 1.6 a**), formées à partir de liaisons de type Hoogsteen avec une troisième base (**Figure 1.6 b**). Ces liaisons impliquent la face des purines n'intervenant pas dans les liaisons hydrogènes de type Watson-Crick : l'amine en position 6 et l'azote en position 7 de la 2'-désoxyadénosine ; le carbonyle en position 6 et l'azote en position 7 de la 2'-désoxyguanosine

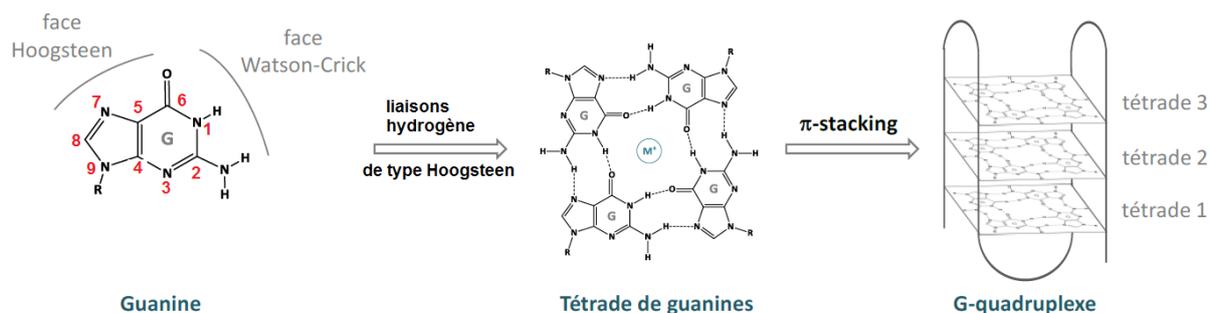
(Figure 1.6 b).<sup>16</sup> Les jonctions Holliday, formées lors de recombinaisons homologues entre deux ou plusieurs brins, constituent une autre forme de structure tertiaire de l'ADN (Figure 1.6 c). Nous allons nous intéresser de plus près à une autre structure d'ordre supérieur, l'ADN G-quadruplexe.



**Figure 1.6 :** Représentation de structures a) triple hélice<sup>17</sup>, b) des liaisons de type Hoogsteen entre les bases T:A:T et C:G:C<sup>+</sup>, avec C<sup>+</sup> la 2'-désoxycytidine protonée sur son C3 et c) d'une jonction Holliday.<sup>18</sup> Figures issues et modifiées de *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1117–1130<sup>17</sup> et de *Nucleic Acids. Rev Biophys* **2000**, *33* (2), 109–159.<sup>18</sup>

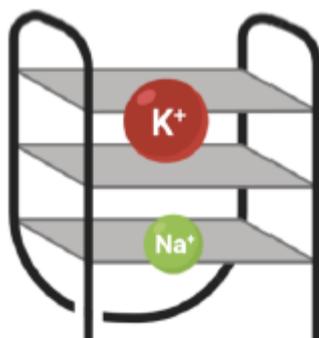
### 1.1.2.1. Structures du G-Quadruplexe

En 1962, M. Gellert a observé que des solutions concentrées en acide guanilyque à pH 5 pouvaient être extrêmement visqueuses, allant même jusqu'à former des gels à basse température. L'étude par rayons X de ces gels a révélé une structure hélicoïdale formée par un empilement de tétrades de guanines. La tétrade de guanines est obtenue par quatre guanines reliées entre elles par huit liaisons de type Hoogsteen.<sup>19</sup> Les liaisons hydrogène de type Hoogsteen, caractéristiques des G-quadruplexes, sont formées entre le carbonyle en position 6 et l'azote en position 7 (face Hoogsteen) d'une guanine avec l'hydrogène de l'amine en position 1 et l'hydrogène de l'amine en position 2 (face Watson-Crick) respectivement d'une autre guanine. Ces structures sont appelées tétrades de guanines ou « G-quartet ». La formation d'un motif G-quadruplexe repose sur l'empilement par  $\pi$ -stacking de plusieurs tétrades de guanines (Figure 1.7).



**Figure 1.7** : Représentation d'une tétrade de guanines et d'un motif G-quadruplexe.

Une quinzaine d'années plus tard, en étudiant la formation d'édifices hélicoïdaux de solutions concentrées de guanosine-5'-monophosphate, l'équipe de Pinnavia démontre par RMN du proton que la présence de cations métalliques tels que le sodium ou le potassium stabilise ces édifices.<sup>20</sup> Par la suite, C. Bailey publie une étude sur la stabilité d'une structure G-quadruplexe formé par la séquence d(CGCG<sub>3</sub>GCG) (*ca.* 7.5  $\mu$ M) dans le tampon Tris HCl (10 mM à pH 7) contenant soit du LiCl, du NaCl, du KCl, du RbCl, du CsCl, du MgCl<sub>2</sub> ou du CaCl<sub>2</sub> (40 mM). Leurs études permettent d'établir une liste de cations métalliques stabilisant les G-quadruplexes, classés par ordre de stabilisation décroissante :  $K^+ > Na^+ > Li^+$ ,  $K^+ > Rb^+ > Cs^+$  et  $Ca^{2+} > Mg^{2+}$  pour les cations divalents.<sup>21</sup> Le potassium présente le plus fort pouvoir stabilisant. En effet, le rayon atomique de ce dernier (220 pm) est trop volumineux pour s'insérer au cœur d'une tétrade, il se place donc entre deux tétrades et interagit avec chacune d'entre elles, stabilisant ainsi le G-quadruplexe. Le sodium stabilise quant-à-lui la structure G-quadruplexe en se positionnant au centre de la tétrade (**Figure 1.8**).

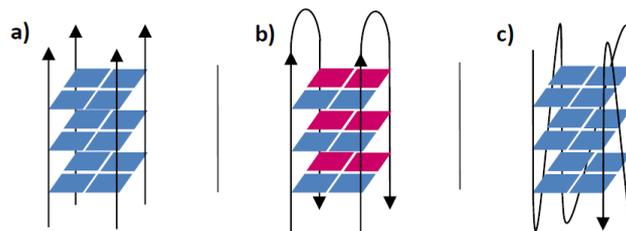


**Figure 1.8** : Représentation schématique de la position des cations potassium et sodium au sein d'une structure G-quadruplexe.

Les cations métalliques, en plus de stabiliser les structures G-quadruplexe, influencent aussi leurs conformations (que l'on nomme topologies dans le domaine des G-quadruplexes, voir paragraphe suivant). En effet, pour une même séquence, des topologies différentes peuvent être adoptées en fonction du cation métallique présent.

### 1.1.2.2. Polymorphisme des G-quadruplexes

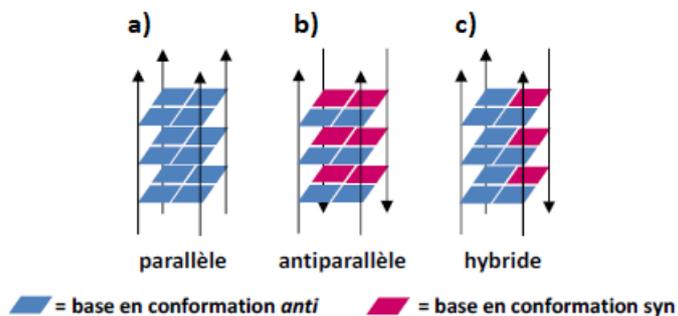
Il a été montré que des séquences d'acides nucléiques de type X<sub>n</sub>-G<sub>p</sub>-X<sub>n</sub>-G<sub>p</sub> ... où X représente les différentes bases azotées, de nombre n variable et G les guanines où le nombre p varie entre 2 et 4, sont capables de former un G-quadruplexe. Ce dernier peut être obtenu à partir de quatre brins (**Figure 1.9 a**), deux brins (**Figure 1.9 b**) ou un seul brin d'acide nucléique (**Figure 1.9 c**), formant respectivement un G-quadruplexe tétramoléculaire, bimoléculaire ou intramoléculaire.



**Figure 1.9** : Exemples d'un G-quadruplexe a) tétramoléculaire, b) bimoléculaire et c) intramoléculaire.

### a. Orientation des brins d'un G-quadruplexe

Indépendamment du nombre de brins qui forment un G-quadruplexe, ce dernier peut adopter une grande variété de topologies selon la séquence d'acides nucléiques, la nature du cation métallique présent dans le milieu. La topologie d'un G-quadruplexe est fonction de l'orientation des brins dans la structure. Lorsque ces derniers sont tous orientés dans le même sens, la topologie adoptée est dite parallèle (**Figure 1.10 a**). La topologie antiparallèle est adoptée lorsque deux brins sont orientés dans un sens et les deux autres brins sont orientés dans le sens opposé (**Figure 1.10 b**). Une troisième topologie dite hybride peut être adoptée par le G-quadruplexe lorsque trois brins sont orientés dans un sens et le quatrième dans le sens opposé aux trois autres (**Figure 1.10 c**).



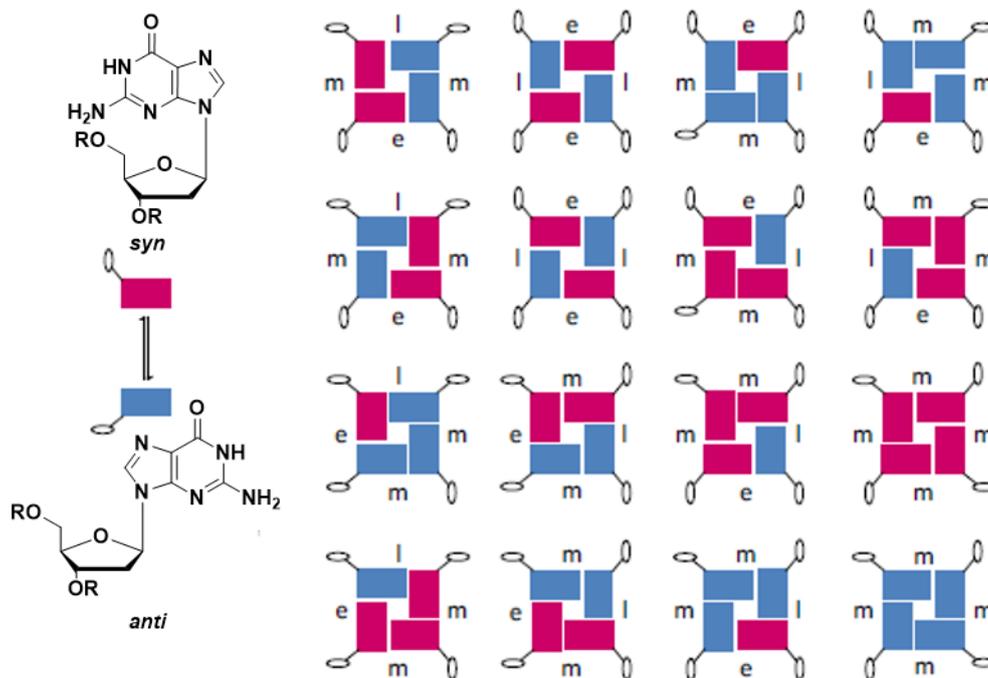
**Figure 1.10** : Exemples de G-quadruplexes tétramoléculaires a) parallèle, b) antiparallèle, c) hybride.

### b. Orientation des bases

Comme mentionné plus haut, une base azotée peut adopter deux conformations selon son angle de torsion glycosidique, la conformation *syn* ou *anti*. L'orientation de la base nucléique au sein d'un motif G-quadruplexe n'est pas anodin, en effet, cette dernière permet de positionner les guanines de façon à favoriser leur appariement par liaisons hydrogènes. De ce fait, deux brins adjacents parallèles présentent leurs bases selon des angles de torsion glycosidique identiques (*syn/syn* ou *anti/anti*) tandis que les angles de torsion de bases formant deux brins adjacents antiparallèles sont opposés (*anti/syn*). Dans les **Figures 1.9** et **1.10**, les bases en *anti* sont représentées par des cases bleues tandis que les bases en *syn* sont en rose.

### c. Les différents sillons d'un G-quadruplexe

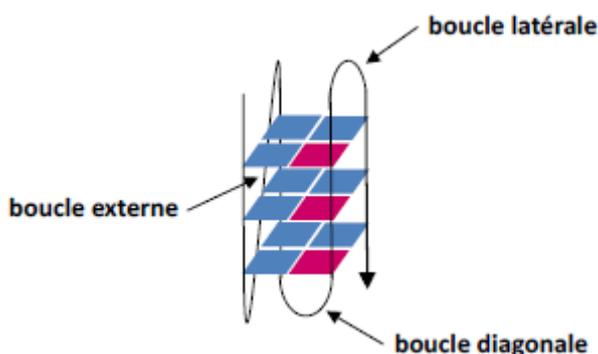
L'orientation des guanines au sein d'un motif G-quadruplexe influence la taille et la position des sillons du G-quadruplexe. Trois types de sillons sont répertoriés : étroit, moyen et large. Il en résulte seize combinaisons d'arrangements théoriques (**Figure 1.11**).<sup>22</sup>



**Figure 1.11** : Illustration des seize tétrades de guanines possibles en fonction de l'orientation des bases *anti* et *syn* avec la représentation de leurs sillons suivant les tailles étroit (e), moyen (m) et large (l).

#### d. Les différentes boucles

Excepté les G-quadruplexes tétramoléculaires, la formation de l'édifice nécessite le repliement de brins entraînant la formation de trois types de boucles possibles. Lorsqu'une boucle relie deux brins adjacents parallèles, elle est qualifiée de boucle externe. Si elle relie deux brins antiparallèles adjacents, elle est qualifiée de boucle latérale. Dans le cas où la boucle relie deux brins antiparallèles opposés sur la structure, elle est qualifiée de boucle diagonale (**Figure 1.12**).



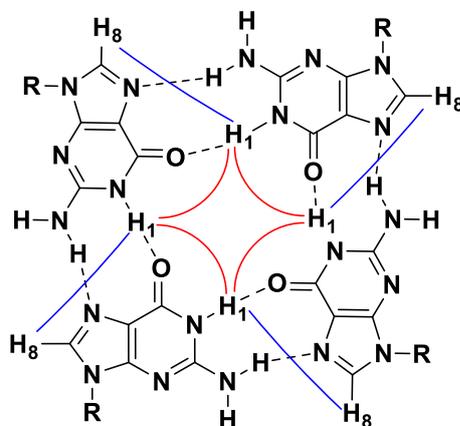
**Figure 1.12** : Représentation des différentes boucles pouvant se former au sein d'une structure G-quadruplexe.

#### e. Détermination de la topologie des G-quadruplexes

Différentes techniques sont utilisées pour déterminer la topologie exacte du G-quadruplexe dans un milieu donné. La RMN fut l'une des premières méthodes utilisées afin de révéler la topologie d'un G-quadruplexe. La cristallographie a ensuite permis d'approfondir les études réalisées par RMN. Par la suite, des méthodes empiriques ont été mises au point afin de sonder la structure d'un G-quadruplexe de manière économe en quantité de matière et facile à mettre en place : le dichroïsme circulaire (CD-TDS) ou l'absorption UV-TDS (TDS : *Thermal Difference Spectra*).

- Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN  $^1\text{H}$ )

Les noyaux permettant d'identifier la conformation du G-quadruplexe sont les protons *iminos* situés en position 1 dont le déplacement chimique se situe entre 10 et 12 ppm et les protons situés en position 8 de la guanine. Une expérience RMN 2D de NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) permet de révéler les protons engagés dans des liaisons Hoogsteen nécessaires à la formation du G-quadruplexe (**Figure 1.13**), permettant ainsi l'identification des conformations *syn/anti* des guanines les unes par rapport aux autres.



**Figure 1.13** : Corrélation possible des protons *aminos* et *iminos* dans une tétrade. Figure issue et modifiée de *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1172–1183.<sup>23</sup>

L'équipe de E. Henderson et E. Blackburn fut la pionnière sur les études de tétrades de guanines par RMN du proton et du phosphore. Ils ont mis en évidence que les guanines de la séquence télomérique de *Tetrahymena*, d(T<sub>2</sub>G<sub>4</sub>)<sub>4</sub>, adoptent une conformation *syn* lorsqu'elles interagissent entre elles par liaisons Hoogsteen dans une solution contenant du Na<sup>+</sup>.<sup>24</sup> Suite à cela, D. Patel identifie par RMN du proton et du phosphore, la structure télomérique humaine d[AG(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] dans une solution contenant du Na<sup>+</sup> comme antiparallèle.<sup>25</sup> En 2003, A. T. Phan démontre que la séquence télomérique humaine d[AGGG(TTAGGG)] en présence de K<sup>+</sup>, peut adopter deux conformations : parallèle ou antiparallèle. Ces deux formes coexistent et s'interconvertissent en solution.<sup>26</sup> L'équipe de D. Yang identifie pour la première fois un G-quadruplexe dans la région du promoteur humain *bcl-2*. Ce dernier s'autoassemble pour former un mélange parallèle/antiparallèle dans une solution contenant du K<sup>+</sup>.<sup>27</sup>

- Cristallographie et Spectrométrie de masse

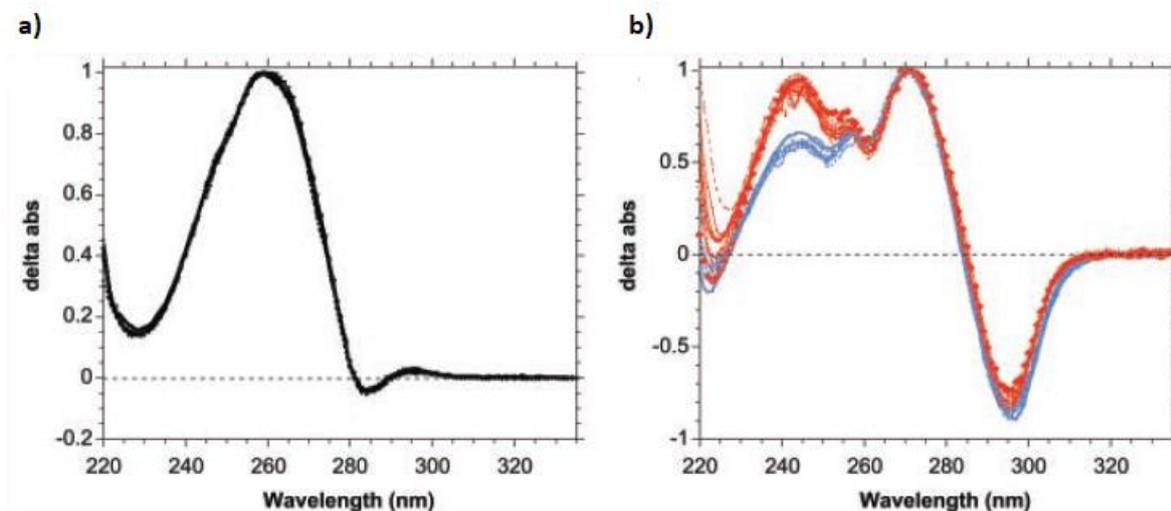
La cristallographie est une technique employée afin de sonder la topologie d'un G-quadruplexe. Dans leurs études cristallographiques, l'équipe de G. Parkinson révèle un résultat inattendu. En faisant cristalliser la séquence d[AG(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] en présence de K<sup>+</sup>, une topologie parallèle est observée,<sup>28</sup> contrairement à la topologie antiparallèle observée par D. Patel en présence de Na<sup>+</sup> par RMN.<sup>25</sup> A. T. Phan<sup>26</sup> et D. Yang<sup>29</sup> ont prouvé que les deux résultats obtenus précédemment ne sont pas en contradiction. En effet, en présence de K<sup>+</sup>, la séquence d[AG(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] adopte une topologie mixte parallèle/antiparallèle.

Par ailleurs, la spectroscopie de masse est aussi capable de discriminer les différentes topologies d'un G-quadruplexe. L'équipe de M. T. Bowers a tout d'abord démonté la faisabilité de ce procédé en analysant par masse des tétrades de 2'-désoxyguanosines (dG)<sup>30</sup> avant d'étudier la séquence télomérique humaine d(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>n</sub>, avec n allant de 1 à 6. Dans leur étude, ils parviennent

même à observer pour  $d(T_2AG_3)_2$  un mélange des topologies antiparallèle/parallèle avec un ratio 9/1.<sup>31,32</sup>

- Thermal Difference Spectra (TDS)

La technique de « *Thermal Difference Spectra* » (TDS), développée par l'équipe de J. L. Mergny, est une méthode de spectroscopie UV permettant de déterminer la structure adoptée par un acide nucléique.<sup>33</sup> Le principe de cette technique consiste à enregistrer les spectres d'absorption entre 200 et 350 nm d'un acide nucléique dans ses états repliés et dénaturés à différentes températures. L'enregistrement se fait de manière générale à des températures largement supérieures et inférieures à la température de dénaturation ( $T_m$ ). La température de dénaturation correspond à la température à laquelle la structure ADN duplexe ou G-quadruplexe se dénature à moitié, c'est-à-dire lorsque la moitié des liaisons hydrogène se rompent, déstructurant ainsi l'édifice avec 50% de l'ADN sous forme de simple brin. La soustraction du spectre de l'état replié (basse température) avec le spectre de l'état dénaturé (haute température) permet d'obtenir le spectre TDS. Cette dernière présente une signature unique pour chaque type de séquence d'acides nucléiques, reflétant les interactions d'empilement des différentes bases. La **Figure 1.14** illustre l'exemple d'un spectre TDS d'ADN duplexe (**Figure 1.14 a**) et le spectre TDS d'un G-quadruplexe, caractérisé par deux maxima aux alentours de 245 et 275 nm et d'un minimum vers 295 nm (**Figure 1.14 b**).

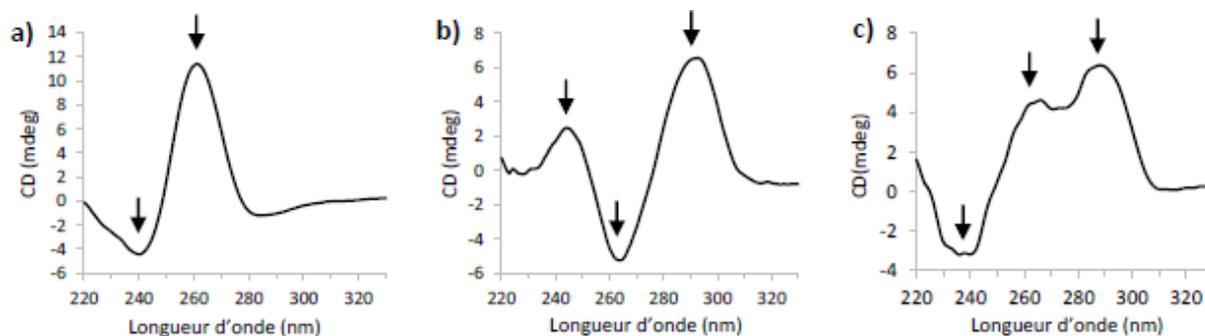


**Figure 1.14** : Exemples d'un spectre TDS a) d'ADN duplex et b) d'un G-quadruplexe. Figure issue et modifiée de *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33 (16), e138–e138.<sup>33</sup>

- Dichroïsme Circulaire (CD)

La topologie d'un édifice G-quadruplexe peut être déterminée par dichroïsme circulaire. Cette technique est basée sur la propriété d'une molécule ou d'un matériau à absorber différemment la lumière selon sa polarisation (circulaire droite ou circulaire gauche). Le dichroïsme circulaire est couramment utilisée pour des analyses de structures, des changements de conformation et pour la détermination de la température de dénaturation ( $T_m$ ) d'acides nucléiques.<sup>34</sup> Cette technique permet d'identifier la topologie d'un motif G-quadruplexe grâce aux signaux caractéristiques de chaque topologie. La **Figure 1.15** présente les signaux caractéristiques des topologies parallèles, antiparallèles et hybrides. La topologie parallèle est caractérisée par un maximum à 260 nm et un minimum à 240 nm (**Figure 1.15 a**). Dans le cas de la topologie antiparallèle, deux maxima sont observés à 240 et 290 nm et un minimum à 260 nm (**Figure 1.15 b**).

La topologie hybride est caractérisée par deux maxima à 260 et 290 nm et un minimum à 240 nm (**Figure 1.15 c**). Cette différence de signal provient de la modification de l'interaction  $\pi$ -stacking entre les différentes tétrades d'une topologie donnée, dû à la variation des angles glycosidiques (*syn* ou *anti*).<sup>35,36</sup> Une chose à souligner est que cette technique de dichroïsme circulaire enregistre un signal moyen. En cas de mélange de plusieurs topologies, le signal CD correspondra à un mélange de signaux des topologies présentes.



**Figure 1.15** : Exemples de signaux CD de G-quadruplexes a) parallèles, b) antiparallèles et c) hybrides.

### 1.1.2.3. Rôles biologiques des G-quadruplexes

La présence des G-quadruplexes *in vivo* a tout d'abord été vérifiée, en 2001, dans des organismes unicellulaires appartenant à la famille des eucaryotes, les ciliés<sup>37</sup>. Cela a été rendu possible par l'utilisation d'anticorps fluorescents ciblant les G-quadruplexes télomériques de *Stylonychia lemnae*. Suite à cela, les études génomiques issues de l'algorithme « Quadparser » ont permis d'identifier 376 000 séquences non chevauchantes aptes à former des G-quadruplexes dans le génome humain<sup>38</sup>. Ces séquences ne sont pas distribuées de façon aléatoire dans le génome. En effet, des séquences répétées capables de former des G-quadruplexes ont été identifiées *in vitro* notamment au niveau des télomères,<sup>28</sup> de l'ADN ribosomal,<sup>39</sup> ou dans la séquence des régions « switch » des chaînes lourdes des immunoglobines.<sup>40</sup>

En 2013, l'équipe de S. Balasubramanian a démontré la présence de G-quadruplexes dans les cellules humaines en utilisant des anticorps (BG4) possédant une très forte affinité envers les G4 (*in vitro*), pour visualiser les structures G-quadruplexes dans l'ADN génomique humain. En plus de cela, ils mettent en évidence que la formation des G-quadruplexes est modulée par les processus biologiques tels que la réplication.<sup>41</sup> En effet, lors de la réplication, le duplexe d'ADN se sépare en deux monobrans permettant ainsi la structuration des motifs G-quadruplexe. L'année suivante, l'équipe de D. Li a non seulement identifié la présence d'un G-quadruplexe dans une famille des ribonucléoprotéines hétérogènes (hnRNP) mais aussi son implication dans la transcription des gènes. En faisant interagir un ligand spécifique des G-quadruplexes, la tétra-(N-méthyl-4-pyridyl) porphyrine (TMPyP4) avec le G-quadruplexe formé dans la région du promoteur hnRNP K des cellules fibrosarcomes humaines, une régulation négative de l'expression de hnRNP K est observée. Ils en concluent que la stabilisation du G-quadruplexe dans le promoteur hnRNP K inhibe la transcription et l'expression de ce dernier.<sup>42</sup>

#### a. G-quadruplexes localisés dans les télomères

- Les télomères



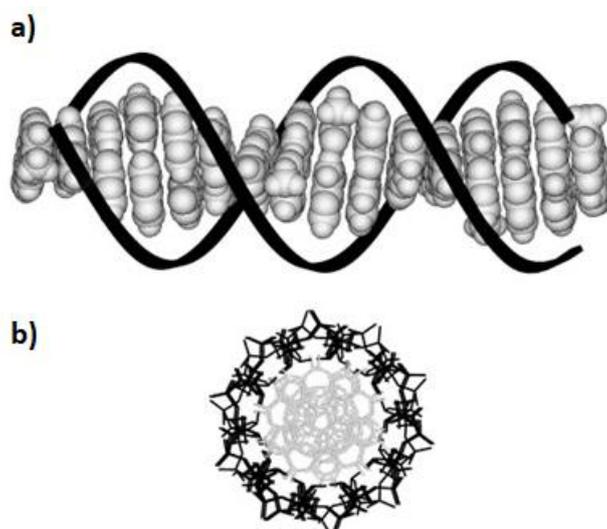
ligands favorisant la formation ou la stabilisation de G-quadruplexes dans les cellules cancéreuses, des études sont entreprises afin de développer des ligands capables d'inhiber l'expression des promoteurs d'oncogène, constituant ainsi une autre voie thérapeutique contre le cancer.<sup>50-52</sup>

## 1.2. Etudes des transferts de charges au sein de l'ADN duplexe

L'ADN est une macromolécule possédant des propriétés fascinantes. Elle est non seulement capable d'influencer le phénotype grâce à son génotype mais participe aussi dans divers processus biologiques. Une nouvelle propriété de l'ADN a été introduite par P. Valenta et H. W. Nürnberg en 1974 : le pouvoir de conduire des charges électriques au sein de l'ADN.<sup>53</sup> Dans leur étude, ils démontrent que les bases adénines et cytosines de l'ADN sont réduites de manière irréversible lorsque l'ADN simple brin ou double brin est adsorbés sur une électrode de mercure (technique de « Hanging Mercury Drop Electrode », HMDE) portée à potentiel très négatif ( $< -1,8$  V/SCE). Ces premières études ont conduit à une nouvelle discipline de recherche concernant l'ADN : l'étude de transfert et de la migration de charges électriques au sein de l'ADN.

### 1.2.1. Transfert de charges au sein de l'ADN duplexe

L'origine de la conductivité de l'ADN a fait l'objet de nombreuses recherches. Il a été ainsi démontré que la source de conductivité de l'ADN n'est pas liée au squelette phosphate mais provient du continuum  $\pi$  formé à partir des noyaux hétéroaromatiques des bases azotées (**Figure 1.17**).<sup>54</sup> Le continuum  $\pi$  est non seulement nécessaire pour assurer le transfert de charges mais influence aussi l'efficacité de ce dernier. En effet, il a été démontré que si le continuum est perturbé, c'est-à-dire en présence de mésappariements des bases, de sites abasiques ou encore de perturbation structurelles dans l'hélicité, l'efficacité du transfert de charges diminue et peut même être inhibé.<sup>55</sup>



**Figure 1.17** : Représentation schématique de la double hélice d'ADN. Le continuum  $\pi$  formé par l'empilement des noyaux aromatiques est représenté en gris tandis que le squelette phosphate est en noir : a) vue perpendiculaire à l'axe de l'hélice, b) vue du bas de l'hélice. Figure issue de *Chem. Phys.* **2002**, 409–428.<sup>56</sup>

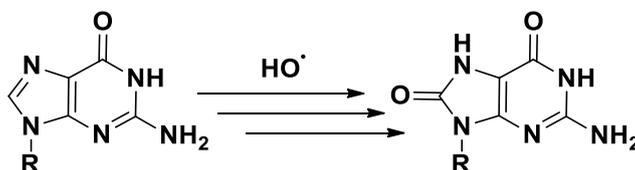
Cette capacité de l'ADN à faire migrer des charges est à l'origine des dommages oxydatifs à longue distance, c'est-à-dire loin du site premier de l'oxydation. L'ADN est constamment sous l'assaut d'agents oxydants endogènes ou exogènes qui causent des dommages oxydatifs, générant

potentiellement des mutations. L'oxydant biologique le plus présent est le fer. Ce dernier peut subir la réaction de Fenton (**Schéma 1.1**) donnant naissance à des radicaux hydroxyles, capables de réagir avec les bases nucléiques.<sup>57</sup>



**Schéma 1.1** : Réaction de Fenton.

Le radical hydroxyle est capable de former des radicaux sur la macromolécule d'ADN soit par abstraction d'hydrogène de la partie sucre de l'ADN,<sup>58</sup> soit par addition du radical hydroxyle sur la base azotée.<sup>59</sup> Le radical engendré peut alors oxyder une base par un transfert mono-électronique formant ainsi une base nucléique sous la forme d'un radical-cation. Cette charge positive formée (cation) peut alors migrer le long de la double hélice jusqu'à un site de faible potentiel d'oxydation. La base la plus facilement oxydable est la 2'-désoxyguanosine, plus particulièrement en position 5'-G au sein d'un site 5'-GG-3'. Le potentiel d'oxydation d'une 2'-désoxyguanosine seule dans le duplex est de 1,29 V (vs. NHE) alors que le potentiel d'oxydation de la 5'-G au sein d'un site 5'-GG-3' diminue d'environ 300 mV.<sup>60</sup> L'oxydation de la 2'-désoxyguanosine conduit à la formation de produits de décomposition irréversible, dont le plus courant est le 8-oxo-7,8-dihydro 2'-désoxyguanosine (**Schéma 1.2**). La 2'-désoxyguanosine est ainsi devenue un témoin privilégié des dommages oxydatifs et par conséquent du phénomène de transfert de charge à longue distance. Ce dernier point sera explicité par la suite.



**Schéma 1.2** : Décomposition de la 2'-désoxyguanosine en 8-oxo-7,8-dihydro 2'-désoxyguanosine.

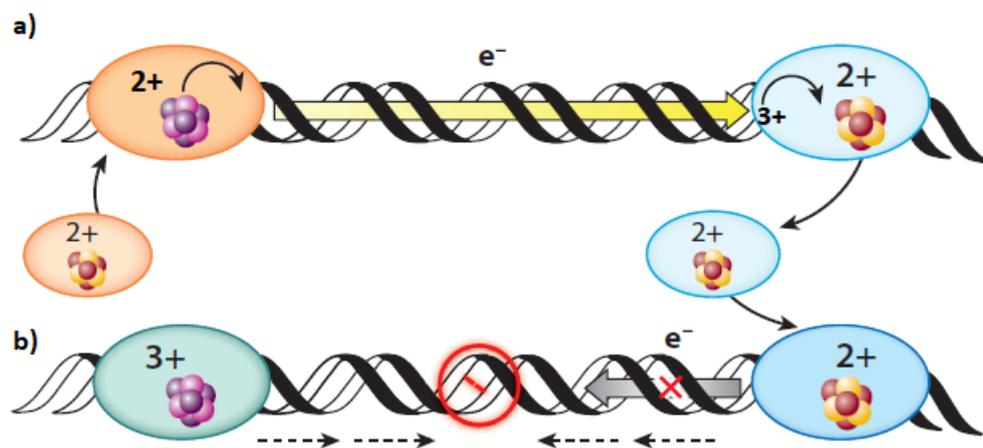
## 1.2.2. Les études dans les cellules et sur électrodes

### 1.2.2.1. Les études en cellules

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN génomique est recouvert de protéines nommées histones, formant le noyau nucléosomique. Ce dernier protège l'ADN des clivages potentiels causés par des petites molécules. L'ADN dans le noyau nucléosomique est ainsi plié et subit même des contraintes stériques, rendant plausible l'hypothèse que le noyau nucléosomique protège l'ADN des dommages oxydatifs à longue distance. L'équipe de J. Barton s'est penchée sur cette problématique et a prouvé que l'ADN subit des dommages oxydatifs à distances même à l'intérieur du noyau nucléosomique.<sup>61</sup>

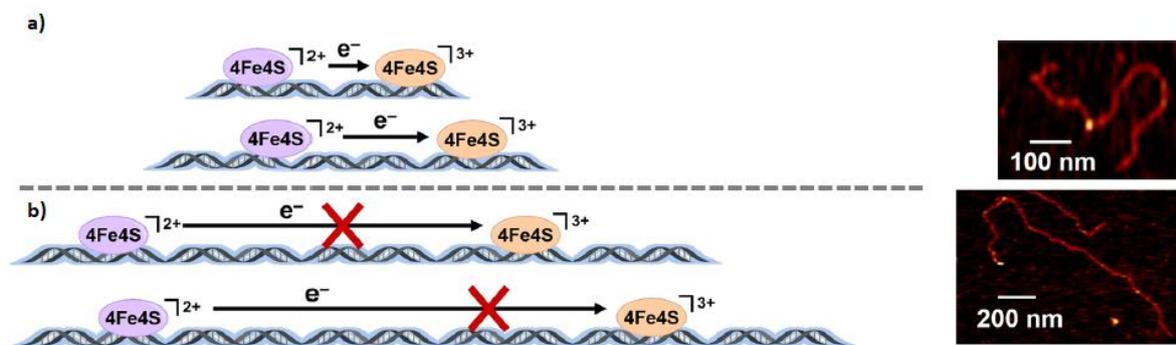
Comme mentionné précédemment, la présence de défauts au sein de la double hélice impacte sa capacité à faire migrer les charges. Couplé au fait que le transfert de charges est aussi possible dans le nucléosome, l'hypothèse que la nature utilise le transfert de charges pour détecter les lésions au sein de l'ADN a vu le jour. De nombreuses protéines de réparation de l'ADN possèdent des sites capables de subir des réactions d'oxydoréduction : les clusters fer-soufre [4Fe4S]. La première protéine de réparation contenant le cluster [4Fe-4S] découverte est l'endonuclease III (Endo III) de *E. coli*.<sup>62</sup> Cette dernière présente différentes affinités avec l'ADN en fonction de son état d'oxydation. L'interaction avec l'ADN de sa forme oxydée [4Fe-4S]<sup>3+</sup> est 550 fois plus forte que sa

forme réduite  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ . Ainsi, un modèle où les protéines possédant des clusters  $[4\text{Fe-4S}]$  jouent le rôle de détecteur de dommages au sein de l'ADN a été proposé.<sup>63</sup> Lorsqu'une protéine de réparation libre à l'état d'oxydation  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  s'associe à l'ADN, celle-ci peut facilement subir une oxydation causée par différentes sources telles que les radicaux hydroxyles ou les guanines oxydées, passant à l'état  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ . Lorsque le cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  d'une protéine s'associe à un brin d'ADN portant déjà une autre protéine dans le cluster est à l'état  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ , une migration de charge entre les clusters  $[4\text{Fe-4S}]$  des deux protéines se produit. Le cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  de la première protéine réduit le cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$  de la deuxième protéine liée à l'ADN. Cette deuxième protéine réduite à l'état  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  peut se dissocier de l'ADN et diffuser vers une autre région de l'ADN avant de s'associer à celui-ci (**Figure 1.18 a**). Ce travail de deux protéines en tandem permet de détecter de façon efficace une lésion ou un mésappariement au sein de la double hélice. En effet, lorsqu'une lésion est présente entre les deux protéines, la migration de la charge entre les deux protéines est interrompue, permettant de localiser la lésion où le transfert de charges est rendu impossible (**Figure 1.18 b**).



**Figure 1.18** : Représentation schématique du processus de détection de lésions au sein de l'ADN par des protéines de réparation. Figure issue et modifiée de *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, *88* (1), 163–190.<sup>63</sup>

En exploitant cette capacité de communication entre deux clusters  $[4\text{Fe-4S}]$ , J. Barton et son équipe ont pu déterminer la distance maximale de transfert de charges au sein de l'ADN duplexe.<sup>64</sup> Pour cela, ils ont fait interagir la protéine Endo III avec des duplexes d'ADN de différentes longueurs et une expérience AFM (*Atomic Force Microscopy*) leur a permis de compter le nombre de protéines fixées sur le duplexe (**Figure 1.19 images à droite**). En effet, deux cas peuvent être observés : le cas où la longueur de l'ADN est inférieure à la distance maximale de propagation de la charge et le cas contraire, où la longueur de l'ADN est supérieure à la distance maximale de transfert de charges. Pour cela, ils ont exploité la différence d'affinité entre le duplexe et la protéine sous les formes  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$  ou  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ . Dans le cas où la longueur du duplexe est dans la limite de propagation des charges (**Figure 1.19 a**), le cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  réduira le cluster  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$  d'une protéine voisine interagissant avec le même duplexe, causant ainsi une perte d'affinité entre la protéine réduite et l'ADN. L'expérience AFM permettra alors de vérifier le nombre de protéines interagissant avec le duplexe. Dans le cas contraire, c'est-à-dire quand la longueur du duplexe est supérieure à la longueur maximale de transfert de charges, les clusters de toutes les protéines resteront sous la forme  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ . Il n'y a donc pas de perte d'affinité et au moins deux protéines interagissant avec le même duplexe seront observées (**Figure 1.19 b**). A travers cette étude, ils en concluent que la distance maximale de transfert de charges au sein de l'ADN duplexe à température ambiante est d'environ 3509 paires de bases, soit  $1,2 \mu\text{m}$ .

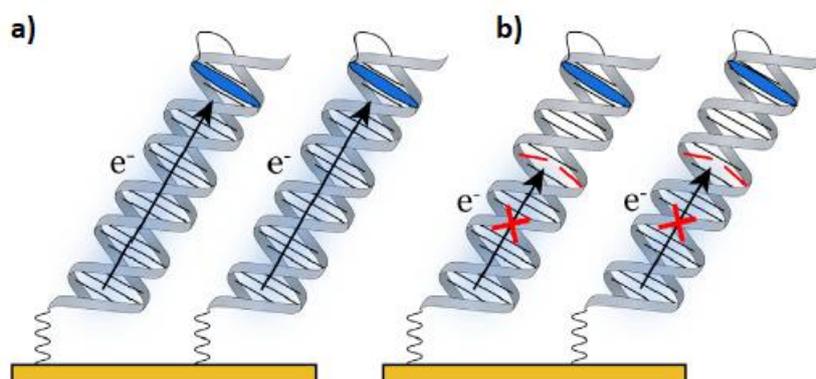


**Figure 1.19** : Détermination de la distance maximale de transfert de charges a) modèle d'un duplexe dans la limite de transfert de charge (gauche) avec une image AFM d'une protéine liée à un duplexe d'ADN, b) modèle d'un duplexe hors de la limite de transfert de charge (gauche) avec une image AFM de plusieurs protéines liées au duplexe. Figure issue et modifiée de *ACS Cent. Sci.* **2019**, 5 (1), 65–72.<sup>64</sup>

### 1.2.2.2. Les études sur électrodes

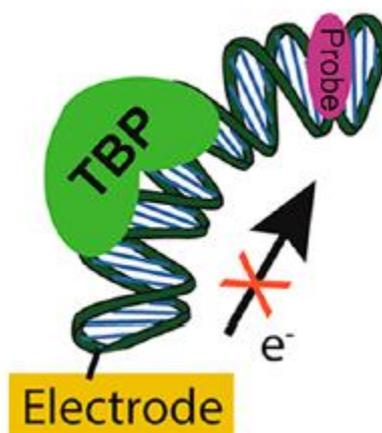
Une des méthodes les plus répandues afin d'étudier le transfert de charges au sein de l'ADN est la voie électrochimique.<sup>65</sup> Cette méthode étudie le transfert de charges à l'état fondamental et nécessite une modification de l'ADN afin de l'accrocher aux électrodes. Un groupement alcane-thiol est nécessaire afin d'ancrer l'ADN sur une électrode d'or alors qu'un groupement pyrène est utilisé pour lier l'ADN à une électrode de graphite. Les potentiels appliqués lors de ces expériences n'endommagent pas les bases de l'ADN et celles-ci se comportent lors du transfert d'électrons au sein du graphite, c'est-à-dire perpendiculaire au continuum  $\pi$ . La détection du transfert de charge se fait par le biais d'une molécule dite sonde. Cette dernière est soit liée de façon covalente à l'ADN, soit s'intercale entre les bases de la macromolécule (**Figure 1.20 a**).

A travers ces études sur électrodes, il en résulte que le degré d'empilement des bases affecte l'efficacité de transfert de charges. L'efficacité de transfert de charges au sein de l'ADN-Z est la plus faible des trois formes. Ceci peut être expliqué par le fait que le continuum  $\pi$  de cette forme est le moins bien structuré. De plus, l'efficacité de transfert de charges est atténuée en présence de mésappariement ou de sites abasiques (**Figure 1.20 b**).<sup>66</sup>



**Figure 1.20** : Représentation schématique d'une molécule d'ADN ancrée sur une électrode avec la molécule sonde représentée en bleue a) ADN sans défaut, b) ADN en présence de mésappariement. Figure issue et modifiée de *Cell Chem. Biol.* **2016**, 23 (1), 183–197.<sup>65</sup>

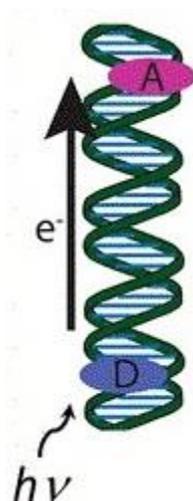
Ces expériences sur surface d'électrode permettent également d'étudier l'incidence de l'interaction ADN-protéine sur l'efficacité du transfert de charges. En effet, l'interaction d'une protéine qui ne perturbe pas le continuum  $\pi$ , telle que la protéine de restriction l'endonucléase *PvuII*, n'influence pas l'efficacité de transfert de charges. Par contre, une protéine telle que la TBP (*TATA-box binding protein*), qui « plie » l'ADN sans perturber l'empilement des bases est capable d'inhiber le transport de charges (**Figure 1.21**).<sup>66</sup>



**Figure 1.21** : Influence de la protéine TBP sur le transfert de charges. Figure issue de *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (7), 1799–1809.<sup>66</sup>

### 1.2.3. Les études en solutions

L'autre méthode couramment utilisée pour l'étude de transfert de charge au sein de l'ADN est l'étude en solution ou aussi appelée études photo-induites. Cette technique, reportée pour la première fois en 1993, met en évidence la capacité des noyaux aromatiques de l'ADN à conduire les charges même en solution.<sup>67</sup> Ces études sont rendues possibles par l'incorporation de deux autres molécules en plus de l'ADN : une molécule photosensible qui joue le rôle de donneur de charge ou injecteur de charge (D) et une molécule sonde (A). Sous irradiation lumineuse, l'injecteur de charge induit la migration de la charge au sein du continuum  $\pi$ , ce déplacement de charge est alors détecté par la sonde (**Figure 1.22**).

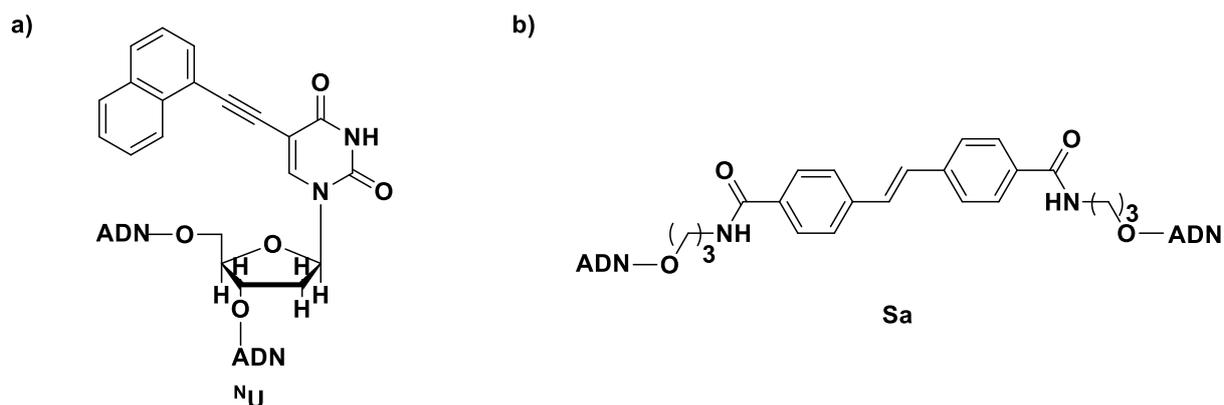


**Figure 1.22** : Schéma d'un transfert de charge photo-induit entre D, le composé donneur de charge et A, le composé accepteur de charge ou sonde. Figure issue de *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (7), 1799–1809.<sup>66</sup>

Les composés dits « injecteur de charge » peuvent être différenciés en deux familles : les molécules organiques et les complexes organométalliques.

### 1.2.3.1. Les injecteurs de charges organiques

Les injecteurs de charges organiques sont de petites molécules liées de façon covalente à l'ADN, soit directement sur la nucléobase (**Figure 1.23 a**), soit par liaison phosphodiester (**Figure 1.23 b**).



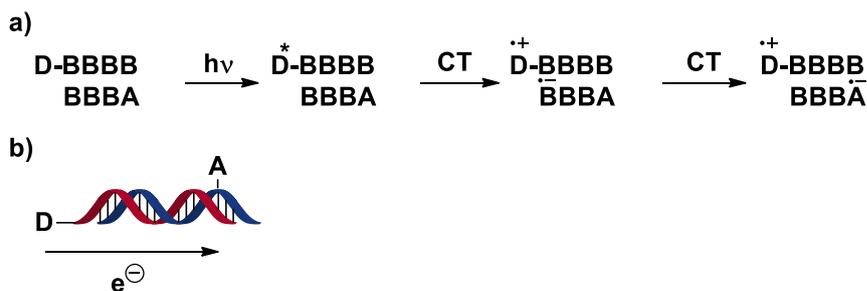
**Figure 1.23** : Exemples d'injecteur de charges organiques : a) <sup>N</sup>U (3-éthynylnaphtalène-2'-désoxyridine), b) Sa (stilbènedicarboxamide).

Chaque molécule possède différentes propriétés photophysique. Ainsi, la 2'-désoxyuridine <sup>N</sup>U modifiée avec un groupement naphtalène est un photo-réducteur ( $E_{ox}^* = -2,48 \text{ V vs SCE}$ )<sup>68</sup> alors que le stilbènedicarboxamide Sa est un photo-oxydant ( $E_{red}^* = 1,68 \text{ V vs SCE}$ ).<sup>55</sup> De ce fait, sous irradiation, différentes molécules peuvent induire deux types de transfert de charges : le transfert d'électron (transfert d'une charge négative) ou le transfert d'une charge positive.

#### a. Le transfert d'électron

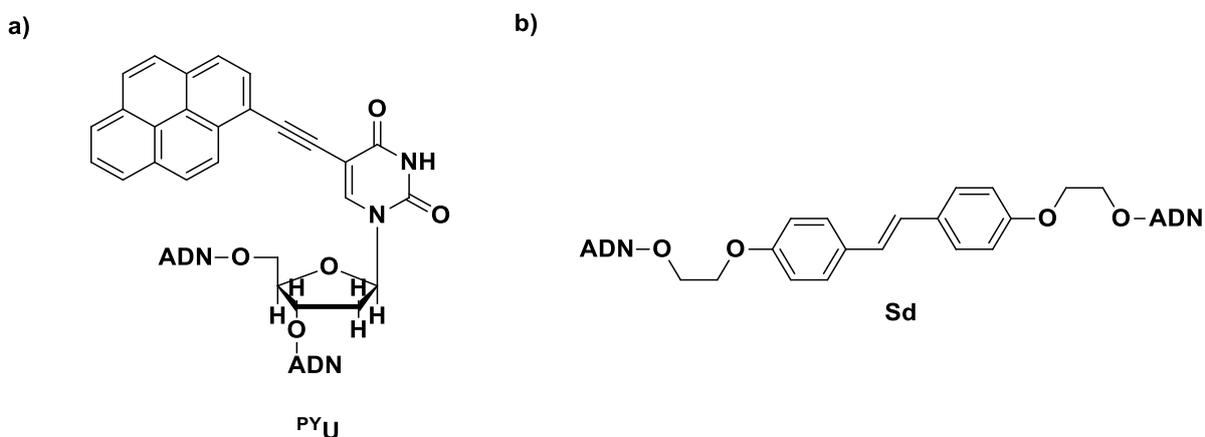
Sous irradiation, la molécule photo-réductrice induit la migration d'une charge négative le long de l'ADN jusqu'à se faire piéger par une sonde. Le donneur de charge (D), en donnant son

électron devient  $D^{*+}$  alors que l'accepteur de charge ou sonde (A) est réduit en  $A^{\bullet-}$  (**Schéma 1.3 a**). Ce processus est illustré schématiquement sur le **Schéma 1.3 b**.



**Schéma 1.3 :** a) schéma d'un transfert d'électron avec D : donneur de charge, B : les bases azotées et A : accepteur de charge et b) représentation schématique d'un transfert d'électron.

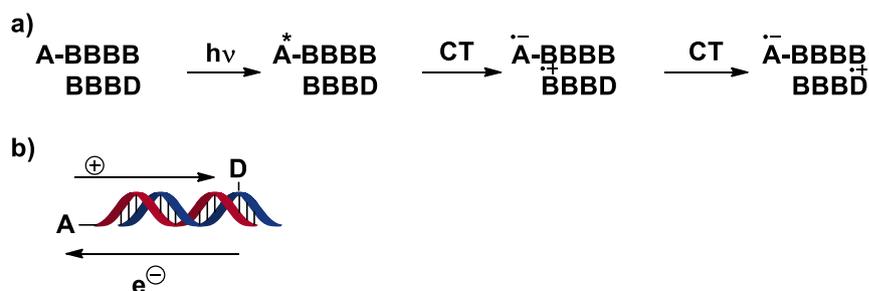
La 2'-désoxyuridine  $^N\text{U}$  modifiée par un groupement éthynylnaphtalène (**Figure 1.23 a**)<sup>68</sup> ou un groupement éthynyl-pyrenyl en position 5 (**Figure 1.24 a**)<sup>69</sup> et le groupement stilbènediéther relié à l'ADN par les groupements phosphates (**Figure 1.24 b**)<sup>70</sup> sont connus pour jouer le rôle d'injecteur d'électron au sein de l'ADN.



**Figure 1.24 :** Exemples d'injecteurs d'électron : a) 3-éthynylpyrenyl-2'-désoxyuridine, b) stilbènediéther.

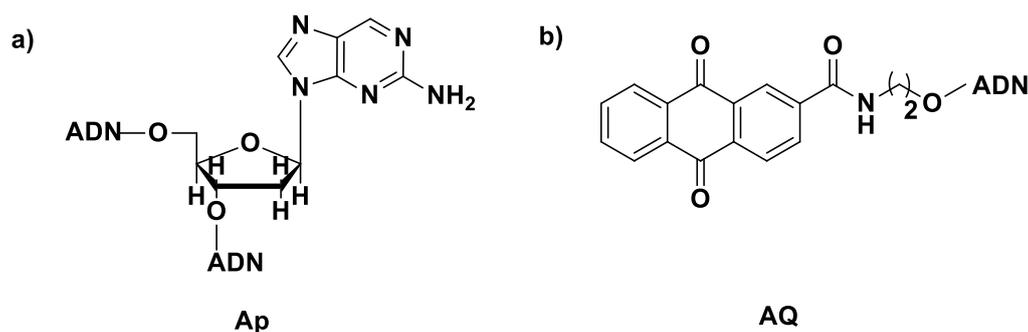
### b. Le transfert de charge positive

A l'opposé du transfert d'électron, le donneur de charge (D) est la sonde tandis que l'accepteur de charge (A) est la molécule photo-oxydante. En effet, l'accepteur de charge à l'état excité  $A^*$ , photo-oxyde la base azotée adjacente conduisant à la formation d'une charge positive sur celle-ci ( $B^{*+}$ ). Cette charge positive se déplace alors le long de l'ADN, oxydant les bases suivantes jusqu'à ce faire piéger par la molécule donneur de charge (D) ou sonde (**Schéma 1.4 a**). Ce processus de transfert de charges positives est représenté schématiquement sur le **Schéma 1.4 b** où le sens de déplacement de la charge positive est à l'opposé du sens de déplacement de l'électron. De manière usuelle, le transfert de charge positive est souvent représenté par le déplacement d'un électron du donneur de charge vers l'accepteur de charge soulignant implicitement le déplacement de la charge positive vers l'autre sens.



**Schéma 1.4** : a) schéma d'un transfert de charge positive avec A : accepteur de charge, B : les bases azotées et D : donneur de charge et b) représentation schématique du transfert de charge positive.

Différents types d'injecteurs de charges positives ont été décrits, par exemples la 2'-désoxy-2-aminopurine (**Figure 1.25 a**)<sup>71</sup> ou l'antraquinone (**Figure 1.25 b**).<sup>72</sup>

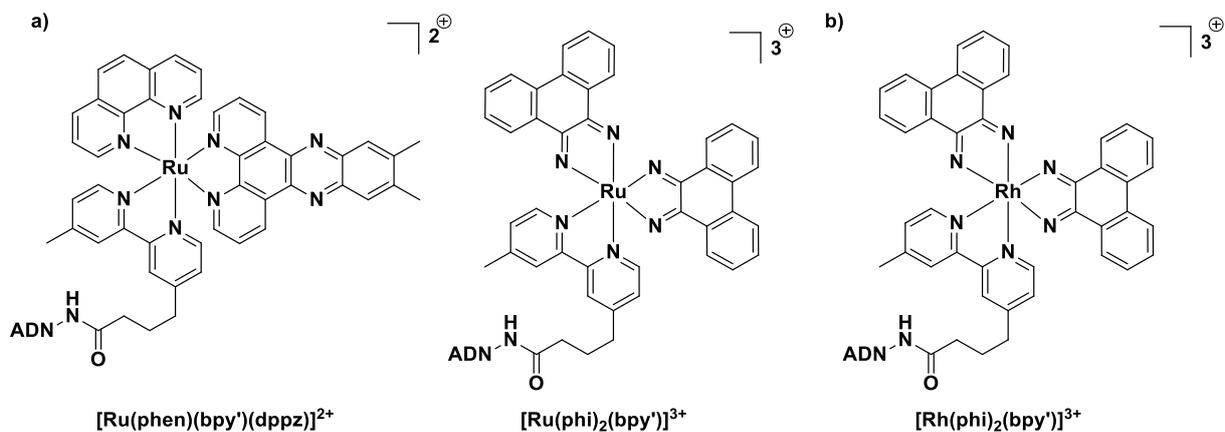


**Figure 1.25** : Exemples d'injecteurs de charge positive (accepteurs / photo-oxydant) : a) 2'-désoxy-2-aminopurine et b) anthraquinone.

### 1.2.3.2. Les injecteurs de charges inorganiques

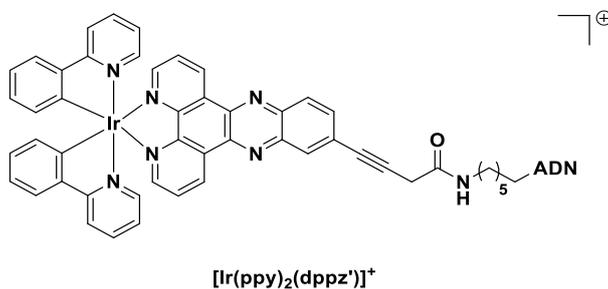
L'autre catégorie d'injecteur de charges regroupe les complexes organométalliques. De manière similaire aux injecteurs de charges organiques, différents complexes sont employés pour étudier soit le transfert de charge positive soit le transfert d'électron.

Les complexes organométalliques les plus connus pour étudier le transfert de charge positive sont les complexes de ruthénium(II) (**Figure 1.26 a**)<sup>73,74</sup> et de rhodium(III) (**Figure 1.26 b**).<sup>60,61</sup> Une particularité du complexe  $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy}') ]^{3+}$  est son pouvoir oxydant élevé,<sup>73</sup> pouvant conduire à l'oxydation de bases pyrimidiques.<sup>75,76</sup>



**Figure 1.26** : Quelques exemples de complexes utilisés dans les études de transferts de charges a) complexes de ruthénium(II) b) complexe de rhodium(III).

Les complexes d'iridium(III) (**Figure 1.27**) font partie d'une catégorie spécifique de complexes organométalliques quand il s'agit de l'étude du transport de charge dans une double hélice d'ADN. En effet, un même complexe peut générer soit un transfert d'électron ou un transfert de charge positive en fonction des conditions expérimentales et de la nature des bases nucléiques impliquées dans le processus.<sup>77,78</sup>



**Figure 1.27** : Structure d'un complexe d'iridium (III) capable d'induire un transfert d'électron ou un transfert de charge positive au sein d'un oligonucléotide.

L'utilisation des complexes organométalliques d'iridium (III) en tant qu'injecteur de charges sera détaillée par la suite.

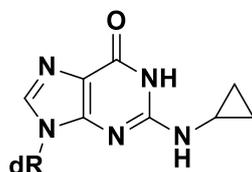
### 1.2.3.3. Les sondes utilisées

Dans le but d'étudier l'efficacité de transfert de charges au sein de l'ADN, une multitude de sondes ont été mises au point. Les plus évidentes sont les bases nucléiques constituant l'ADN, puis viennent les bases nucléiques modifiées. Les molécules organiques et des complexes organométalliques peuvent également être utilisés.

#### a. Les bases azotées de l'ADN

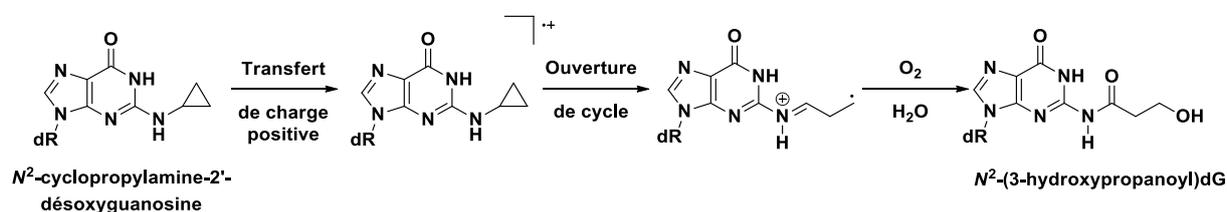
Comme mentionné en amont, la base la plus facilement oxydable est la 2'-désoxyguanosine. L'oxydation de la 2'-désoxyguanosine conduit à la formation de la 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (**Schéma 1.2**). Ainsi, les 2'-désoxyguanosines présentes au sein de la séquence d'ADN sont des sondes en elles-mêmes. C'est pour cela qu'elle fut l'une des premières sondes utilisées pour étudier le transfert de charge au sein de l'ADN.<sup>79,80</sup>

Cependant, cette sonde naturelle présente un désavantage. En effet, il existe une compétition entre la migration de la charge et le piégeage de la charge par la sonde en réaction avec l'oxygène et/ou l'eau du milieu. L'efficacité de transfert de charges est également déterminée par la compétition entre la vitesse de migration et la vitesse de piégeage de la charge. Cette limitation cinétique a conduit au développement d'une sonde possédant une vitesse de piégeage de la charge nettement supérieure à la vitesse de migration. Cette nouvelle sonde est une 2'-désoxyguanosine modifiée en position 2 par un groupement cyclopropylamine (dG<sup>CPA</sup>) (**Figure 1.28**).<sup>81</sup>



**Figure 1.28** : Structure de la nouvelle sonde développée : la 2-cyclopropylamine-2'-désoxyguanosine (dG<sup>CPA</sup>).

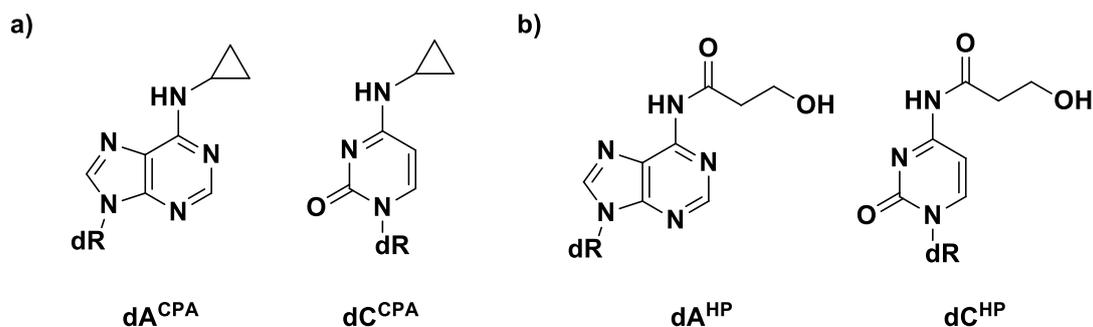
En présence d'un transfert de charge positive, la 2-cyclopropylamine-2'-désoxyguanosine est oxydée, menant à l'ouverture irréversible du cyclopropane, formant un radical carboné iminium. Ce dernier réagit avec l'oxygène et/ou l'eau pour former *in fine*, le composé *N*<sup>2</sup>-(3-hydroxypropanoyl) dG (**Schéma 1.5**).<sup>80</sup>



**Schéma 1.5** : Mécanisme de piégeage de la charge positive par la 2-cyclopropylamine-2'-désoxyguanosine.

Schéma issu et modifié de *J. Amer. Chem. Soc.* **2001**, *123* (39), 9681–9682.<sup>81</sup>

De façon similaire, de nouvelles sondes dites « *fast trap* » ont été développées en ajoutant le groupement cyclopropylamine sur les bases nucléiques 2'-désoxyadénosine et 2'-désoxycytidine, conduisant aux sondes 6-cyclopropylamine-2'-désoxyadénosine dA<sup>CPA</sup><sup>82</sup> et 4-cyclopropylamine-2'-désoxycytidine dC<sup>CPA</sup><sup>75</sup> (**Figure 1.29 a**).



**Figure 1.29** : Structures a) des sondes dA<sup>CPA</sup>, dC<sup>CPA</sup> et b) des produits de décompositions dA<sup>HP</sup>,<sup>82</sup> dC<sup>HP</sup>.<sup>75</sup> Figures issues et modifiées de *J. Amer. Chem. Soc.* **2003**, *125* (34), 10154–10155<sup>82</sup> et *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101* (52), 17914–17919.<sup>75</sup>

Le piégeage de charge positives par les sondes  $dA^{CPA}$  et  $dC^{CPA}$  conduit à la formation irréversible des produits  $N^6$ -(3-hydroxypropanoyl) dA ( $dA^{HP}$ )<sup>82</sup> et  $N^4$ -(3-hydroxypropanoyl) dC ( $dC^{HP}$ )<sup>75</sup> respectivement (Figure 1.29 b).

En ce qui concerne les pièges à électron, le plus connu est la 5-bromo-2'-désoxyuridine ( $dU^{Br}$ ). En présence d'un électron excédentaire issu du processus de réductions, la 5-bromo-2'-désoxyuridine libère l'ion bromure et se décompose irréversiblement en 2'-désoxyuridine en passant par la 2'-désoxyuridine-5-yl (Schéma 1.6).<sup>83</sup>

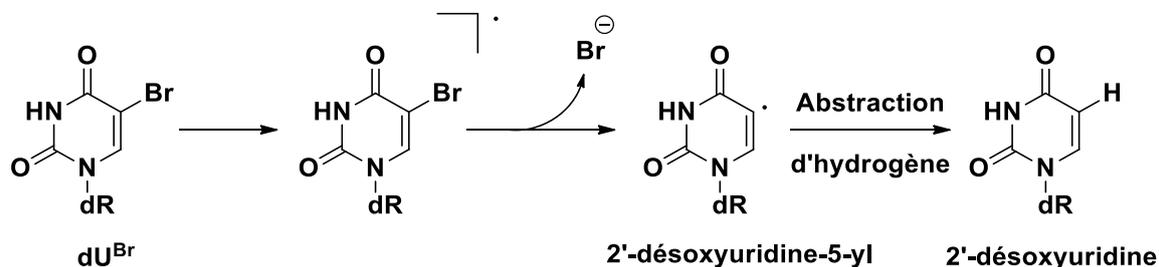


Schéma 1.6 : Mécanisme de piégeage de l'électron par le  $dU^{Br}$ . Schéma issu et modifié de *J. Amer. Chem. Soc.* **1996**, *118* (42), 10025–10030.<sup>83</sup>

L'utilisation de la 8-bromo-2'-désoxyadénosine ( $8dA^{Br}$ ) ainsi que de la 8-bromo-2'-désoxyguanosine ( $8dG^{Br}$ ) a aussi été étudiée (Figure 1.30). L'étude réalisée démontre que la  $dU^{Br}$  reste le meilleur piège à électron par rapport à  $8dA^{Br}$  et  $8dG^{Br}$ , c'est pour cela que la  $dU^{Br}$  reste le piège à électron par excellence.<sup>84</sup>

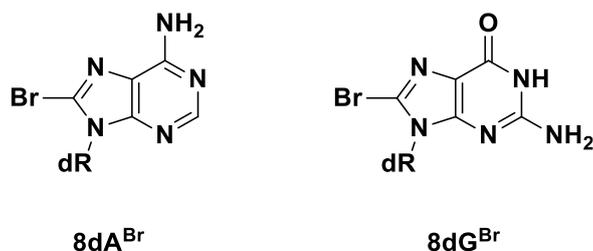
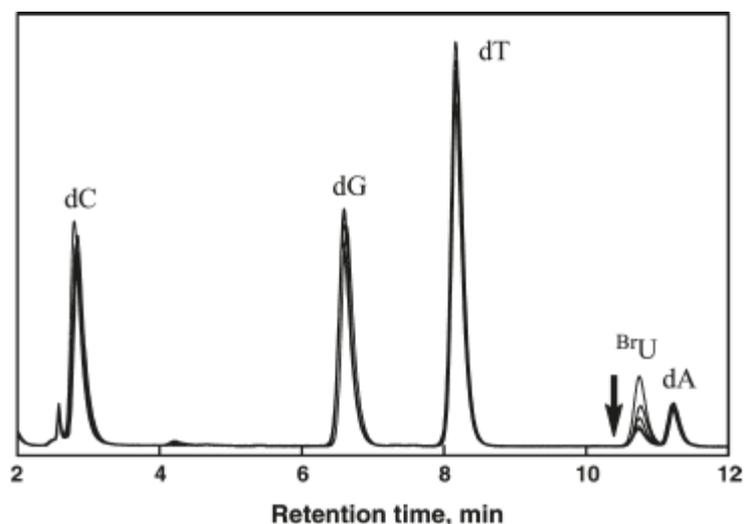


Figure 1.30 : Structures des autres pièges à électron.

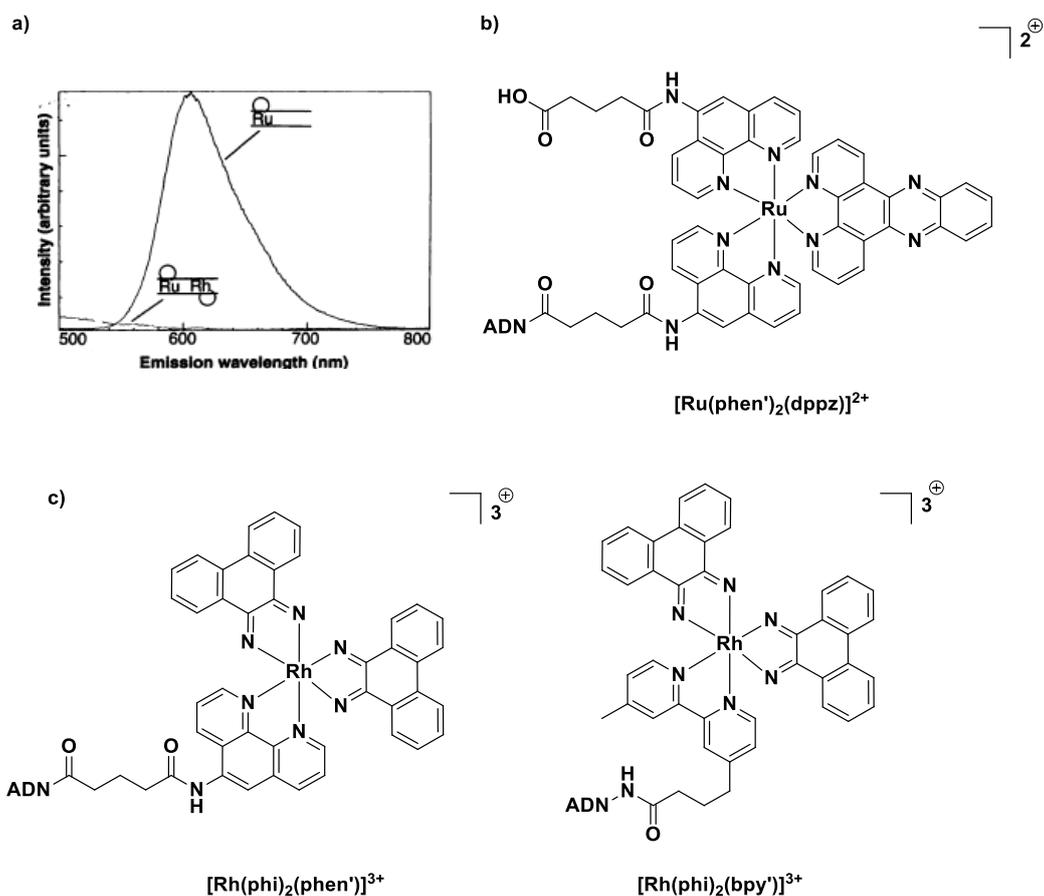
Le principe de l'étude de transfert de charges en utilisant ces sondes 2'-désoxynucléosides repose sur une analyse HPLC en phase inverse permettant d'observer la diminution (*i.e.* décomposition) du pic de la sonde correspondante en fonction du temps d'irradiation. Un exemple de suivi de décomposition de la sonde  $dU^{Br}$  par RP-HPLC est illustré dans la Figure 1.31.



**Figure 1.31** : Chromatogramme RP-HPLC illustrant la diminution du pic de la sonde dU<sup>Br</sup>. Figure issue de *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (8), 2423–2428.<sup>68</sup>

### *b. Les complexes organométalliques*

Contrairement à l'utilisation des bases azotées comme sondes, où l'on quantifie sa décomposition, l'étude de transfert de charges en utilisant des complexes organométalliques comme accepteur de charge se fait par suivi d'extinction de leur luminescence respective. La **Figure 1.32** montre un exemple de tel système. Un complexe de Ru(II) (**Figure 1.32 b**) est greffé de façon covalente à de l'ADN double brin et présente une luminescence caractéristique de son association au brin complémentaire. (**Figure 1.32 a, profil du haut**). En présence d'un brin complémentaire portant un complexe de Rh(III) hautement photo-oxydant (**Figure 1.32 c**), la luminescence du complexe de Ru(II) est inhibée (**Figure 1.32 a, profil du bas**).<sup>67</sup> Cette disparition de luminescence est attribuée un transfert d'électron du complexe du Ru(II) (dès lors considéré comme un donneur de charge négative) vers le complexe de Rh(III), démontrant ainsi la possibilité d'une migration de charge au sein d'un empilement d'hétérocycles aromatiques formant un continuum  $\pi$ .

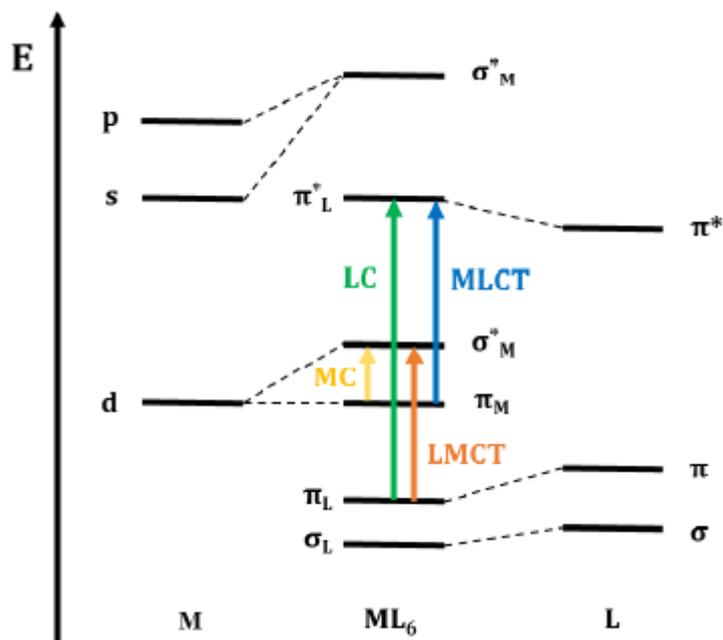


**Figure 1.32** : a) Spectre d'émission de l'ADN en présence de l'injecteur de charge (complexe de Ru(II)) uniquement, spectre du haut et en présence de l'accepteur de charge (complexe de Rh(III)) sur le brin complémentaire, spectre du bas,<sup>67</sup> b) structure du complexe de Ru(II)<sup>67</sup> et c) structures des complexes de rhodium(III) utilisés en tant qu'accepteur de charge.<sup>65,67</sup> Figures issues et modifiées de *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23* (1), 183–197<sup>65</sup> et *Science* **1993**, *262* (5136), 1025–1029.<sup>67</sup>

### 1.3. Les complexes organométalliques

Les complexes organométalliques présentent la particularité de voir leurs propriétés photophysiques et photochimiques modifiées en fonction des ligands entourant le cation métallique central. Ceci permet ainsi une grande flexibilité de modulation des propriétés des complexes. Dans cette partie, nous allons détailler les propriétés photophysiques et photochimiques des complexes métalliques.

Les complexes organométalliques sont des édifices supramoléculaires formés à partir d'un cation métallique (M) et de ligands (L). Le diagramme des orbitales moléculaires (*i.e.* les différents niveaux énergétiques accessibles pour les électrons du complexe) des complexes de géométrie octaédrique ( $ML_6$ ) est représenté dans le **Figure 1.33**. Les orbitales moléculaires sont classées selon (i) la nature de l'orbitale moléculaire ( $\sigma$  ou  $\pi$ ), (ii) leur caractère liant, anti liant ou non liant et (iii) la prédominance de la localisation de l'orbitale moléculaire (centrée sur le métal ou centrée sur le ligand).<sup>85</sup>



**Figure 1.33** : Schéma d'un diagramme d'orbitale moléculaire pour un complexe organométallique de géométrie octaédrique avec différentes types de transitions possible après absorption de lumière par le complexe.<sup>85</sup>

Lorsque le complexe est absorbé de la lumière, un électron situé sur l'orbitale la plus haute occupée (HOMO pour « *highest occupied molecular orbital* ») se déplace vers l'orbitale la plus basse vacante (LUMO pour « *lowest unoccupied molecular orbital* »). En fonction de la nature de l'orbitale moléculaire, différentes transitions électroniques peuvent être différenciées (voir plus bas).

### 1.3.1. Absorption de la lumière

#### 1.3.1.1. La loi de Beer-Lambert

L'absorption d'un faisceau de lumière monochromatique d'une longueur d'onde  $\lambda$  donnée par un composé en solution est décrite par la loi de Beer-Lambert (**Equation 1.1**).

$$A_\lambda = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon_\lambda l C$$

**Equation 1.1**

Avec  $A_\lambda$  l'absorbance,  $I_0$  l'intensité de la lumière incidente,  $I$  l'intensité de la lumière transmise,  $\varepsilon_\lambda$  le coefficient d'extinction molaire (en  $M^{-1}.cm^{-1}$ ),  $l$  la longueur du trajet parcouru par le faisceau (en cm) et  $C$  la concentration du composé (en  $mol.L^{-1}$  ou M).

#### 1.3.1.2. Les transitions électroniques

L'absorption de la lumière dans la gamme de l'UV-visible conduit à des transitions électroniques entre les orbitales moléculaires du complexe (**Figure 1.32**). Ces transitions sont classées en différentes catégories<sup>85</sup> :

#### **a. Les transitions centrées sur le métal (MC pour « metal centered »)**

Ces transitions impliquent les orbitales moléculaires centrées sur le métal ( $\pi_M$  et  $\sigma^*_M$ ) et sont caractérisées par des coefficients d'extinction molaires faibles ( $\epsilon < 1000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Ces transitions correspondent à des transitions d-d, interdites par les règles de sélection (détaillées par la suite) expliquant ainsi les valeurs faibles pour les coefficients d'extinction molaire.

#### **b. Les transitions centrées sur le ligand (LC pour « ligand centered »)**

Les orbitales moléculaires participants à ces transitions sont celles centrées sur le ligand ( $\pi_L$  et  $\pi^*_L$ ). Ces transitions sont observées dans la gamme UV du spectre et présentent des hautes valeurs de coefficients d'extinction molaires ( $\epsilon > 100\,000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ).

#### **c. Les transitions « Ligand-to-Metal Charge-Transfer » (LMCT)**

Ces transitions ont lieu lorsqu'un électron situé sur une orbitale moléculaire centrée sur le ligand ( $\pi_L$ ) est promu vers une orbitale moléculaire centrée sur le métal ( $\sigma^*_M$ ). Ces transitions sont observées lorsque le ligand est facilement oxydable et le métal facilement réduit. Ces transitions sont aussi décrites comme des processus d'oxydo-réduction intramoléculaire.

#### **d. Les transitions « Metal-to-Ligand Charge-Transfer » (MLCT)**

Ces transitions sont observées lorsque l'électron présent sur l'orbitale centrée sur le métal ( $\pi_M$ ) « peuple » l'orbitale vide centrée sur le ligand ( $\pi^*_L$ ). Ces transitions sont aussi considérées comme un processus d'oxydo-réduction intramoléculaire où le métal est oxydé alors que le ligand est réduit. Les valeurs de coefficients d'extinction molaires ( $\epsilon$ ) sont aux alentours de  $10\,000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .

### **1.3.1.3. Les règles de sélection**

Les règles de sélection permettent de prédire l'intensité des transitions électroniques. En effet, les transitions sont soit autorisées soit interdites.<sup>85</sup> Toutefois, les transitions interdites peuvent aussi être observées, mais avec des intensités plus faibles. Deux règles définissent les transitions électroniques :

#### **a. La règle de sélection de symétrie**

Cette règle s'applique à la symétrie des orbitales concernées. Les transitions entre les orbitales de même symétrie sont interdites (*e.g.* les transitions d-d ou p-p) tandis que les transitions s-p, p-d ou d-f sont autorisées. Bien que certaines transitions sont interdites, elles peuvent cependant être observées lorsque la moléculaire perd sa symétrie, causée par des vibrations moléculaires.

#### **b. La règle de sélection de spin**

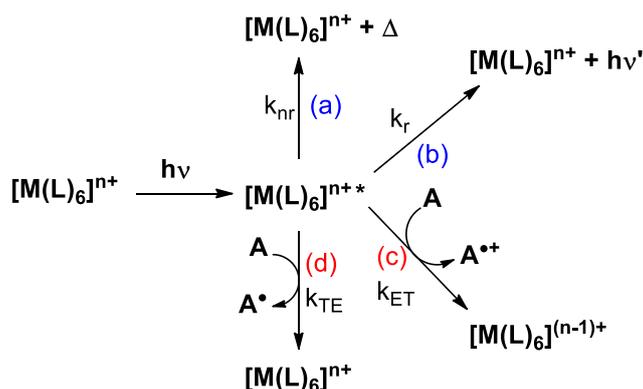
Les transitions entre états de différentes multiplicités sont interdites (singulet-triplet). Ainsi les transitions électroniques ne sont possibles que si la multiplicité n'est pas modifiée (singulet-singulet ou triplet-triplet). Il est à noter que certains métaux tels que le ruthénium ou l'iridium ne sont pas affectés par cette règle à cause du couplage spin-orbite, autorisant ainsi les transitions singulet-triplet.

### 1.3.2. Désexcitation de l'état excité/Retour à l'état fondamental

Lorsque le complexe est à l'état excité, c'est-à-dire après absorption de lumière, ce dernier subit une désexcitation (*i.e.* retour à l'état fondamental). Cette désexcitation peut être causée par des processus photophysiques ou photochimiques (ces deux phénomènes sont détaillés par la suite).

Les processus de désexcitation photophysiques conduisent au retour à l'état fondamental du complexe par libération de chaleur (non-radiatif) (**Figure 1.34 a**) ou par émission de lumière (radiatif) (**Figure 1.34 b**).

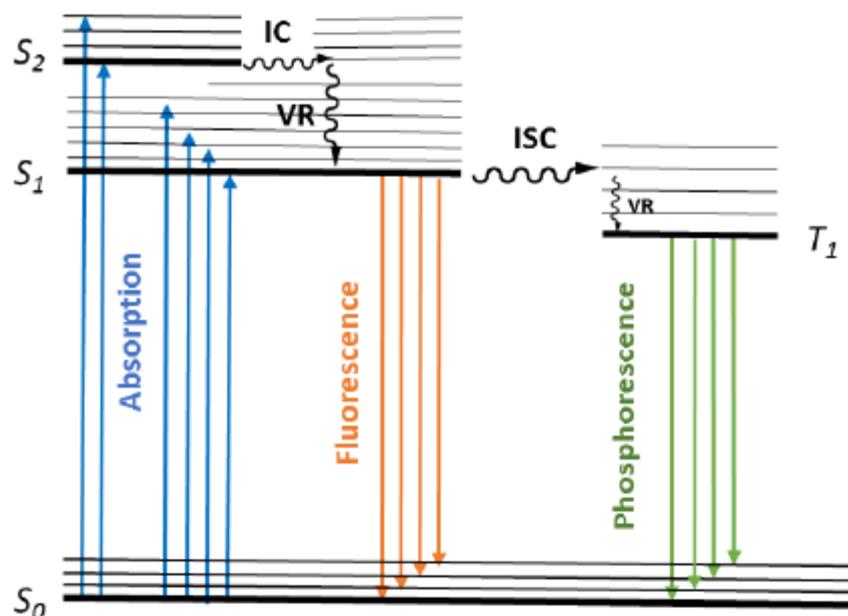
Pour le cas des processus de désexcitations photochimiques, une molécule interagit avec le complexe à l'état excité et conduit à la désexcitation du complexe par transfert d'électron (**Figure 1.34 c**) ou par transfert d'énergie (**Figure 1.34 d**).



**Figure 1.34** : Représentation des différentes voies de désexcitation d'un complexe excité : a) libération de chaleur, b) émission de lumière, c) transfert d'électron et d) transfert d'énergie.  $k_{nr}$  et  $k_r$  sont les constantes de désexcitation non radiative et radiative.  $k_{ET}$  et  $k_{TE}$  sont les constantes de désexcitation par transfert d'électron et par transfert d'énergie.

#### 1.3.2.1. La désexcitation photophysique

Le diagramme de Perrin-Jablonski résume les principales voies de désexcitations photophysiques (**Figure 1.35**). Les états singulets sont représentés par  $S_0$  (l'état fondamental),  $S_1$ ,  $S_2$  ... et les états triplets par  $T_1$ ,  $T_2$  ... Les états électroniques sont représentés par des lignes horizontales épaisses alors que les états vibrationnels sont représentés par des lignes horizontales fines. Les transitions radiatives (fluorescence et phosphorescence) sont représentées par des flèches droites tandis que les transitions non radiatives sont représentées par des flèches ondulées.



**Figure 1.35** : Diagramme de Perrin-Jablonski décrivant les différentes voies de désexcitation.

#### a. Désexcitation non radiative

Après absorption de la lumière, l'état excité se situe dans un haut état vibrationnel. Ces molécules excitées dissipent l'excès d'énergie vibrationnelle par collision avec les molécules environnantes. Ce processus est appelé relaxation vibrationnelle (VR pour « vibrational relaxation ») et se produit à une vitesse de l'ordre de la picoseconde (ps).

La conversion interne (IC pour « internal conversion ») est une transition non radiative qui a lieu entre deux états électroniques de même multiplicité. Ce processus intervient avec des vitesses de l'ordre de la nanoseconde (ns).

Le croisement inter-système (ISC pour « intersystem crossing ») est aussi un processus non radiatif qui intervient entre deux états électroniques qui ne partagent pas la même multiplicité. Nous pouvons observer par exemple le passage d'un état excité singulet (S<sub>1</sub>) à l'état excité triplet (T<sub>1</sub>) par un croisement inter-système. Ce croisement, bien que interdit par les règles de sélection, est rendu possible par le couplage spin-orbite.

#### b. Désexcitation radiative

La désexcitation radiative correspondant à l'émission d'un photon lorsque le complexe revient à l'état fondamental à partir d'un état excité. Ce processus peut être classifié en deux types : la fluorescence et la phosphorescence. Le terme général pour désigner ces deux processus est luminescence. Nous parlons de fluorescence lorsque la transition est autorisée de spin (singulet-singulet) tandis que la phosphorescence correspond à une transition interdite de spin (singulet-triplet). Les propriétés de luminescence d'un composé sont caractérisées par la durée de vie de l'état excité ( $\tau$ ) et le rendement quantique de luminescence ( $\phi_L$ ).

- La durée de vie de l'état excité ( $\tau$ )

En l'absence de collision, l'état excité A\* se désexcite selon un taux de décomposition d'ordre 1 correspondant à la durée de vie de l'état excité ( $\tau$ ). L'**Equation 1.2** décrit la cinétique de désexcitation de l'état excité :

$$\frac{d[A^*]}{dt} = -(k_r + k_{nr})[A^*]$$

**Equation 1.2**

Avec  $[A^*]$  la concentration de la population de A à l'état excité,  $k_r$  et  $k_{nr}$  les constantes de désexcitation radiative et non radiative respectivement. La durée de vie de l'état excité  $\tau$  est obtenue à partir de l'**Equation 1.3** :

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

**Equation 1.3**

- Le rendement quantique de luminescence ( $\phi_L$ )

Le rendement quantique de luminescence ( $\phi_L$ ) correspond à la fraction de molécule à l'état excité qui retourne à l'état fondamental  $S_0$  *via* émission d'un photon. En d'autres termes, le rendement quantique de luminescence est le ratio entre le nombre de photons émis sur le nombre de photon absorbés (**Equation 1.4**).

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

**Equation 1.4**

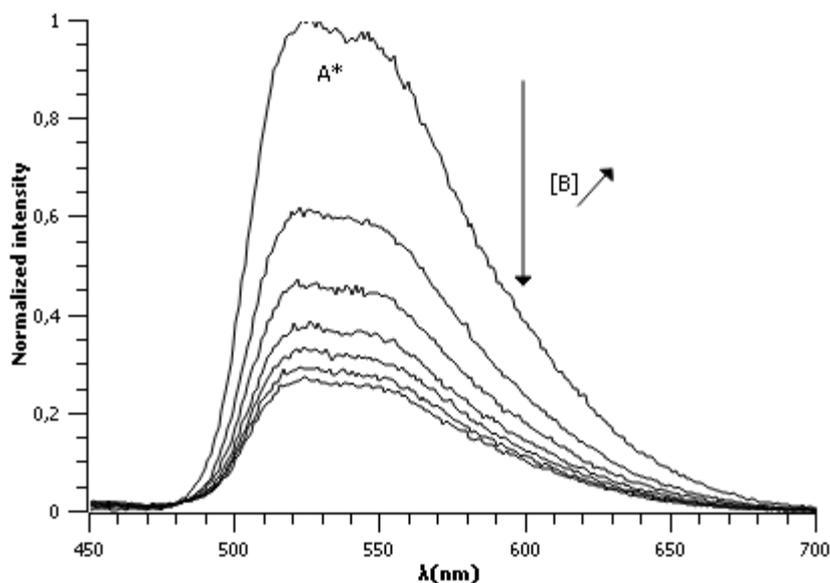
Avec  $k_r$  et  $k_{nr}$  les constantes de désexcitation radiative et non radiative respectivement et  $\tau$  la durée de vie de l'état excité.

### 1.3.2.2. Désexcitation photochimiques

Le processus de désexcitation photophysique n'entraîne pas de modification de la composition chimique des composés contrairement au processus de désexcitation photochimique. Ce type de processus fait intervenir des réactions chimiques appelées photo-réactions, possédant une photo-réactivité intrinsèque à chaque molécule.

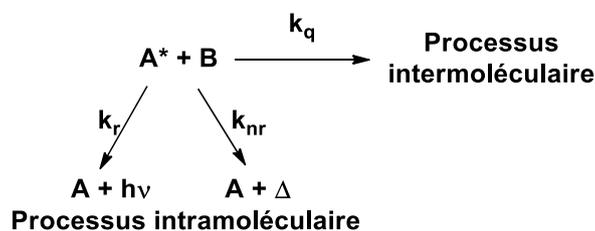
#### a. Le phénomène de « quenching » de luminescence

La désexcitation de l'état excité d'une molécule  $A^*$  par une molécule « quencher » B peut faire intervenir différents phénomènes tels que le transfert d'électron ou le transfert d'énergie. Ces processus induisent une diminution de l'intensité de luminescence (« quenching » de luminescence) du composé  $A^*$  en présence d'un « quencher » B (**Figure 1.36**).



**Figure 1.36** : Représentation d'un phénomène de « quenching » de luminescence de A\* par augmentation de la concentration en B.

Ces photo-réactions sont en compétition avec les processus de désexcitations radiatives (expliquant la diminution de l'intensité de luminescence) et non radiatives (**Figure 1.37**). Lorsque, en solution, les espèces A\* et B diffusent l'une vers l'autre, un « quenching » dynamique a lieu.



**Figure 1.37** : Illustration des processus de désexcitation intramoléculaire et intermoléculaire d'un composé à l'état excité A\*.

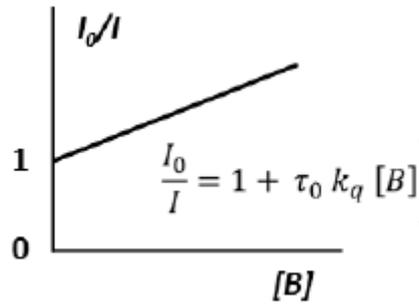
L'efficacité de « quenching » de luminescence en présence d'un « quencher » B est évaluée par la relation de Stern-Volmer (**Equation 1.6**).

$$\frac{\tau_0}{\tau} = \frac{I_0}{I} = 1 + \tau_0 k_q [B] = 1 + K_{SV}[B]$$

**Equation 1.6**

Avec  $\tau_0$  et  $\tau$  les durée vie de luminescence en absence et en présence de « quencher » B,  $I_0$  et  $I$  l'intensité de luminescence en absence et en présence de B,  $k_q$  la constante cinétique de « quenching » et  $K_{SV}$  la constante de Stern-Volmer.

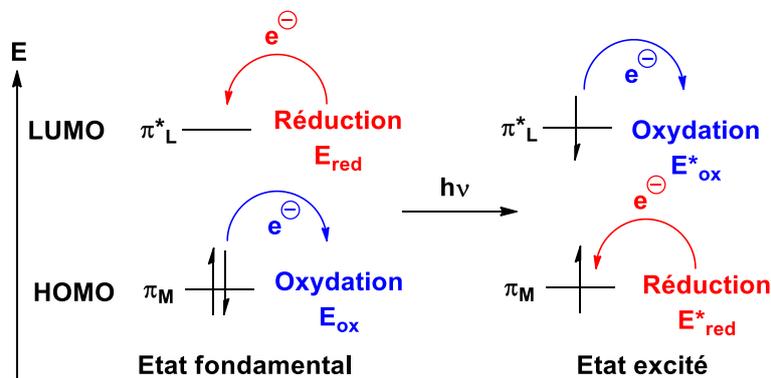
Le ratio  $I_0/I$  est tracé en fonction de la concentration du « quencher » B afin d'obtenir la constante de Stern-Volmer correspondant au coefficient directeur de la droite (**Figure 1.38**). Dans un milieu non visqueux, la valeur de  $k_q$  est de manière usuelle aux alentours de  $10^9$ - $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Ceci démontre une grande efficacité de « quenching » qui est limité par la diffusion des espèces dans le milieu.



**Figure 1.38** : Exemple de courbe de Stern-Volmer obtenue pour un « quenching » dynamique.

### b. Le transfert d'électron

Le transfert d'électron (ET pour « electron transfer ») est une source de « quenching » de luminescence. En effet, les molécules à l'état excité sont de meilleurs accepteurs et donneurs d'électron par rapport aux molécules à l'état fondamental. Après absorption d'un photon, un électron est promu de la HOMO vers la LUMO, rendant ainsi plus facile l'oxydation ou la réduction de l'espèce à l'état excité (**Figure 1.39**).



**Figure 1.39** : Représentation schématique de l'accentuation du pouvoir oxydant et du pouvoir réducteur d'une espèce à l'état excité.

Les potentiels de réduction  $E^*_{red}$  et d'oxydation  $E^*_{ox}$ , à l'état excité peuvent être obtenus par les expressions suivantes :

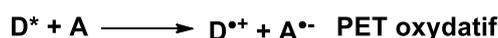
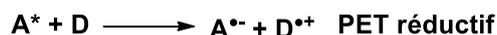
$$E^*_{red} = E_{red} + E_{00} \quad \text{Eq. 1.7}$$

$$E^*_{ox} = E_{ox} - E_{00} \quad \text{Eq. 1.8}$$

**Equations 1.7 et 1.8**

$E_{red}$  et  $E_{ox}$  sont les potentiels de réduction et d'oxydation respectifs à l'état fondamental,  $E_{00}$  est l'énergie de transition entre l'état excité de plus basse énergie vers l'état fondamental, tous les deux à l'état vibrationnel 0. De manière usuelle,  $E_{00}$  est assimilée à l'énergie associée à la longueur d'onde maximale d'émission d'une molécule donnée.

Le processus de désexcitation par oxydation ou réduction de l'état excité est appelé transfert d'électron photo-induit (PET pour « photoinduced electron transfer ») et peut être représenté entre les deux espèces A (accepteur d'électron) et D (donneur d'électron) par :



**Schéma 1.7** : Processus de transfert d'électron photo-induit réductif et oxydatif.

La relation de Rehm-Weller permet de déterminer la faisabilité de ces processus du point de vue de la thermodynamique (**Equation 1.9**).

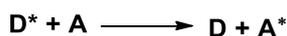
$$\Delta G_{ET} = (E(D/D^+) - E(A^{\cdot-}/A)) - E_{00} - \frac{e^2}{\epsilon d}$$

**Equation 1.9**

Avec  $E(D/D^+)$  le potentiel d'oxydation du donneur d'électron,  $E(A^{\cdot-}/A)$  le potentiel de réduction de l'accepteur,  $E_{00}$  est l'énergie de la transition 0-0 (assimilée au  $\lambda_{\max}$  de l'émission) et  $\frac{e^2}{\epsilon d}$  l'enthalpie libre associée à l'interaction coulombienne ( $e$  : charge élémentaire,  $\epsilon$  : constante diélectrique du solvant,  $d$  : distance entre les deux espèces), cette dernière est très souvent négligeable dans un solvant polaire raison de la haute valeur de constante diélectrique ( $\epsilon$ ).

### c. Le transfert d'énergie

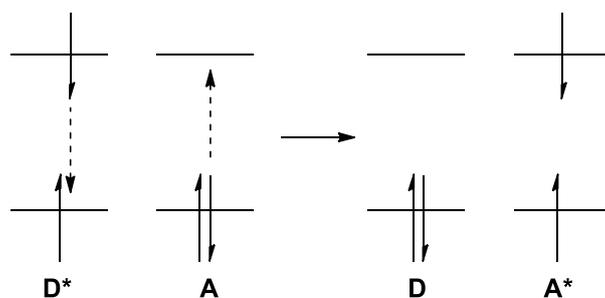
Le transfert d'énergie consiste à transférer l'état excité d'une première molécule  $D^*$  (donneur à l'état excité) vers une autre molécule  $A$  (accepteur), créant ainsi une nouvelle espèce à l'état excité,  $A^*$  (**Schéma 1.8**). Ce transfert d'énergie conduit au « quenching » de luminescence de la molécule  $D^*$  par la molécule  $A$ .



**Schéma 1.8** : Processus de transfert d'énergie.

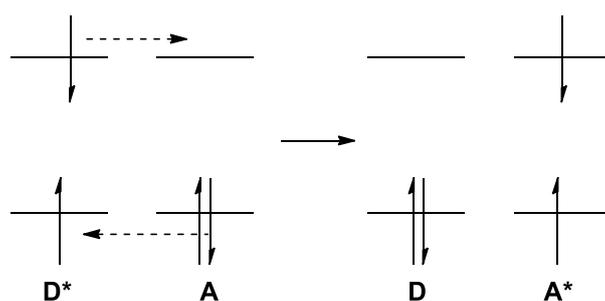
Ce processus de transfert d'énergie peut être classifié par trois mécanismes :

- Le transfert radiatif : ce type de transfert d'énergie a lieu lorsque le composé  $A$  absorbe la lumière émise par la désexcitation du composé  $D^*$  à proximité. Ceci implique que le spectre de luminescence du composé  $D$  se superpose avec le spectre d'absorption du composé  $A$ .
- Le transfert d'énergie de Förster est un processus non radiatif qui implique un chevauchement entre le spectre d'émission de la molécule donneur et le spectre d'absorption de la molécule accepteur. Une interaction coulombienne (dipôle-dipôle) a lieu entre  $D^*$  et  $A$  permettant ainsi le passage à l'état excité de la molécule  $A$  lorsque la molécule  $D^*$  se désexcite à proximité (**Figure 1.40**). Ce processus non radiatif est aussi appelé « résonance », d'où le nom FRET pour « Förster Resonance Energy Transfer ». Ce transfert d'énergie peut se produire sans que les molécules rentrent en contact et n'est possible qu'entre états de même multiplicité électronique (singulet-singulet).



**Figure 1.40** : Représentation schématique d'un transfert d'énergie de Förster.

- Le transfert d'énergie de Dexter est *a contrario*, un processus qui nécessite un contact rapproché entre les deux molécules. Ce phénomène peut avoir lieu entre états de multiplicité de spin différents et peut aussi être considéré comme un double transfert d'électrons (**Figure 1.41**).



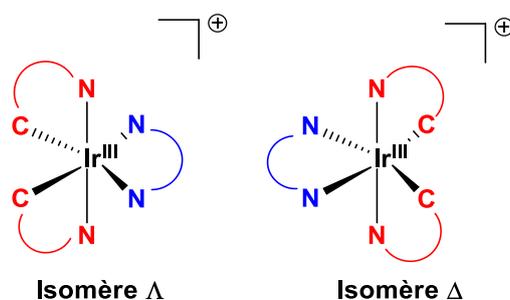
**Figure 1.41** : Représentation schématique d'un transfert d'énergie de Dexter.

### 1.3.3. Le cas des complexes bis-cyclométallés d'iridium (III)

Les composés photoréactifs à base de métaux de transitions sont plus intéressants que les molécules organiques par leur longue durée de vie de l'état excité triplet. Cette différence de durée de vie est rendue possible par la présence d'atome lourd (le métal de transition) qui favorise le couplage spin-orbite. Nous allons nous concentrer sur l'utilisation des complexes d'iridium (III) dans le cadre de cette thèse. Les particularités de ces composés sont détaillées par la suite.

#### 1.3.3.1. Structure

Les complexes bis-cyclométallés d'iridium (III) sont obtenus par chélation de deux ligands anioniques (C-N chélation, en rouge sur la **Figure 1.42**) sur le centre métallique. Un troisième ligand polypyridinique neutre (N-N chélation, en bleu sur la **Figure 1.42**) sera incorporé au sein du complexe afin de former un complexe de formule générale  $[\text{Ir}(\text{C-N})_2(\text{N-N})]^+$ . Deux isomères optiques peuvent être obtenus à partir de trois ligands bidentates : les énantiomères  $\Lambda$  et  $\Delta$  (**Figure 1.42**).<sup>86</sup>



**Figure 1.42** : Isomères optiques  $\Delta$  et  $\Delta$  d'un complexe  $[\text{Ir}(\text{C-N})_2(\text{N-N})]^+$ .

Par ailleurs, l'incorporation de deux ligands anionique et un ligand neutre sur le centre métallique iridium (III) conduit à la formation d'un complexe chargé une fois positif. Par conséquent, un contre-ion négatif est associé au complexe chargé positivement. Ce contre-ion joue un rôle important sur la solubilisation du complexe. Le contre-ion  $\text{PF}_6^-$  est utilisé afin de solubiliser le complexe dans les milieux organiques tandis que le contre-ion chlorure favorise la solubilité dans le milieu aqueux.

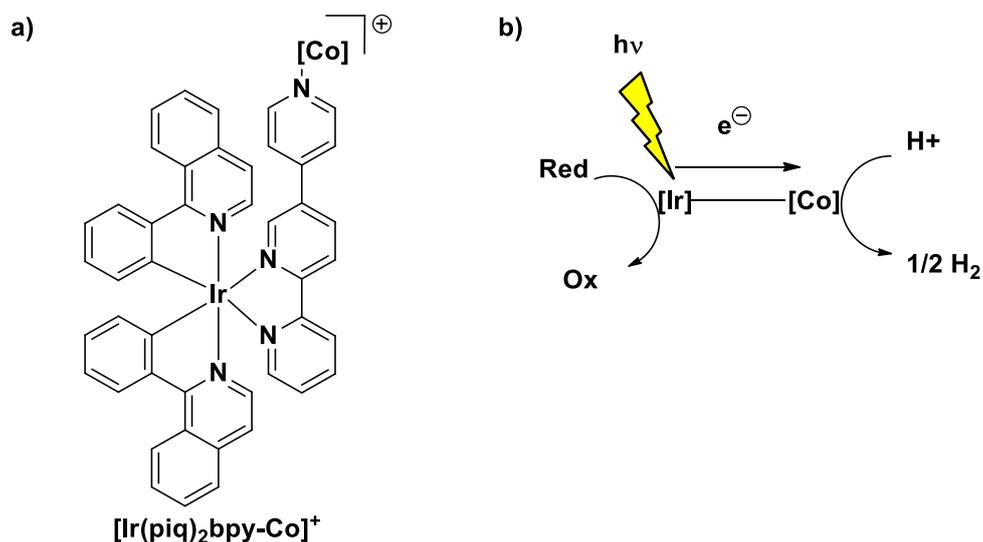
### 1.3.3.2. Versatilité des propriétés physicochimiques

Les complexes d'iridium (III) de type  $[\text{Ir}(\text{C-N})_2(\text{N-N})]^+$  sont très étudiés car les orbitales frontières HOMO et LUMO peuvent être modulées indépendamment en fonction des ligands. En effet, l'orbitale HOMO est centrée sur les ligands C-N tandis que l'orbitale LUMO est centrée sur le ligand N-N. Ceci implique que les propriétés photophysiques et photochimiques des complexes d'iridium peuvent être modifiées selon les ligands présents autour du centre métallique.

Il faut savoir par ailleurs qu'ajouter des groupements chimiques sur les ligands C-N et N-N modifie également les énergies des orbitales HOMO et LUMO respectivement. De manière générale, l'incorporation de groupement électroattracteur stabilise la HOMO et la LUMO alors que l'ajout de groupement électrodonneur les déstabilise. De ce fait, en présence de groupements électroattracteurs sur les ligands, le complexe présente des potentiels d'oxydation et de réduction plus positifs alors qu'en présence de groupements électrodonneurs, les potentiels d'oxydation et de réduction sont déplacés vers des valeurs plus négatives.<sup>87,88</sup>

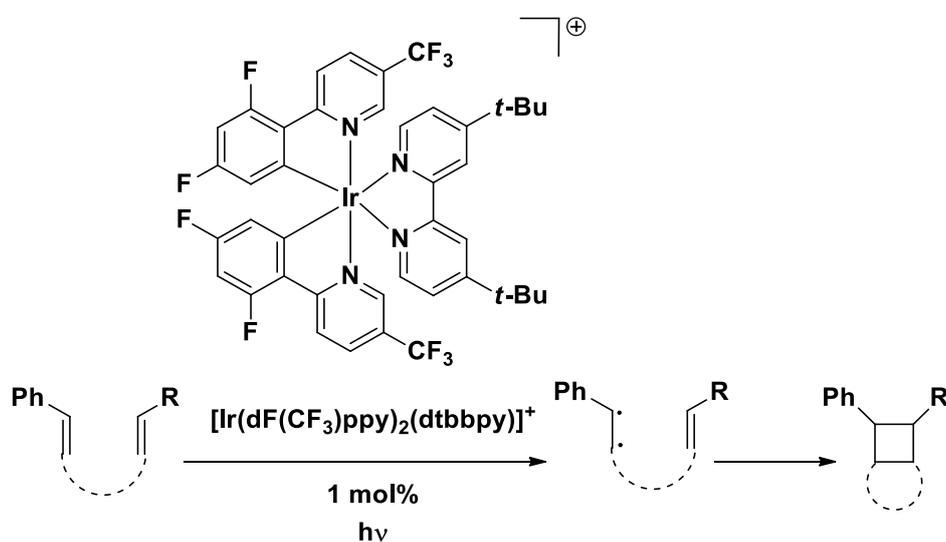
### 1.3.3.3. Applications des complexes d'iridium (III)

Cette possibilité de moduler facilement les propriétés photophysiques et photochimiques des complexes d'iridium (III) leur permet d'être utilisés dans différents domaines. Nous pouvons citer par exemple le domaine de la photoproduction de dihydrogène ( $\text{H}_2$ ). Des dyades dinucléaires Ir-Co (**Figure 1.43 a**) ont été mises au point afin profiter des avantages des deux partenaires : la partie iridium permet de moduler la longueur d'irradiation tandis que la partie cobalt est le centre catalytique où le dihydrogène est produit (**Figure 1.43 b**).<sup>89,90</sup>



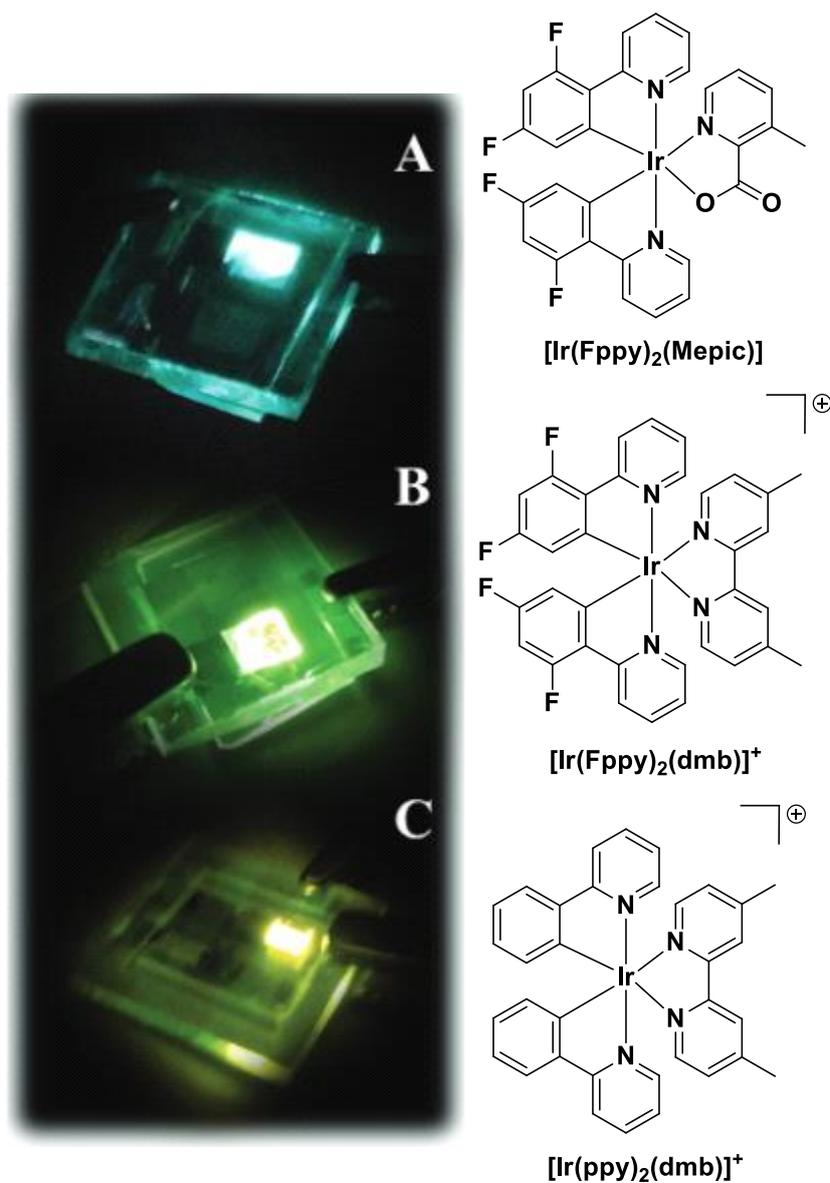
**Figure 1.43** : a) Structure d'un complexe dinucléaire Ir-Co utilisé pour la photoproduction de dihydrogène, b) représentation schématique du processus photochimique conduisant à la photoproduction de dihydrogène.

Les complexes d'iridium (III) sont aussi utilisés en tant que photocatalyseur. Des études ont démontré que le complexe d'iridium (III) (**Schéma 1.9**) sous irradiation visible, est capable d'initier des réactions de cycloadditions [2+2] de molécules portant le groupement styrène.<sup>91</sup>



**Schéma 1.9** : Exemple d'un complexe d'iridium utilisé dans la photocatalyse. Schéma issu et modifié de *Science* **2014**, *343* (6174), 1239176–1239176.<sup>91</sup>

Les complexes d'iridium (III) peuvent aussi servir de dispositif émetteur de lumière dans les OLEDs. La **Figure 1.44** présente trois complexes d'iridium (III) qui émettent à différentes longueur d'onde.<sup>92</sup>

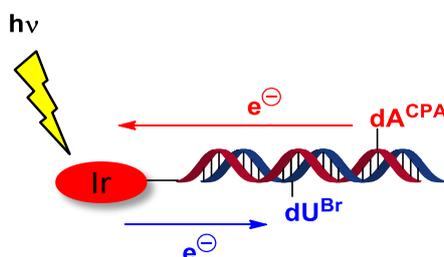


**Figure 1.44** : Exemple de différents complexes d'Ir(III) présentant une émission à différentes longueurs d'onde.  
Figure issue et modifiée de *Dalton Trans.* **2015**, 44 (33), 14559–14573.<sup>92</sup>

### 1.3.4. Les complexes d'iridium dans les études de transferts de charges dans l'ADN

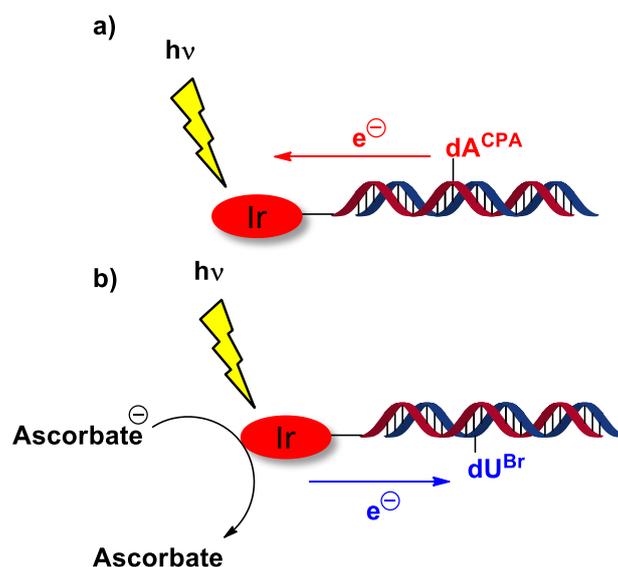
L'équipe de J. Barton a mis au point un complexe d'iridium (III), lié de façon covalente à un brin d'ADN, capable d'induire à la fois un transfert d'électron et un transfert de charge positive (**Figure 1.27**) au sein de la double hélice. Au travers de leurs études, ils démontrent que ce complexe d'iridium (III) est non seulement capable de photo-oxyder la  $\text{dG}^{\text{CPA}}$  (*i.e.* transfert d'une charge positive) mais aussi de photo-réduire la  $\text{dC}^{\text{CPA}}$  (*i.e.* transfert d'une charge négative). Cependant, ils observent que la décomposition de la sonde  $\text{dC}^{\text{CPA}}$  peut aussi être causée par un transfert de charge positive, suggérant ainsi une possible compétition entre la décomposition oxydative et réductive de la sonde  $\text{dC}^{\text{CPA}}$  et par conséquent, la possibilité d'utiliser le complexe d'iridium (III) comme injecteur de charge positive et négative au sein d'un oligonucléotide.<sup>93,94</sup>

La **Figure 1.27** représente un autre exemple démontrant l'utilisation de ces complexes pour la migration de charges positives et négatives, où un oligonucléotide portant le complexe d'iridium(III) et deux sondes  $dA^{CPA}$  (piège à charge positive) et  $dU^{Br}$  (piège à électron) a été synthétisé. Sous irradiation, le complexe d'iridium (III) photo-oxyde la sonde  $dA^{CPA}$ , causant ainsi la décomposition de cette dernière par transfert de charge positive vers la sonde (flèche rouge). Dans un second temps, le complexe mono-réduit (possédant un électron excédentaire) va à son tour réduire la sonde  $dU^{Br}$  par un transfert de charge négative (flèche bleue). Cet exemple montre que le complexe d'iridium(III) permet bien le transfert de charges positives et négatives à travers un processus nommé « *ping-pong electron transfer* » (**Figure 1.45**).<sup>77</sup>



**Figure 1.45** : Représentation schématique du processus de « ping-pong electron transfer ». Figure issue et modifiée de *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47 (47), 9067–9070.<sup>77</sup>

Dans le but d'étudier un seul type de transfert de charges (positives ou négatives), l'incorporation d'un piège spécifique (piège à électron ou à charge positive) est nécessaire au sein du brin d'ADN (**Figure 1.46**). Dans une autre étude, la sonde  $dA^{CPA}$  a été utilisée en tant que piège à charges positives tandis que la sonde  $dU^{Br}$  joue le rôle de piège à charges négatives.<sup>78</sup> Dans le cas du transfert de charges positives (**Figure 1.46 a**), sous irradiation, le complexe d'iridium (III) photo-oxyde la base adjacente et conduit à la formation d'une charge positive. Cette dernière se retrouve piégée par la sonde ( $dA^{CPA}$ ). En ce qui concerne le transfert de charges négatives (**Figure 1.46 b**), de l'ascorbate de sodium est ajouté dans le milieu afin de générer un complexe d'iridium mono-réduit, suite à la photo-oxydation de l'ascorbate de sodium par le complexe excité. L'électron excédentaire présent sur le complexe peut alors migrer le long de l'ADN et se faire piéger par la sonde ( $dU^{Br}$ ).



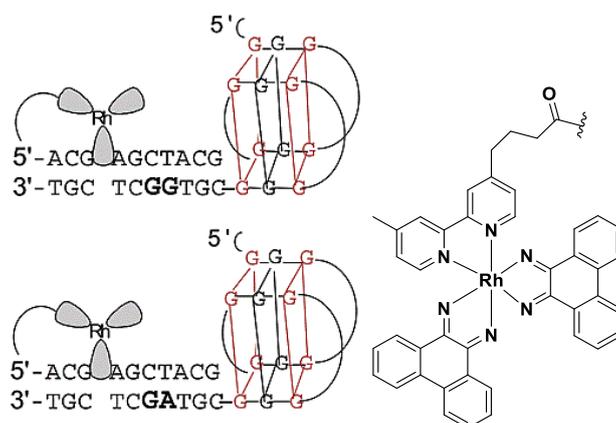
**Figure 1.46** : Représentation schématisques des expériences de transferts de charges a) positives et b) négatives en présence d'ascorbate de sodium comme « quencher » externe. Figure issue et modifiée de *J. Amer. Chem. Soc.* **2008**, *130* (4), 1152–1153.<sup>78</sup>

Par conséquent, les complexes d'iridium (III) constituent une catégorie de molécule à part, pouvant jouer le rôle d'injecteur de charges positives ou négatives. Ils sont donc très intéressants pour les études comparatives de transferts de charges au sein séquences définies d'ADN.

#### 1.4. Le transfert de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe

Comme montré ci-dessus, le transfert de charge au sein de l'ADN duplexe a fait l'objet d'une multitude de recherches que ce soit en solution, sur électrode ou dans la cellule. De plus, différents outils, tels que les sondes « fast trap » ou les complexes organométalliques, ont été développés afin d'approfondir ces études de transferts de charges au sein du duplexe d'ADN. *A contrario* les études de transferts de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe sont encore peu nombreuses. En effet, le haut degré de polymorphisme des G-quadruplexes est un obstacle majeur pour la conception d'expérience démontrant un possible transfert de charges au sein de système G-quadruplexe. Néanmoins, nous pouvons trouver quelques études au sein de la littérature.

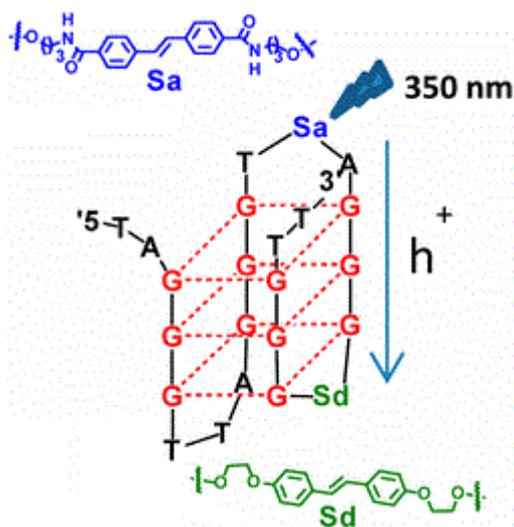
En 2003, Barton et coll. ont publié une étude sur le transport de charges dans l'ADN G-quadruplexe en utilisant un complexe de rhodium comme photo-oxydant et la 2'-désoxyguanosine comme sonde (**Figure 1.47**). Le complexe de rhodium photo-excité, photo-oxyde la base adjacente, induisant ainsi un transfert de charges positives vers les 2'-désoxyguanosines formant le G-quadruplexe.



**Figure 1.47** : Représentation schématique du système G-quadruplexe utilisé par Barton pour l'étude de transfert de charges. Figure issue de *Biochemistry* **2003**, 42 (48), 14159–14165.<sup>95</sup>

Ils montrent que seules les 2'-désoxyguanosines extérieures aux G-tétrades (les 2'-désoxyguanosines en rouge) subissent une dégradation « à distance » du complexe. Aucune décomposition n'est observée sur les 2'-désoxyguanosines centrales du G-tétrades ou les 2'-désoxyguanosines de la partie duplexe (les 2'-désoxyguanosines en gras).<sup>95</sup>

Plus récemment, le groupe du Professeur M. R. Wasielewski a présenté un système de G-quadruplexe comportant le stilbènedicarboxamide (Sa) comme injecteur de charge et le stilbènediéter (Sd) comme accepteur de charge. Sous irradiation, le stilbènedicarboxamide photo-oxyde la base adjacente, créant ainsi une charge positive. Cette dernière migre le long de l'édifice jusqu'à se faire piéger par le stilbènediéter (**Figure 1.48**).

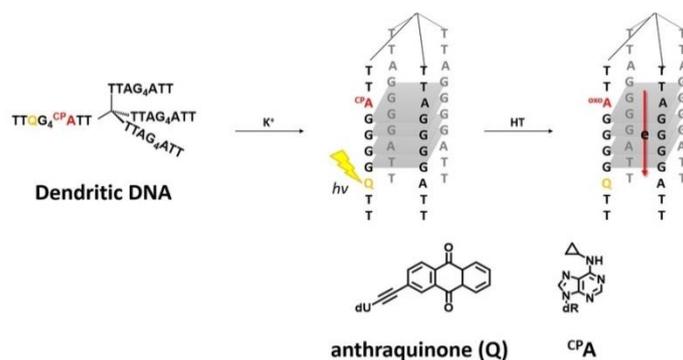


**Figure 1.48** : Système G-quadruplexe utilisé par Wasielewski pour l'étude de transfert de charges. Figure issue de *J. Amer. Chem. Soc.* **2017**, 139 (5), 1730–1733.<sup>96</sup>

Ces résultats montrent que (i) une migration de charge a lieu au sein du G-quadruplexe et (ii) l'efficacité de transfert de charges au sein des G-quadruplexe est plus importante par rapport au duplexe.<sup>96</sup>

La même année, le groupe du Dr. F. Shao publie une étude sur le transfert de charge au sein d'un G-quadruplexe contraint par un noyau carboné portant quatre éthylènes glycol liés à des

oligonucléotides. L'injecteur de charge utilisé est l'antraquinone (oxydant) et la sonde, la 6-cyclopropylamine-2'-désoxyadénosine (**Figure 1.49**).



**Figure 1.49** : Système G-quadruplexe contraint utilisé par Shao. Figure issue de *Chem. - Eur. J.* **2017**, 23 (56), 13980–13985.<sup>97</sup>

A travers leurs expériences, ils montrent que l'efficacité de transfert de charges de l'ADN G-quadruplexe est plus importante que celle de l'ADN duplexe. De plus, l'efficacité de transfert de charge dans un G-quadruplexe augmente avec le nombre de 2'-désoxyguanosines présentes dans la structure G-quadruplexe.<sup>97</sup>

Au vu de l'importance des G-quadruplexes dans le génome et du peu d'études sur la migration de charge dans ces systèmes, nous nous sommes intéressés au transfert de charge au sein d'édifices G-quadruplexes. Les objectifs de cette thèse de doctorat sont présentés dans le chapitre suivant.

## **Chapitre 2 : Objectifs**

## 2.1. Stratégie

Le transfert de charge au sein de l'ADN est une étude fondamentale qui permet notamment de comprendre comment un organisme vivant met à profit la structure particulière de l'ADN (continuum  $\pi$ ) dans différents processus biologiques, comme la détection de mutations par localisation de la région spécifique où l'ADN est endommagé.<sup>63,98</sup> En plus de cela, cette capacité de conduire les charges permet la conception de circuits logiques dans le milieu de l'électronique au niveau moléculaire.<sup>99</sup>

Comme mentionné dans l'introduction, les nombreuses études de transfert de charges au sein de l'ADN se sont basées sur l'ADN duplexe. L'étude de transfert de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe reste à ce jour peu étudiée. En effet, un obstacle majeur à l'étude des transferts de charges au sein des G-quadruplexes est son polymorphisme. Le G-quadruplexe peut adopter diverses topologies : parallèle, antiparallèle ou hybride. C'est sans compter qu'un G-quadruplexe peut aussi être formé à partir d'un seul brin, de deux brins ou de quatre brins d'ADN, rendant encore plus complexe l'étude de transfert de charges dans les G-quadruplexes. Afin de résoudre cette problématique de polymorphisme, des outils ont été développés dans notre laboratoire afin de contraindre et de contrôler la topologie d'un G-quadruplexe.

Le concept du TASQ (*Template Assembled Synthetic G-Quadruplex*) (**Figure 2.1 a**) a été développé afin de répondre à cette problématique de polymorphisme du G-quadruplexe. La construction de cet édifice se base sur un cyclodécapeptide, appelé RAFT pour « *Regioselectively Adressable Functionnalised Template* » (**Figure 2.1 b**) sur lequel sont greffés des oligonucléotides pour former un système G-quadruplexe contraint. Ce cyclodécapeptide possède en réalité deux faces fonctionnalisables. De manière usuelle, la face supérieure est utilisée pour la fixation des oligonucléotides formant le G-quadruplexe. La face inférieure est quant à elle utile pour fixer le RAFT sur un support solide (par exemple une fonction biotine sur le RAFT afin de l'immobiliser sur une surface de streptavidine), permettant par exemple les études d'interactions entre le G-quadruplexe et des ligands ou des protéines.<sup>100,101</sup>

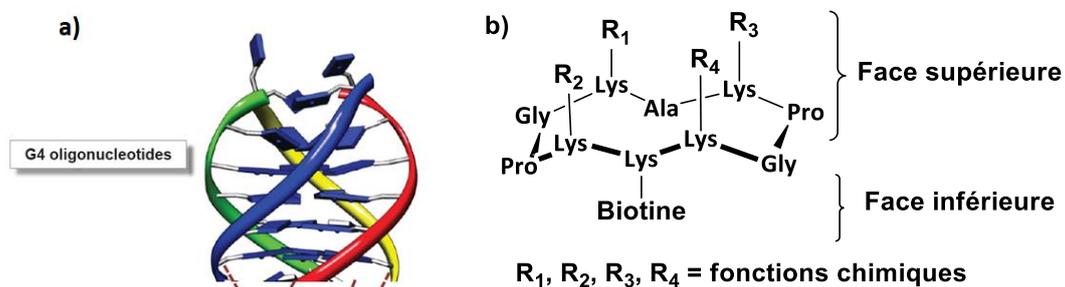
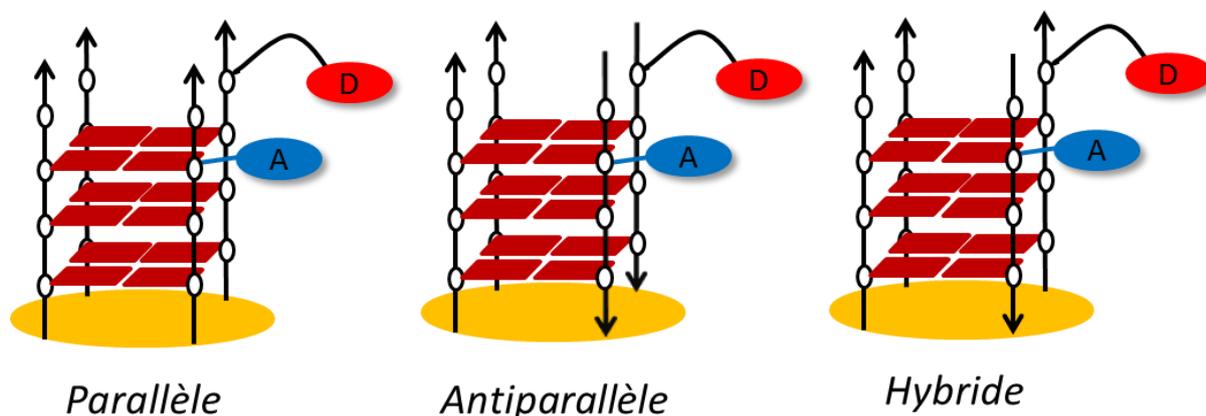


Figure 2.1 : Représentation des concepts a) TASQ et b) RAFT.

C'est grâce aux différentes fonctions chimiques présentes sur le RAFT (**Figure 2.1 b**) que les oligonucléotides peuvent être ancrés dessus afin de contrôler la topologie du G-quadruplexe formé (**Figure 2.2**).

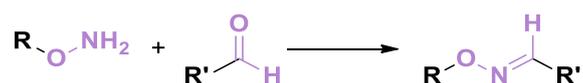


**Figure 2.2** : Représentation schématique de différentes topologies possible de G-quadruplexe contraint, avec D le composé donneur de charges et A la molécule accepteur de charges.

La liaison des oligonucléotides sur le châssis peptidique s'effectue par des ligations chimiosélectives. Ces réactions mettent en jeu deux fonctions chimiques complémentaires et spécifiques. Ces fonctions chimiques possèdent la particularité d'être orthogonales entre elles mais sont aussi compatibles avec la synthèse peptidique sur support solide. Nous allons nous focaliser sur deux ligations chimiosélectives utilisées classiquement au laboratoire pour l'assemblage de conjugués peptide-oligonucléotides.

- Ligation oxime :

Cette ligation est une réaction d'addition nucléophile entre une fonction nucléophile (oxyamine) et une fonction électrophile (aldéhyde) (**Schéma 2.1**).<sup>102</sup> La présence d'un doublet non liant de l'oxygène permet une meilleure stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse du lien éther d'oxime (par effet mésomère donneur), rendant ce dernier stable sur une large gamme de pH allant de 3 à 9.<sup>103</sup> La ligation oxime est de nos jours classiquement utilisée pour l'obtention de conjugués oligonucléotidiques, de par la forte réactivité de l'oxyamine vis-à-vis des composés carbonyles tels que les aldéhydes ou cétones ainsi que par sa stabilité du lien formé, notamment en milieu biologique.



**Schéma 2.1** : Ligation oxime.

- CuAAC (Copper catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition)

La cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le Cu (I), aussi appelé CuAAC, est une variante de la cycloaddition de Huisgen (**Schéma 2.2**).<sup>104</sup> La CuAAC a été développée par l'équipe de K. B. Sharpless en 2002 sur de petites molécules organiques.<sup>105</sup> La particularité de la CuAAC est la régiosélectivité de cette réaction, en effet, seul le produit 1,4 est formé contrairement à la cycloaddition de Huisgen où un mélange des produits 1,4 et 1,5 est obtenu. De plus, la possibilité de réaliser cette réaction en milieu aqueux, à température ambiante a permis de rendre cette réaction

biocompatible. La CuAAC est ainsi devenue une réaction classique permettant une préparation facile, rapide et efficace d'une multitude de biomolécules modifiées (nucléosides, nucléotides, oligonucléotides).<sup>106</sup> En 2010, notre laboratoire a ainsi étendu le protocole de CuAAC sur oligonucléotide par post-fonctionnalisation, en utilisant du cuivre (II) (CuSO<sub>4</sub>) qui est réduit *in situ* en présence d'ascorbate de sodium afin de former l'espèce Cu (I).<sup>107</sup>

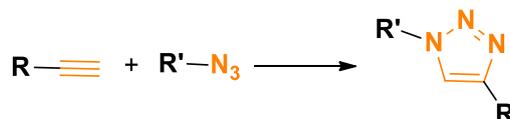


Schéma 2.2 : Réaction de CuAAC.

## 2.2. Objectifs de la thèse de doctorat

Avant d'entamer les études de transferts de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe, nous allons dans un premier temps développer plusieurs complexes d'iridium (III) photo-oxydants comme injecteur de charge (Figure 2.3).

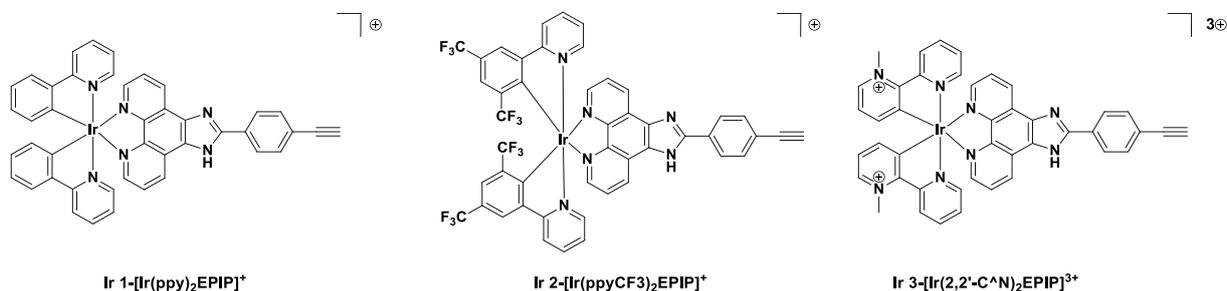
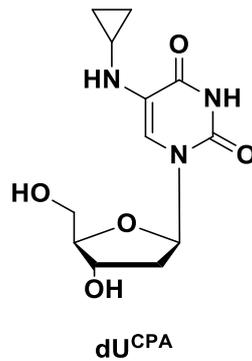


Figure 2.3 : Structures des différents complexes d'iridium (III) synthétisés au cours de cette thèse de doctorat.

Les complexes d'iridium(III) développés présentent des caractères photo-oxydant croissants grâce aux ligands électroattracteurs entourant le noyau d'iridium. En augmentant leur pouvoir oxydant, nous pouvons favoriser l'exergonicité et l'efficacité de transfert de charges. Une fois ces complexes préparés, leur capacité à photo-oxyder une base nucléique sera examinée par des expériences de « quenching » de luminescence nous permettant ainsi de déterminer le meilleur complexe injecteur de charges.

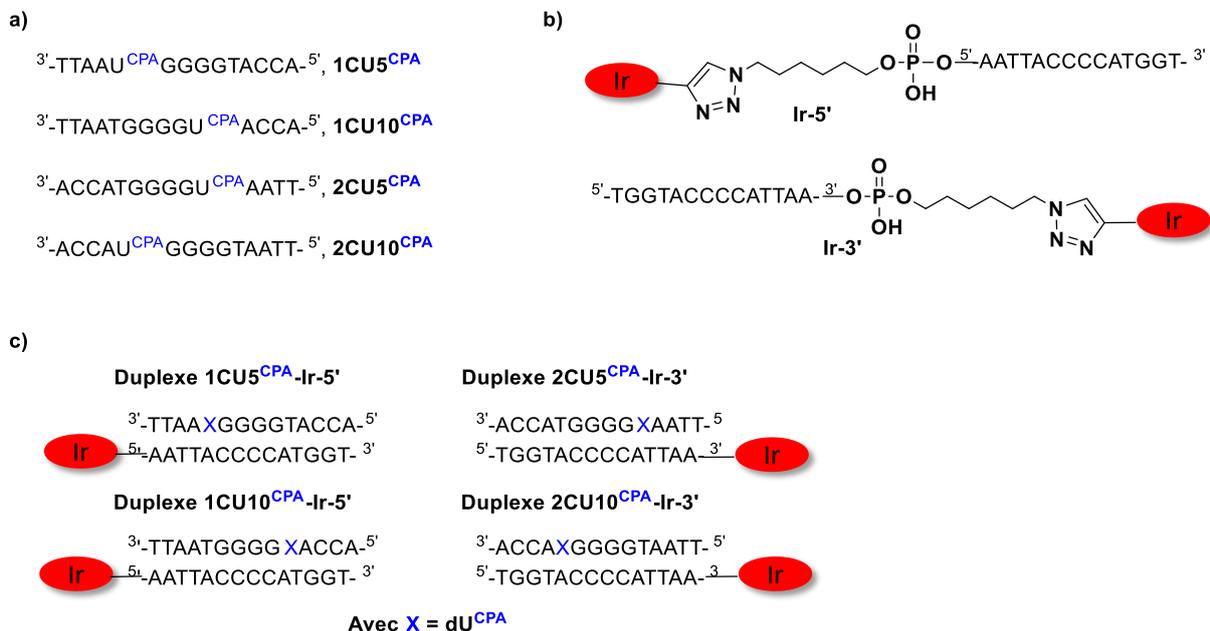
Parallèlement au développement de nouveaux injecteurs de charges, nous allons aussi développer une nouvelle sonde. Nous avons choisi de synthétiser la 5-cyclopropylamine-2'-désoxyuridine, dU<sup>CPA</sup> (Figure 2.4). En effet, la synthèse et l'utilisation de cette molécule comme sonde n'ont jamais encore été reportées dans la littérature. De plus, la modification à la position 5 de la 2'-désoxyuridine présente l'avantage (i) de ne pas perturber l'hybridation de la structure d'ADN et (ii) être facilement réalisable au laboratoire.



**Figure 2.4** : Structure de la sonde dU<sup>CPA</sup>.

Cette sonde est basée sur la 2'-désoxyuridine, produit de départ peu onéreux, permettant ainsi un accès facile à la préparation de cette sonde.

Une fois la sonde obtenue, nous allons l'incorporer sur oligonucléotide (**Figure 2.5 a**). De plus, la synthèse du brin complémentaire porteur du complexe d'iridium (III) sera réalisée (**Figure 2.5 b**) permettant l'accès à différentes structures d'ADN duplexe (**Figure 2.5 c**). Des séquences présentant quatorze nucléotides ont été envisagées afin de former des systèmes de duplexes avec un pas d'hélice complet. De plus, nous avons incorporé un enchainement de quatre G afin de se rapprocher d'une structure G-quadruplexe.

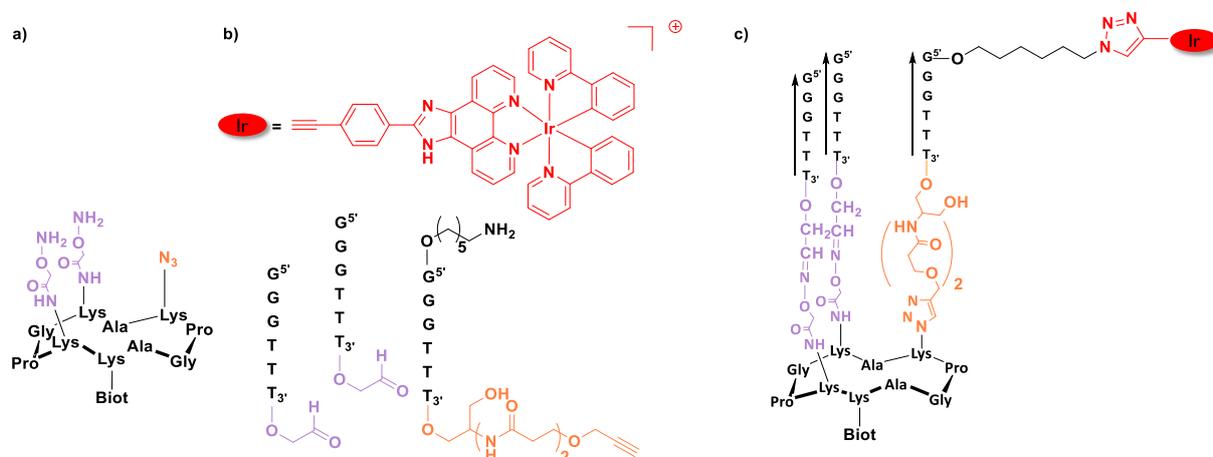


**Figure 2.5** : Représentation des oligonucléotides porteurs a) de la sonde, b) du complexe d'iridium, c) représentation schématique du duplexe d'ADN portant l'injecteur et l'accepteur de charge.

Une fois le duplexe d'ADN formé, des expériences de transferts de charges nous permettront de confirmer d'une part que le complexe d'iridium (III) est capable d'induire un transfert de charges et que d'autre part, la sonde est bien capable de détecter ce transport de charges. Ceci constituera ainsi notre preuve de concept. Nous utiliserons alors l'injecteur de charge ainsi que l'accepteur de charge pour nos expériences de transferts de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe.

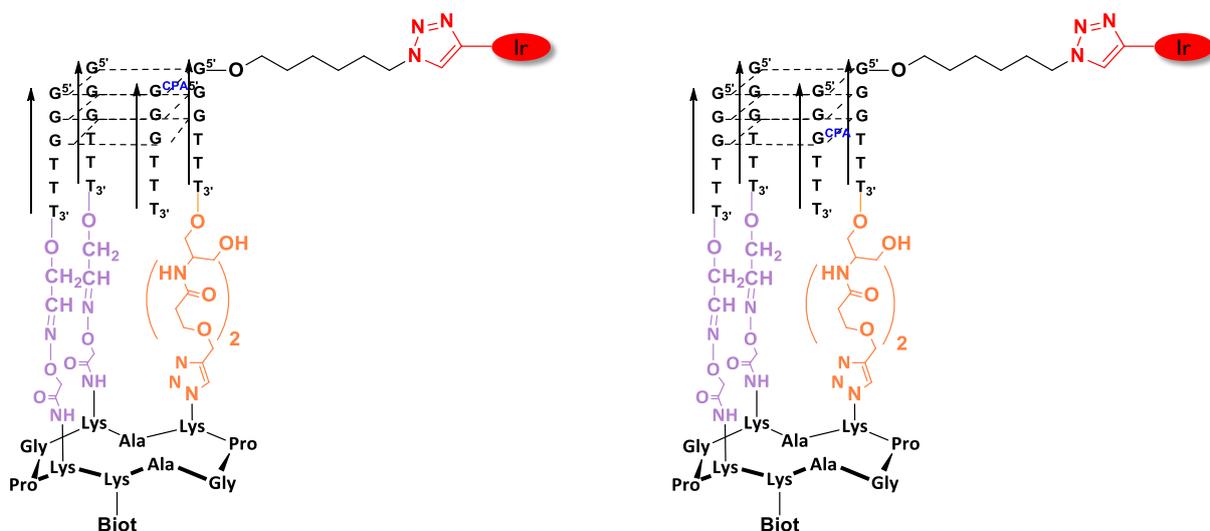
Concernant la synthèse des structures G-quadruplexe contraint, il nous faut préparer différents partenaires : (i) le châssis peptidique sur lequel seront ancrés les différents

oligonucléotides (**Figure 2.6 a**), (ii) les oligonucléotides qui vont permettre la formation du G-quadruplexe (**Figure 2.6 b**). Une fois les différents partenaires synthétisés, il nous faut alors assembler les partenaires pour former l'édifice précurseur (**Figure 2.6 c**). Pour des raisons de simplicité, les liaisons phosphodiester reliant l'oligonucléotide aux phosphoramidites modifiées sur les positions 3' ou 5' (voir **Figure 2.5 b**) ne seront plus explicitement représentées mais seront simplifiées par la suite par une simple liaison oxygène-ODN.



**Figure 2.6 :** a) structure d'un châssis peptidique envisagé, b) représentation schématique des oligonucléotides c) représentation schématique du système G-quadruplexe formé à partir des différents oligonucléotides et du châssis peptidique.

Une fois l'édifice précurseur préparé (**Figure 2.6 c**), l'ajout du quatrième brin porteur de la sonde dans des conditions structurantes permettra de former un G-quadruplexe à topologie contrôlée (**Figure 2.7**). Pour nos premières expériences de transferts de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe, nous avons opté pour l'utilisation d'une sonde déjà décrite dans la littérature, la dG<sup>CPA</sup>.<sup>72,81</sup>



**Figure 2.7 :** Structure du G-quadruplexe formé à partir du quatrième brin porteur de la sonde dG<sup>CPA</sup>.

Nous réaliserons les expériences de transferts de charges positives à partir de ces deux édifices G-quadruplexe de topologie parallèle.

Ce manuscrit de thèse se divise en trois parties. Le chapitre 3 présente la conception des complexes d'iridium (III) ainsi que de leurs caractérisations. Les propriétés photophysiques et

photochimiques de ces complexes d'iridium (III) ont été examinées afin d'évaluer leurs capacités à induire un transfert de charges au sein de l'ADN.

Le chapitre 4 se divise en deux sous-parties traitant : (i) de la préparation de systèmes d'ADN duplexes portant la nouvelle sonde ainsi que du complexe d'iridium (III) mentionné dans le chapitre 3. Pour cela, la synthèse de la nouvelle sonde en série 2'-désoxynucléoside ainsi qu'en série oligonucléotide sera abordée, suivie de la synthèse du brin complémentaire portant le complexe d'iridium (III). (ii) La synthèse de l'édifice G-quadruplexe précurseur en commençant par détailler la synthèse du châssis peptidique, suivi de la synthèse des divers oligonucléotides et pour finir l'assemblage de ces différents partenaires dans le but de former l'édifice désiré.

Le chapitre 5 est aussi divisé en deux sous-parties présentant : (i) des expériences de transferts de charges au sein de l'ADN duplexe afin de confirmer notre preuve de concept et (ii) des expériences de transferts de charges positives au sein de l'ADN G-quadruplexe de topologie parallèle en présence de la sonde dG<sup>CPA</sup>.

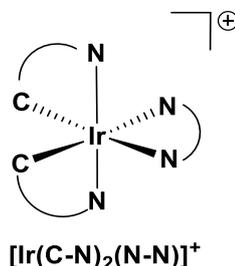
Le chapitre 6 clôtura par une conclusion générale ainsi que des perspectives de cette thèse.

Il est à noter que cette thèse, de trois ans, a été réalisée en collaboration étroite entre les universités Grenoble-Alpes et UCLouvain à Louvain-la-Neuve. Les manipulations sont donc réparties entre les deux laboratoires. La synthèse des complexes d'iridium (III), leurs caractérisations, les études photophysiques et photochimiques ainsi que les études de transfert de charges au sein des systèmes duplexes ont été réalisés à Louvain-la-Neuve. Tandis que le développement de la nouvelle sonde ainsi que la synthèse des différents oligonucléotides, des peptides, l'assemblage des oligonucléotides sur le châssis peptidique, leurs caractérisations, et les études de transferts de charges au sein du système G-quadruplexe ont été effectués à Grenoble.

## **Chapitre 3 : Synthèse et études de complexes d'iridium (III) comme injecteur de charges**

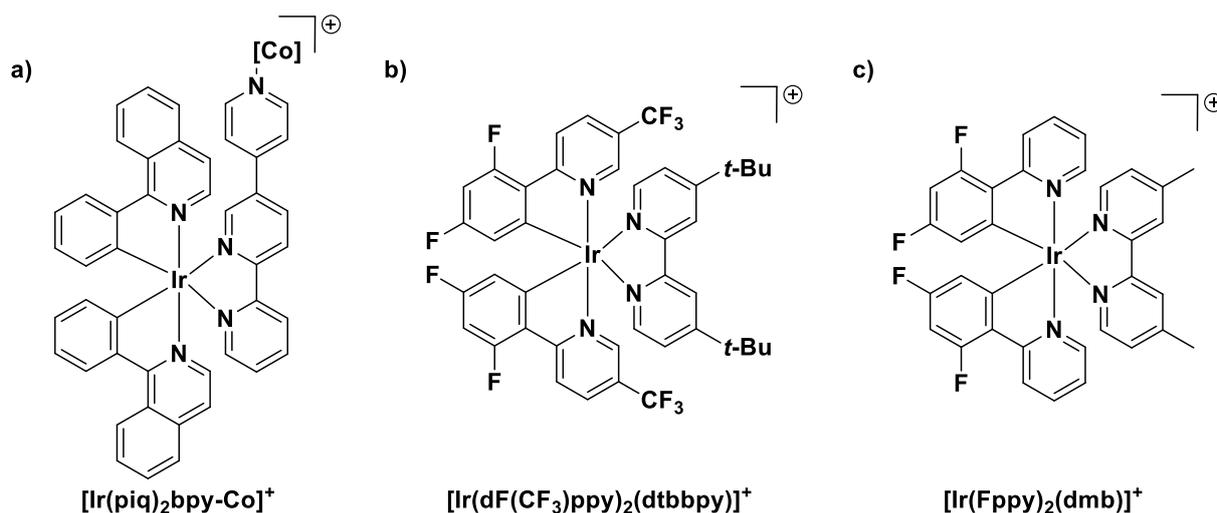
### 3.1. Introduction

Les complexes d'iridium (III) sont des composés présentant une variété de propriétés pouvant servir dans différents domaines. En effet, le centre métallique iridium peut se coordonner avec des atomes de carbone provenant de ligands cyclométallés et avec des atomes d'azote, issus de ligands diimine, formant ainsi un complexe hexacoordiné de type  $[\text{Ir}(\text{C-N})_2(\text{N-N})]^+$  (**Figure 3.1**).



**Figure 3.1** : Structure générale d'un complexe  $[\text{Ir}(\text{C-N})_2(\text{N-N})]^+$

Ce sont les ligands entourant l'atome d'iridium qui confèrent au complexe ses propriétés photophysiques et photochimiques. Ainsi, des complexes d'iridium(III) sont utilisés dans différentes applications telles que la photo-production de dihydrogène (**Figure 3.2 a**),<sup>89,90</sup> la photo-catalyse (**Figure 3.2 b**),<sup>91</sup> les OLEDs (**Figure 3.2 c**),<sup>92,108</sup> ou encore dans le domaine médical en tant que sonde biologique.<sup>109-111</sup>

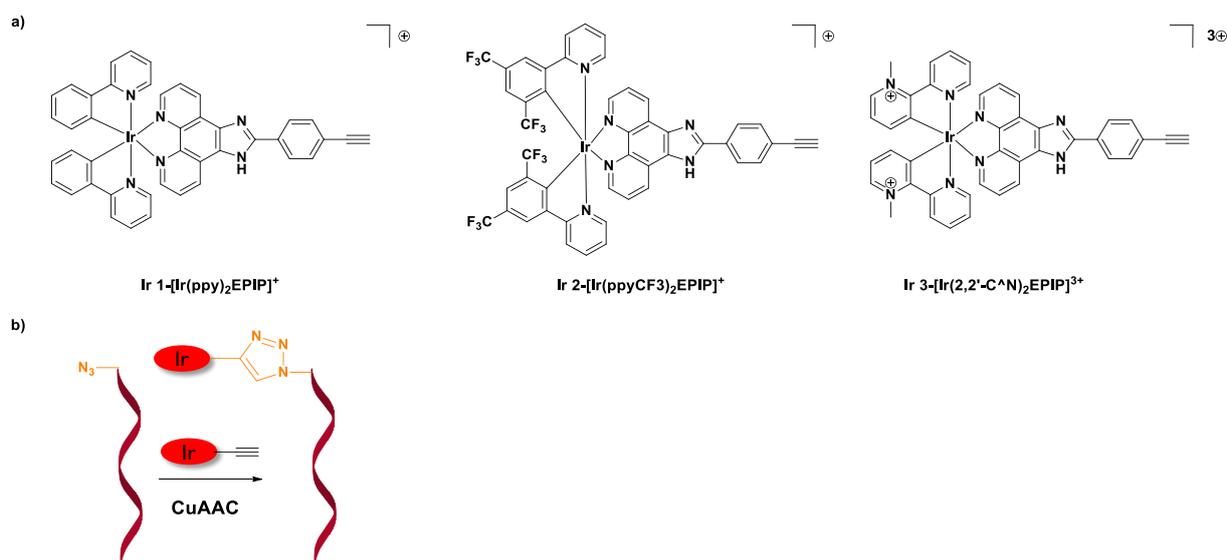


**Figure 3.2** : Exemples de complexes utilisés dans a) la photo-production de  $\text{H}_2$ ,<sup>89</sup> b) la photo-catalyse,<sup>91</sup> c) les OLEDs<sup>92</sup>.

Les complexes d'iridium(III) sont des candidats idéaux pour induire un transfert de charges au sein de l'ADN. En effet, ces derniers possèdent non seulement une bonne photo-stabilité mais sont aussi capables de jouer le rôle d'injecteur de charge positive (photo-oxydation) et de charge négative (photo-réduction) (Voir p. 41).<sup>78</sup> C'est pour cela que nous allons nous focaliser sur l'utilisation d'un complexe d'iridium (III) pour induire un transfert de charge au sein de l'ADN.

## 3.2. Objectifs

Ce chapitre présente la synthèse et la caractérisation de nouveaux complexes d'iridium (III), qui nous serviront d'injecteurs de charges dans l'étude de transferts de charges au sein de l'ADN. Pour cela, nous avons envisagé la préparation de trois complexes avec un pouvoir de photo-oxydation croissant, de **Ir 1** à **Ir 3**, en incorporant divers ligands  $\pi$  déficients (**Figure 3.3 a**). Nous nous sommes basés sur le complexe **Ir 1**, déjà décrit dans la littérature<sup>112</sup> pour la conception de complexes plus photo-oxydants. La fonction alcyne présente sur le ligand planaire du complexe, 2-[4-(2-éthynyl)phényl]-1H-imidazo[4,5-f][1,10]-phénanthroline (EPIP), permet de lier le complexe d'iridium à un oligonucléotide porteur d'une fonction azoture via l'utilisation d'une réaction de cyclo-addition catalysée par la cuivre (CuAAC) (**Figure 3.3 b**).



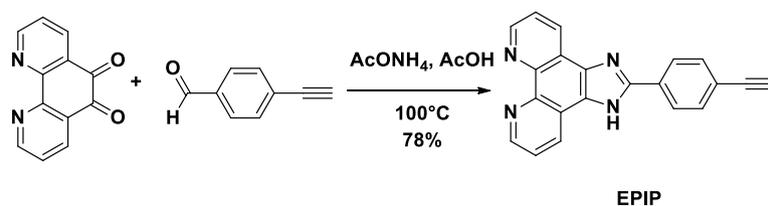
**Figure 3.3** : a) Structure des complexes d'iridium (III) **Ir 1-3**, b) Représentation schématique de la réaction de CuAAC entre le complexe et l'oligonucléotide.

Dans un premier temps, les complexes sont synthétisés et caractérisés par RMN du proton et par spectrométrie de masse. Ensuite, les études photophysiques et photochimiques permettent de compléter la caractérisation des nouveaux complexes d'iridium (III). Pour finir, une étude pour déterminer si les complexes sont capables d'oxyder une base nucléique.

## 3.3. Résultats

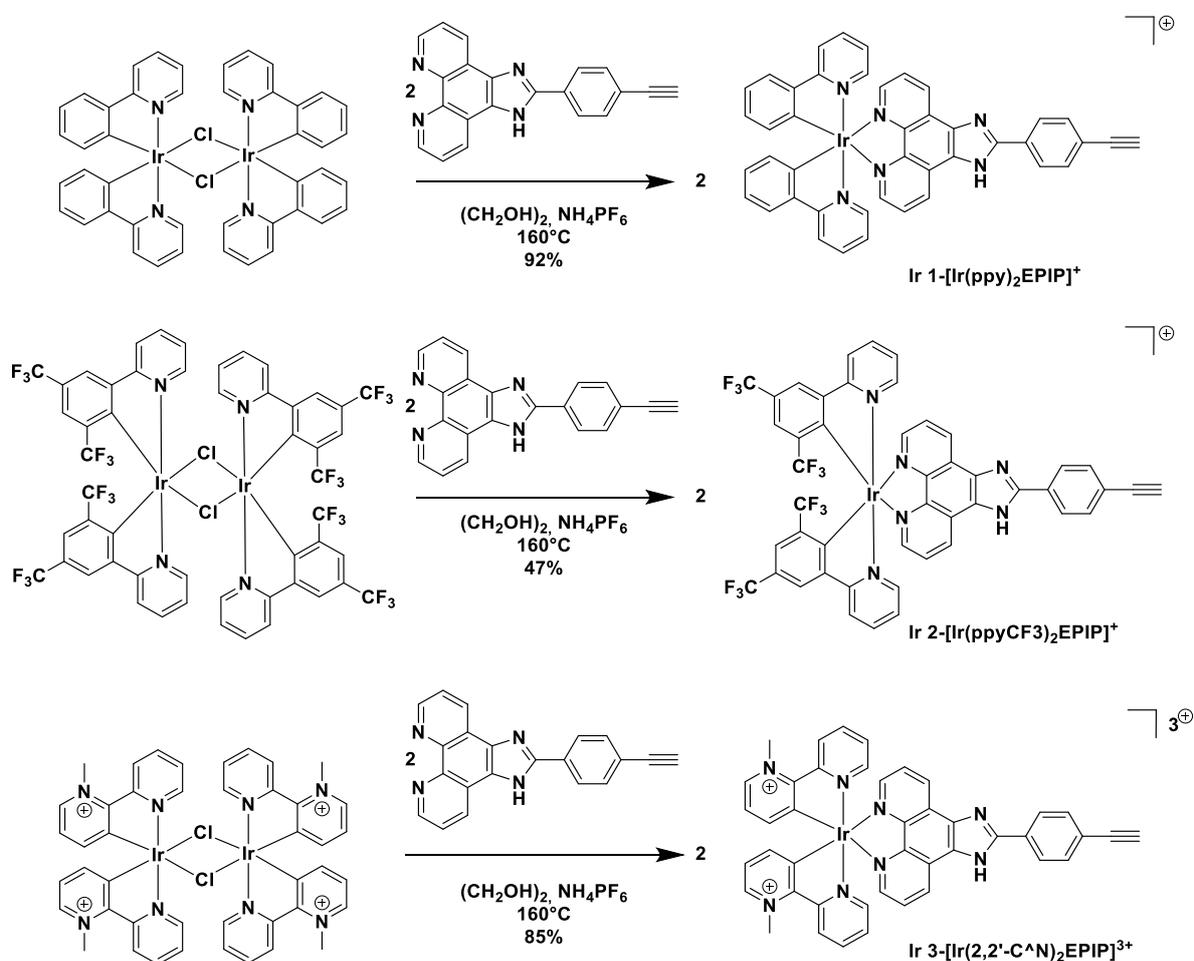
### 3.3.1. Synthèse des complexes d'iridium (III)

Le ligand quasi-planaire EPIP a été préparé par une réaction de condensation entre le 4-éthynylbenzaldéhyde et la 1,10-phénanthroline-5,6-dione dans un milieu ammoniacal selon le protocole de L. De Cola (**Schéma 3.1**).<sup>112</sup>



**Schéma 3.1** : Synthèse du ligand EPIP.

Les complexes **Ir 1-3** sont obtenus par une réaction de chélation entre le dimère précurseur  $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2\text{Cl}]_2$ , avec  $\text{C}^{\wedge}\text{N}$  représentant le ligand phénylpyridine (ppy), 2-(3,5-bis(trifluorométhyl)phényl)pyridine (ppyCF<sub>3</sub>) ou (2,2'-C<sup>+</sup>N) représentant le ligand N-méthylphénylpyridine et le ligand planaire EPIP (**Schéma 3.2**). La chélation est réalisée à 160°C dans l'éthylène glycol et à l'obscurité sous argon pour éviter la photo-déchélation ou l'oxydation des ligands par l'oxygène de l'air ambiant. Les complexes synthétisés sont soit purifiés par des cycles de lavages à l'eau, puis à l'éthanol et pour finir à l'éther diéthylique, soit purifiés sur colonne chromatographique de silice avec comme éluant une solution de H<sub>2</sub>O/KNO<sub>3</sub> sat/CH<sub>3</sub>CN - 1/1/7, pour la purification du complexe **Ir 3**. Dans les deux cas, les complexes sont obtenus sous forme de sel d'hexafluorophosphate. Ces derniers ont été caractérisés par RMN du proton, spectrométrie de masse HRMS et par des analyses UV-visible, voltampérométrie cyclique ainsi que par des études photochimiques.



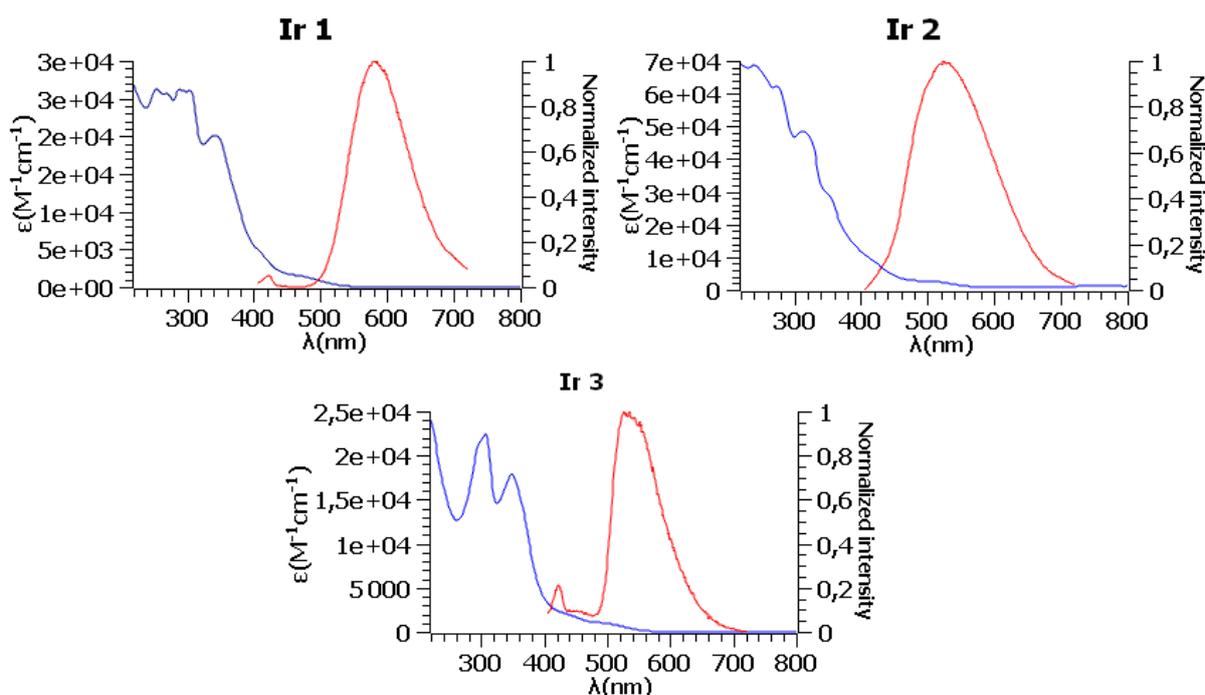
**Schéma 3.2** : Synthèse des complexes **Ir 1-3**.

La chélation du ligand diimine sur le centre métallique peut être prouvée par une analyse du spectre RMN du proton. En effet, un singulet blindé correspondant au signal du proton de l'alcyne est détecté à  $\delta$  3.20 ppm pour **Ir 1** (dans le  $\text{CDCl}_3$ ), 3.51 ppm pour **Ir 2** (dans le  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) et 2.21 ppm pour **Ir 3** (dans le  $\text{D}_2\text{O}$ ). De plus, par la symétrie axiale du complexe d'iridium, les signaux comptent pour deux protons. Les expériences par spectroscopie de corrélation COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ont permis d'attribuer sans ambiguïté les signaux aux protons du complexe d'iridium (III) (Voir partie expérimentale p.77).

### 3.3.2. Etudes des complexes d'iridium (III)

#### 3.3.2.1. Propriétés de luminescence et d'absorption

Les propriétés photophysiques des complexes **Ir 1-3** ont été évaluées dans l'eau et l'acétonitrile. Les spectres d'absorption et d'émission dans l'acétonitrile à 298 K sont représentés dans le **Figure 3.4**. Les données spectroscopiques sont résumées dans le **Tableau 3.1**.



**Figure 3.4 :** Spectres d'absorption (en bleu) et d'émission (en rouge) des complexes **Ir 1-3** dans l'acétonitrile.

Les complexes **Ir 1-3** présentent des bandes d'absorptions intenses dans la région de l'UV (250 à 380 nm) avec des coefficients d'extinctions molaires élevés ( $\epsilon > 20\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). En comparant avec la littérature<sup>112-114</sup> et aux spectres d'absorption des ligands libres, ces bandes correspondent aux transitions centrées sur les ligands (LC). Les transitions CT (*charge transfer*) sont observées à plus basse énergie ( $\lambda > 380 \text{ nm}$ ), avec des coefficients d'extinction molaire plus faible ( $\epsilon < 20\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La nature de ces transitions n'est pas définie de façon certaine, en effet, ces dernières consistent en un mélange de transitions MLCT (Metal to Ligand Charge Transfer) et de transitions LLCT (Ligand to Ligand Charge Transfer).<sup>115</sup> En ce qui concerne les complexes portant des ligands de type C<sup>N</sup> bpy-Me (**Ir 3**), c'est un mélange de transitions MLCT et de transitions LC (Ligand Centered) qui est observé.<sup>113</sup> Ces transitions impliquent le métal et le ligand C<sup>N</sup> comme donneur d'électron tandis que le ligand N<sup>N</sup> (EPIP) agit comme accepteur d'électron. Ce mélange de transitions est aussi désigné par le terme « Metal-Ligand to Ligand Charge Transfer » (MLLCT).<sup>115</sup>

Complexe	$\lambda_{\text{Abs}} (\epsilon)^a$	$\lambda_{\text{Em}}^b$		$\Phi_{\text{em}}^c$	$\tau (\text{ns})^d$		$k_r (\text{s}^{-1})^e$
	$\text{CH}_3\text{CN}$	$\text{H}_2\text{O}$	$\text{CH}_3\text{CN}$		$\text{CH}_3\text{CN}$	$\text{CH}_3\text{CN}$	
<b>Ir 1</b>	470 (1.5)	576	585	0,0750	70 (330)	78 (84)	1,07E+06
<b>Ir 2</b>	518 (2.4)	595	526	0,0110	212 (800)	109 (161)	5,19E+04
<b>Ir 3</b>	500 (0.92)	529	527	0,0169	33 (68)	136 (146)	5,12E+05

<sup>a</sup>  $\lambda$  en nm pour l'absorption la plus bathochrome dans l'acétonitrile (coefficient d'extinction molaire,  $\epsilon \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). <sup>b</sup>  $\lambda$  en nm à température ambiante dans l'eau et l'acétonitrile. <sup>c</sup> Rendement quantique d'émission mesuré par rapport à la référence Quinine, sous air, excitation à 375 nm, erreurs estimées à 10%. <sup>d</sup> Durées de vie de luminescence mesurées sous air ou sous argon (entre parenthèses). <sup>e</sup> Constante de désexcitation radiative calculée sous air.

**Tableau 3.1** : Données d'absorption et de luminescence des complexes **Ir 1-3**.

Le complexe **Ir 1** présente une luminescence dans la région orange du spectre visible, semblable à ce qui est observé dans la littérature.<sup>112,116</sup> Le déplacement hypsochrome d'émission observé dans l'acétonitrile de **Ir 1** à **Ir 2** et **Ir 3** peut être expliqué par la stabilisation de la HOMO (« highest occupied molecular orbital »), orbitale principalement centrée sur le métal et fortement stabilisée par les groupements électroattracteurs portés par les ligands. La durée de vie de luminescence ( $\tau$ ) augmente lorsque l'on passe de l'air à l'argon dans l'acétonitrile. Ceci suggère ainsi la capacité des complexes à « photosensibiliser » l'oxygène triplet (dissout dans l'acétonitrile) en oxygène singulet.

### 3.3.2.2. Etudes électrochimiques

Les potentiels d'oxydation et de réduction des complexes **Ir 1-3** ont été déterminés par voltampérométrie cyclique dans l'acétonitrile désoxygéné, les données sont regroupées dans le **Tableau 3.2** et les voltampérogrammes sont reportés dans la partie « Supporting Information » 3.6.4

Complexe	$E_{\text{ox } 1/2}$	$E_{\text{ox}}^*{}^a$	$E_{\text{red } 1/2}$	$E_{\text{red}}^*{}^a$
<b>Ir 1</b>	1.36	-0.76	-1.59	0.54
<b>Ir 2</b>	>2	<i>n.d.*</i>	-1.45	0.90
<b>Ir 3</b>	>2	<i>n.d.*</i>	-0.68	1.68

Mesures réalisées à température ambiante dans l'acétonitrile désoxygéné avec une solution 0,1 M  $\text{Bu}_4\text{NClO}_4$  agissant comme électrolyte support (V versus Ag/AgCl électrode de référence). <sup>a</sup> Potentiel de l'état excité estimé à partir des équations  $E_{\text{ox}}^* = E_{\text{ox } 1/2} - E^{0-0}$  et  $E_{\text{red}}^* = E_{\text{red } 1/2} + E^{0-0}$ . L'énergie de l'état excité  $E^{0-0}$  est assimilée au maximum du spectre d'émission dans l'acétonitrile à 298 K. *n.d.\** : non déterminé à cause de l'impossibilité de mesurer  $E_{\text{ox}}$  à l'état fondamental.

**Tableau 3.2** : Données électrochimiques de **Ir 1-3** (V versus Ag/AgCl).

Le complexe **Ir 1** présente une vague d'oxydation réversible qui correspond, sur base de comparaison avec des données de la littérature, à l'oxydation du fragment Ir-phénylpyridine.<sup>117</sup> En ce qui concerne **Ir 2** et **Ir 3**, aucune oxydation n'a été détectée en dessous de 2 V *versus* Ag/AgCl, due à la présence des groupements capteurs trifluorométhyle et pyridinium respectivement, stabilisant l'orbitale HOMO des complexes et par conséquent, rendant les complexes plus difficiles à oxyder.<sup>114,116</sup> En ce qui concerne la réduction, la première vague de réduction est centrée sur le ligand EPIP. Les vagues de réduction suivantes présentes pour les complexes **Ir 2** et **Ir 3**, (voir **Supporting Information 3.6.4** p.91) correspondent à la réduction successive des ligands  $\pi$  déficients.<sup>113,118</sup> Par ailleurs, le déplacement anodique de **Ir 1** à **Ir 2** et **Ir 3** est cohérent avec la présence de groupement électroattracteurs sur le ligand ancillaire.

Au vu de ces études électrochimiques, nous pouvons affirmer que le fragment Ir-C<sup>N</sup> contribue à l'orbitale HOMO, permettant ainsi d'attribuer la transition MLLCT à la transition  $d\pi_{(Ir-C^N)} \rightarrow \pi^*_{(N^N)}$ .

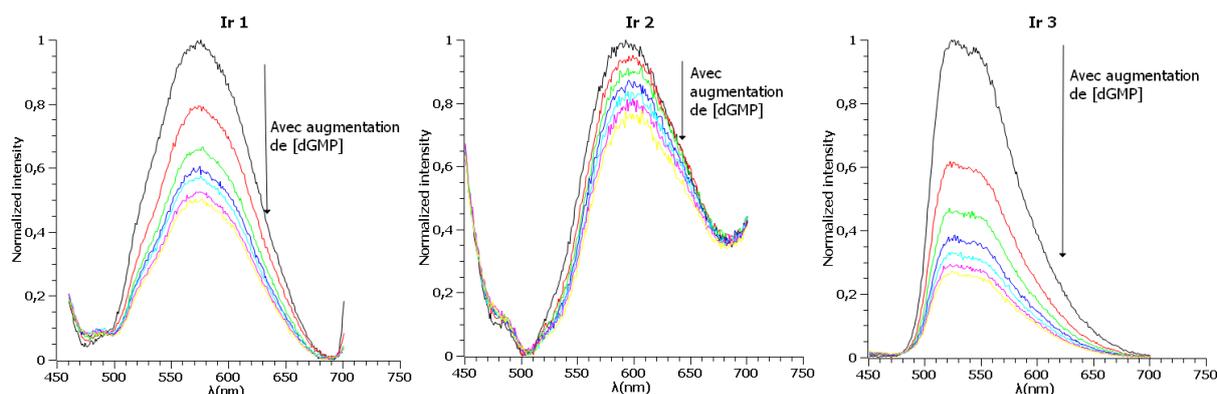
A partir des mesures de voltampérométrie et des données spectroscopiques, les potentiels de réduction et d'oxydation à l'état excité peuvent être estimés. En analysant ces valeurs, le pouvoir photo-oxydant ( $E^*_{red}$ ) augmente de **Ir 1** à **Ir 3**, en accord avec la présence de groupements électroattracteurs.

### 3.3.2.3. Etudes de photo-réactivité

A travers ces études, la capacité des complexes à « photo-abstraire » un électron d'un substrat donné sera examinée. Dans un premier temps, la 2'-déoxyguanosine-5'-monophosphate (dGMP) sera utilisée comme donneur d'électron car la guanine est la base la plus facilement oxydable de l'ADN ( $E_{ox} = 1.10$  V *versus* Ag/AgCl).<sup>119</sup> Cela nous permettra d'évaluer la capacité du complexe à induire un transfert de charge positive (« electron hole » en anglais) au sein de l'ADN. Dans un second temps, l'ascorbate de sodium sera utilisé pour jouer le rôle de donneur d'électron. En effet, il est connu que l'ascorbate de sodium peut subir une photo-oxydation par un complexe d'iridium à l'état excité, formant ainsi un complexe Ir mono-réduit.<sup>77</sup>

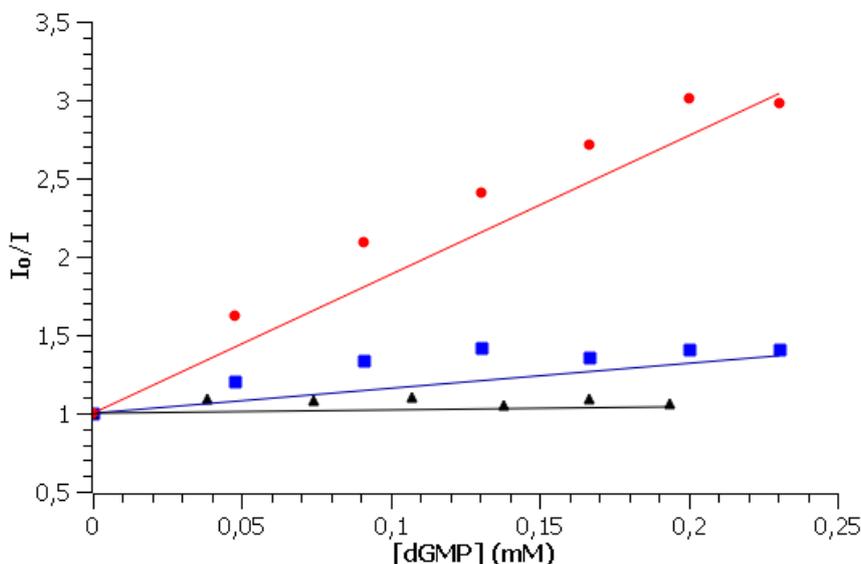
#### a. Evolution de la luminescence en présence de concentration croissante en dGMP

Une expérience d'inhibition de la luminescence (« quenching ») est réalisée afin d'évaluer la capacité des complexes à « photo-abstraire » un électron de la dGMP. La **Figure 3.5** montre une diminution de l'intensité d'émission des complexes **Ir 1** et **Ir 3** lorsque la concentration en dGMP dans le milieu augmente.



**Figure 3.5 :** Evolution de la luminescence des complexes **Ir 1-3** avec une concentration croissante de dGMP (allant de 0 à 0.23 mM), longueur d'onde d'excitation : 375 nm, concentration des complexes : 50  $\mu$ M dans le tampon Tris HCl (50 mM à pH 7.4).

Une relation linéaire de type Stern-Volmer est obtenue à partir de ces données, suggérant un « quenching » dynamique de l'état excité des complexes **Ir 1** et **Ir 3** en présence de dGMP (**Figure 3.6**).



**Figure 3.6 :** Droite de Stern-Volmer obtenues lors de l'addition de quantité croissante de dGMP au complexes **Ir 1** (bleue), **Ir 2** (noir) et **Ir 3** (rouge).

En considérant le potentiel d'oxydation à l'état excité de **Ir 3** et en utilisant l'équation empirique de Rehm-Weller, le processus d'oxydation (**Equation 3.1**) de la dGMP par l'état excité du complexe est supposé exergonique de 0.64 eV (**Tableau 3.3**). Il est donc raisonnable d'attribuer le processus d'inhibition de la luminescence à un transfert d'électron photo-induit (PET : *photo-induced electron transfer*) entre la dGMP et le complexe (**Equation 3.1**).



**Equation 3.1**

Les constantes cinétiques de « quenching »  $k_q$  obtenues pour les trois complexes à partir de la relation de Stern-Volmer sont reprises au **Tableau 3.3**. Les complexes **Ir 1** et **Ir 3** possèdent une constante cinétique du même ordre de grandeur, c'est-à-dire aux alentours de  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , tandis que la constante de « quenching » du complexe **Ir 2** est un ordre de grandeur plus petite. Bien que l'équation empirique de Rehm-Weller indique que le processus de PET entre la dGMP et le complexe **Ir 1** est supposé endergonique, la haute valeur de  $k_q$  (proche de la limite de diffusion) obtenue prouve que ce processus a lieu avec une bonne efficacité. De plus, le processus de PET entre la dGMP et le complexe **Ir 3** est aussi très efficace comme le montre la haute valeur de  $k_q$  (elle également très proche de la limite de diffusion) ainsi que par l'exergonicité du processus de PET. Par contre le transfert d'électron photo-induit entre la dGMP et le complexe **Ir 2** semble non seulement limité par la thermodynamique ( $\Delta G_{\text{PET}} > 0$ ) mais aussi par la diffusion de la dGMP vers le complexe **Ir 2**.

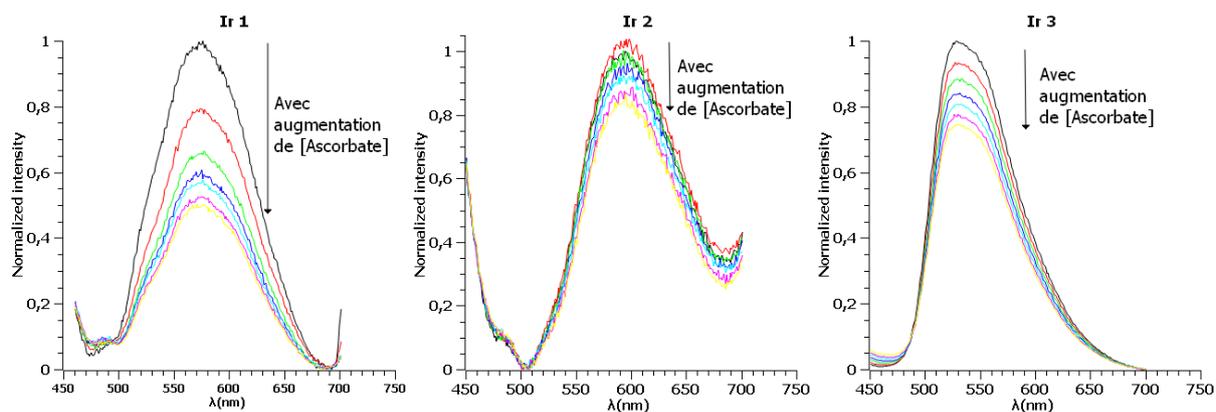
Complexe	$k_q^a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$\Delta G_{PET}^b$ (eV)
<b>Ir 1</b>	1.85E+10	0.50
<b>Ir 2</b>	1.46E+09	0.13
<b>Ir 3</b>	3.94E+10	-0.64

<sup>a</sup> La constante de « quenching »,  $k_q$ , est obtenue à partir de l'équation de Stern-Volmer  $I_0/I = 1 + k_q\tau_0[Q]$ , avec  $I_0$ , l'intensité de luminescence au maximum d'émission en l'absence de « quencher », ici le dGMP,  $I$ , l'intensité de luminescence au maximum d'émission en présence du « quencher » et  $\tau_0$ , le temps de vie de l'état excité du complexe en l'absence du « quencher » mesuré dans une solution aqueuse sous air et  $[Q]$  la concentration de « quencher ». <sup>b</sup> L'exergonicité du PET déduit de l'équation de Rehm-Weller  $\Delta G = E_{ox\ dGMP} - E_{red\ complexe} - E^{0-0}_{complexe} - 0,06$  ( $E_{ox\ dGMP} = 1.1\ V$ )<sup>119</sup>,  $E^{0-0} = \pm hc/\lambda_{Em}$

**Tableau 3.3** : Constante de « quenching » des complexes **Ir 1-3** avec le dGMP et les paramètres thermodynamiques de PET entre les complexes et le dGMP.

### b. Titrage en luminescence en présence d'ascorbate de sodium

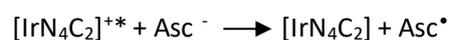
Une expérience de « quenching » de luminescence a été réalisée cette fois ci en présence d'ascorbate de sodium (**Figure 3.7**).



**Figure 3.7** : Titration en luminescence des complexes **Ir 1-3** avec une concentration croissante d'ascorbate de sodium (allant de 0 à 0.23 mM), longueur d'onde d'excitation : 375 nm, concentration des complexes : 50  $\mu$ M dans le tampon Tris HCl (50 mM à pH 7.4).

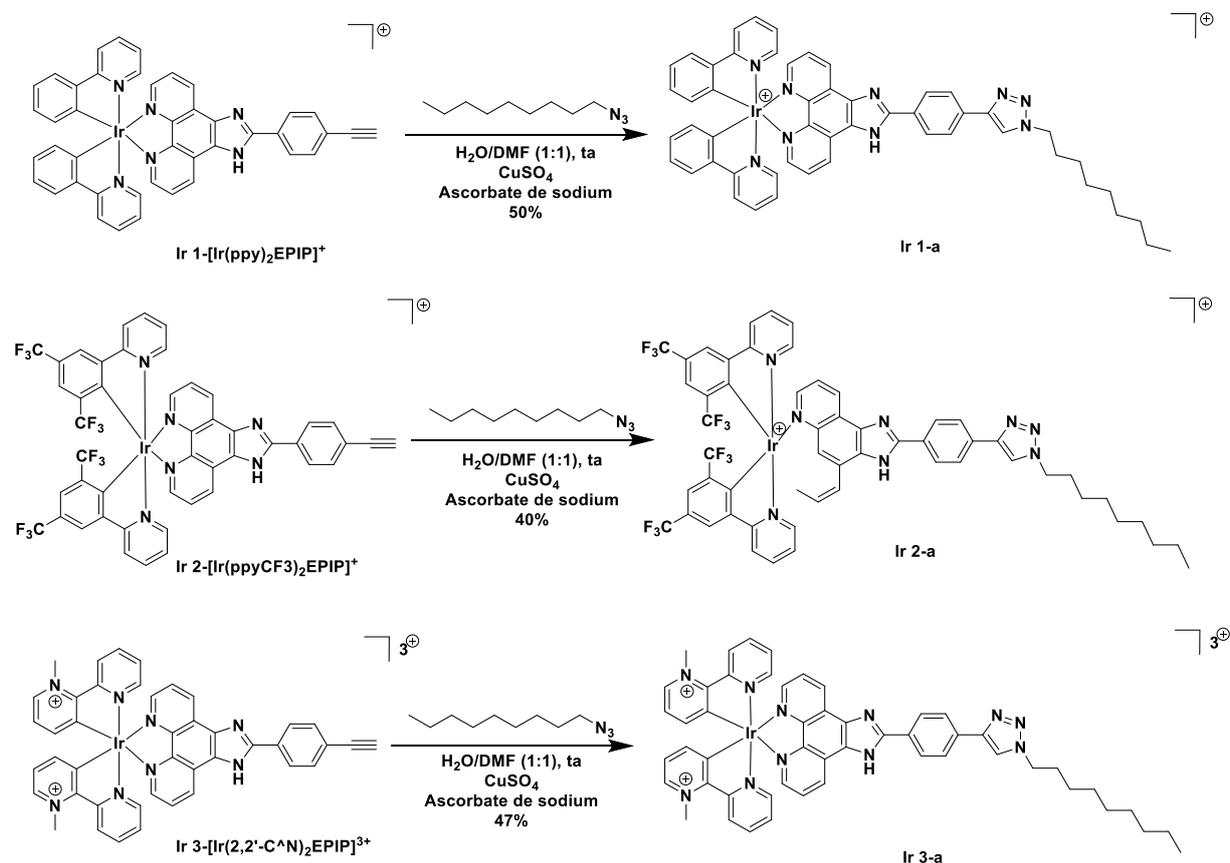
A travers ces expériences, nous observons que la luminescence du complexe **Ir 1** diminue fortement avec une concentration croissante d'ascorbate de sodium. Tandis que la luminescence des complexes **Ir 2** et **Ir 3** diminuent légèrement.

En suivant la même méthodologie qu'en présence de dGMP, le processus de PET pour les trois complexes est supposé exergonique (**Tableau 3.4**) et peut être résumé par l'équation suivante :





dans un mélange eau/diméthylformamide (1:1). (**Schéma 3.4**). Après une nuit de réaction et purification sur colonne chromatographique de silice, les « complexes triazolyles » sont obtenus avec un rendement d'environ 50%. Ces « complexes triazolyles » ont été caractérisés par RMN du proton et spectroscopie UV-visible.

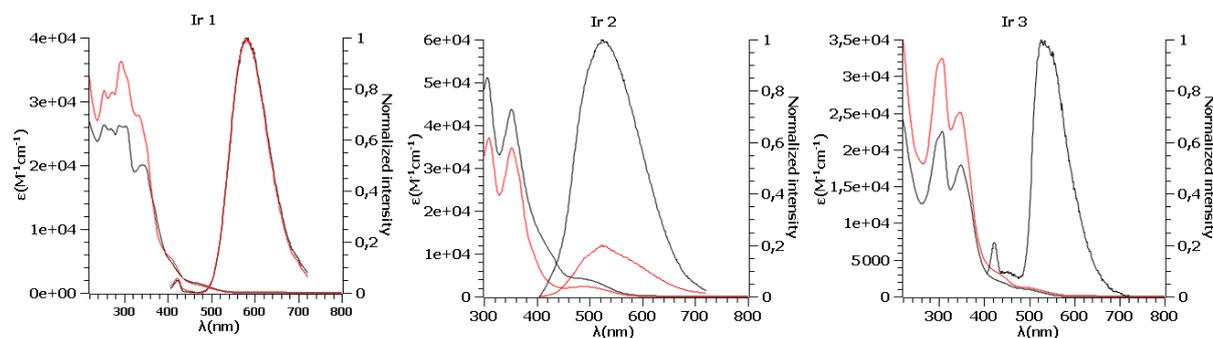


**Schéma 3.4** : Synthèse des « complexes triazolyles » à partir des complexes porteurs de la fonction alcyne.

Les spectres RMN du proton (voir partie expérimentale p.81-82) permettent de confirmer que la réaction a bien eu lieu entre l'alcyne du complexe d'iridium (III) et la fonction azoture de l'azidononane. En effet, la présence des protons aliphatiques du groupement méthyle (dont le pic intègre pour trois protons) et la présence d'un multiplet correspondant aux douze protons de la chaîne aliphatique aux alentours de 1 ppm indiquent bien la formation des trois « complexes triazolyles ».

### 3.3.3.2. Comparaison des spectres d'absorption et d'émission

Les spectres d'absorption et d'émission des complexes **Ir 1-Ir 3** et des « complexes triazolyles » correspondants **Ir1-a-Ir3-a** ont été enregistrés dans l'acétonitrile à température ambiante. La **figure 3.8** illustre la comparaison des spectres d'absorption et d'émission des complexes **Ir 1**, **Ir 2** et **Ir 3**, en noir avec les complexes **Ir 1-a**, **Ir 2-a** et **Ir 3-a**, en rouge.



**Figure 3.8 :** Comparaison des spectres d'absorption avec l'échelle des coefficients d'extinction molaire à gauche et l'échelle des intensités normalisées pour le spectre d'émission à droite. Les courbes en noires correspondent aux complexes de départ et les courbes en rouges aux « complexes triazolyles ».

Concernant les spectres d'absorption, les valeurs des coefficients d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) des complexes **Ir 1** et **Ir 3** augmentent par l'incorporation du groupement cyclique triazole. Alors que d'une façon étonnante, ceux du complexe **Ir 2** diminuent après formation du motif triazole.

Pour les spectres d'émission, on n'observe pas de différence d'intensité entre le spectre d'émission du complexe **Ir 1-a** et **Ir 1**. Par contre, un phénomène de « quenching » de luminescence est observé pour le complexe **Ir 2** après la formation du lien triazole. En effet, l'intensité d'émission du « complexe triazolyle » **Ir 2-a** est réduit jusqu'à atteindre environ 20% de l'intensité initiale du complexe **Ir 2**. En ce qui concerne le complexe **Ir 3**, un « quenching » de luminescence total est observé après la formation du lien triazole.

La comparaison des rendements quantique de luminescence des complexes portant le groupement alcyne (**Ir 1-3**) avec les « complexes triazolyles » (**Ir 1-a** à **Ir 3-a**) nous permet de vérifier les résultats obtenus par les études photophysiques (**Tableau 3.5**). Nous constatons ainsi que le rendement quantique de luminescence du complexe **Ir 1-a** est similaire à celui de **Ir 1**. Alors que les rendements quantiques de luminescence des complexes **Ir 2-a** et **Ir 3-a** diminuent drastiquement par rapport aux rendements quantique de luminescence des complexes de références **Ir 2** et **Ir 3** respectivement.

Complexe	$\Phi_{em}^a$	Complexe	$\Phi_{em}^a$
<b>Ir 1</b>	0.0075	<b>Ir 1-a</b>	0.0071
<b>Ir 2</b>	0.0011	<b>Ir 2-a</b>	0.00033
<b>Ir 3</b>	0.0017	<b>Ir 3-a</b>	0.00020

<sup>a</sup> Rendement quantique d'émission mesuré par rapport à la référence Quinine, sous air, excitation à 375 nm, erreurs estimées à 10%.

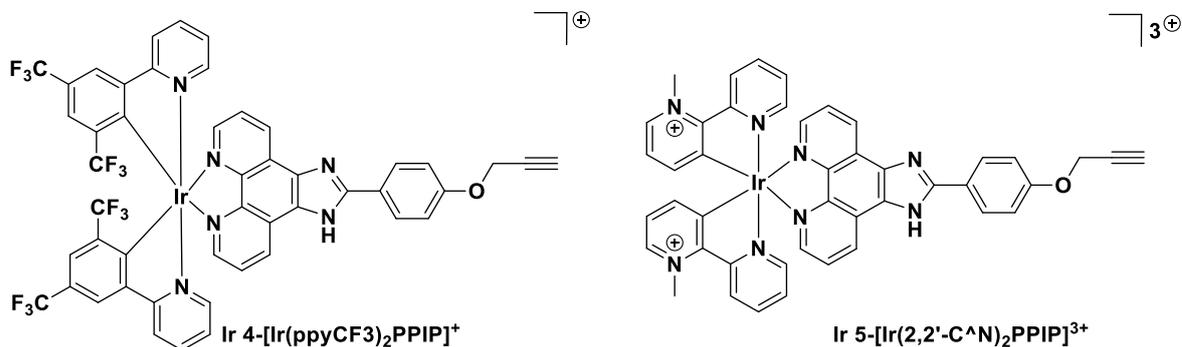
**Tableau 3.5 :** Comparaison des valeurs de rendement quantique de luminescence des complexes **Ir 1-3** par rapport aux complexes **Ir 1-a** à **Ir 3-a**.

Nous supposons alors que l'état excité des complexes **Ir 2-a** et **Ir 3-a** se désexcitent par un transfert d'électron de la partie triazole vers le centre métallique. L'hypothèse retenue est que cette désexcitation non radiative est rendue favorable par le fait que les électrons sont délocalisés sur tout le ligand PIP.

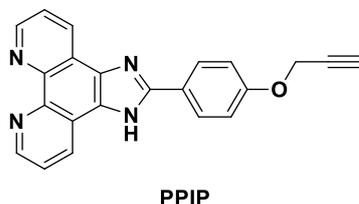
Afin de montrer que ce phénomène d'inhibition de luminescence est causé par la délocalisation des électrons du ligand PIP, nous avons envisagé de réduire la délocalisation en

introduisant un groupement méthyle entre la fonction alcyne et le noyau aromatique du ligand PIP. Les 2 complexes suivants **Ir 4** et **Ir 5** (**Figure 3.9 a**), ont été envisagé à partir des précurseurs  $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2\text{Cl}]_2$  avec  $(\text{C}^{\wedge}\text{N})$  les ligands (ppyCF<sub>3</sub>) ou (2,2'-C<sup>^</sup>N), décrits précédemment et un nouveau ligand : 2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phényl)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]phénanthroline (PPIP) (**Figure 3.9 b**).

a)



b)



**Figure 3.9** Structures a) des nouveaux complexes proposés b) du nouveau ligand PPIP.

### 3.3.3.3. Détermination de l'origine de l'extinction de luminescence observée

La synthèse du ligand PPIP est décrite dans le **schéma 3.5**. Dans un premier temps, la préparation de la molécule 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldéhyde, précurseur de la PPIP, a été nécessaire. Pour cela, la réaction entre deux produits commerciaux 4-hydroxybenzaldéhyde et bromure de propargyle est réalisées en présence de carbonate de potassium dans l'acétone à 50°C. Après une nuit de réaction, une purification sur colonne chromatographique de silice est réalisée.<sup>121</sup> Pour finir, une condensation entre la 1,10-phénanthroline-5,6-dione et la 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldéhyde dans les mêmes conditions que celles décrites pour la synthèse de EPIP est réalisée, formant ainsi le ligand 2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phényl)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]phénanthroline (PPIP) avec un rendement de 72% (**Schéma 3.5**). Une caractérisation par RMN du proton nous permet confirmer la formation du ligand PPIP par l'apparition d'un doublet à 4.93 ppm correspondant aux protons du CH<sub>2</sub> en α de l'oxygène ainsi par le signal de l'alcyne vrai à 3.64 ppm, en plus des pics caractéristiques de la partie phénanthroline (9.03 ppm, 8.92 ppm et 7.83 ppm). Ce nouveau ligand a aussi été caractérisé par HRMS (voir partie expérimentale p.83).

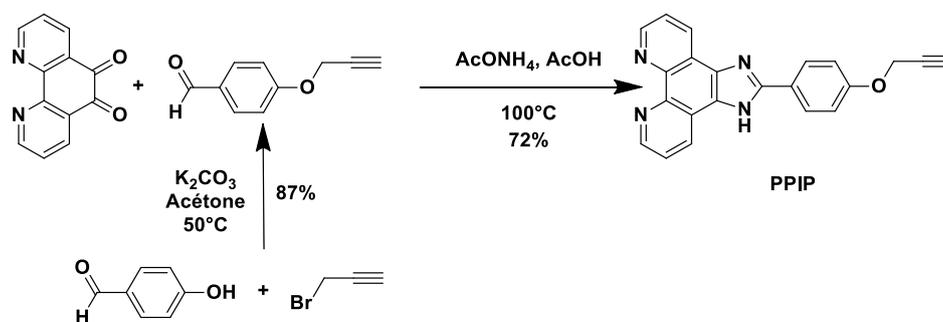


Schéma 3.5 : Synthèse du ligand PPIP.

Une fois le ligand PPIP obtenu, nous avons alors formé les complexes **Ir 4** et **Ir 5** par chélation du ligand PPIP avec les dimères  $[\text{Ir}(\text{CF}_3\text{ppy})_2\text{Cl}]_2$  et  $[\text{Ir}(2,2'\text{-C}^{\wedge}\text{N})_2\text{Cl}]_2$  respectivement (Schéma 3.6). De manière similaire aux complexes précédents, une analyse du spectre RMN du proton nous a permis de confirmer la formation de ces nouveaux complexes **Ir 4** et **Ir 5**. En plus des pics caractéristiques des ligands ancillaires (e.g. les deux singulets à  $\delta$  8.73 ppm et 7.73 ppm situés en position  $\alpha$  du groupement  $\text{CF}_3$  du complexe **Ir 4** et le singulet à  $\delta$  4.72 ppm correspondant au groupement méthyle du complexe **Ir 5**), les pics caractéristiques du ligand PPIP sont aussi observés sur le spectre RMN du proton des nouveaux complexes : les pics des protons du groupement  $\text{CH}_2$  à  $\delta$  4.43 ppm pour **Ir 4** et 4.03 ppm pour **Ir 5** et le pic de l'alcyne vrai à  $\delta$  3.37 ppm et 3.17 ppm pour les complexes **Ir 4** et **Ir 5** respectivement.

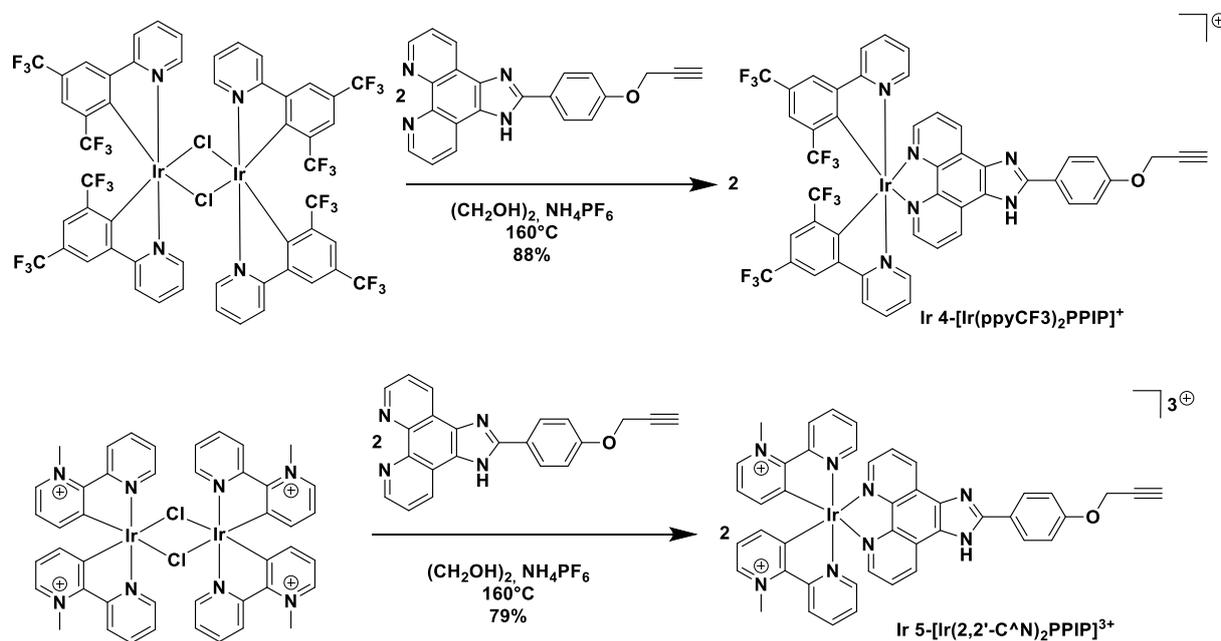


Schéma 3.6 : Synthèse des complexes **Ir 4** et **Ir 5**.

De la même manière que pour les complexes précédents, des études photophysiques ont été entreprises afin de caractériser les nouveaux complexes synthésés. Ces données sont regroupées dans le tableau ci-dessous (Tableau 3.6). Il est à noter que complexe **Ir 4** est insoluble dans l'eau, expliquant pourquoi les mesures n'ont pas été réalisées dans l'eau.

Complexe	$\lambda_{\text{Abs}} (\epsilon)^a$	$\lambda_{\text{Em}}^b$		$\Phi_{\text{em}}^c$	$\tau (\text{ns})^d$		$k_r (\text{s}^{-1})^e$
	CH <sub>3</sub> CN	H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>3</sub> CN	CH <sub>3</sub> CN	H <sub>2</sub> O	CH <sub>3</sub> CN
<b>Ir 4</b>	426 (3.6)	<i>n.d.*</i>	524	0.00283	140 (598)	<i>n.d.*</i> <i>n.d.*</i>	2.02E+04
<b>Ir 5</b>	470 (3.5)	570	565	0.0122	263 (541)	222 (236)	4.56E+04

<sup>a</sup>  $\lambda$  en nm pour l'absorption la plus bathochrome dans l'acétonitrile (coefficient d'extinction molaire,  $\epsilon \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). <sup>b</sup>  $\lambda$  en nm à température ambiante dans l'eau et l'acétonitrile. <sup>c</sup> Rendement quantique d'émission mesuré par rapport à la référence Quinine, sous air, excitation à 375 nm, erreurs estimées à 10%. <sup>d</sup> Durées de vie de luminescence mesurées sous air ou sous argon (entre parenthèses). <sup>e</sup> Constante de désexcitation radiative calculée sous air. *n.d.\** : non déterminé à cause de l'impossibilité de mesurer car le complexe n'est pas soluble dans l'eau.

**Tableau 3.6** : Données d'absorption et de luminescence des complexes **Ir 4-5**.

Sur la base de comparaison avec la littérature<sup>112-115</sup> ainsi que par les études photophysiques des complexes **Ir 1-3**, nous pouvons attribuer les transitions dans la région de l'UV aux transitions centrées sur les ligands (LC). Les transitions CT observées à plus basse énergie ( $\lambda > 380 \text{ nm}$ ) sont attribuées aux transitions MLLCT.

Nous remarquons que la longueur d'onde d'émission du complexe **Ir 4** ( $\lambda_{\text{Em}} = 524 \text{ nm}$ ) n'est pas modifiée par rapport au complexe **Ir 2** ( $\lambda_{\text{Em}} = 526 \text{ nm}$ ). Cependant, nous observons un déplacement bathochrome de la longueur d'onde d'émission du complexe **Ir 5** ( $\lambda_{\text{Em}} = 565 \text{ nm}$ ) par rapport au complexe **Ir 3** ( $\lambda_{\text{Em}} = 527 \text{ nm}$ ). Les complexes **Ir 4** et **Ir 5** présentent aussi la capacité à « photosensibiliser » l'oxygène triplet en oxygène singulet comme illustré par l'augmentation de la durée de vie de luminescence dans l'acétonitrile en passant de l'air à l'argon.

Les mesures de voltampérométrie cyclique des complexes **Ir 4** et **Ir 5** ont été réalisées dans l'acétonitrile désoxygéné et sont regroupées dans le **Tableau 3.7** ci-dessous.

Complexe	$E_{\text{ox } 1/2}$	$E_{\text{ox}}^*{}^a$	$E_{\text{red } 1/2}$	$E_{\text{red}}^*{}^a$
<b>Ir 4</b>	>2	<i>n.d.*</i>	-1.43	0.92
<b>Ir 5</b>	>2	<i>n.d.*</i>	-1.65	0.71

Mesures réalisées à température ambiante dans l'acétonitrile désoxygéné avec une solution 0.1 M Bu<sub>4</sub>NClO<sub>4</sub> agissant comme électrolyte support (V *versus* Ag/AgCl électrode de référence). <sup>a</sup> Potentiel de l'état excité estimé à partir des équations  $E_{\text{ox}}^* = E_{\text{ox } 1/2} - E^{0-0}$  et  $E_{\text{red}}^* = E_{\text{red } 1/2} + E^{0-0}$ . L'énergie de l'état excité  $E^{0-0}$  est assimilée au maximum du spectre d'émission dans l'acétonitrile à 298 K. *n.d.\** : non déterminé à cause de l'impossibilité de mesurer  $E_{\text{ox}}$  à l'état fondamental.

**Tableau 3.7** : Données électrochimiques de **Ir 4-5** (V *versus* Ag/AgCl).

Comme observé pour les complexes **Ir 2** et **Ir 3**, aucune vague d'oxydation n'a été détectée en dessous de 2 V *versus* Ag/AgCl pour les complexes **Ir 4** et **Ir 5**, due à la présence des groupements électrocaptifs trifluorométhyle et pyridinium.<sup>114,116</sup> Pour la réduction, nous observons la première vague de réduction centrée sur le ligand PPIP à  $E_{\text{red } 1/2} = -1.65 \text{ V}$  *versus* Ag/AgCl pour les complexes **Ir 4** et **Ir 5**, semblable à celle observée pour les complexes **Ir 2** et **Ir 3** centrée sur le ligand EPIP à  $E_{\text{red } 1/2} = -1.66 \text{ V}$  *versus* Ag/AgCl (voir **Support Information 3.6.4** p.91-92). Ceci nous laisse penser que l'ajout du groupement O-CH<sub>2</sub> sur la partie PIP ne modifie pas l'énergie de l'orbitale LUMO centrée sur le ligand PPIP. En plus, de cette vague de réduction centrée sur le ligand PPIP, nous observons une

vague de réduction supplémentaire à  $E_{red \frac{1}{2}} = -1.43 \text{ V versus Ag/AgCl}$  pour **Ir 4** correspondant à la réduction du ligand  $\text{CF}_3\text{ppy}$  (comparé à  $E_{red \frac{1}{2}} = -1.45 \text{ V versus Ag/AgCl}$  pour **Ir 2**). En ce qui concerne le complexe **Ir 5**, il semble que lors de la mesure de voltampérométrie cyclique, la solution n'a pas été bien désoxygénée, causant ainsi l'apparition de la vague de réduction du tétrabutylammonium ( $\text{Bu}_4\text{N}^+$  ou  $\text{TBA}^+$ , agissant comme électrolyte support) par l'oxygène à  $E_{red \frac{1}{2}} = -0.82 \text{ V versus Ag/AgCl}$ .<sup>117</sup> A cause de la vague de réduction de l'électrolyte support par l'oxygène, nous ne pouvons malheureusement pas observer les vagues de réductions de la partie 2,2'-C^N du complexe **Ir 5**. Nous ne pouvons donc pas en tirer de conclusions pour le complexe **Ir 5**.

La comparaison des propriétés photophysiques et électrochimiques des complexes **Ir 2** et **Ir 4** indique que l'ajout du groupement  $\text{O-CH}_2$  entre la partie phénanthroline et la partie alcyne du ligand PPIP ne conduit pas à la modification des propriétés photophysiques et électrochimiques.

La réaction des complexes **Ir 4** et **Ir 5** avec de l'azido-nonane, du sulfate de cuivre et de l'ascorbate de sodium permet d'obtenir les « complexes triazolyles » correspondants **Ir 4-a** et **Ir 5-a** (Schéma 3.7). Après une nuit de réaction à température ambiante, à l'obscurité et sous argon le complexe **Ir 4-a** est obtenu par précipitation dans l'éther diéthylique. Nous avons pu confirmer l'obtention du complexe **Ir 4-a** par apparition des signaux caractéristiques de la chaîne alkyle intégrant pour douze protons vers 1.29 ppm ou du signal correspondant au  $\text{CH}_3$  à 0.90 ppm. Malheureusement, le complexe **Ir 5-a** n'a pas pu être obtenu malgré les multiples tentatives de synthèses sous différentes conditions.

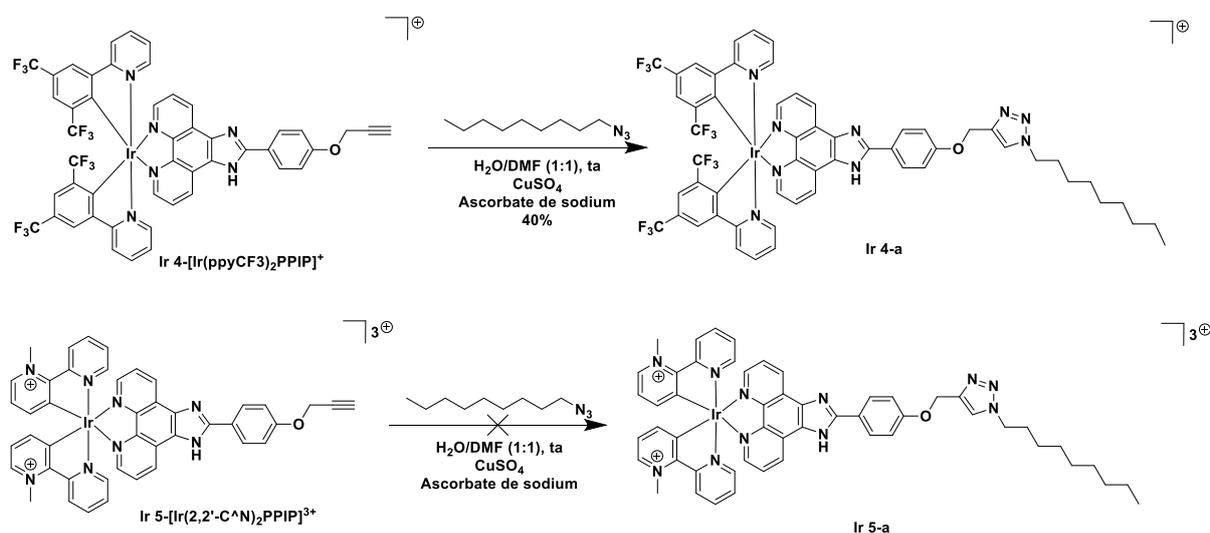
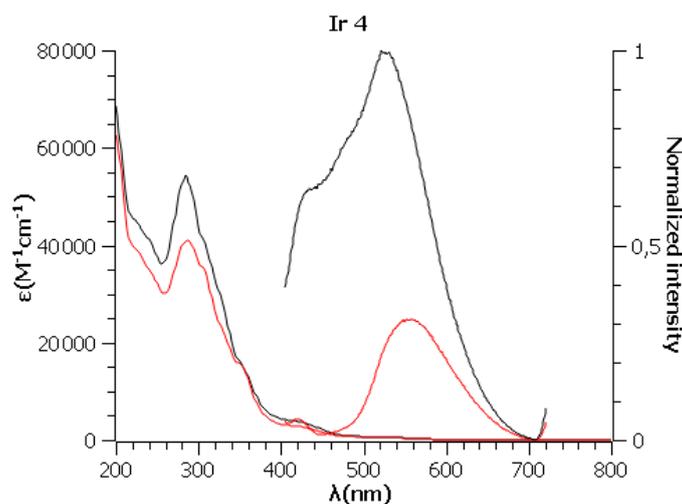


Schéma 3.7 : Synthèse des « complexes triazolyles » **Ir 4-a** et **5-a**.

La comparaison des spectres d'absorption et d'émission ainsi que des valeurs de rendement quantique de luminescence n'a dès lors pu être réalisée que pour les complexes **Ir 4** et **Ir 4-a** (Figure 3.10 et Tableau 3.8).



**Figure 3.10** : Comparaison des spectres d'absorption avec l'échelle des coefficients d'extinction molaire à gauche et l'échelle des intensités normalisées pour le spectre d'émission à droite, **Ir 4** en noir et **Ir 4-a** en rouge.

Complexe	$\Phi_{em}^a$	Complexe	$\Phi_{em}^a$
<b>Ir 4</b>	0.0028	<b>Ir 4-a</b>	0.00090

<sup>a</sup> Rendement quantique d'émission mesuré par rapport à la référence Quinine, sous air, excitation à 375 nm, erreurs estimées à 10%.

**Tableau 3.8** : Comparaison des valeurs de rendement quantique de luminescence de complexe **Ir 4** par rapport à **Ir 4-a**.

Nous constatons ainsi une diminution de l'intensité d'émission du complexe **Ir 4-a** par rapport à **Ir 4**, démontrant une inhibition de luminescence du « complexe triazolyle » formé. De plus, la comparaison du rendement quantique d'émission de ces deux complexes confirme le phénomène d'inhibition de luminescence.

A travers ces études, nous constatons que même en ajoutant un groupement O-CH<sub>2</sub>, afin d'éloigner le motif triazole formé de la partie phénanthroline, un phénomène de « quenching » de luminescence reste présent. Nous avons supposé que cette désexcitation du complexe est favorisée par la délocalisation des électrons sur la partie PIP du ligand, facilitant ainsi un transfert d'électron de la partie triazole vers le centre métallique. Or, par les études sur les complexes **Ir 4** et **Ir 4-a**, nous avons prouvé que ce n'est pas les ligands EPIP ou PPIP qui sont à l'origine de ce phénomène de « quenching » de luminescence observé.

### 3.4. Conclusion

Une série de complexes d'iridium (III) a été conçue dans le but de servir d'injecteur de charge au sein de l'ADN. A travers les études photophysiques et photochimiques, les complexes **Ir 1** et **Ir 3** semblent être aptes à induire un transfert de charges au sein de l'ADN. En effet, ils sont capables d'induire un transfert d'électron photo-induit (PET) que ce soit en présence de dGMP ou d'ascorbate de sodium, formant ainsi un complexe d'iridium mono-réduit.

Cependant, en comparant les propriétés d'absorption et d'émission des complexes portant la fonction alcyne et des « complexes triazolyles », seul le complexe **Ir 1** conserve ses propriétés d'émission (pas d'extinction de luminescence et rendement quantique de luminescence inchangé)

après la formation du motif triazole. Alors que les complexes **Ir 2** et **Ir 3** voient leur luminescence diminuer ou éteinte. Nous avons émis l'hypothèse que le « quenching » de luminescence est causé par un transfert d'électron de la partie triazole vers le centre métallique. Mais les études entreprises par la suite avec le complexe **Ir 4** ont démontré que c'est le caractère électroattracteur des ligands ancillaires qui est la cause du phénomène de « quenching » de luminescence.

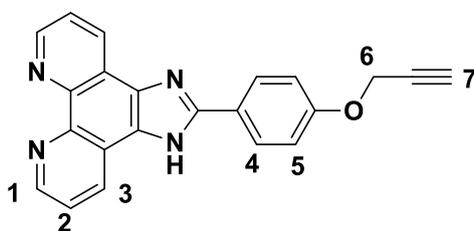
Au vu de ces études, nous avons choisi de travailler avec le complexe **Ir 1** pour les études de transport de charge au sein de l'ADN. En effet, ce complexe est capable d'induire un transfert d'électron de type PET en présence de dGMP et d'ascorbate de sodium. De plus, les propriétés photophysiques de ce dernier sont conservées après la formation du lien triazole, laissant penser qu'après incorporation du complexe **Ir 1** au sein de l'ADN, ce dernier sera toujours capable d'induire le transfert de charge de type PET.

### 3.5. Section expérimentale

#### 3.5.1. Materials and methods

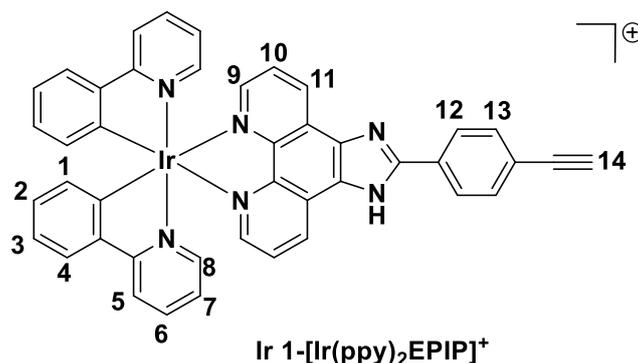
$[\text{Ir}(\text{ppy})_2\text{Cl}]_2$ ,  $^{122}[\text{Ir}(\text{ppyCF}_3)_2\text{Cl}]_2$ ,  $^{114}[\text{Ir}(\mathbf{2},\mathbf{2}'\text{-C}\wedge\text{N})_2\text{Cl}]_2$ ,  $^{113}$  2-(4-ethynylphenyl)-1H-imidazo[4,5f][1,10]phenanthroline (EPIP),  $^{112}$   $[\text{Ir}(\text{ppy})_2\text{EPIP}]\cdot\text{PF}_6$ ,  $^{112}$  4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde,  $^{121}$  nonylazide,  $^{123}$  were synthesized according to previously described literature protocols. All solvents for the spectroscopic and electrochemical measurements were of spectroscopic grade. Water was purified with a Millipore Milli-Q system.  $^1\text{H}$  NMR experiments were performed in  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ,  $\text{DMSO-d}_6$  or  $\text{D}_2\text{O}$  on a Bruker AC-300 Avance II (300 MHz) or on a Bruker AM-500 (500 MHz) at  $20^\circ\text{C}$ . The chemical shifts (given in ppm) are measured vs. the residual peak of the solvent as the internal standard. High-resolution mass spectrometry (HRMS) spectra were recorded on a Q-Extractive orbitrap from ThermoFisher using reserpine as internal standard. Samples were ionized by electrospray ionization (ESI; capillary temperature =  $320^\circ\text{C}$ , vaporizer temperature =  $320^\circ\text{C}$ , sheath gas flow rate = 5 mL/min). For solubility purposes, all the complexes were converted to the chloride salt for experiments in aqueous media, or to the hexafluorophosphate salt for studies in organic solvents.

#### 3.5.2. Synthetic protocols

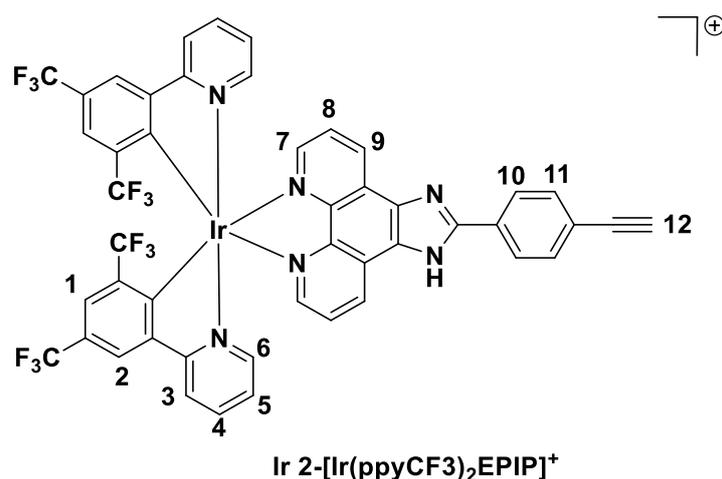


**2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline (PPIP).** 4-(prop-2-yn-1-yloxy)benzaldehyde (96 mg, 0.6 mmol) was dissolved in acetic acid (20 mL) followed by the addition of 1,10-phenanthroline-5,6-dione (126 mg, 0.6 mmol) and ammonium acetate (426 mg, 6 mmol). The mixture was heated at  $100^\circ\text{C}$  overnight and then cooled to room temperature. Aqueous ammonia solution 25% (30 mL) was added and the mixture was stirred for 2 hours. The formed precipitate was filtered and the obtained solid was washed with water and acetone, then dried to yield the desired product in a 72% yield (151 mg). No further purification was required.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

$\delta$  9.03 (dd,  $J = 4.3, 1.7$  Hz,  $2H_{1,1'}$ ), 8.92 (dd,  $J = 8.1, 1.7$  Hz,  $2H_{3,3'}$ ), 8.25 (d,  $J = 8.8$  Hz,  $2H_{4,4'}$ ), 7.83 (dd,  $J = 8.1, 4.3$  Hz,  $2H_{2,2'}$ ), 7.23 (d,  $J = 8.9$  Hz,  $2H_{5,5'}$ ), 4.93 (d,  $J = 2.3$  Hz,  $2H_6$ ), 3.64 (t,  $J = 2.3$  Hz,  $1H_7$ ). HRMS (+)  $m/z$  calcd for  $C_{22}H_{14}N_4O$ : 350.1168,  $m/z$  found: 351.1240  $[M+H]^+$

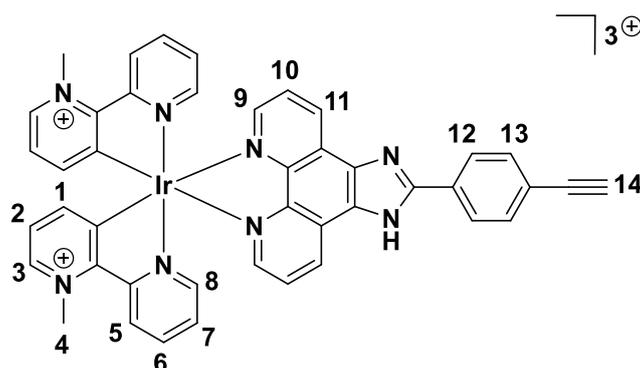


**[Ir(ppy)<sub>2</sub>EPIP].1PF<sub>6</sub> (Ir 1).** [Ir(ppy)<sub>2</sub>Cl]<sub>2</sub> (100 mg, 93  $\mu$ mol) and 2-(4-ethynylphenyl)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline (60 mg, 187  $\mu$ mol) were dissolved in ethylene glycol (15 mL). The mixture was stirred at 160°C overnight, in the dark under argon. Upon cooling, water and ammonium hexafluorophosphate (10 mg) were added to the solution. An orange precipitate was formed and recovered by centrifugation. The orange solid was then washed with water (3x), ethanol (1x) and diethyl ether (3x). The desired product was obtained with a 92% yield (70 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  12.4 (s, NH), 9.46 (d,  $J = 7.6$  Hz,  $1H_9$ ), 9.24 (d,  $J = 7.8$  Hz,  $1H_9$ ), 8.32 (d,  $J = 8.3$  Hz,  $2H_{12,12'}$ ), 8.21 (d,  $J = 27.7$  Hz,  $2H_{11,11'}$ ), 7.97 (d,  $J = 7.9$  Hz,  $2H_{1,1'}$ ), 7.83 (m,  $2H_{10,10'}$ ), 7.79 – 7.72 (m,  $4H_{2,2',8,8'}$ ), 7.60 (d,  $J = 8.3$  Hz,  $2H_{13,13'}$ ), 7.39 (d,  $J = 19.4$  Hz,  $2H_{4,4'}$ ), 7.13 (t,  $J = 7.4$  Hz,  $2H_{7,7'}$ ), 7.02 (t,  $J = 7.3$  Hz,  $2H_{6,6'}$ ), 6.90 (dd,  $J = 24.1, 7.1$  Hz,  $2H_{3,3'}$ ), 6.44 (dd,  $J = 14.2, 7.4$  Hz,  $2H_{5,5'}$ ), 3.20 (s,  $1H_{14}$ ). HRMS (+)  $m/z$  calcd for  $[C_{43}H_{28}IrN_6 - PF_6]^+$ : 821.2005,  $m/z$  found: 821.1997



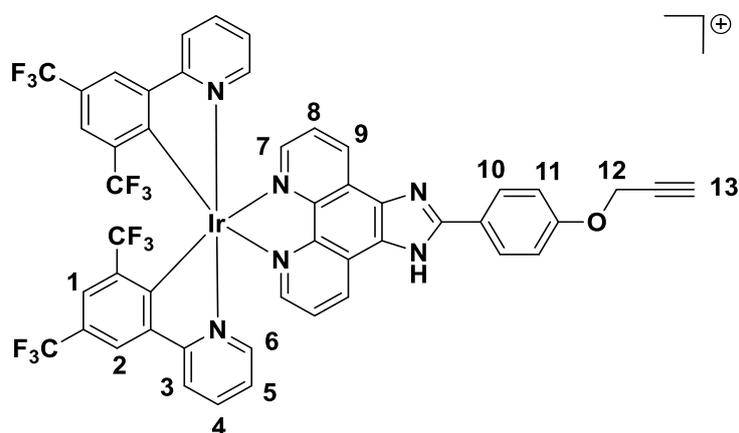
**[Ir(ppyCF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>EPIP].1PF<sub>6</sub> (Ir 2).** [Ir(ppyCF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl]<sub>2</sub> (50 mg, 31  $\mu$ mol) and 2-(4-ethynylphenyl)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline (20 mg, 62  $\mu$ mol) were dissolved in ethylene glycol (15 mL). The mixture was stirred at 120°C overnight, in the dark, under argon. Upon cooling, deionized water and ammonium hexafluorophosphate (10 mg) were added to the solution. An orange precipitate was formed and recovered by centrifugation. The orange solid was then washed with water (3x) and diethyl ether (3x). The desired product was obtained with a 47% yield (11 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  9.06 (s,  $2H_{1,1'}$ ), 8.50 (d,  $2H_{7,7'}$ ), 8.24 (d,  $J = 8.1$  Hz,  $2H_{6,6'}$ ), 8.20 (d,  $J = 8.0$  Hz,  $2H_{10,10'}$ ), 8.06 (d,  $J = 4.2$  Hz,  $2H_{8,8'}$ ), 7.89 – 7.82 (m,  $4H_{2,2',9,9'}$ ), 7.75 (t,  $J = 7.8$  Hz,  $2H_{5,5'}$ ), 7.68 (d,  $J = 7.7$  Hz,  $2H_{11,11'}$ ), 7.16

(d,  $J = 4.7$  Hz,  $2H_{3,3'}$ ), 6.73 (t,  $J = 6.4$  Hz,  $2H_{4,4'}$ ), 3.51 (s,  $1H_{12}$ ). HRMS (+)  $m/z$  calcd for  $[C_{47}H_{24}F_{12}IrN_6 - PF_6]^+$ : 1093.1500,  $m/z$  found: 1093.1489



**Ir 3-[Ir(2,2'-C<sup>N</sup>)<sub>2</sub>EPIP]<sup>3+</sup>**

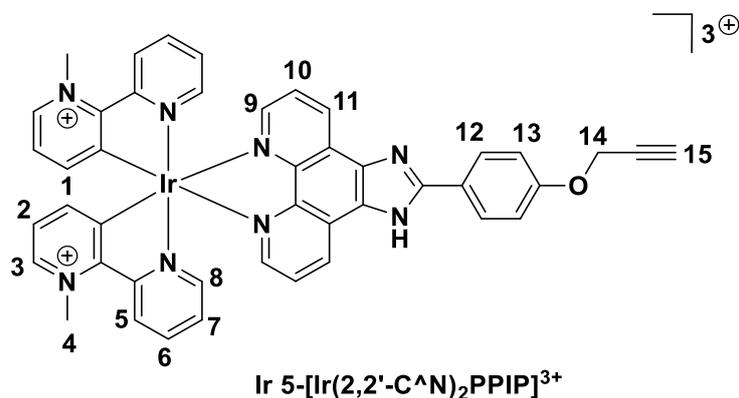
**[Ir(2,2'-C<sup>N</sup>)<sub>2</sub>EPIP].3PF<sub>6</sub> (Ir 3).** [Ir(2,2'-C<sup>N</sup>)<sub>2</sub>Cl]<sub>2</sub> (15 mg, 47  $\mu$ mol) and 2-(4-ethynylphenyl)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline (40 mg, 23  $\mu$ mol) were dissolved in ethylene glycol (15 mL). The mixture was stirred at 160°C overnight, in the dark, under argon. Upon cooling, deionized water and ammonium hexafluorophosphate (10 mg) were added to the solution. An orange/red precipitate was formed and recovered by centrifugation. The crude product was purified by column chromatography (H<sub>2</sub>O/KNO<sub>3</sub> sat/CH<sub>3</sub>CN - 1/1/7), then solubilized in water and ammonium hexafluorophosphate (10 mg) were added to the solution. An orange/red precipitate was formed and recovered by centrifugation. The desired product was obtained with an 85% yield (17 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  9.11 (d,  $J = 8.4$  Hz,  $2H_{3,3'}$ ), 8.78 (d,  $J = 8.7$  Hz,  $2H_{8,8'}$ ), 8.63 (dd,  $J = 5.2, 2.2$  Hz,  $2H_{9,9'}$ ), 8.28 (d,  $J = 5.1$  Hz,  $2H_{1,1'}$ ), 8.20 (t,  $J = 7.5$  Hz,  $2H_{7,7'}$ ), 7.96 (dd,  $J = 5.7, 0.8$  Hz,  $2H_{5,5'}$ ), 7.92 (dd,  $J = 8.4, 5.1$  Hz,  $2H_{2,2'}$ ), 7.84 (d,  $J = 7.9$  Hz,  $2H_{12,12'}$ ), 7.50 – 7.44 (m,  $4H_{10,10',11,11'}$ ), 7.41 – 7.37 (m,  $2H_{6,6'}$ ), 7.06 (d,  $J = 7.7$  Hz,  $2H_{13,13'}$ ), 4.84 (s,  $H_{4,4'}$ ), 2.21 (s,  $1H_{14}$ ). HRMS (+)  $m/z$  calcd for  $[C_{43}H_{32}IrN_8 - 3 PF_6]^3+$ : 853.2368,  $m/z$  found: 426.1145 corresponding to  $[C_{43}H_{32}IrN_8 - 3 PF_6 - H]^2+$



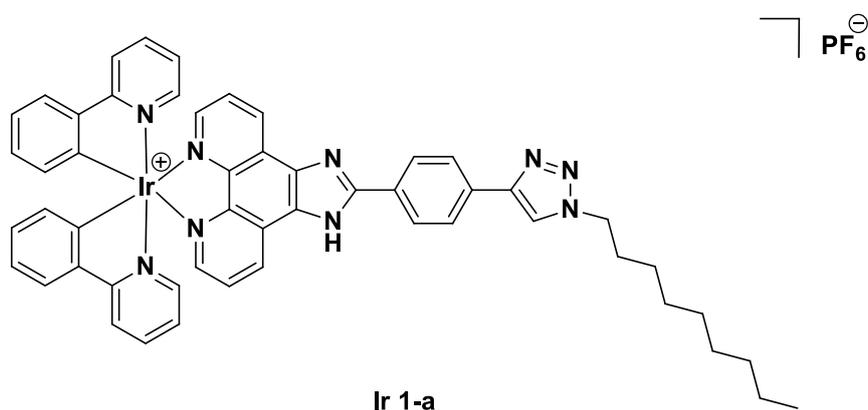
**Ir 4-[Ir(ppyCF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PPIP]<sup>+</sup>**

**[Ir(ppyCF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>PPIP].1PF<sub>6</sub> (Ir 4).** [Ir(ppyCF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl]<sub>2</sub> (20 mg, 12  $\mu$ mol) and 2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline (9 mg, 25  $\mu$ mol) were dissolved in ethylene glycol (5 mL). The mixture was stirred at 90°C overnight, in the dark, under argon. Upon cooling, deionized water and ammonium hexafluorophosphate (10 mg) were added to the solution. An orange/red precipitate was formed and recovered by centrifugation. The orange solid was then washed with water (3x) and diethyl ether (3x). The desired product was obtained with an 88% yield (14 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,

DMSO-d6)  $\delta$  10.14 (s, 1H NH), 9.18 (dd,  $J = 13.5, 7.5$  Hz, 2H<sub>7,7'</sub>), 8.73 (s, 2H<sub>1,1'</sub>), 8.60 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H<sub>6,6'</sub>), 8.17 – 7.99 (m, 6H<sub>8,8',9,9',10,10'</sub>), 7.82 (t,  $J = 7.9$  Hz, 2H<sub>5,5'</sub>), 7.73 (s, 2H<sub>2,2'</sub>), 7.13 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H<sub>3,3'</sub>), 7.00 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H<sub>11,11'</sub>), 6.83 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H<sub>4,4'</sub>), 4.43 (s, 1H<sub>13</sub>), 3.37 (d,  $J = 5.1$  Hz, 2H<sub>12</sub>). HRMS (+)  $m/z$  calcd for [C<sub>48</sub>H<sub>26</sub>F<sub>12</sub>IrN<sub>6</sub>O – PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>: 1123.1606,  $m/z$  found: 1085.1438 corresponding to [M-C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>– PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup>

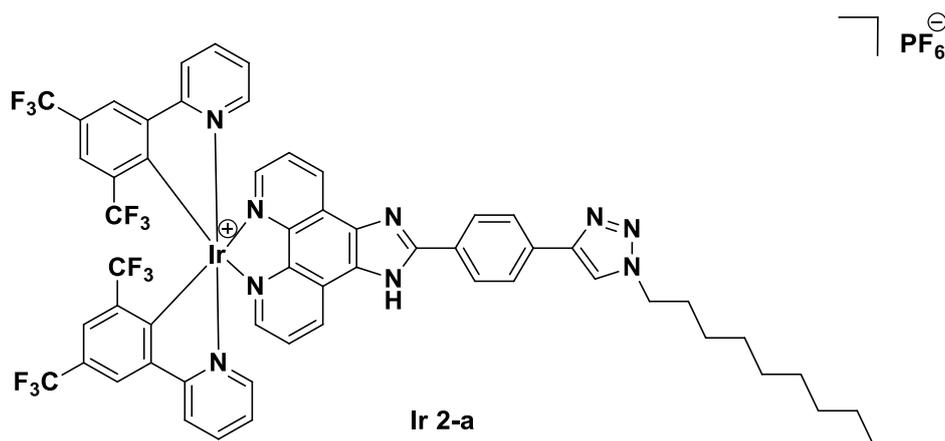


**[Ir(2,2'-C<sup>N</sup>)<sub>2</sub>PPIP].3PF<sub>6</sub> (Ir 5).** A mixture of [Ir(2,2'-C<sup>N</sup>)<sub>2</sub>Cl]<sub>2</sub> (50 mg, 29  $\mu$ mol) and 2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline (20 mg, 58  $\mu$ mol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (6 mL/2 mL) was stirred at 60°C overnight, in the dark, under argon. Upon cooling, deionized water and ammonium hexafluorophosphate (10 mg) were added to the solution. An orange/red precipitate was formed and recovered by centrifugation. The orange/red solid was then washed with water (3x) and diethyl ether (3x). The desired product was obtained with a 79% yield (30 mg). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d6)  $\delta$  10.06 (dd,  $J = 5.8, 1.7$  Hz, 2H), 9.42 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 9.16 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 9.03 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H), 8.92 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 8.68 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 8.57 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 8.54 – 8.43 (m, 2H), 8.25 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 7.88 (q,  $J = 6.9$  Hz, 4H), 7.60 – 7.47 (m, 2H), 7.35 – 7.21 (m, 4H), 7.13 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H), 4.72 (s, 6H), 4.03 (s, 2H), 3.17 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H).

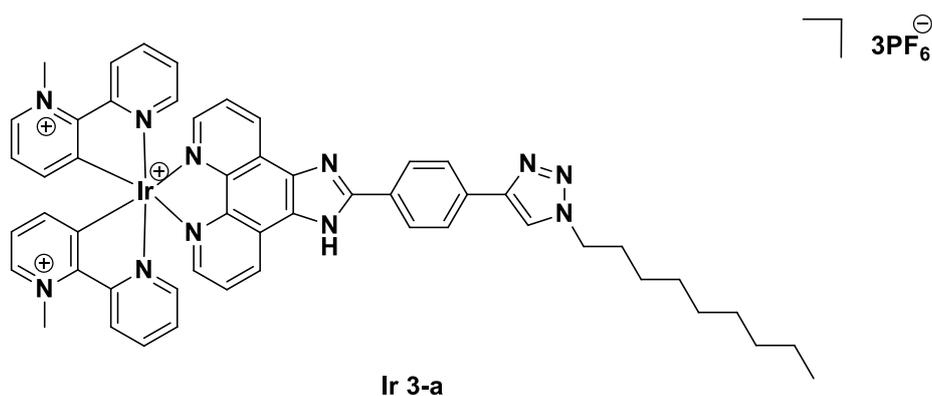


**[Ir(ppy)<sub>2</sub>(nonyl-tl-PIP)].1PF<sub>6</sub> (Ir 1-a).** A mixture of Ir 1 (8.3 mg, 9.7  $\mu$ mol) and azidononane (2.5 mg, 15  $\mu$ mol) was dissolved in 1 mL degassed DMF/H<sub>2</sub>O (1/1) solution followed by addition of sodium ascorbate (1.9 mg, 9.7  $\mu$ mol) and CuSO<sub>4</sub> (3.3 mg, 9.7  $\mu$ mol). The mixture was stirred overnight at room temperature in the dark and under argon. At the end of the reaction, the crude product was purified over SiO<sub>2</sub> chromatography (DCM/MeOH 95/5) to afford pure Ir 1-a (5 mg, 50% yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.64 (s, 1H), 8.62 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 8.17 (dd,  $J = 5.0, 1.2$  Hz, 2H), 7.95 (d,  $J = 7.4$  Hz, 4H), 7.83 (s, 1H), 7.80 – 7.68 (m, 6H), 7.40 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 7.10 (td,  $J = 7.7, 1.1$  Hz, 2H), 6.99 (td,  $J = 7.5, 1.3$  Hz, 2H), 6.91 – 6.84 (m, 2H), 6.42 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 4.41 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.99 – 1.93

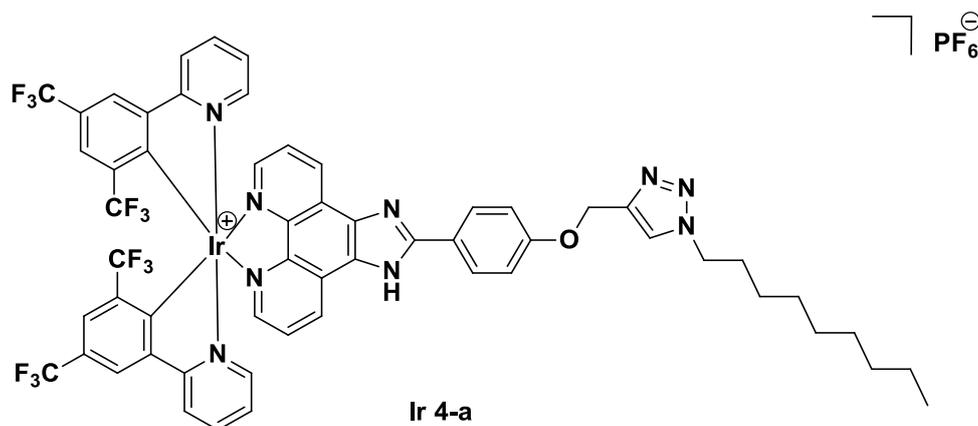
(m, 2H), 1.25 (m, 12H), 0.93 – 0.83 (m, 3H). HRMS (+)  $m/z$  calcd for  $[C_{52}H_{47}IrN_9 - PF_6]^+$ : 990.3578,  $m/z$  found: 990.3575



**[Ir(ppyCF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(nonyl-ti-PIP)].PF<sub>6</sub> (Ir 2-a).** A mixture of **Ir 2** (8 mg, 6.4  $\mu$ mol) and azidononane (24 mg, 42  $\mu$ mol) was dissolved in 1 mL degassed DMF/H<sub>2</sub>O (1/1) solution followed by addition of sodium ascorbate (1.4 mg, 7.1  $\mu$ mol) and CuSO<sub>4</sub> (2.4 mg, 7.1  $\mu$ mol). The mixture was stirred overnight at room temperature in the dark and under argon. At the end of the reaction, the crude product was purified over SiO<sub>2</sub> chromatography (DCM/MeOH 95/5) to afford pure **Ir 2-a** (3.6 mg, 40% yield) <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  9.15 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 8.50 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 2H), 8.32 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 8.24 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 8.18 (s, 1H), 8.06 – 7.95 (m, 4H), 7.90 – 7.67 (m, 6H), 7.17 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 6.78 – 6.69 (m, 2H), 4.41 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.39 – 1.21 (m, 12H), 0.87 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 3H).



**[Ir(2,2'-C<sup>N</sup>)<sub>2</sub>(nonyl-ti-PIP)].3PF<sub>6</sub> (Ir 3-a).** A mixture of **Ir 3** (8.5 mg, 8.9  $\mu$ mol) and azidononane (2.2 mg, 13  $\mu$ mol) was dissolved in 1 mL degassed DMF/H<sub>2</sub>O (1/1) solution followed by addition of sodium ascorbate (1.8 mg, 8.9  $\mu$ mol) and CuSO<sub>4</sub> (3 mg, 8.9  $\mu$ mol). The mixture was stirred overnight at room temperature in the dark and under argon. At the end of the reaction, the crude product was purified by column chromatography (H<sub>2</sub>O/KNO<sub>3</sub> sat/CH<sub>3</sub>CN 2/2/7), then solubilized in water and ammonium hexafluorophosphate (a spatula tip) were added to the solution to afford pure **Ir 3-a** (4.7 mg, 47% yield). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN)  $\delta$  9.30 – 9.09 (m, 2H), 8.64 (s, 2H), 8.50 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 2H), 8.29 – 8.03 (m, 6H), 7.95 – 7.69 (m, 6H), 7.45 (dd,  $J$  = 7.9, 6.1 Hz, 2H), 7.32 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 4H), 4.73 (d,  $J$  = 13.1 Hz, 6H), 4.41 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.45 – 1.12 (m, 12H), 0.98 – 0.79 (m, 3H). HRMS (+)  $m/z$  calcd for  $[C_{52}H_{51}IrN_{11} - 3PF_6]^{3+}$ : 340.7981,  $m/z$  found: 340.7982



**[Ir(ppyCF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(nonyl-tl-PIP)].1PF<sub>6</sub> (Ir 4-a).** A mixture of Ir 4 (12 mg, 9.5 μmol) and azidononane (32 mg, 190 μmol) was dissolved in 1 mL degassed DMF/H<sub>2</sub>O (1/1) solution followed by addition of sodium ascorbate (2 mg, 9.5 μmol) and CuSO<sub>4</sub> (3.2 mg, 9.5 μmol). The mixture was stirred overnight at room temperature in the dark and under argon. At the end of the reaction, the precipitate was recovered by centrifugation. The orange solid was then washed with water (3x) and diethyl ether (3x). The desired product was obtained with a 38% yield (5 mg). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ 9.15 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 8.51 (s, 2H), 8.25 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 8.18 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.02 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.89 – 7.70 (m, 5H), 7.61 (s, 2H), 7.18 (m, 2H), 7.02 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.74 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.58 (m, 2H), 3.30 (s, 2H), 1.29 (m, 12H), 0.90 (m, 3H).

### 3.5.3. Absorption and luminescence studies

UV-vis absorption spectra were recorded on a Shimadzu UV-1700 apparatus. The concentration of the complexes was 50 μM. Room temperature luminescence spectra were recorded on a Varian Cary Eclipse instrument. Quantum yields were obtained using Quinine as a reference.<sup>124</sup> Luminescence lifetime measurements were performed after irradiation at λ = 400 nm obtained by the second harmonic of a Titanium:Sapphire laser (picosecond Tsunami laser spectra physics 3950-M1BB+39868-03 pulse picker doubler) at a 80 kHz repetition rate. The Fluotime 200 from AMS technologies was used for the decay acquisition. It consists of a GaAs microchannel plate photomultiplier tube (Hamamatsu model R3808U-50) followed by a time-correlated single photon counting system from Picoquant (PicoHarp300). The ultimate time resolution of the system is close to 30 ps. Luminescence decays were analyzed with FLUOFIT software available from Picoquant.

### 3.5.4. Electrochemical studies

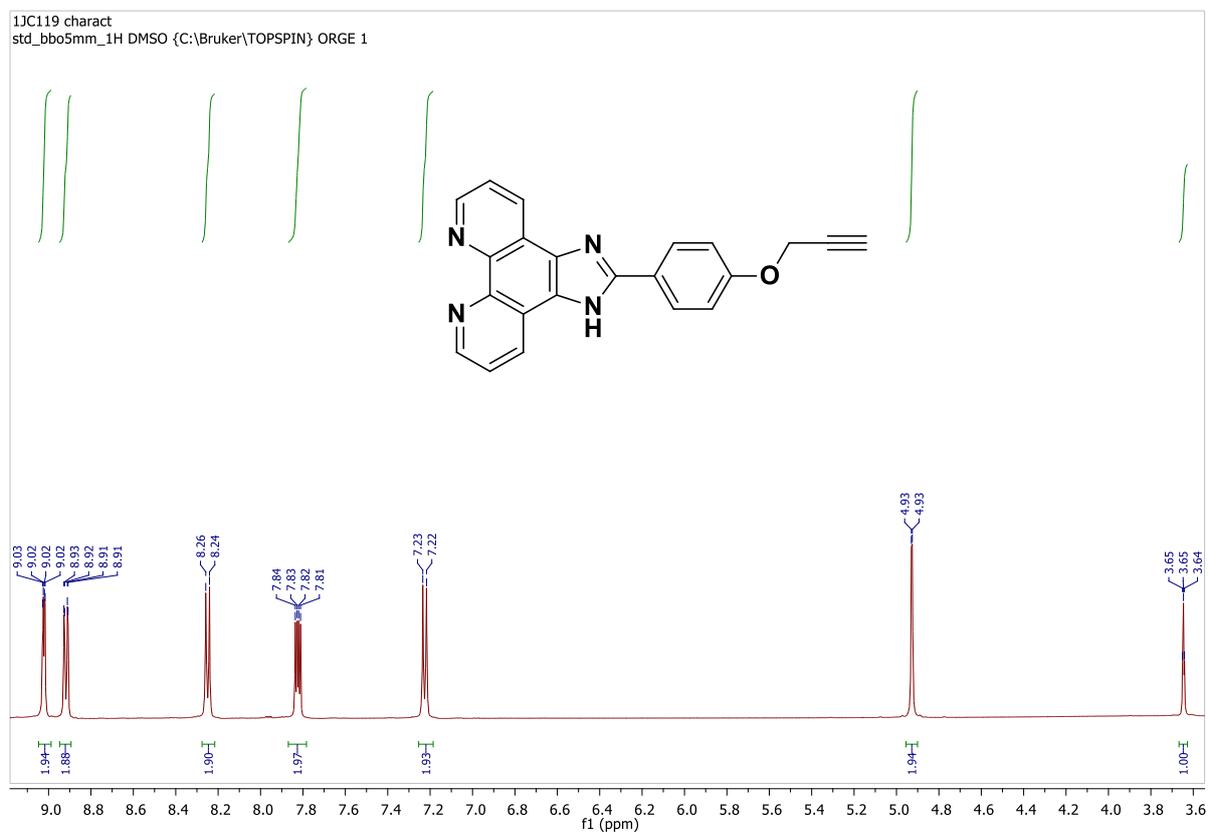
Cyclic voltammetry was carried out in a one-compartment cell, using a glassy carbon disk working electrode (approximate area = 0.03 cm<sup>2</sup>), a platinum wire counter electrode, and an Ag/AgCl reference electrode. The potential of the working electrode was controlled by an Autolab PGSTAT 100 potentiostat through a PC interface. The cyclic voltammograms were recorded with a sweep rate of 100 mV.s<sup>-1</sup>, in dried acetonitrile (Sigma-Aldrich, HPLC grade). The concentration of the complexes was 8.10<sup>-4</sup> mol/L, with 0.1 mol/L tetrabutylammonium perchlorate as supporting electrolyte. Before each measurement, the samples were purged by nitrogen. Redox potentials were controlled by comparison with ferrocene, added at the end of the measurement.

### 3.5.5. Luminescence titration

dGMP and sodium ascorbate titration experiment of Ir **1-3** were recorded on a Varian Cary Eclipse instrument. A solution of dGMP (1 mM) or sodium ascorbate (1 mM) was progressively added to a solution of complex (50  $\mu$ M) in Tris HCl (50 mM, pH 7.4).

## 3.6. Supporting information

### 3.6.1. $^1\text{H}$ of PPIP ligand



### 3.6.2. $^1\text{H}$ and 2D NMR of Ir(III) complexes

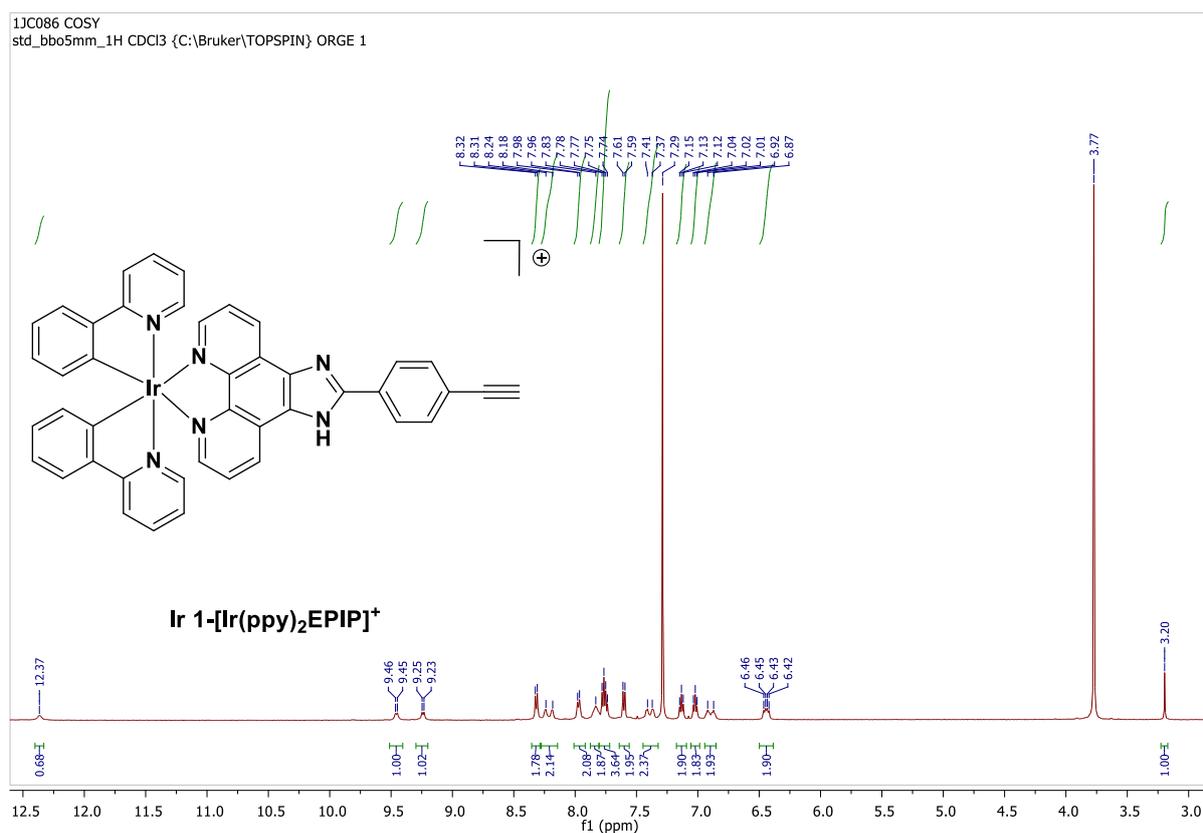


Figure S6.1  $^1\text{H}$  NMR spectra of *Ir 1* (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

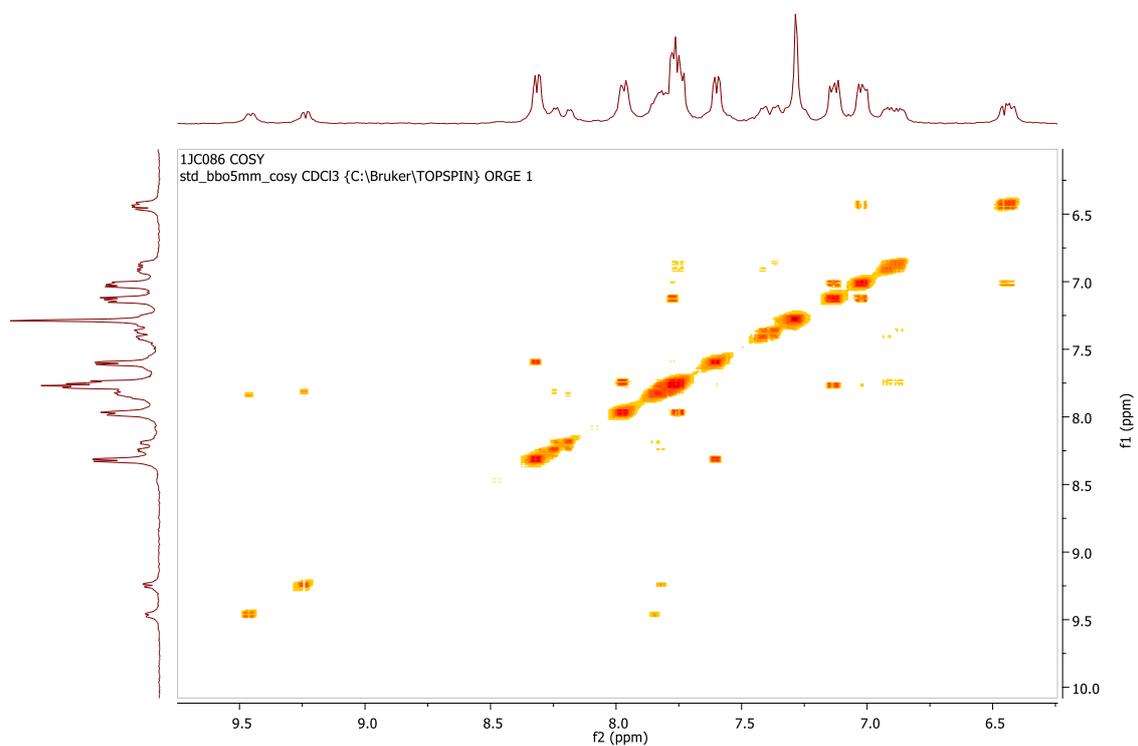
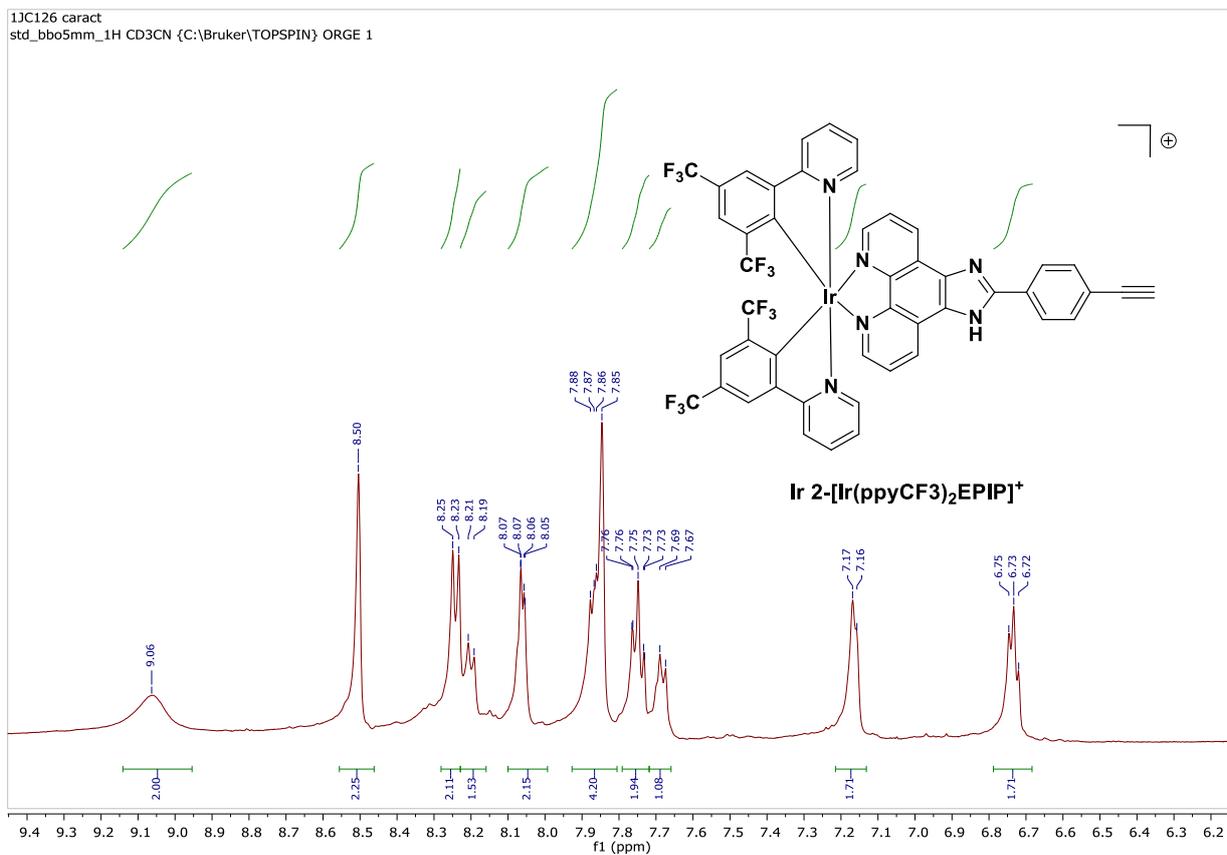
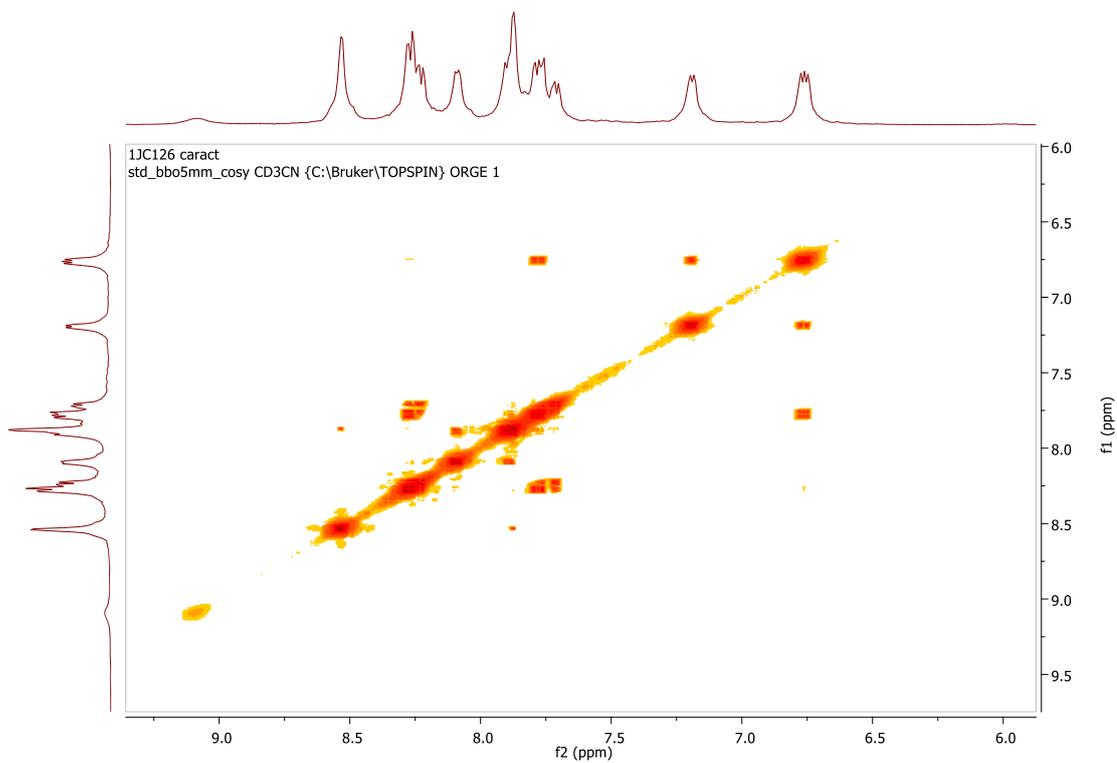


Figure S6.2 COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NMR spectra of *Ir 1* (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figure S6.3** <sup>1</sup>H NMR spectra of *Ir 2* (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN).



**Figure S6.4** COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NMR spectra of *Ir 2* (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN).

1JC084 caract/1  
std\_bbo5mm\_1H D2O {C:\Bruker\TOPSPIN} ORGE 1

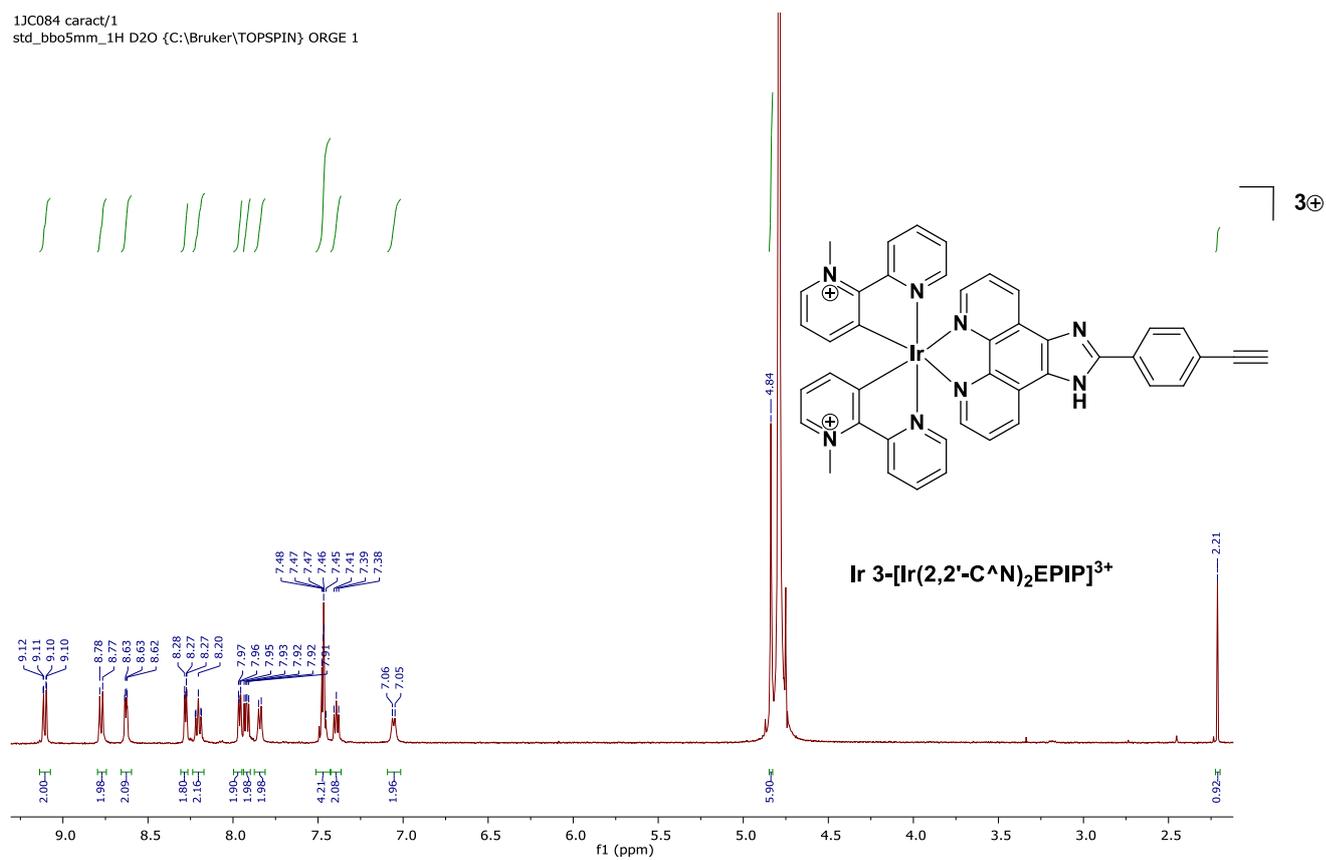


Figure S6.5 <sup>1</sup>H NMR spectra of Ir 3 (500 MHz, D<sub>2</sub>O).

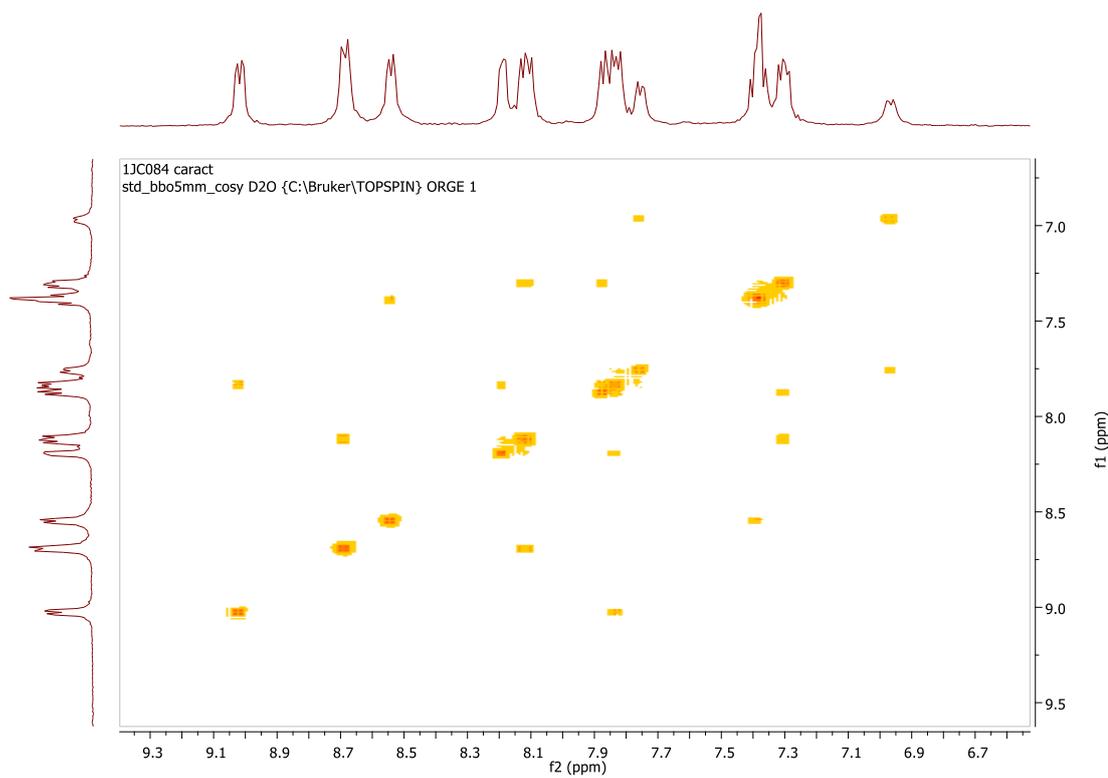


Figure S6.6 COSY<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NMR spectra of Ir 3 (500 MHz, D<sub>2</sub>O).

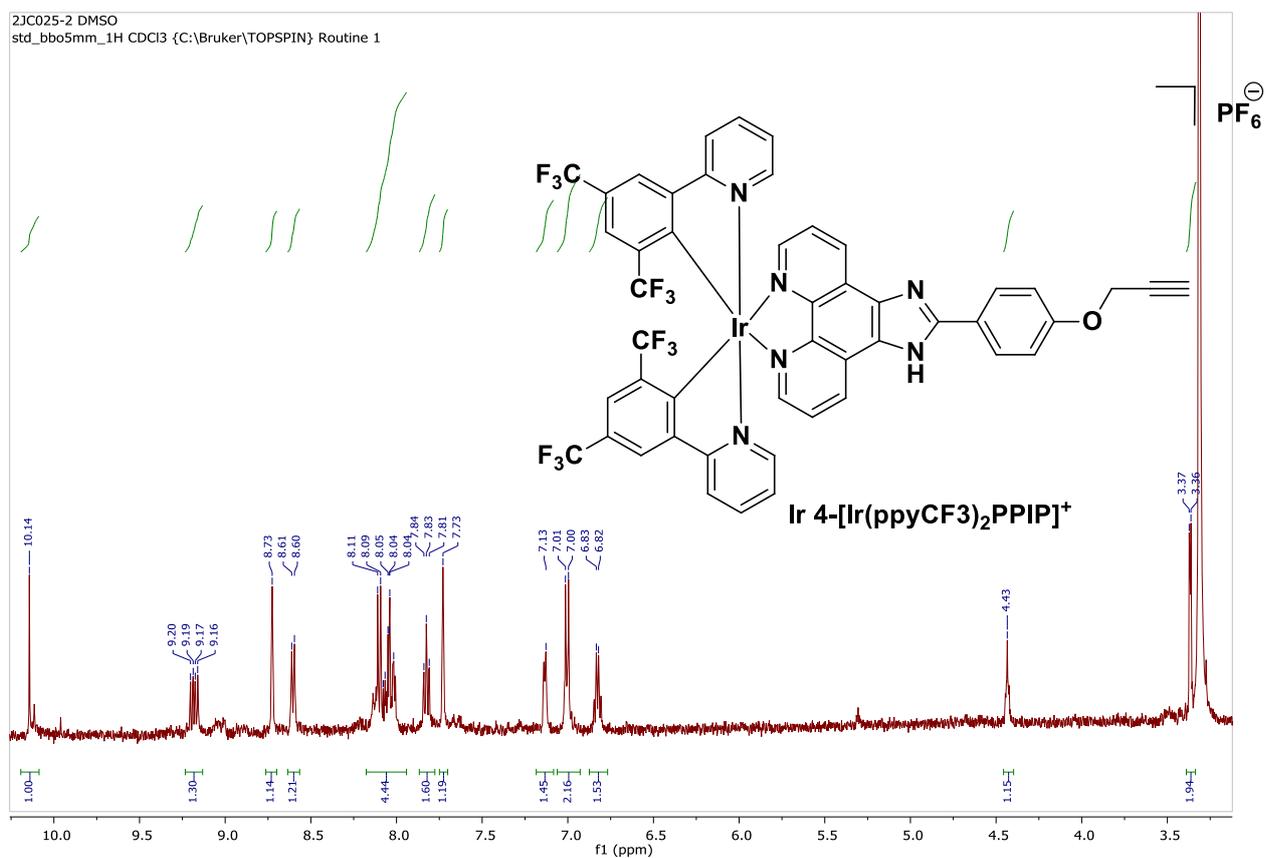


Figure S6.7 <sup>1</sup>H NMR spectra of *Ir 4* (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

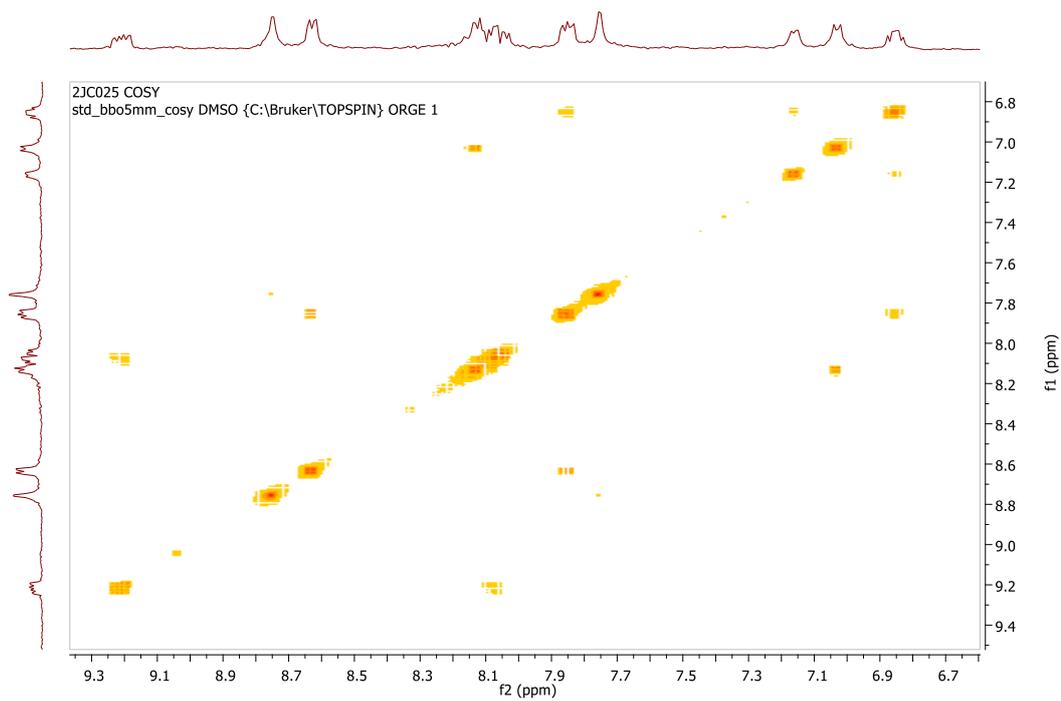
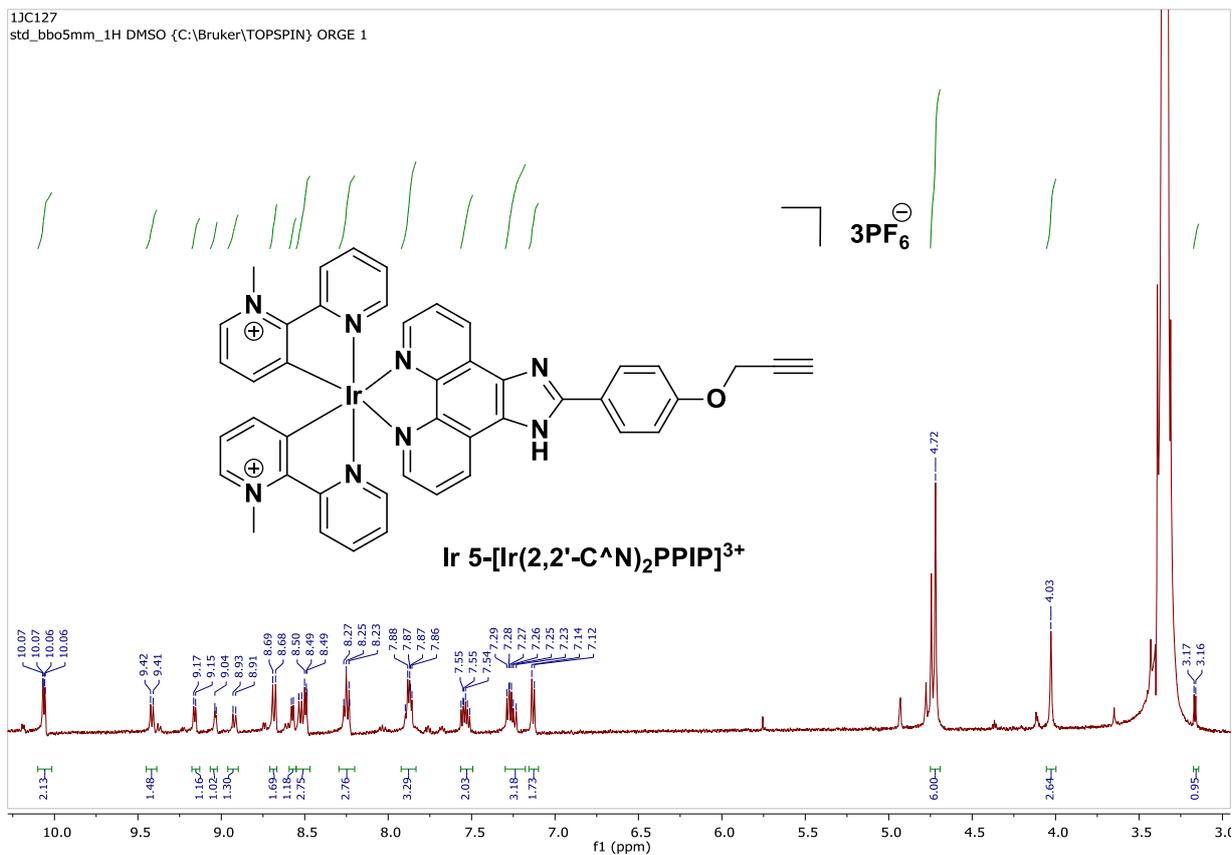
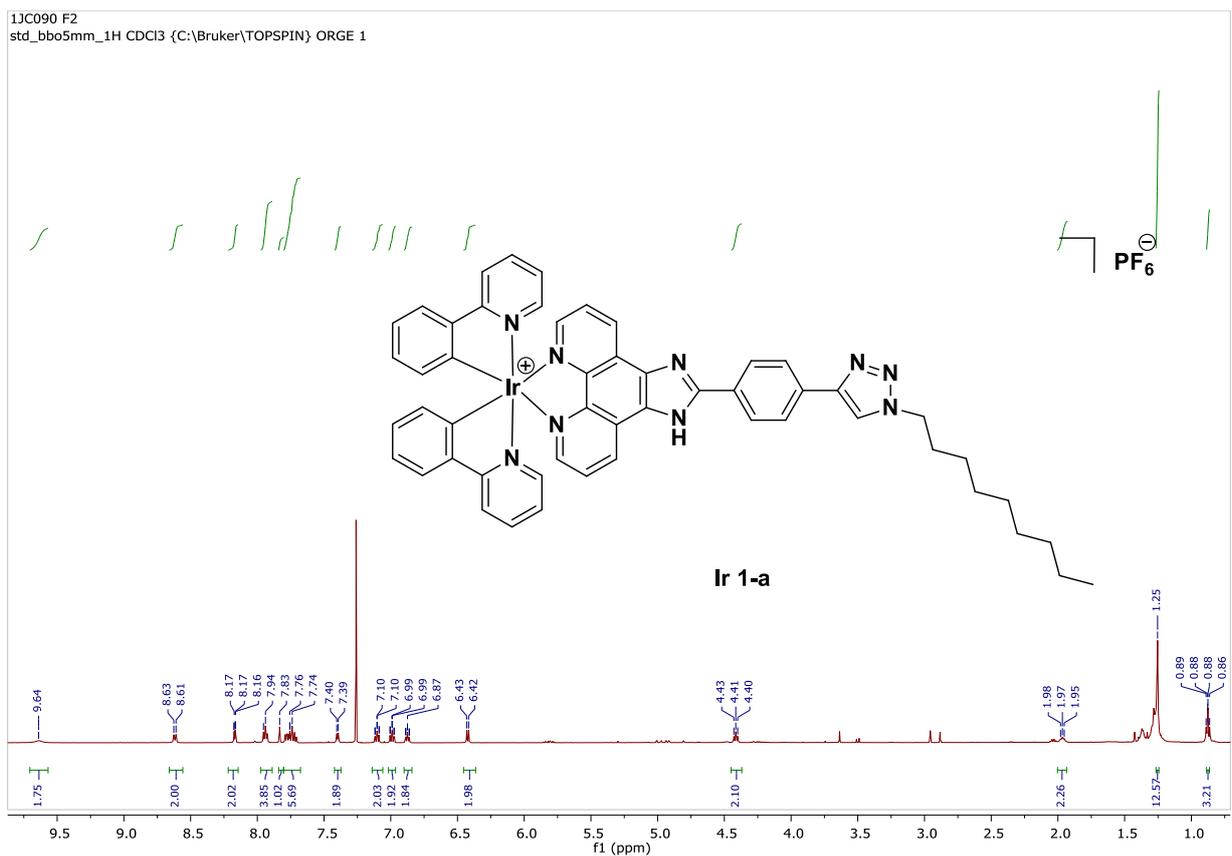


Figure S6.8 COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NMR spectra of *Ir 4* (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Figure S6.9** <sup>1</sup>H NMR spectra of *Ir 5* (500 MHz, DMSO).



**Figure S6.10** <sup>1</sup>H NMR spectra of *Ir 1-a* (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

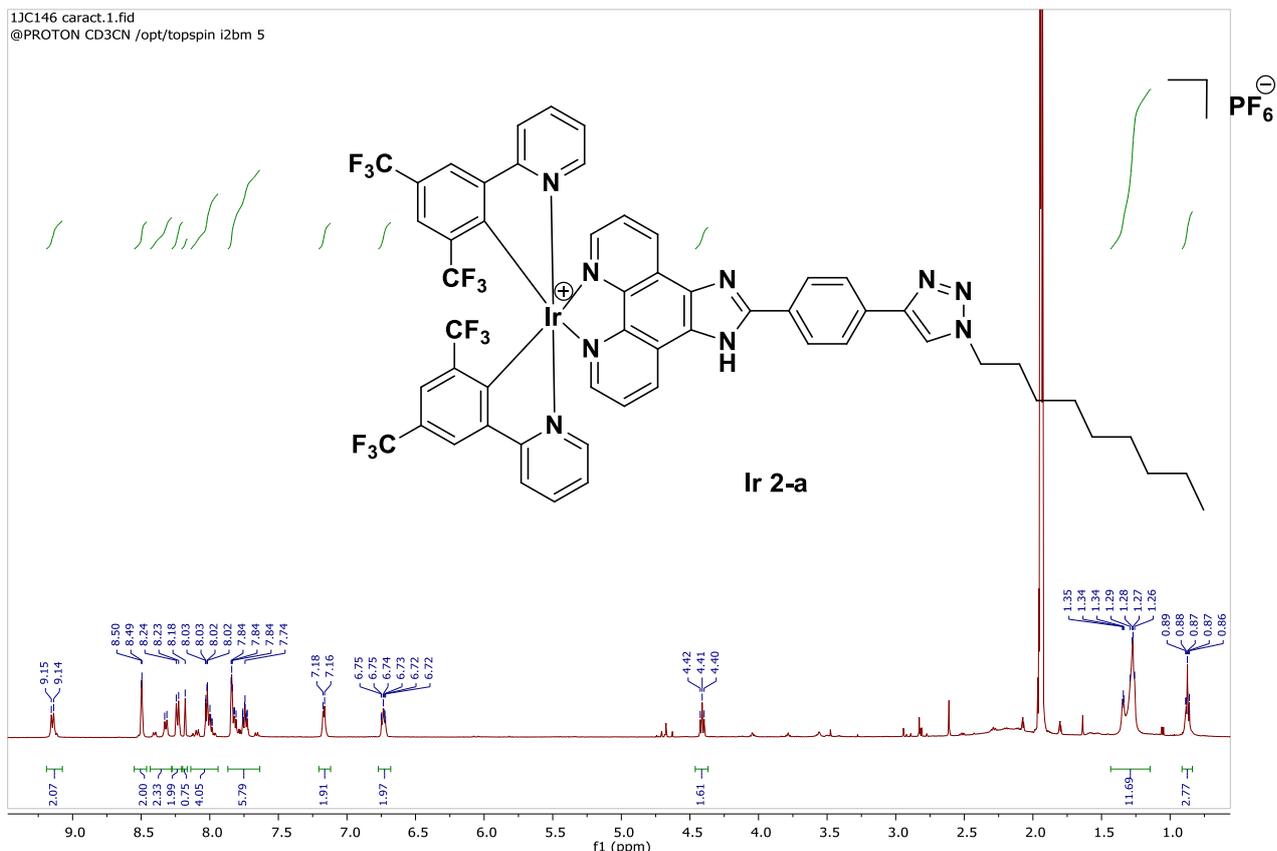


Figure S6.11 <sup>1</sup>H NMR spectra of **Ir 2-a** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

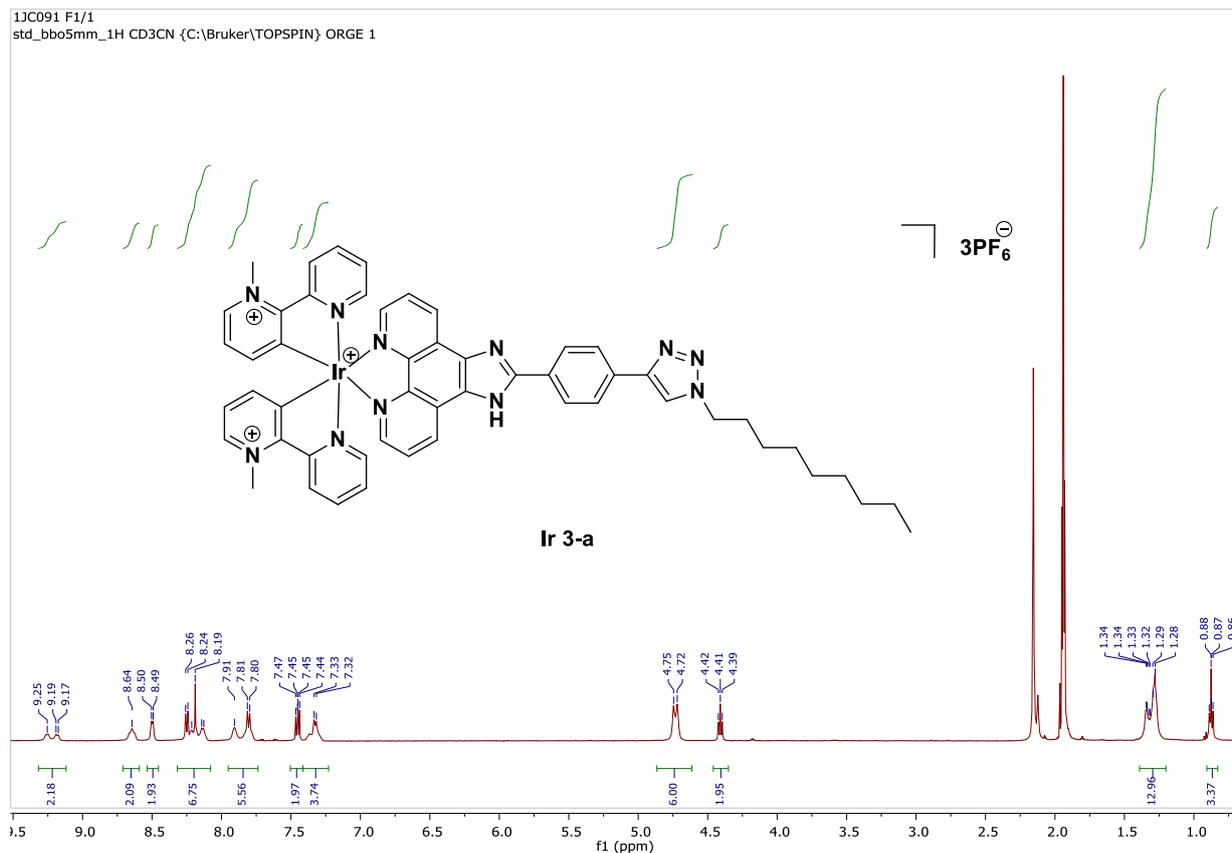


Figure S6.12 <sup>1</sup>H NMR spectra of **Ir 3-a** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

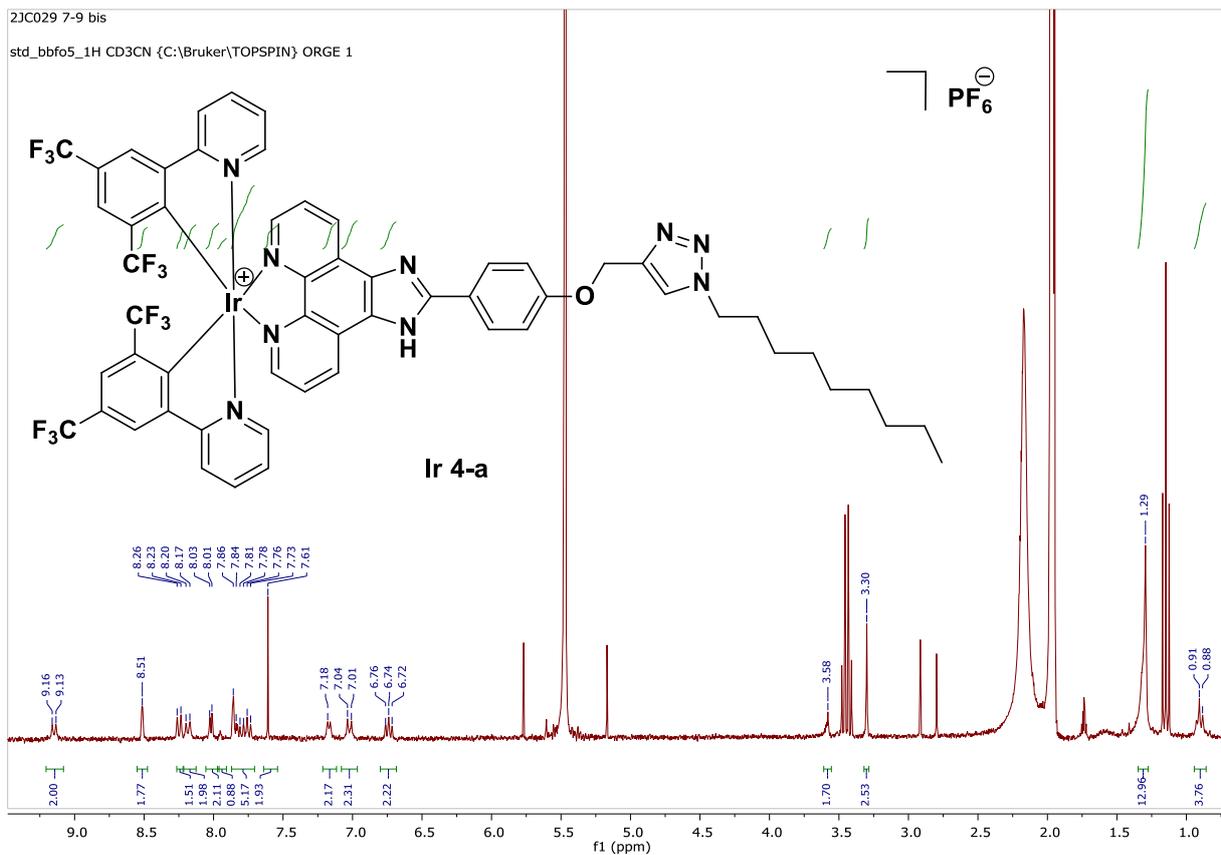
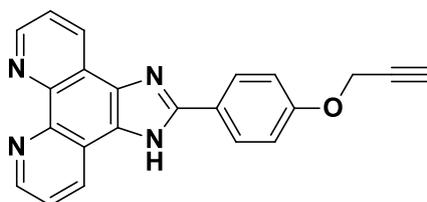
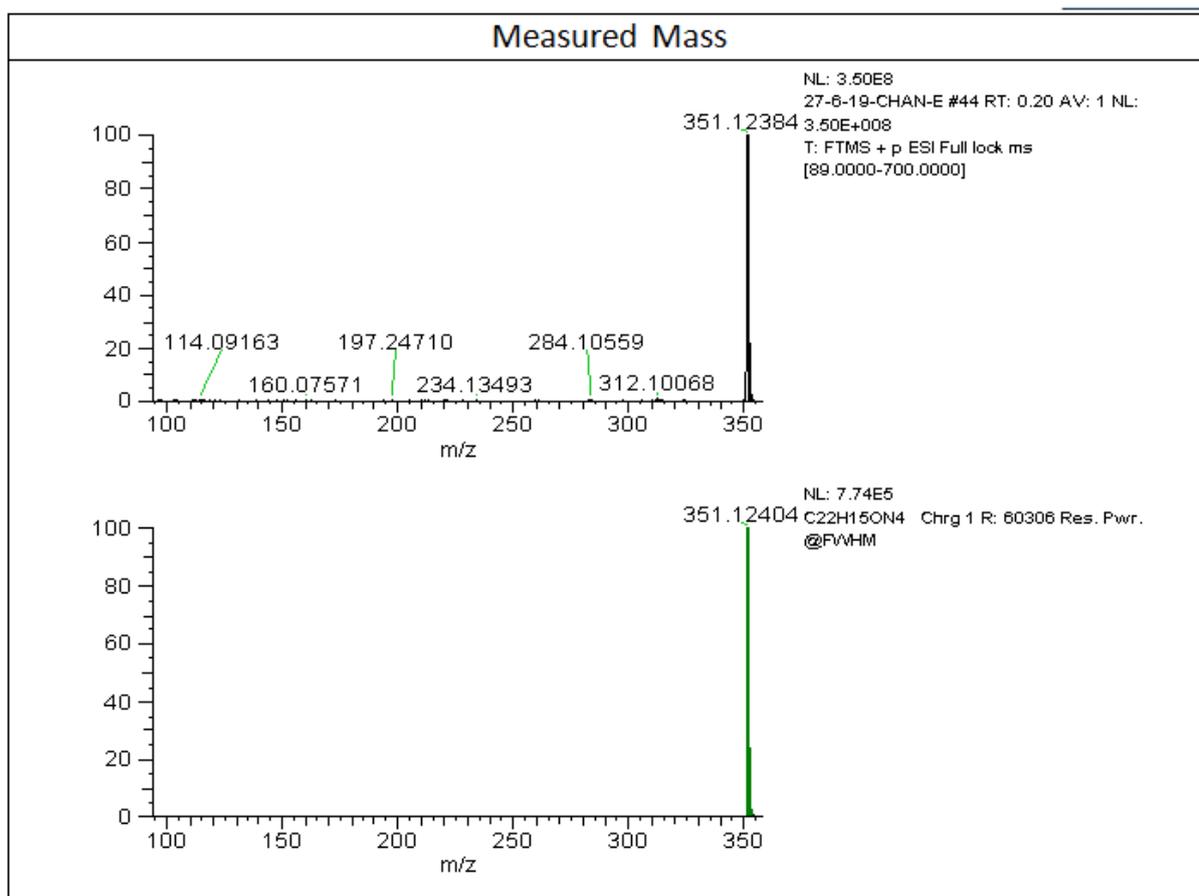


Figure S6.13  $^1\text{H}$  NMR spectra of Ir 4-a (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

### 3.6.3. HRMS spectra



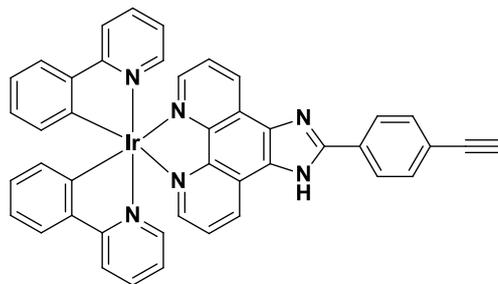
2-(4-(prop-2-yn-1-yloxy)phenyl)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline (PIIP)



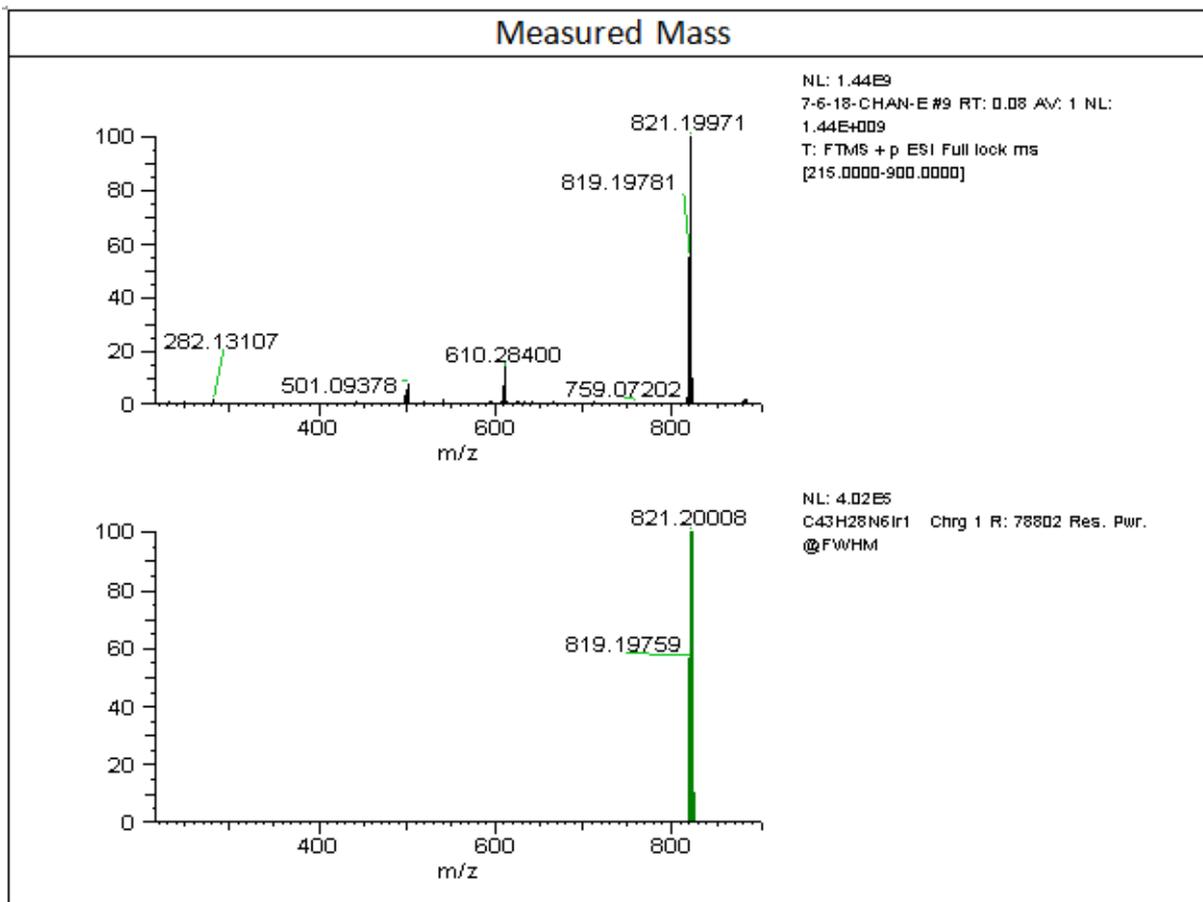
### Elemental Composition Results

m/z	Formula	Score	Delta ppm	OriginalFormula	Theo. Mass
351.12384	C <sub>22</sub> H <sub>15</sub> ON <sub>4</sub>	96.76	-0.56	C22H15ON4	351.12404

**Figure S6.14** HRMS data for *PPIP* ligand



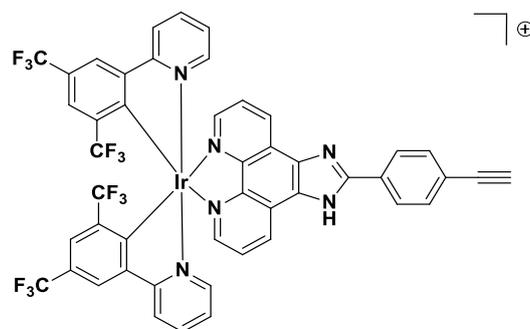
Ir 1-[Ir(ppy)<sub>2</sub>EPIP]<sup>+</sup>



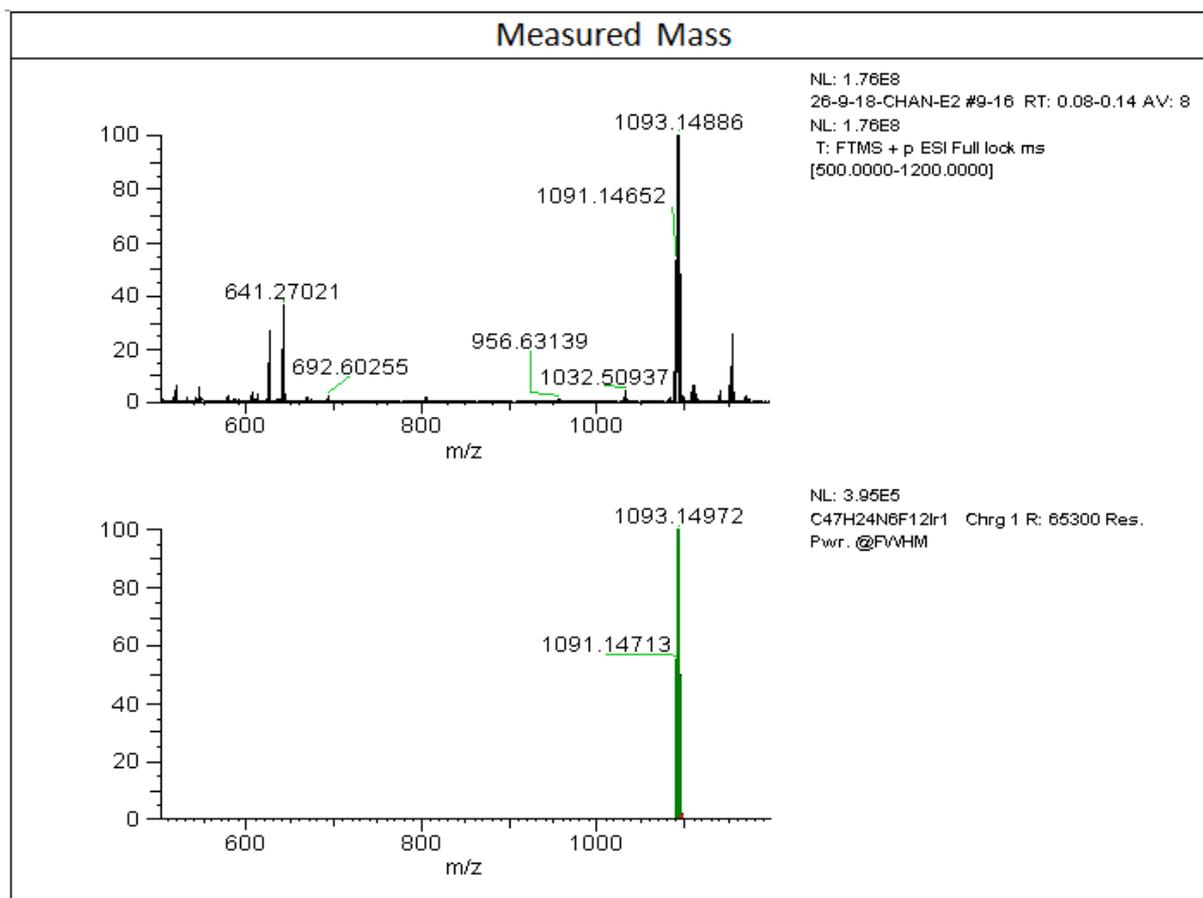
### Elemental Composition Results

m/z	Formula	Score	Delta ppm	OriginalFormula	Theo. Mass
819.19781	C <sub>43</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> <sup>191</sup> Ir	91.76	0.28	C43H28N6[191]Ir	819.19759

Figure S6.15 HRMS data for Ir 1



Ir 2-[Ir(ppyCF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>EPIP]<sup>+</sup>

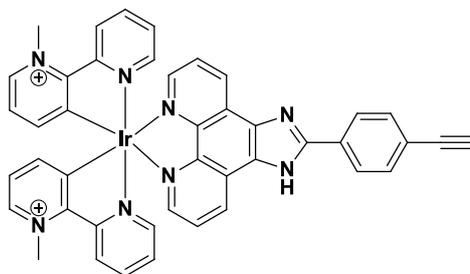


**Elemental Composition Results**

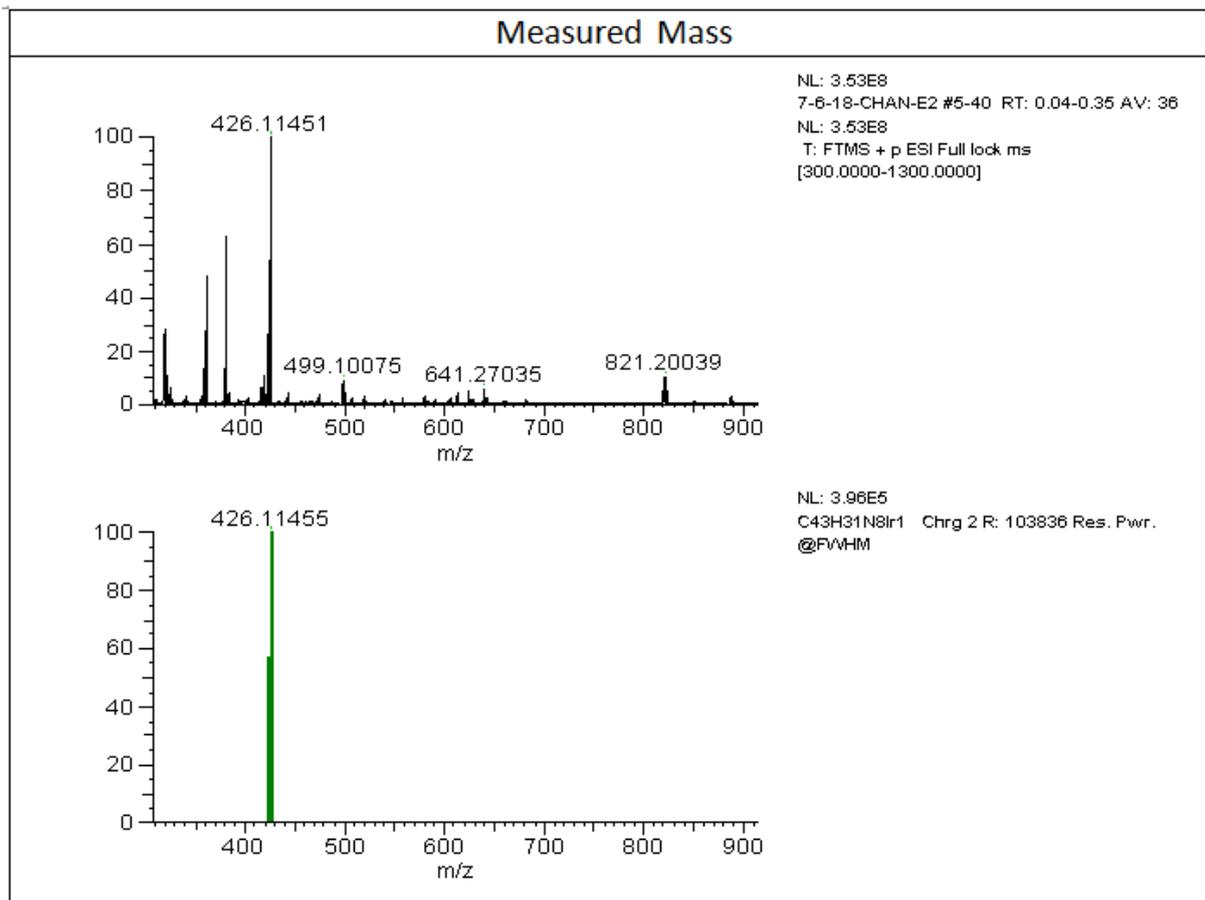
m/z	Formula	Score	Delta ppm	OriginalFormula	Theo. Mass
1091.14652	C <sub>47</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> F <sub>12</sub> <sup>191</sup> Ir	76.38	-0.56	C47H24N6F12[191]Ir	1091.14713

Figure S6.16 HRMS data for Ir 2

3<sup>⊕</sup>



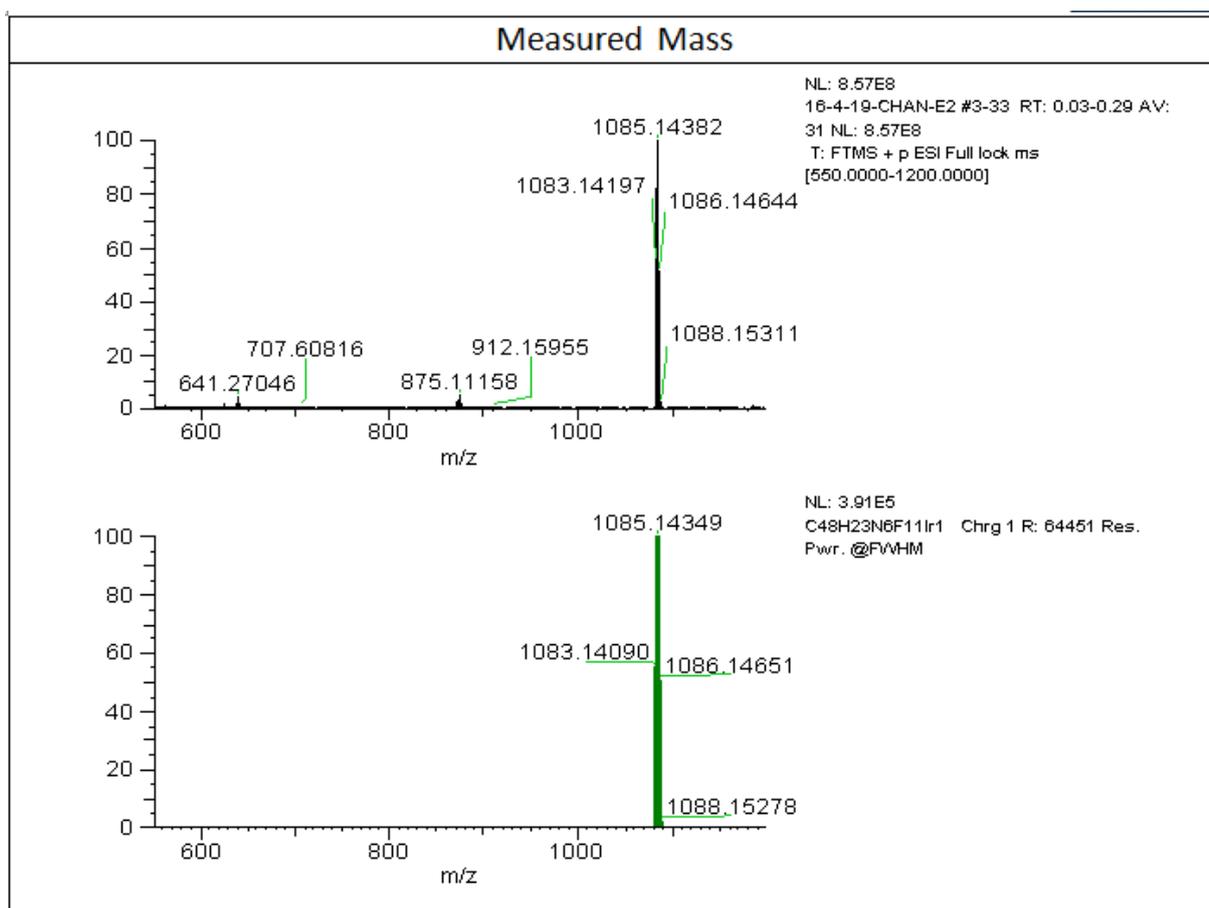
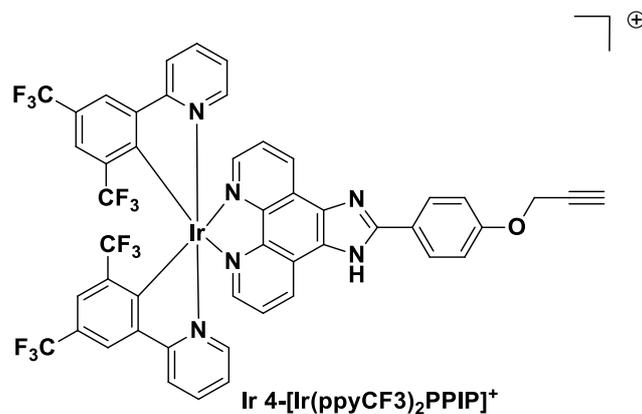
Ir 3-[Ir(2,2'-C<sup>^</sup>AN)<sub>2</sub>EPIP]<sup>3+</sup>



**Elemental Composition Results**

m/z	Formula	Score	Delta ppm	OriginalFormula	Theo. Mass
425.11343	C <sub>43</sub> H <sub>31</sub> N <sub>8</sub> <sup>191</sup> Ir	82.69	0.24	C43H31N8[191]Ir	425.11333

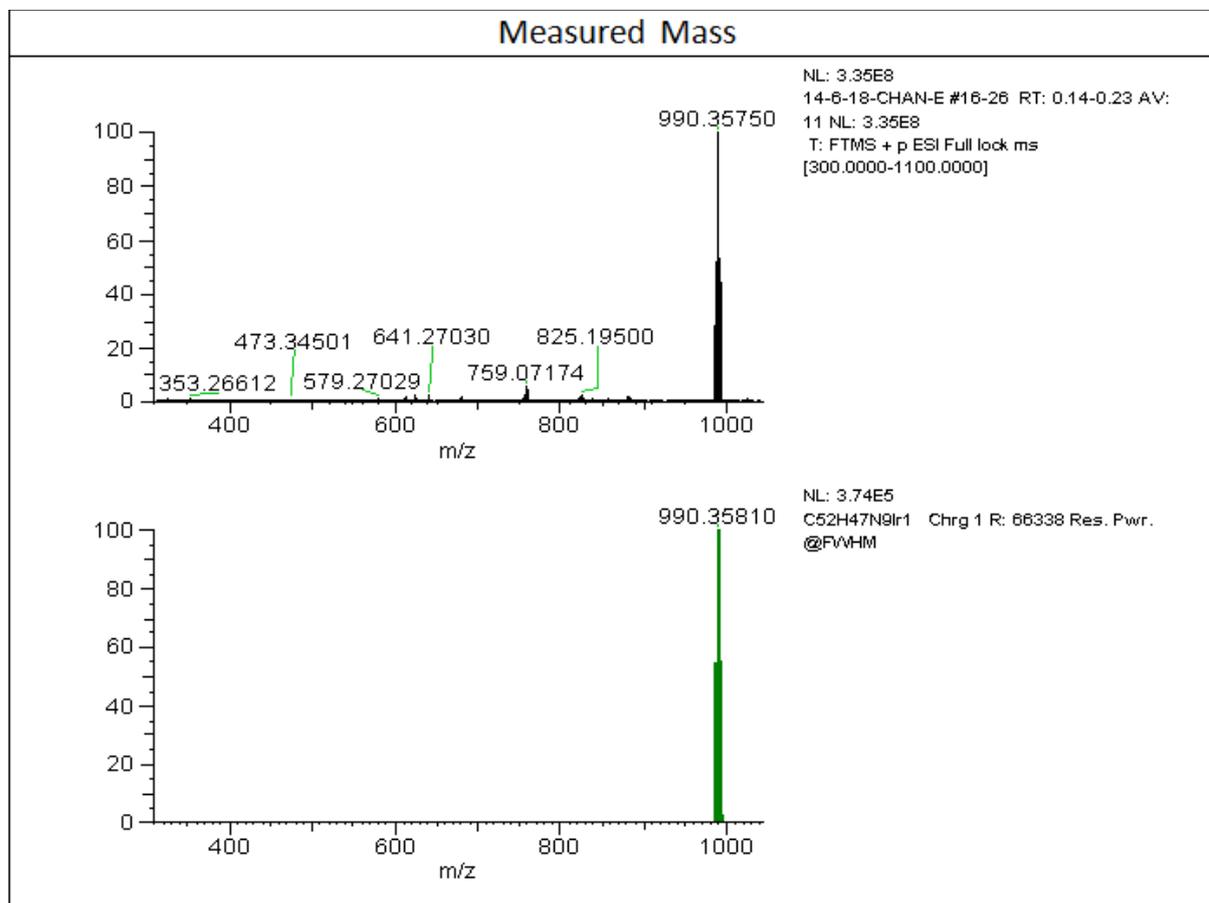
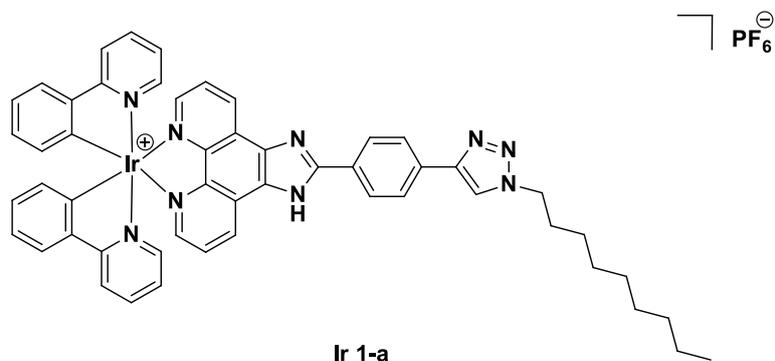
Figure S6.17 HRMS data for Ir 3



### Elemental Composition Results

m/z	Formula	Score	Delta ppm	OriginalFormula	Theo. Mass
1083.14197	C <sub>48</sub> H <sub>23</sub> N <sub>6</sub> F <sub>11</sub> <sup>191</sup> Ir	92.06	0.99	C48H23N6F11[191]Ir	1083.14090

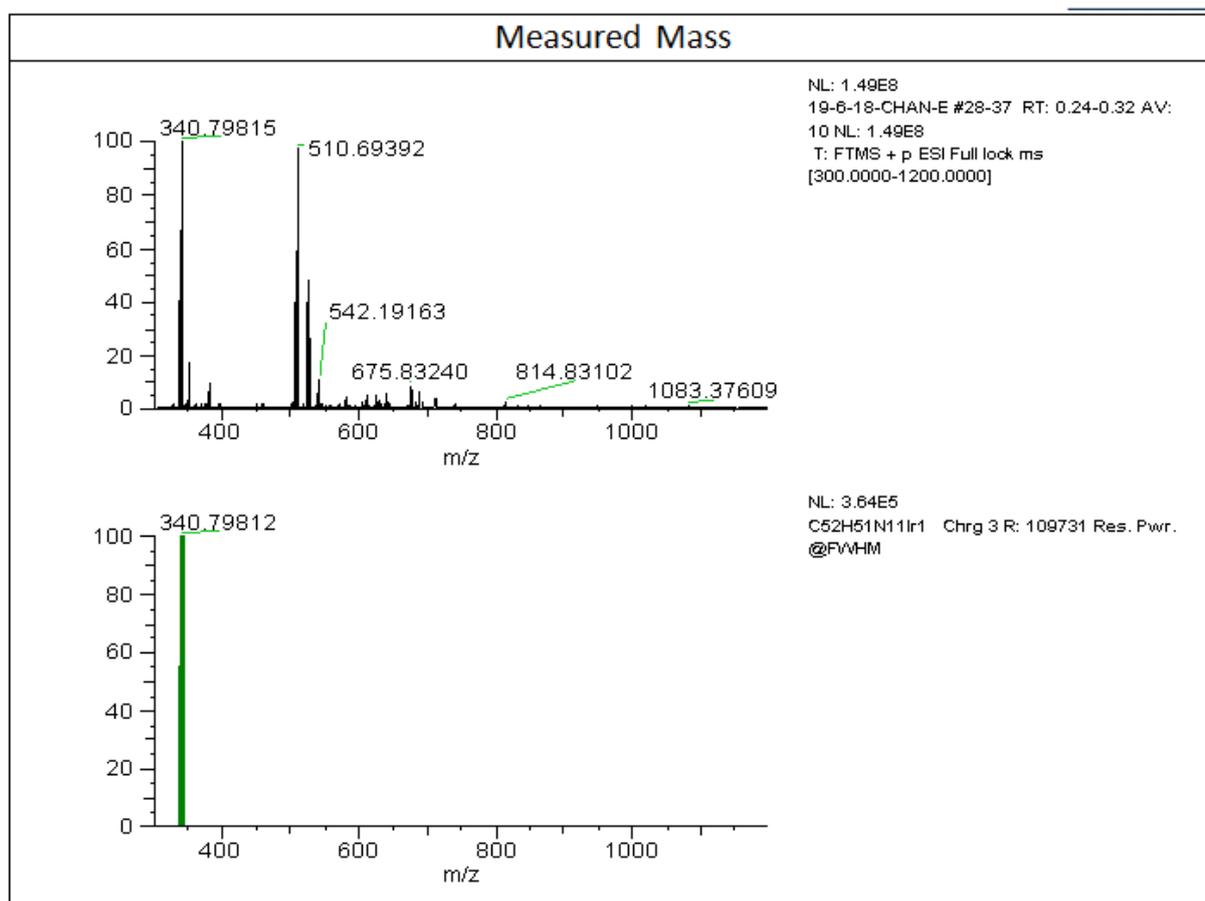
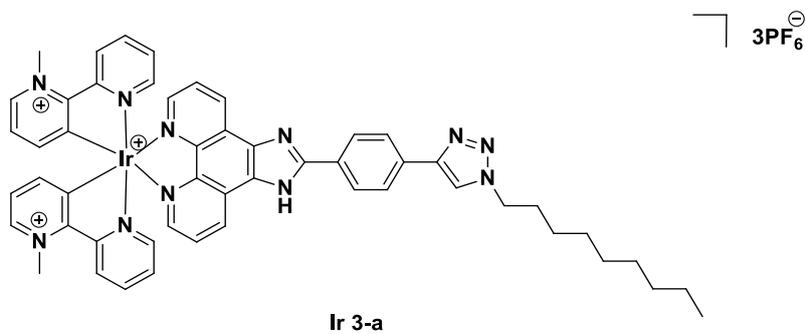
**Figure S6.17 HRMS data for Ir 4**



### Elemental Composition Results

m/z	Formula	Score	Delta ppm	OriginalFormula	Theo. Mass
988.35559	C <sub>52</sub> H <sub>47</sub> N <sub>9</sub> <sup>191</sup> Ir	76.65	0.11	C <sub>52</sub> H <sub>47</sub> N <sub>9</sub> [191]Ir	988.35549

**Figure S6.18 HRMS data for Ir 1-a**



### Elemental Composition Results

m/z	Formula	Score	Delta ppm	Original Formula	Theo. Mass
340.13104	C <sub>52</sub> H <sub>51</sub> N <sub>11</sub> <sup>191</sup> Ir	67.95	1.26	C <sub>52</sub> H <sub>51</sub> N <sub>11</sub> [191]Ir	340.13061

**Figure S6.18 HRMS data for Ir 3-a**

### 3.6.4. Cyclic voltammograms for Ir(III) complexes

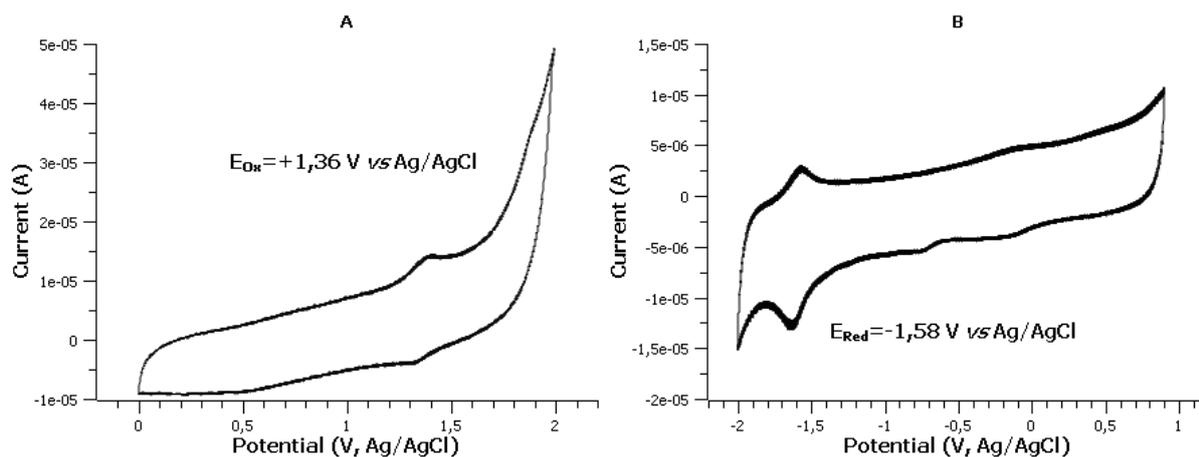


Figure S6.19 Cyclic voltammograms of Ir 1. (A) positive polarization and (B) negative polarization.

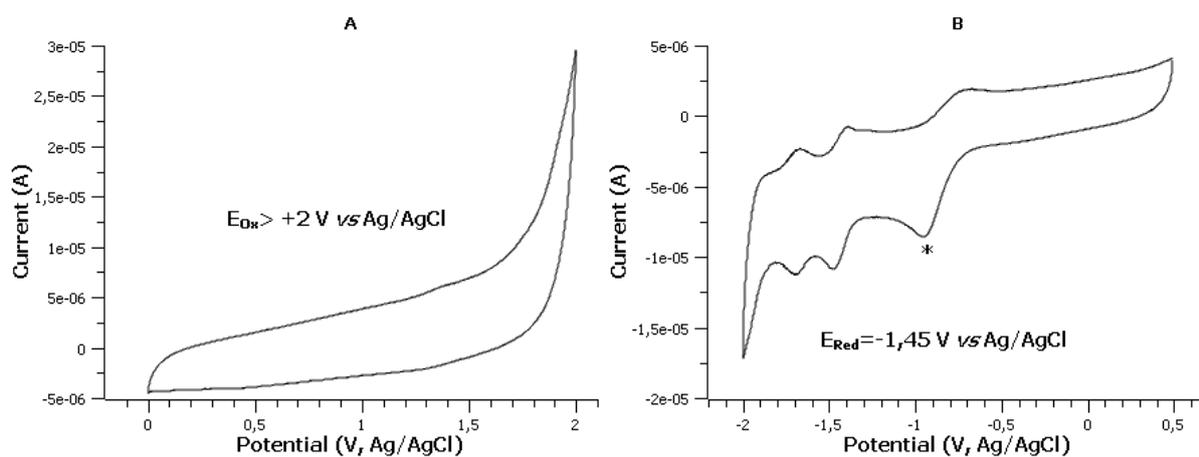


Figure S6.20 Cyclic voltammograms of Ir 2. (A) positive polarization and (B) negative polarization. \*This peak is assigned to a TBA<sup>+</sup> stabilized O<sub>2</sub> reduction (due to residual O<sub>2</sub> in the solution).<sup>117</sup>

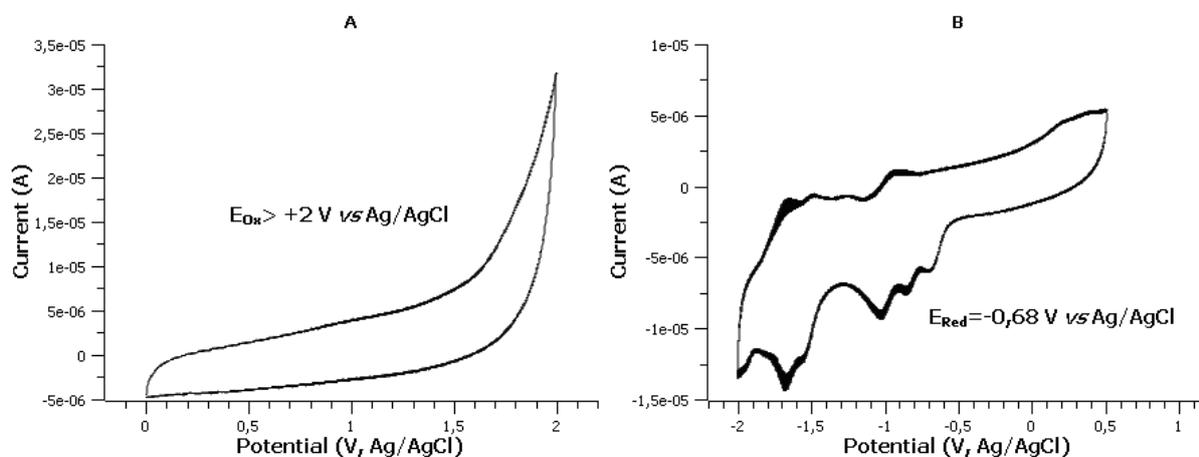
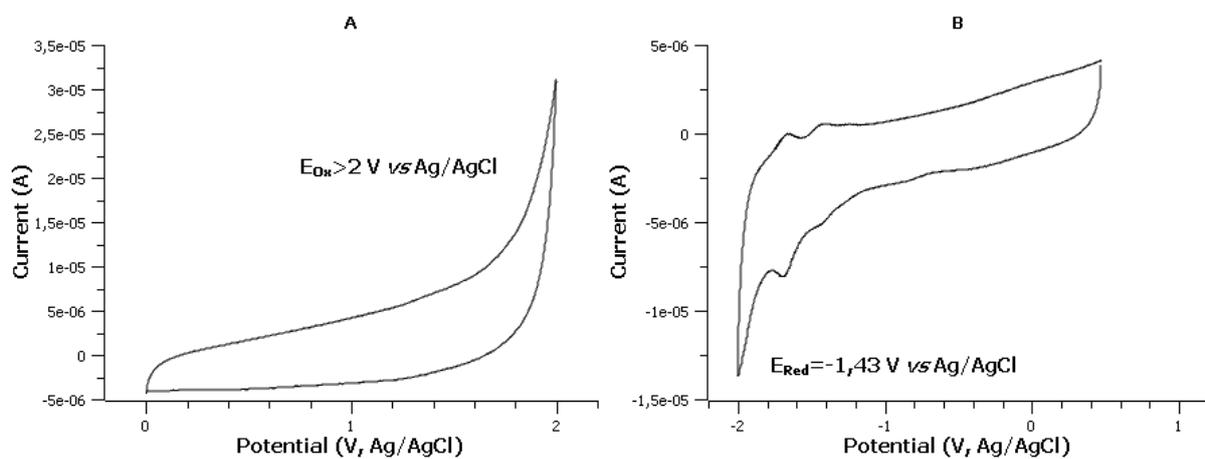
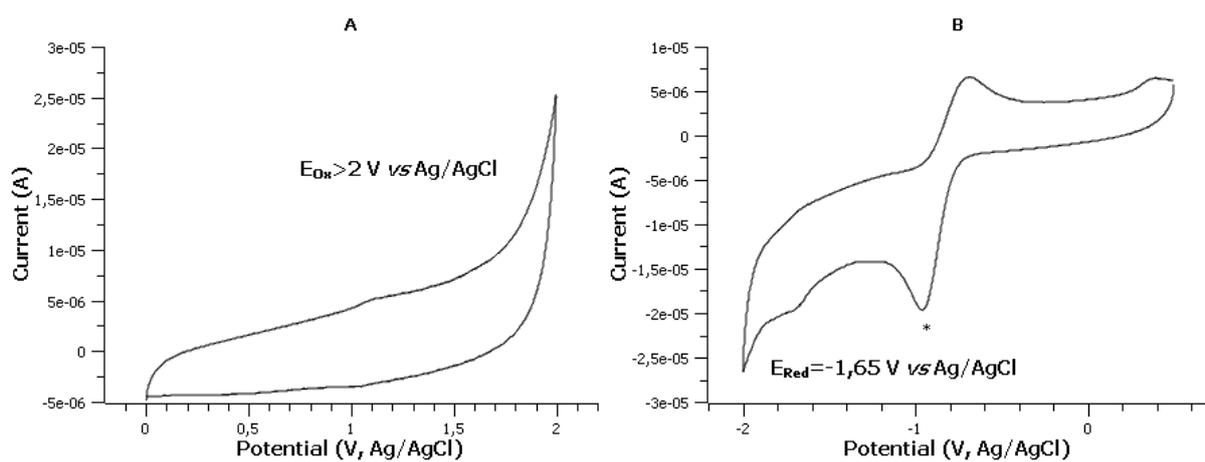


Figure S6.21 Cyclic voltammograms of Ir 3. (A) positive polarization and (B) negative polarization.



**Figure S6.22** Cyclic voltammograms of Ir 4. (A) positive polarization and (B) negative polarization.



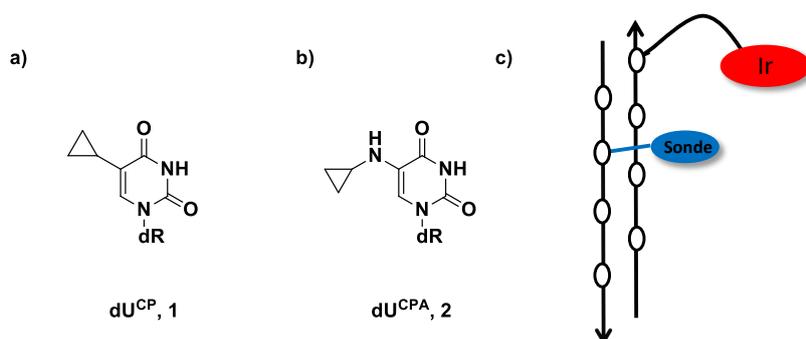
**Figure S6.23** Cyclic voltammograms of Ir 5. (A) positive polarization and (B) negative polarization. \*This peak is assigned to a TBA<sup>+</sup> stabilized O<sub>2</sub> reduction (due to residual O<sub>2</sub> in the solution).<sup>117</sup>

## **Chapitre 4 : Synthèse des ADN duplexes et ADN G-quadruplexes**

## 4.1. Synthèse des systèmes ADN duplexe

### 4.1.1. Objectifs

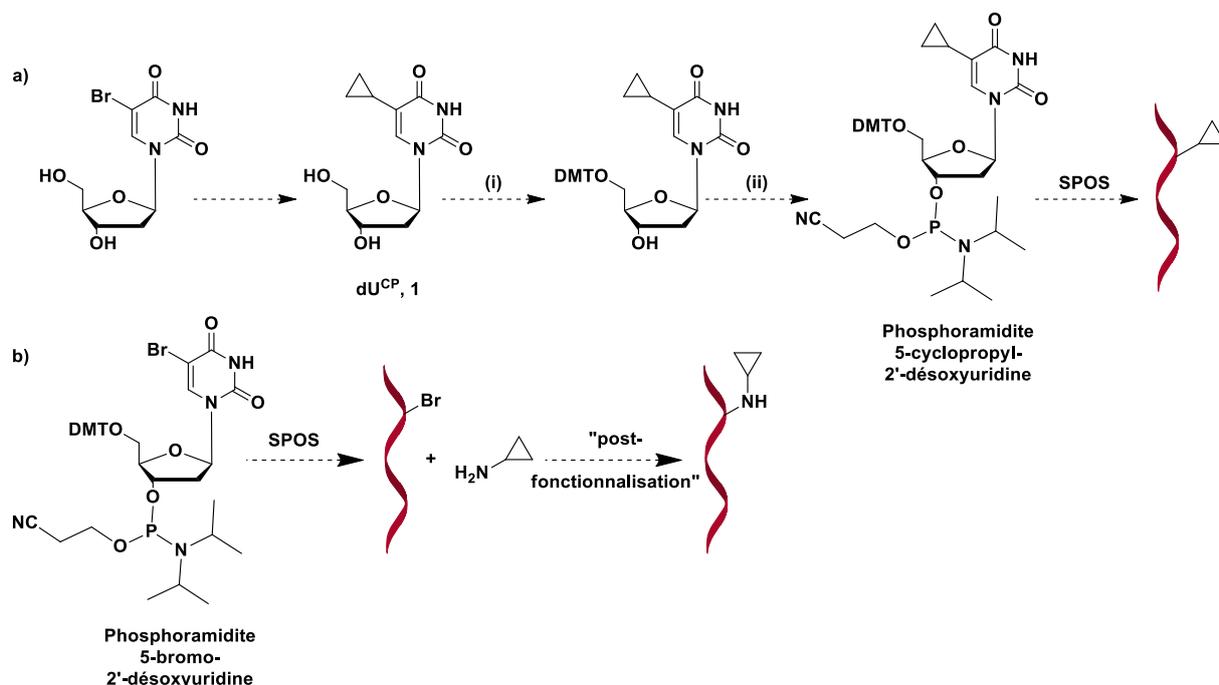
Comme mentionné dans le Chapitre 2, notre premier objectif est d'étudier le transfert de charges photo-induit dans un duplex d'ADN en utilisant une nouvelle sonde de type « fast trap » et un injecteur de charge de type complexe d'iridium. Ce sous-chapitre se divise en deux parties: (i) le développement d'une sonde « fast trap » 5-cyclopropyl-2'-désoxyuridine ( $dU^{CP}$ ) **1** (**Figure 4.1 a**) et 5-cyclopropylamine-2'-désoxyuridine ( $dU^{CPA}$ ) **2** (**Figure 4.1 b**), capable de piéger à la fois les électrons et les charges positives et (ii) de la préparation du brin complémentaire portant un complexe d'iridium, **Ir 1**, préparé préalablement (voir Chapitre 3), comme injecteur de charge. En présence de ces deux brins d'oligonucléotides complémentaires, nous pouvons alors former un système d'ADN duplexe nous permettant d'étudier le transfert de charges au sein de celui-ci (**Figure 4.1 c**).



**Figure 4.1 :** Représentation de la a) 5-cyclopropyl-2'-désoxyuridine  $dU^{CP}$  **1**, b) 5-cyclopropylamine-2'-désoxyuridine  $dU^{CPA}$  **2**, c) du système duplexe d'ADN avec en rouge l'injecteur de charge et en bleu la sonde.

La stratégie envisagée pour la synthèse de l'oligonucléotide porteur de la nouvelle sonde est de partir du produit commercial 5-bromo-2'-désoxyuridine. Deux approches différentes sont proposées :

- Dans un premier cas, nous avons envisagé d'introduire la  $dU^{CP}$  **1** au sein d'un oligonucléotide par synthèse automatisée. Pour cela le produit commercial 5-bromo-2'-désoxyuridine ( $dU^{Br}$ ) doit être converti en 5-cyclopropyl-2'-désoxyuridine ( $dU^{CP}$ , **1**) puis transformé en phosphoramidite pour une incorporation dans l'oligonucléotide par synthèse sur support solide des oligonucléotides (décrite ultérieurement). L'abréviation SPOS (« solid phase oligonucleotide synthesis ») sera utilisée par la suite pour désigner cette technique. (**Schéma 4.1 a**).
- Pour le second cas, nous avons considéré l'ajout du groupement cyclopropylamine par une réaction dite de « post fonctionnalisation » (**Schéma 4.1 b**) à partir de l'oligonucléotide précurseur porteur du nucléoside 5-bromo-2'-désoxyuridine. La synthèse d'oligonucléotides portant des sondes « fast trap » décrite dans la littérature, est aussi réalisée par une réaction de « post fonctionnalisation ».<sup>75,76,81</sup>



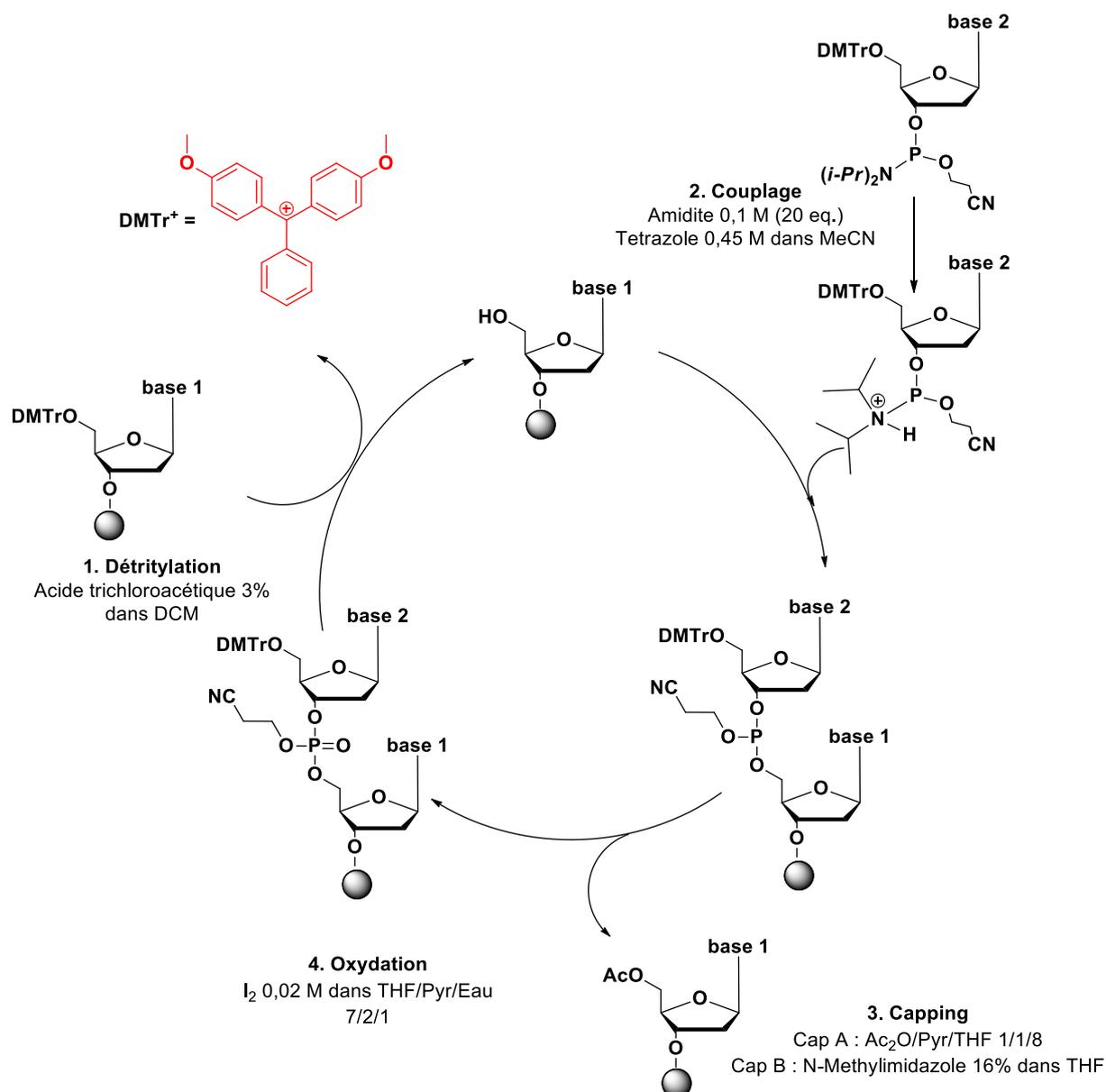
**Schéma 4.1** : a) Synthèse envisagé pour la préparation d'oligonucléotides porteur du groupement cyclopropane (i) chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle, pyridine, (ii) (*i-Pr*)<sub>2</sub>NEt, NC(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OP(Cl)N(*i-Pr*)<sub>2</sub> b) représentation schématique de la synthèse de l'oligonucléotide porteur du groupement cyclopropylamine à partir de l'oligonucléotide précurseur obtenu par SPOS.

Suite à cela, l'oligonucléotide porteur de la sonde sera apparié au brin complémentaire comportant l'injecteur de charge **Ir 1**, formant un duplexe d'ADN (**Figure 4.1 c**).

## 4.1.2. Résultats

### 4.1.2.1. Généralité sur la synthèse des oligonucléotides

De manière générale, la synthèse de brins d'ADN est réalisée en phase solide par la chimie des phosphoramidites<sup>125</sup> sur synthétiseur automatique (SPOS). Sur support solide, l'élongation d'une chaîne nucléotidique se fait de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. L'incorporation de nucléotides successifs comporte quatre étapes, illustrées sur le **Schéma 4.2**.



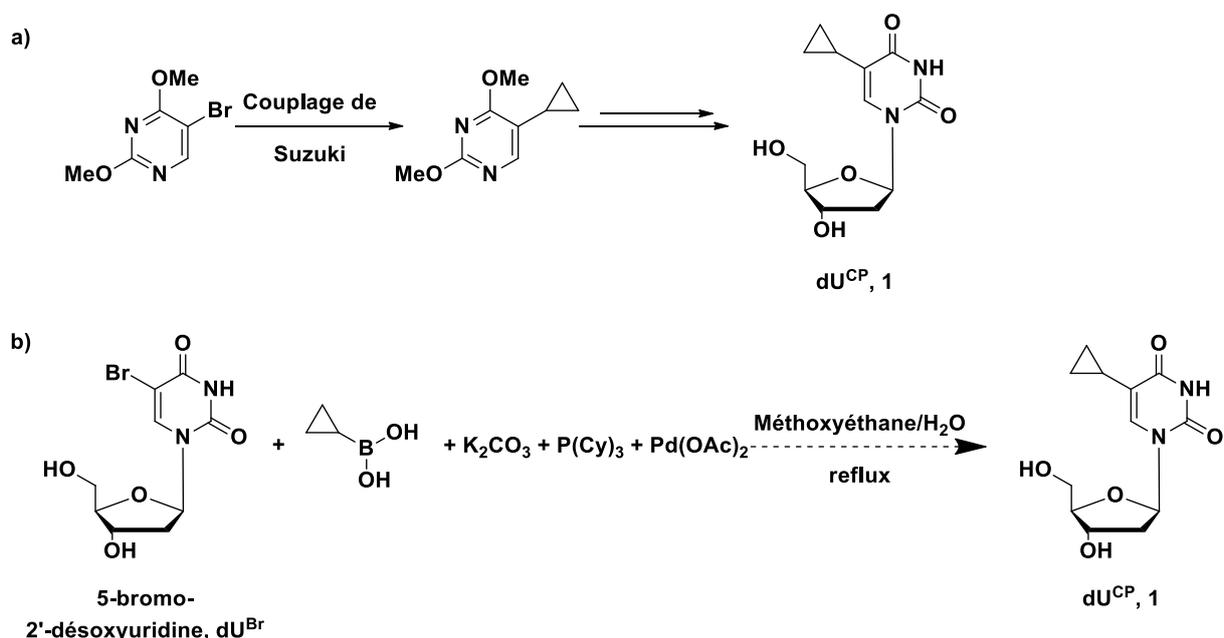
**Schéma 4.2 :** Cycle de synthèse d'oligonucléotides par la méthode aux phosphoramidites.

La première étape, la détritylation, consiste à enlever le groupement protecteur (le diméthoxytrityle, DMT) de l'hydroxyle en 5' du sucre en présence d'une solution d'acide trichloroacétique dans le dichlorométhane. Le cation libéré, le diméthoxytritylium (DMTr<sup>+</sup>) de couleur rouge, permet d'évaluer par conductimétrie l'efficacité de chaque cycle complet de synthèse. L'étape suivante consiste à incorporer le nucléotide protégé suivant grâce au groupement hydroxyle déprotégé en position 5'. Pour cela, la réaction est réalisée en présence de tétrazole, un activateur permettant le couplage et la formation d'un phosphite triester. La troisième étape est le coiffage ou « capping » en anglais. Le coiffage se fait en présence d'un mélange de deux réactifs : Cap A (Ac<sub>2</sub>O/pyridine/THF 10/10/80) et Cap B (N-méthylimidazole/THF 10/90), permettant ainsi l'acétylation des hydroxyles qui n'ont pas réagi lors du couplage précédent. En effet, le couplage à chaque cycle n'est jamais total, laissant ainsi certains hydroxyles en 5' libres. Ces hydroxyles peuvent réagir lors des cycles de synthèse suivants formant de ce fait des oligonucléotides tronqués de

séquences différentes. Pour finir, la dernière étape permet de générer une liaison phosphodiester stable, par oxydation de la liaison triester en présence de diode.

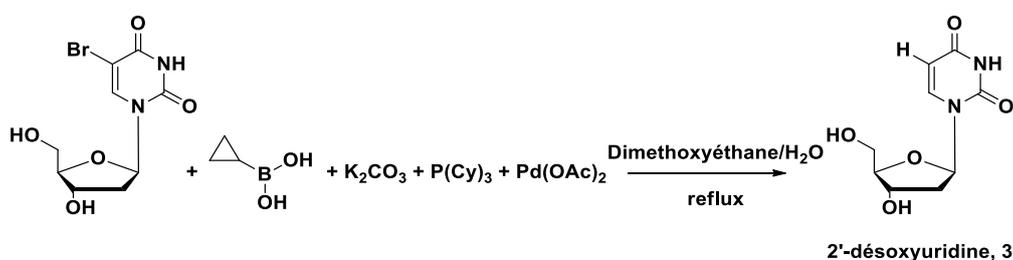
#### 4.1.2.2. Synthèse de la sonde 5-cyclopropyl-2'-désoxyuridine **1**

Nous nous sommes basés sur le protocole de F. Seela, dans lequel l'obtention du nucléoside 5-cyclopropyl 2'-désoxyuridine **1** se fait à partir de la 5-bromo-2,4-diméthoxypyrimidine en présence de l'acide cyclopropylboronique dans les conditions de couplage de Suzuki (**Schéma 4.3 a**).<sup>126</sup> Nous avons envisagé de préparer la 5-cyclopropyl-2'-désoxyuridine **1** directement à partir du produit commercial 5-bromo-2'-désoxyuridine en utilisant les conditions de couplage décrites par F. Seela (**Schéma 4.3 b**).



**Schéma 4.3** : a) Synthèse de la dU<sup>CP</sup> selon le protocole de F. Seela, b) Synthèse proposée pour l'obtention de la dU<sup>CP</sup> **1** à partir du nucléoside 5-bromo-2'-désoxyuridine.

En appliquant les conditions de couplage de Suzuki selon le protocole décrit par F. Seela<sup>126</sup>, c'est-à-dire en présence de la 5-bromo-2'-désoxyuridine, de l'acide cyclopropylboronique, du carbonate de potassium, du tricyclohexylphosphine et de l'acétate de palladium (II), le milieu réactionnel est chauffé à reflux dans un mélange méthoxyéthane/eau (6:4) pendant 24 heures. Une analyse par chromatographie sur couches minces révèle la formation d'un produit (plus polaire). A la fin de la réaction, le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur silice. En isolant le produit majoritaire formé, nous constatons que le produit désiré dU<sup>CP</sup> **1** n'est pas obtenu mais c'est le produit **3** (2'-désoxyuridine) issu d'une réaction de réduction (ou aussi désigné sous le terme de « débromination ») qui s'est formé (**Schéma 4.4**). En effet, l'analyse par RMN du proton indique l'apparition d'un doublet intégrant pour un proton à 5.90 ppm et qui corrèle avec le proton en position 6 (7.86 ppm). Le pic de ce dernier est aussi sous la forme d'un doublet alors que nous nous attendons à un singulet. L'analyse ESI-MS(+) nous confirme que le groupement cyclopropyl n'a pas été incorporé mais c'est la « débromination » du produit de départ qui a eu lieu.



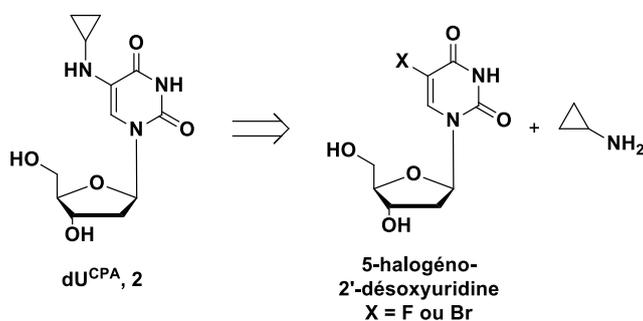
**Schéma 4.4 :** Obtention du produit de « débromination » **3** dans les conditions de couplage de Suzuki.

Nous avons alors essayé d'autres conditions de synthèse. En se basant sur les conditions décrites par l'équipe de F. Shao,<sup>127</sup> en utilisant les mêmes réactifs que décrit précédemment, mais en ajoutant en plus le ligand 3,3',3''-triphénylphosphine trisulfonate de sodium (TPPTS) et en chauffant à 100°C dans l'eau, le même produit de réduction est obtenu. En effet, il semble qu'une réaction indésirable de  $\beta$ -élimination d'hydrure a lieu à l'étape de transmétallation, causant *in fine* la « débromination » ou réduction du composé au lieu de l'insertion du groupement cyclopropane sur la 2'-désoxyuridine.<sup>128,129</sup>

La formation de la 5-cyclopropyl-2'-désoxyuridine **1** à partir d'une réaction de couplage de Suzuki entre la 5-bromo-2'-désoxyuridine et l'acide cyclopropylboronique n'ayant pas donné les résultats attendus, nous avons alors envisagé de concevoir une sonde basée sur la 5-cyclopropylamine-2'-désoxyuridine (dU<sup>CPA</sup>) **2**.

#### 4.1.2.3. Synthèse de la sonde 5-cyclopropylamine-2'-désoxyuridine **2**

Comme mentionné précédemment, la préparation classique d'oligonucléotides porteurs d'une sonde dite « fast trap » est réalisée par « post fonctionnalisation » sur l'oligonucléotide précurseur. Mais avant de réaliser la réaction de « post fonctionnalisation » directement sur oligonucléotides, nous allons tout d'abord mettre au point la réaction au stade du nucléoside avant de procéder sur oligonucléotide. La stratégie envisagée est d'utiliser un nucléoside commercial, 5-halogéno-2'-désoxyuridine (halogène : Br ou F), sur lequel on fait réagir la cyclopropylamine afin d'induire une réaction de substitution nucléophile aromatique pour introduire le groupement cyclopropylamine (**Schéma 4.5**).

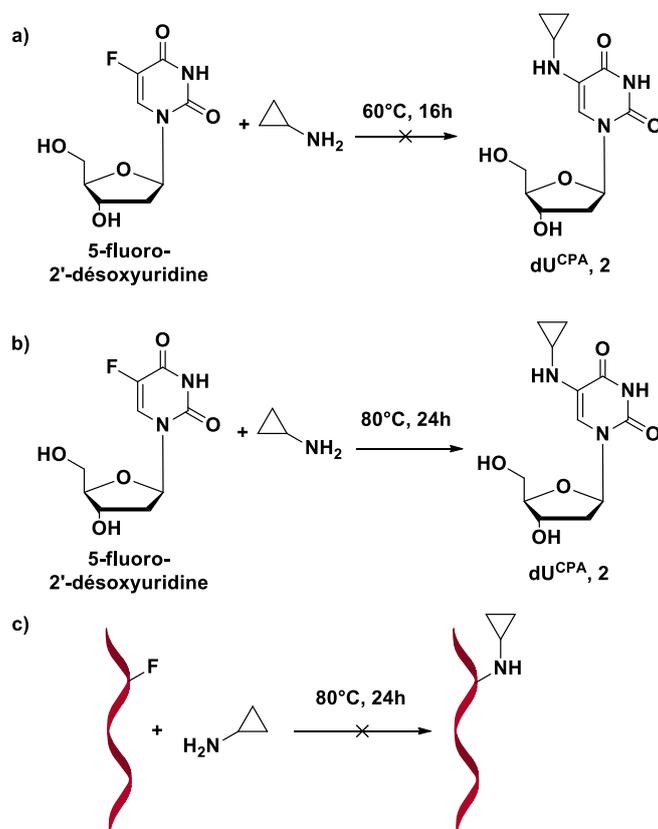


**Schéma 4.5 :** Synthèse envisagée pour la préparation de la 5-cyclopropylamine-2'-désoxyuridine.

##### a. Travaux préliminaires

Des travaux préliminaires ont été entrepris avant le début de cette thèse de doctorat afin de vérifier la faisabilité de cette réaction en suivant les protocoles de « post fonctionnalisation » classiques. Tout d'abord, le nucléoside précurseur commercial, 5-fluoro-2'-désoxyuridine, est chauffé

en présence de cyclopropylamine 6 M, à 60°C pendant 16h. Cependant la formation du produit **2** n'a pas été observée (**Schéma 4.6 a**). En modifiant les conditions de réactions, c'est-à-dire en chauffant à 80°C pendant 24 h, le produit désiré **2** est obtenu (**Schéma 4.6 b**). Sachant que l'incorporation du groupement cyclopropylamine est possible en série nucléoside, nous avons alors tenté d'introduire celui-ci en série oligonucléotide. Malheureusement, nous n'observons pas la formation de l'oligonucléotide désiré mais l'oligonucléotide de départ est récupéré (**Schéma 4.6 c**).

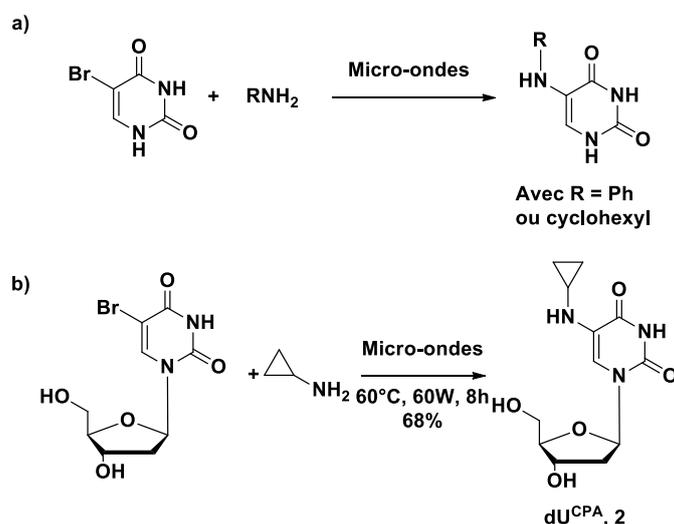


**Schéma 4.6** : Synthèse de dU<sup>CPA</sup> **2** a) à 60°C pendant 16h b) à 80°C pendant 24h et c) synthèse de l'oligonucléotide porteur de la sonde par « post fonctionnalisation ».

Puisque l'incorporation du groupement cyclopropylamine n'est possible qu'en série nucléoside pour la 5-fluoro-2'-désoxyuridine, nous avons alors envisagé l'utilisation du produit commercial 5-bromo-2'-désoxyuridine, comme alternative.

### b. En série nucléoside

En se basant sur les travaux de Y. Chergn sur des composés similaires (l'incorporation de divers amines sur la 5-bromouracile par réaction dans un réacteur micro-ondes, **Schéma 4.7 a**),<sup>130</sup> la préparation du composé **2** par voie micro-ondes a été considérée (**Schéma 4.7 b**).

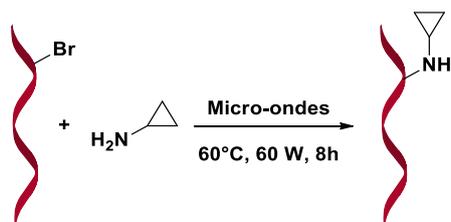


**Schéma 4.7 :** a) Exemple de substitution de la 5-bromouracile par des amines, b) Synthèse par voie micro-ondes de la dU<sup>CPA</sup> 2.

Le produit dU<sup>CPA</sup> 2 est obtenu après 8 heures de réaction dans un réacteur micro-ondes avec un chauffage à 60°C (60 W), en présence de la 5-bromo-2'-désoxyuridine et de la cyclopropylamine (0.1 M). Cependant une dégradation du produit a été observée durant l'étape de purification sur une colonne chromatographique de silice. L'acidité de la silice serait la cause de la dégradation du produit. Pour pallier ce problème, un éluant contenant 1% de TEA a été utilisée pour désactiver la silice, nous permettant l'obtention du produit désiré avec 68% de rendement. Le produit dU<sup>CPA</sup> 2 a été caractérisé par RMN du proton et par analyse UPLC-MS. Nous retrouvons en particulier les déplacements chimiques caractéristiques du groupement cyclopropyl avec les deux multiplets intégrant pour deux protons vers 0.70 et 0.50 ppm correspondant aux deux groupements CH<sub>2</sub> du cyclopropane.

### c. En série oligonucléotide

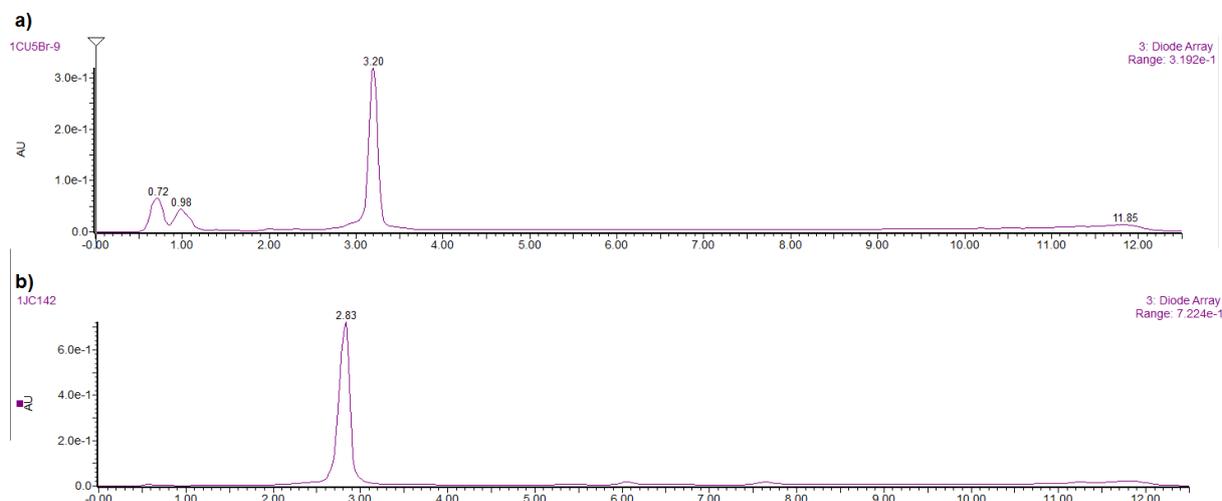
Avec la confirmation que l'ajout du groupement cyclopropylamine est possible par synthèse en série nucléoside *via* une activation aux micro-ondes, nous avons envisagé l'incorporation du groupement cyclopropylamine sur un oligonucléotide portant la 5-bromo-2'-désoxyuridine au sein de sa séquence (**Schéma 4.8**).



**Schéma 4.8 :** a) Synthèse envisagée pour la préparation d'oligonucléotides porteurs du groupement cyclopropylamine.

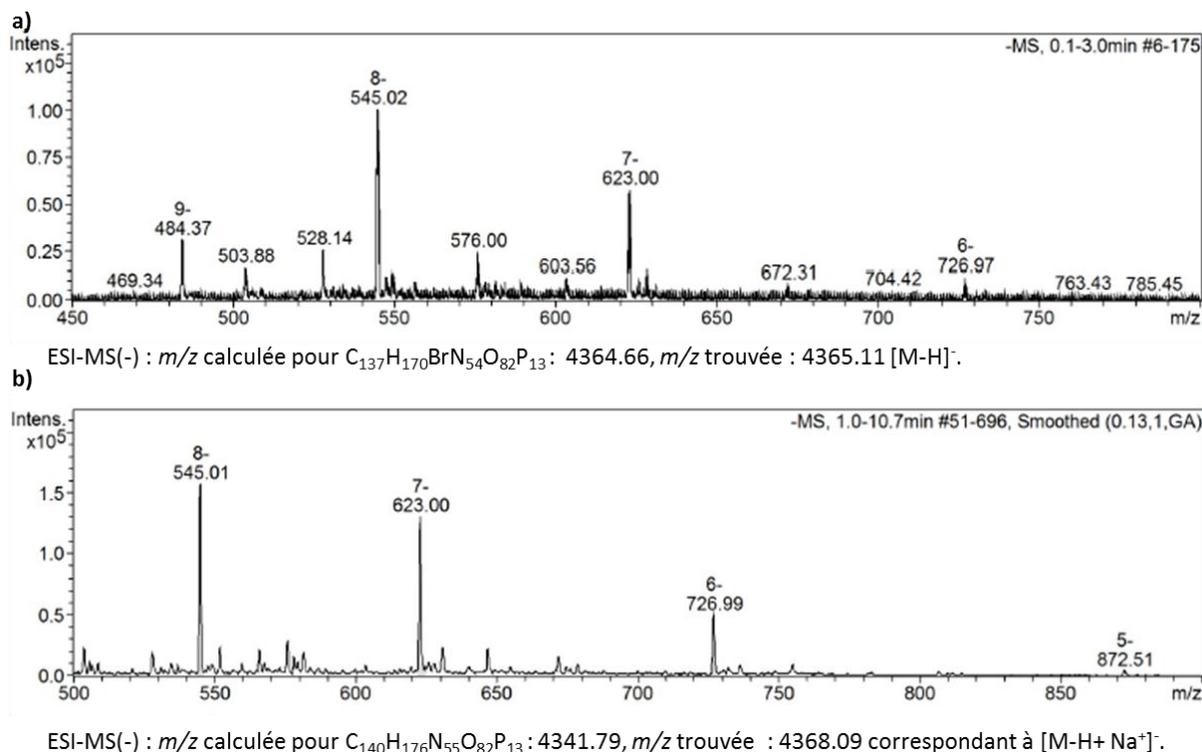
Les oligonucléotides de départ sont préparés par méthode SPOS en utilisant le phosphoramidite commercial 5-bromo-2'-désoxyuridine. En utilisant le même protocole de réaction que pour le 2'-désoxynucléoside, la réaction de l'oligonucléotide bromé dans un réacteur micro-ondes avec la cyclopropylamine à 60°C (60 W) est réalisée pendant 8h dans un tube scellé (**Schéma 4.6**). A la fin de

la réaction, le brut réactionnel est dessalé sur une colonne chromatographique d'exclusion stérique (NAP-25) avant la purification par chromatographie liquide haute pression (HPLC) semi-préparatrice en phase inverse. En comparant les analyses par UPLC des oligonucléotides portant l'atome de brome et le groupement cyclopropylamine, une modification du temps de rétention est observée quoique assez faible (**Figure 4.2**) De façon surprenante, l'analyse par spectrométrie de masse nous donne une masse identique à celle de l'oligonucléotide de départ, ce dernier ayant la même masse que l'oligonucléotide porteur du groupement cyclopropylamine formant un adduit avec un ion sodium ( $[M+H + Na]^+$ ).



**Figure 4.2 :** Chromatogramme UPLC de a) l'oligonucléotide portant l'atome de brome (1CU5<sup>Br</sup>), b) l'oligonucléotide porteur du groupement cyclopropylamine (1CU5<sup>CPA</sup>).

Nous avons alors effectué une analyse de spectrométrie de masse ESI-MS(-) afin de confirmer l'incorporation du groupement cyclopropylamine. Les analyses ESI-MS(-) sont représentés dans la **Figure 4.3**. Nous constatons que les résultats des analyses de masses obtenues concordent avec nos observations par UPLC-MS: la formation d'un adduit de l'oligonucléotide porteur de la sonde et un ion sodium ( $[M+H + Na]^+$ ) (donc de même masse que le produit de départ) est observée.

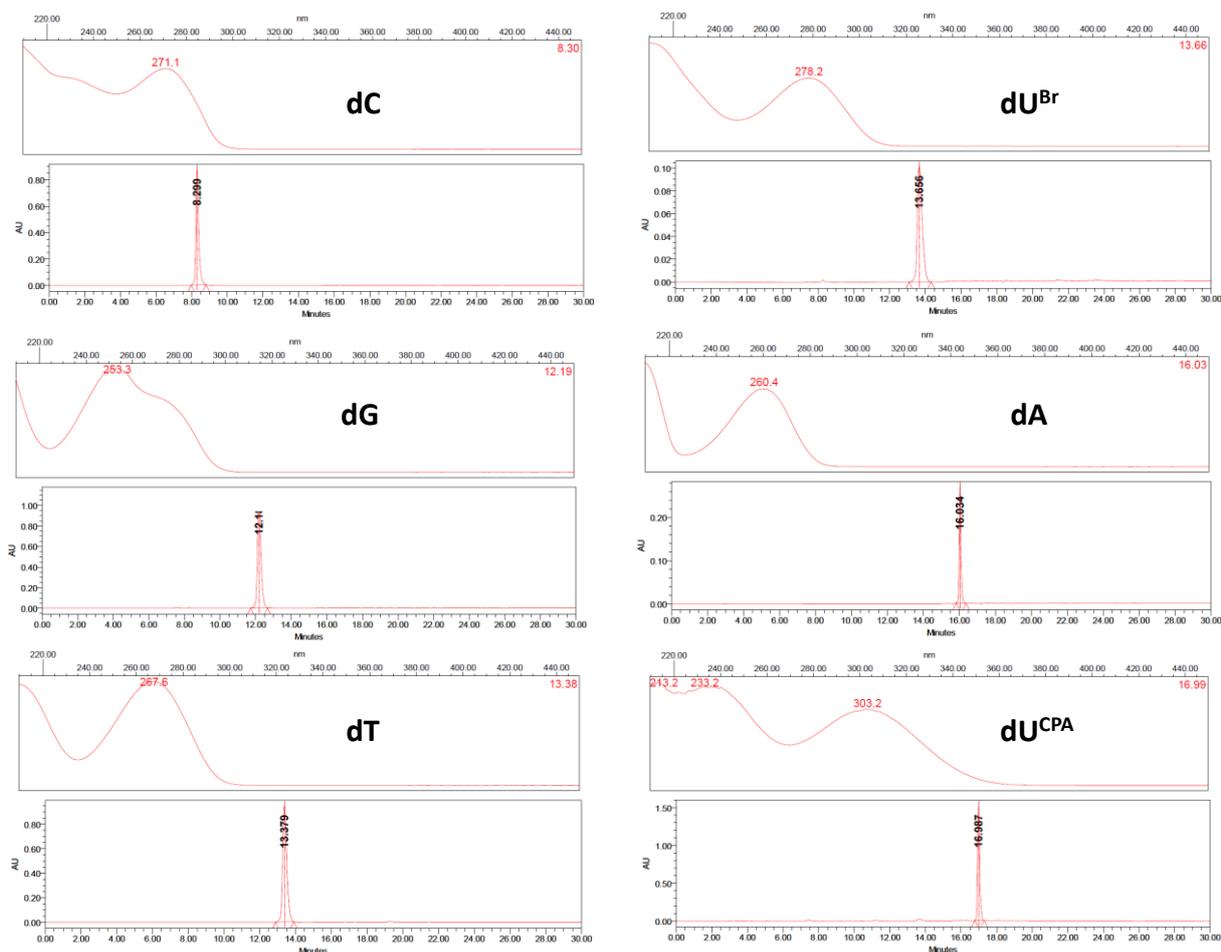


**Figure 4.3** : Spectrométrie de masse ESI-MS(-) pour a) l'oligonucléotide de départ portant l'atome de brome (**1CU5<sup>Br</sup>**), b) l'oligonucléotide porteur du groupement cyclopropylamine (**1CU5<sup>CPA</sup>**).

Dans le but de vérifier de manière non équivoque que le groupement cyclopropylamine a bien été incorporé dans l'oligonucléotide, nous avons envisagé d'utiliser la technique de l'hydrolyse enzymatique. Celle-ci consiste à couper les liaisons phosphodiester de l'oligonucléotide avec des enzymes et d'analyser par HPLC analytique en phase inverse les différents 2'-désoxynucléosides issus de la digestion et ainsi confirmer la présence de la 5-cyclopropylamine-2'-désoxyuridine **2**.

#### d. Hydrolyse enzymatique des oligonucléotides **1CU5<sup>Br</sup>** et **1CU5<sup>CPA</sup>**

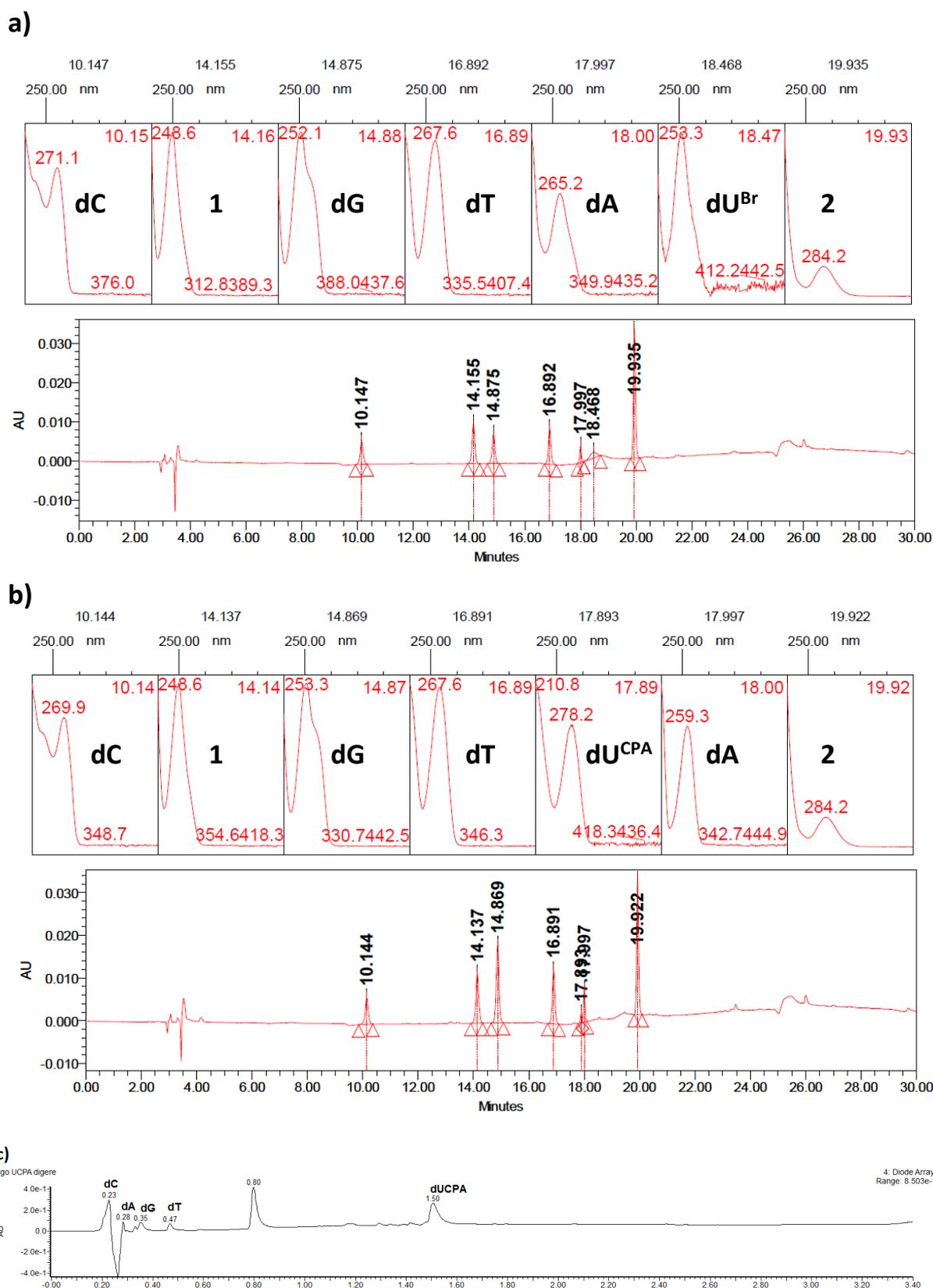
Avant d'entamer les expériences d'hydrolyse enzymatique et l'analyse RP-HPLC, la détermination du temps de rétention de chaque 2'-désoxynucléoside a été nécessaire. En effet, après hydrolyse enzymatique de l'oligonucléotide, l'analyse RP-HPLC comportera autant de pics que de 2'-désoxynucléosides : les quatre 2'-désoxynucléosides naturels (dA, dT, dG et dC) et la 2'-désoxyuridine modifiée par l'atome de brome (dU<sup>Br</sup>) ou le groupement cyclopropylamine (dU<sup>CPA</sup>). La **Figure 4.4** présente le temps de rétention ainsi que le profil d'absorption UV de chaque 2'-désoxynucléoside, obtenu par analyse HPLC analytique en phase inverse.



**Figure 4.4 :** Chromatogramme et spectre UV des différents 2-déoxynucléosides naturels et modifiés.

Une fois le temps de rétention de chaque 2'-déoxynucléoside déterminé, les oligonucléotides **1CU5<sup>Br</sup>** portant l'atome de brome et **1CU5<sup>CPA</sup>** portant le groupement cyclopropylamine ont été soumis à une hydrolyse enzymatique suivie d'une analyse RP-HPLC. Les chromatogrammes obtenus sont représentés dans la **Figure 4.5**. Les quatre 2'-déoxynucléosides (dC, dG, dT, dA) sont bien présents, le pic correspondant à la 5-bromo-2'-désoxyuridine (dU<sup>Br</sup>) apparaît à 18,47 min sur la **Figure 4.5 a** alors que le pic correspondant à la 5-cyclopropylamine-2'-désoxyuridine **2** (dU<sup>CPA</sup>) apparaît à 17,89 min (**Figure 4.5 b**). Une analyse UPLC-MS nous permet de confirmer ces observations (**Figure 4.5 c**). Ceci montre clairement que le groupement cyclopropylamine est bien introduit dans l'oligonucléotide **1CU5<sup>CPA</sup>** après la réaction.

Par ailleurs, deux pics supplémentaires apparaissent, alors qu'en théorie seuls cinq pics doivent être observés (les quatre 2'-déoxynucléosides (dC, dG, dT, dA) et la 2'-désoxyuridine modifiée). Nous supposons que l'origine du pic 1 dont le temps de rétention est à 14,16 min (**Figure 4.5 a**) et à 14,14 min (**Figure 4.5 b**) provient de la désamination de la 2-désoxyadénosine, causée par la présence de désaminases au sein des enzymes de digestion. Le pic 2 à 19,93 min (**Figure 4.5 a**) et 19,92 min (**Figure 4.5 b**) provient des enzymes utilisées (ceci sera détaillé dans le Chapitre 6). Nous observons par ailleurs une légère modification du spectre d'absorption des 2'-déoxynucléosides dU<sup>Br</sup> et dU<sup>CPA</sup> entre les **Figure 4.4** et **4.5**. En effet, il est à noter que les analyses RP-HPLC de la **Figure 4.4** ont été réalisées dans l'eau alors que les chromatogrammes de la **Figure 4.5** sont obtenus après digestion enzymatique dans le tampon HEPES 50 mM à pH 7.4 et le tampon de digestion. Cette modification de spectre d'absorption est donc probablement due à une différence de force ionique.



**Figure 4.5 :** Chromatogramme du mélange obtenu après : a) hydrolyse enzymatique de l'oligonucléotide **1CU5<sup>Br</sup>** de départ, b) hydrolyse enzymatique de oligonucléotide après réaction en présence de cyclopropylamine, avec **1**, un sous-produit de dégradation et **2**, un pic issu des enzymes, c) chromatogramme UPLC du mélange digéré.

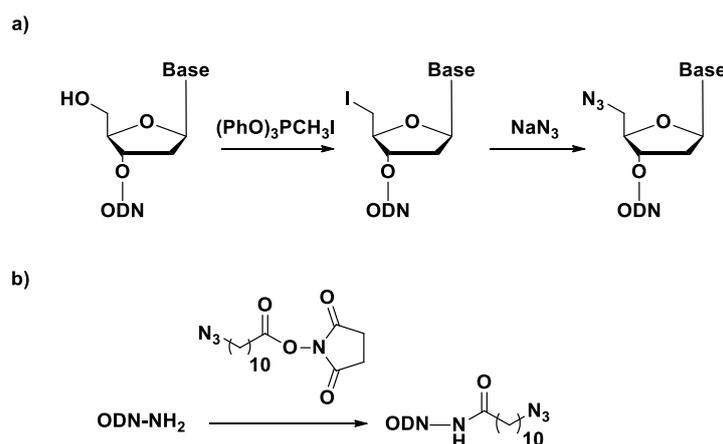
Quatre séquences d'oligonucléotides portant le groupement cyclopropylamine ont été synthétisées et sont illustrées dans le **Figure 4.6**. La raison pour laquelle quatre oligonucléotides présentant le groupement cyclopropylamine ont été préparés, sera expliquée dans le chapitre suivant.

- a) 3'-TTAAU<sup>CPA</sup>GGGGTACCA-5', 1CU5<sup>CPA</sup>
- b) 3'-TTAATGGGGU<sup>CPA</sup>ACCA-5', 1CU10<sup>CPA</sup>
- c) 3'-ACCATGGGGU<sup>CPA</sup>AATT-5', 2CU5<sup>CPA</sup>
- d) 3'-ACCAU<sup>CPA</sup>GGGGTAATT-5', 2CU10<sup>CPA</sup>

**Figure 4.6** : Séquences des oligonucléotides portant le groupement cyclopropylamine.

#### 4.1.2.4. Préparation du brin complémentaire portant l'injecteur de charge

Nous avons envisagé d'introduire l'injecteur de charge sur l'oligonucléotide par une réaction de cyclo-addition catalysée par le cuivre (CuAAC) entre le complexe d'iridium portant la fonction alcyne (voir **Schéma 3.2** p. 57) et des oligonucléotides portant la fonction complémentaire azoture. Différentes techniques sont décrits dans la littérature afin d'introduire la fonction azide au sein des oligonucléotides. La conversion de l'hydroxyle en 5' du 2'-désoxynucléotide en halogène avant de permettre une substitution nucléophile par une molécule d'azoture de sodium est bien documentée dans la littérature (**Schéma 4.9 a**)<sup>131,132</sup>. Une autre méthode d'incorporation du groupement azide consiste en une « post fonctionalisation » en faisant réagir un oligonucléotide porteur d'une amine en présence du succinimidyl-11-azido undecanoate (**Schéma 4.9 b**).<sup>133</sup>

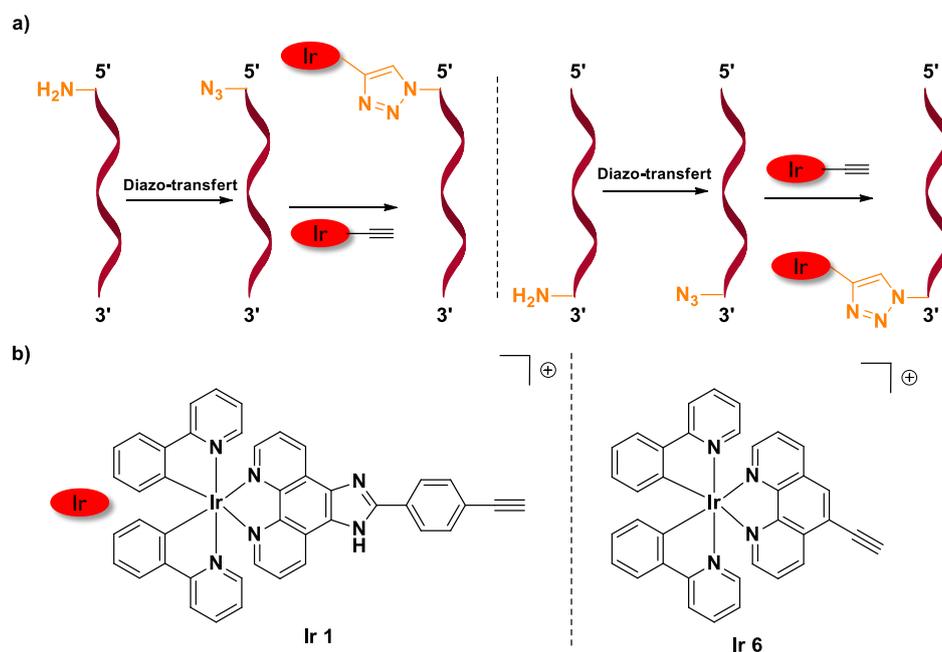


**Schéma 4.9** : Synthèse d'oligonucléotide porteur du groupement azoture par a) conversion sur support de l'hydroxyle en 2' en halogène puis substitution nucléophile en présence d'azoture de sodium<sup>131,132</sup> et b) par réaction entre un oligonucléotide porteur de la fonction amine et du succinimidyl-11-azido undecanoate.<sup>133</sup>

Nous avons considéré l'utilisation d'une méthode mise au point au laboratoire qui consiste à réaliser une réaction de diazo-transfert sur une amine aliphatique portée par l'oligonucléotide.<sup>134</sup> Dans un premier temps, l'oligonucléotide portant une fonction amine sera préparé par SPOS puis cette fonction amine sera transformée en groupement azoture par une réaction de diazo-transfert (voir **Figure 4.7**). Deux oligonucléotides portant la fonction amine soit à l'extrémité 3' soit à l'extrémité 5' ont été synthétisés. Ainsi l'injecteur de charge se trouvera sur deux extrémités différentes, la raison

pour laquelle ces deux oligonucléotides ont été préparés sera explicitée dans le chapitre suivant (**Figure 4.6 a**).

Dans un premier temps, nous avons prévu de commencer les études de transferts de charges au sein de l'ADN duplexe en utilisant un système de référence pour comparaison, à savoir le complexe **Ir 6** développé précédemment au laboratoire de Louvain-la-Neuve et dont les propriétés d'émission ne sont pas modifiées après la formation d'un lien triazole (**Figure 4.7 b**).<sup>135</sup> Une fois les premiers essais effectués avec le premier complexe, nous allons étudier les transferts de charges en présence du complexe **Ir 1** (**Figure 4.7 b**) décrit dans le chapitre précédent, dans le but de valider notre preuve de concept.

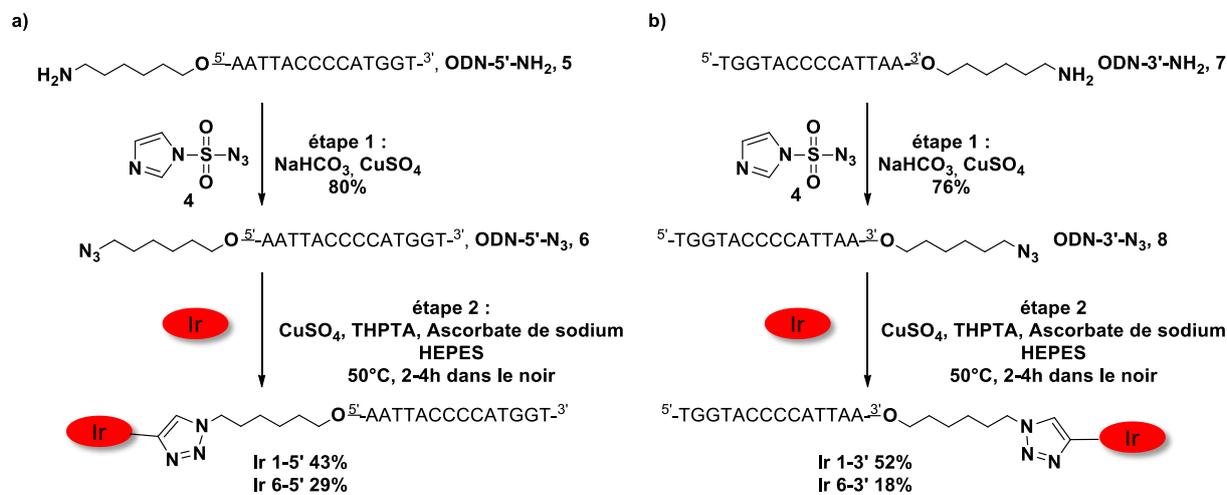


**Figure 4.7 :** a) Représentation schématique de la synthèse du brin complémentaire portant l'injecteur de charge, b) représentation des deux complexes d'iridium qui serviront d'injecteurs de charges.

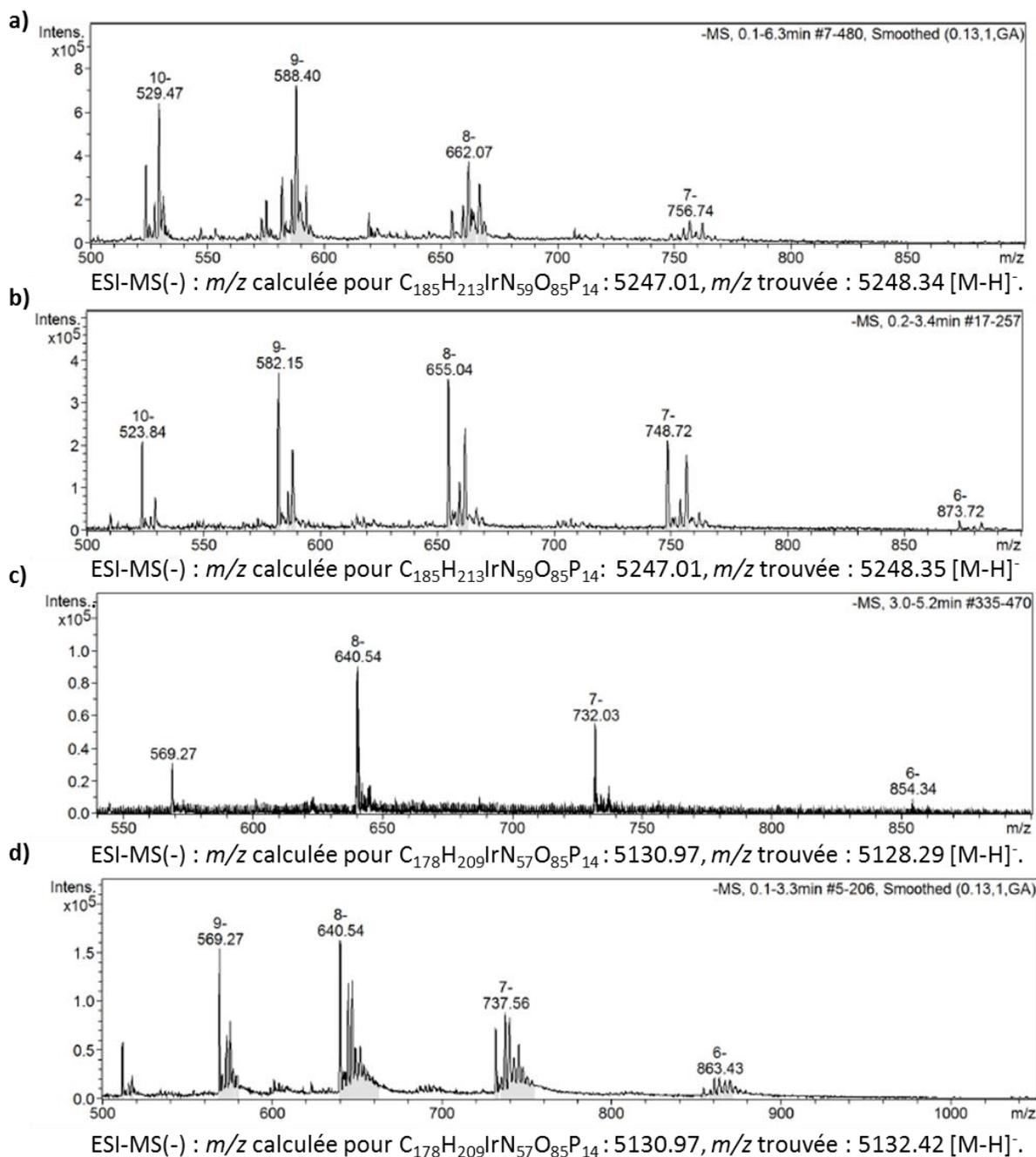
Le **Schéma 4.10** présente la synthèse des oligonucléotides **Ir 1-3'**, **Ir 6-3'**, **Ir 1-5'** et **Ir 6-5'** porteurs des complexes d'iridium **Ir 1** et **Ir 6** correspondants, à partir des oligonucléotides de départ porteur de la fonction amine à l'extrémité 3' et 5', respectivement.

Dans un premier temps, nous avons préparé deux oligonucléotides portant la fonction amine soit sur l'extrémité 3' soit sur l'extrémité 5' par la méthode SPOS en utilisant respectivement la résine « 3' C6 amino CPG » et le phosphoramidite commercial « C6 amino ». Dans un second temps, la fonction amine de l'oligonucléotide est transformée en fonction azoture par une réaction de diazo-transfert (**Schéma 4.10 a et b, étape 1**). Cette réaction est réalisée à 60°C pendant 3 heures et met en jeu le réactif de diazo-transfert (imidazole-1-sulfuryl azoture, ISAHC, **4**), le sulfate de cuivre et du bicarbonate de sodium.<sup>134</sup> A la fin de la réaction, l'oligonucléotide porteur du groupement azoture est dessalé sur une colonne chromatographique d'exclusion stérique (NAP-25) et l'étape de purification n'a pas été nécessaire. Pour finir, une réaction de CuAAC entre l'oligonucléotide portant la fonction azoture et l'alcyne du complexe d'iridium permet de lier le complexe d'iridium au brin d'oligonucléotide (**Schéma 4.10 a et b, étape 2**). Cette réaction de CuAAC est réalisée en présence de sulfate de cuivre, d'ascorbate de sodium, en milieu tamponné HEPES à pH 7.4 et avec addition de la tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine (THPTA), une molécule stabilisante du cuivre (I). Le milieu

réactionnel est chauffé à 60°C pendant 3 à 6 heures à l'obscurité et sous argon. A la fin de la réaction, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) est ajouté dans le milieu réactionnel afin de capter le cuivre présent dans le milieu. Suite à cela, le brut réactionnel est dessalé sur une colonne chromatographique d'exclusion stérique (NAP-25) pour éliminer le cuivre, suivie d'une purification par RP-HPLC, nous permettant d'obtenir les oligonucléotides porteurs des complexes **Ir 1** et **Ir 6** sur les extrémités 3' et 5'. Les différents conjugués **Ir 1-3'**, **Ir 6-3'**, **Ir 1-5'** et **Ir 6-5'** ont été caractérisés par spectrométrie de masse electrospray (**Figure 4.8**).



**Schéma 4.10** : Synthèse des oligonucléotides portant les complexes a) en position 5' et b) en position 3'.



**Figure 4.8 :** Spectres de masse ESI-MS(-) de a) l'oligonucléotide **Ir 1-5'**, b) l'oligonucléotide **Ir 1-3'**, c) l'oligonucléotide **Ir 6-5'** et d) l'oligonucléotide **Ir 6-3'**.

Comme illustré dans le **Schéma 4.10**, nous avons préparé quatre oligonucléotides avec un complexe d'iridium (**Ir 1** ou **Ir 6**) ancré sur l'oligonucléotide soit par l'extrémité 3' soit par l'extrémité 5', formant ainsi deux paires d'oligonucléotides en fonction du complexe d'iridium présent. D'un côté, la paire composée des oligonucléotides couplés au complexe **Ir 1** (**Ir 1-3'** et **Ir 1-5'**) et de l'autre côté, la paire comportant les oligonucléotides reliés au complexe **Ir 6** (**Ir 6-3'** et **Ir 6-5'**).

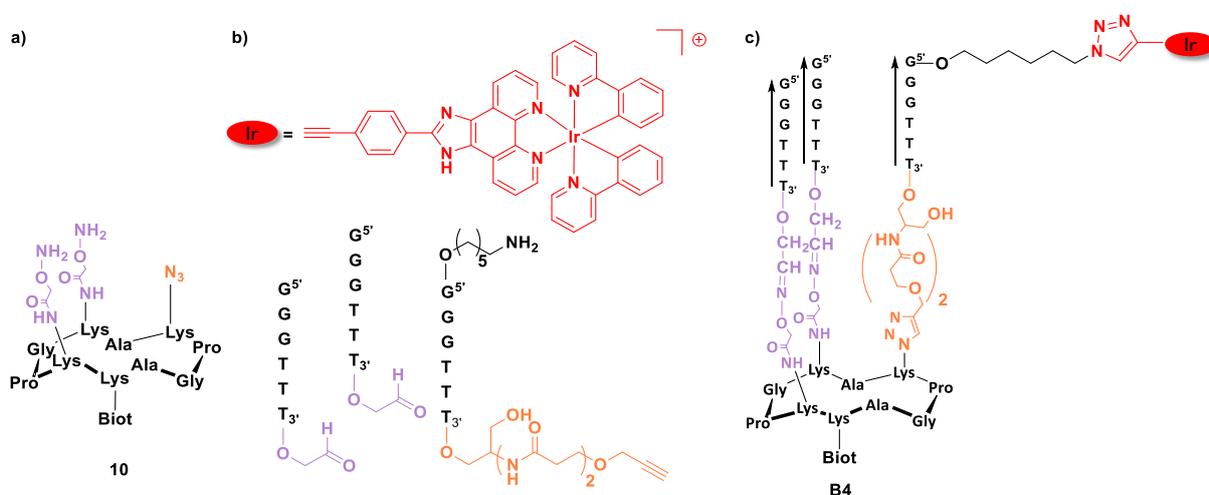
La raison pour laquelle ces quatre oligonucléotides porteurs du complexe ont été préparés, sera expliquée au chapitre suivant.

## 4.2. Synthèse des systèmes G-quadruplexe

### 4.2.1. Objectifs

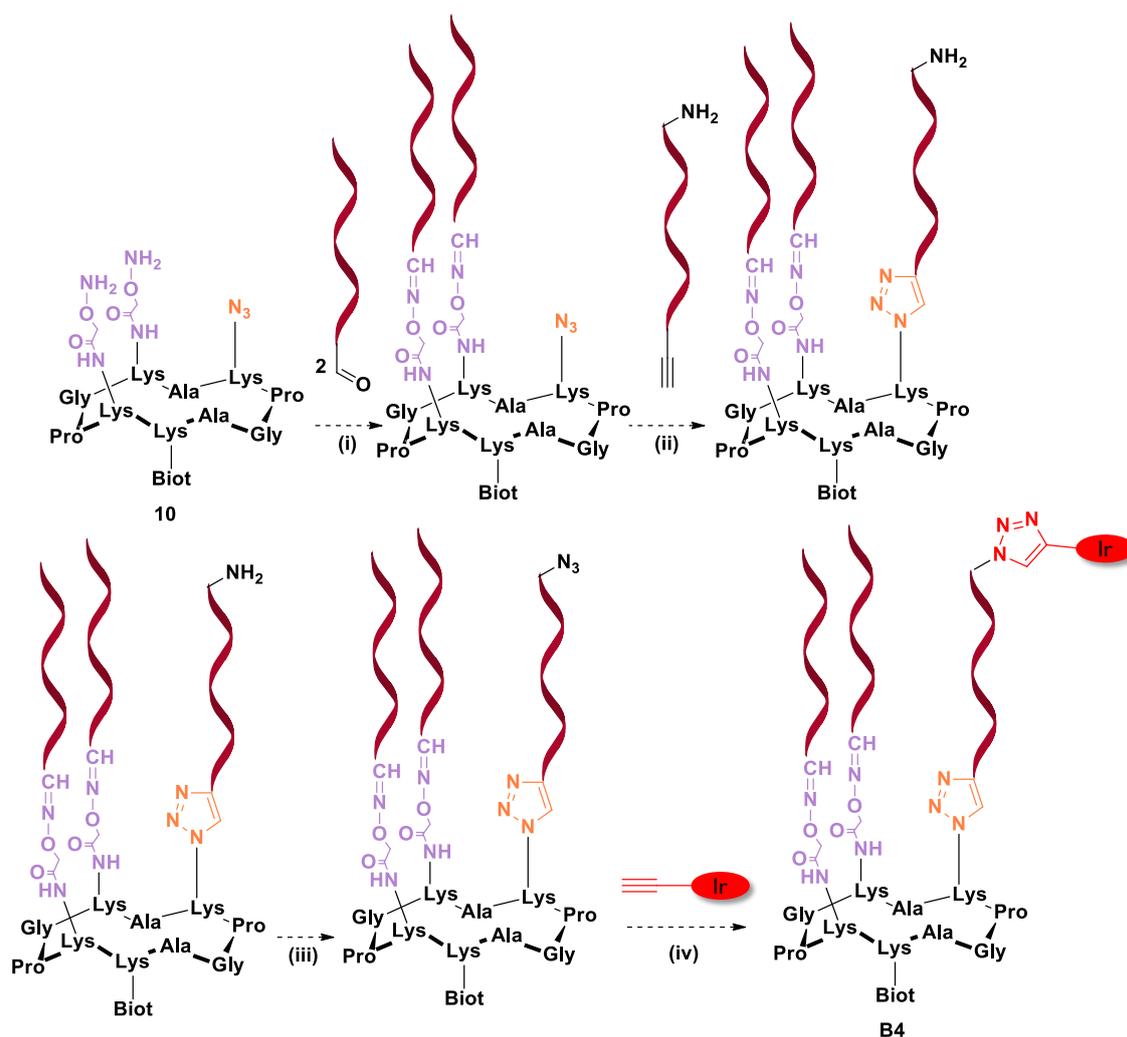
Les G-quadruplexes possèdent un degré de polymorphisme élevé qui rend difficile les études de transferts de charges. En effet, comme vu dans l'introduction, les G-quadruplexes peuvent être formés par un brin, deux brins ou quatre brins d'oligonucléotides, mais peuvent aussi adopter différentes topologies. C'est pour cela que nous avons introduit un outil afin de contraindre et ainsi connaître sans ambiguïté la topologie du G-quadruplexe : le concept TASQ (« Template Assembled Synthetic G-Quadruplexes ») (Chapitre 2 Objectifs).

Ce sous-chapitre présente la synthèse de l'édifice **B4** (Figure 4.8 c), nécessaire à la formation du G-quadruplexe contraint. Pour cela, nous allons tout d'abord présenter la synthèse du châssis peptidique **10** (Figure 4.8 a), suivie de la synthèse des différents oligonucléotides nécessaires à la formation du système G-quadruplexe (Figure 4.8 b) et pour finir l'assemblage de ces différentes parties afin de former l'édifice **B4**. L'ajout du quatrième brin d'oligonucléotide dans le but de former la structure G-quadruplexe à topologie contrôlée sera abordé dans le chapitre suivant.



**Figure 4.8** : Structures a) du châssis peptidique de départ, b) des différents oligonucléotides nécessaires à la formation de l'édifice, ainsi que du complexe **Ir 1**, c) de l'édifice cible **B4**.

La stratégie d'approche générale pour la synthèse de l'édifice **B4** est décrite dans le **Schéma 4.11**. La préparation des châssis peptidiques est réalisée sur SPPS, en y incorporant certains acides aminés modifiés sous forme de « building blocks ». La synthèse des différents oligonucléotides est quant-à-elle effectuée par SPOS.



**Schéma 4.11** : Représentation schématique de la synthèse de l'édifice **B4**.

Dans un premier temps, deux oligonucléotides portant une fonction aldéhyde seront reliés au châssis peptidique **10** par une ligation oxime entre les fonctions oxyamines présentes sur le peptide et la fonction aldéhyde de l'oligonucléotide (**Schéma 4.11 i**). Ensuite, un oligonucléotide doublement modifié avec une fonction alcyne sur l'extrémité 3' et une fonction amine sur l'extrémité 5', est fixé sur le châssis peptidique par une réaction de CuAAC entre la fonction azoture portée par le peptide et la fonction alcyne présente sur l'oligonucléotide (**Schéma 4.11 ii**). La troisième étape consiste à convertir la fonction amine présente sur l'oligonucléotide inséré en groupement azoture par une seconde réaction de diazo-transfert (**Schéma 4.11 iii**). Cette conversion permet alors l'ajout d'un complexe d'iridium présentant une fonction alcyne par une seconde réaction de CuAAC entre l'alcyne du complexe d'iridium et la fonction azoture portée par l'oligonucléotide, formant ainsi l'édifice **B4** (**Schéma 4.11 iv**).

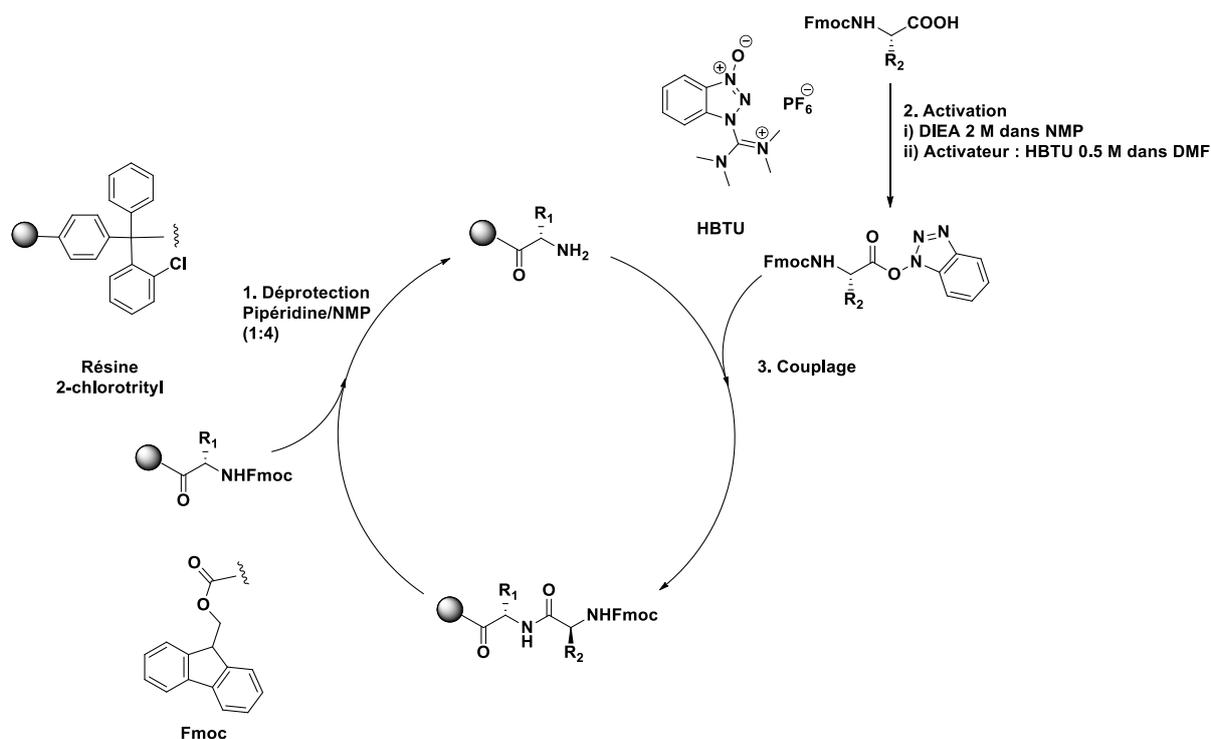
Nous avons choisi cette séquence de réactions car, de par la grande réactivité des fonctions oxyamines, il est préférable de former les liaisons éther d'oximes entre les fonctions oxyamines du peptide et la fonction aldéhyde de l'oligonucléotide tout de suite après l'élimination des groupements protecteurs Eei (voir plus bas). Ceci permet d'éviter la formation d'adduits covalents non désirés en « masquant » la réactivité des fonctions oxyamines. De plus, ces liens éther d'oxime sont stables dans les conditions de réactions de CuAAC, permettant la formation du lien triazole entre la fonction alcyne présente sur l'oligonucléotide et le groupement azoture porté par le peptide après la ligation oxime. La compatibilité de ces deux réactions a déjà été décrite dans la littérature.<sup>136</sup>

De plus, en utilisant l'oligonucléotide doublement modifié par une fonction alcyne et une fonction amine, nous pouvons ajouter le complexe d'iridium(III), espèce photosensible et photoréactive, à la dernière étape.

## 4.2.2. Résultats

### 4.2.2.1. Généralité sur la synthèse peptidique

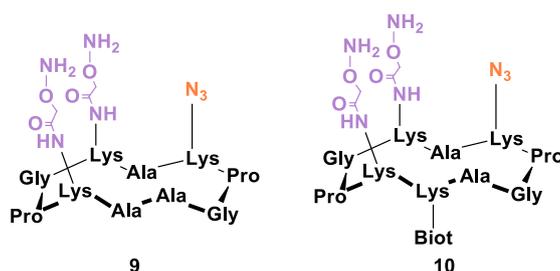
La synthèse des châssis peptidiques, détaillée dans le **Schéma 4.12**, est réalisée par synthèse peptidique supportée en phase solide (SPPS) selon la méthode dérivée de R. B. Merrifield développée en 1960.<sup>137</sup> La SPPS se base sur l'addition successive d'acides aminés par formation de liens peptidiques. Des cycles de déprotection et de couplage permettent l'élongation d'une chaîne peptidique fixée de manière covalente à une bille de résine. L'allongement de la chaîne peptidique se fait du C-terminal au N-terminal et chaque étape correspond à l'ajout d'un nouvel acide aminé en présence d'un agent activateur (HBTU) et d'une base (DIEA). La stratégie de synthèse adoptée, « Fmoc/tBu », consiste à incorporer les acides aminés à la séquence avec comme groupement protecteur de l'amine en  $\alpha$ , le Fmoc. La déprotection se fait en présence de 10% de pipéridine dans la DMF afin de libérer le groupement Fmoc par  $\beta$ -élimination et ainsi permettre l'incorporation de l'acide aminé suivant. Cette stratégie de synthèse nécessite également la protection des fonctions réactives présentes sur la chaîne latérale des acides aminés. Ainsi, les groupements protecteurs sur la chaîne latérale doivent être stables dans les conditions de couplages et de déprotections utilisées pour l'élongation des chaînes peptidiques. La résine utilisée pour la synthèse de tous les châssis peptidiques décrits dans ce manuscrit est la 2-chlorotrityl. Cette résine présente l'avantage de pouvoir se séparer du peptide dans des conditions acides douces (10% d'acide acétique), compatibles avec les groupements protecteurs utilisés sur les chaînes latérales des différents châssis peptidiques.



**Schéma 4.12 :** Cycle de synthèse peptidique sur support solide (SPPS).

#### 4.2.2.2. Synthèse des châssis peptidiques 9 et 10

Nous avons considéré deux châssis peptidiques servant de base de construction des G-quadruplexes contraints, ces peptides sont représentés dans la **Figure 4.9**.



**Figure 4.9** : Structures des différents châssis peptidiques.

Les châssis peptidiques **9** et **10** portent deux fonctions chimiques différentes qui permettent de lier trois oligonucléotides sur le peptide. La différence entre ces deux structures est la présence d'une lysine portant une fonction biotine pour le châssis **10** tandis que dans le cas du peptide **9**, c'est une alanine qui est positionnée à cette même position. Nous avons considéré la substitution de l'alanine par une lysine fonctionnalisée par une biotine afin de faciliter l'isolement du quatrième brin avant l'étape d'hydrolyse enzymatique. En effet, en incorporant le groupement biotine, nous avons la possibilité d'immobiliser le châssis peptidique sur une surface de streptavidine, par l'interaction biotine/streptavidine, facilitant ainsi la récupération de l'oligonucléotide portant la sonde.

Nous allons dans un premier temps vérifier que l'incorporation des trois oligonucléotides sur le châssis peptidique est bien possible en utilisant le châssis peptidique **9** comme témoin. Une fois les réactions optimisées, nous allons alors préparer l'édifice **B4** à partir du châssis peptidique **10**.

##### a. Préparation des acides aminés modifiés sous forme de « building block »

Avant de commencer la synthèse des châssis peptidiques sur synthétiseur automatique en SPPS, nous avons tout d'abord préparé différents acides aminés modifiés sous forme de « building blocks » qui seront introduits dans la SPPS.

- Synthèse de l'acide aminé lysine modifié avec une fonction azoture

La fonction azoture est introduite sur le châssis peptidique durant la synthèse supportée sous forme d'un « building block », fmoc-azidonorleucine **11**. Cet acide aminé modifié est compatible avec les différentes étapes de couplage et de déprotection ayant lieu durant la synthèse en SPPS. Cet acide aminé modifié est obtenu à partir de l'acide aminé Fmoc-Lys-OH dans les conditions de diazo-transfert.<sup>138</sup> La réaction est réalisée en milieu basique en présence du réactif de diazo-transfert (imidazole-1-sulfuryl azoture, ISAHC **4**) et de sulfate de cuivre. Après une nuit de réaction à température ambiante, une extraction en milieu acide permet d'obtenir l'acide aminé **11** avec un rendement de 80% (**Schéma 4.13**).

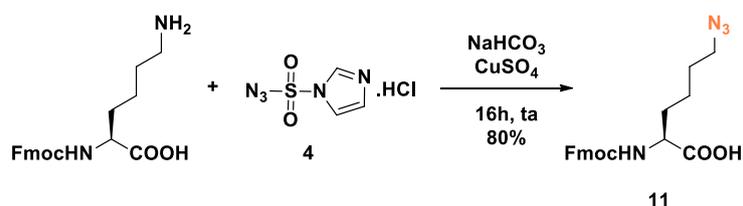


Schéma 4.13 : Synthèse de la Fmoc-azidonorleucine **11**.

- Synthèse de l'acide aminé lysine modifié avec une fonction oxyamine

La fonction oxyamine présente sur la lysine est protégée par le groupement 1-éthoxyéthylidène (Eei) durant l'élongation du peptide sur synthèse supportée, formant ainsi un « building block » protégé.<sup>139</sup> Ce groupement protecteur permet non seulement de bloquer totalement la réactivité des oxyamines mais est aussi compatible avec les cycles de déprotections et de couplages de la synthèse supportée. Ce « building block » est obtenu à partir de l'acétimide-NHS **12a**, par réaction avec l'acide aminé Fmoc-Lys-OH en milieu basique pendant 4 heures, formant ainsi le « building block » **12**. L'obtention du composé **12a** se fait dans un premier temps par une substitution nucléophile de l'éthyl-N-hydroxyacétimide sur l'acide iodoacétique suivie d'une activation de la fonction acide carboxylique par une fonction *N*-hydroxysuccinimide en présence de DCC.

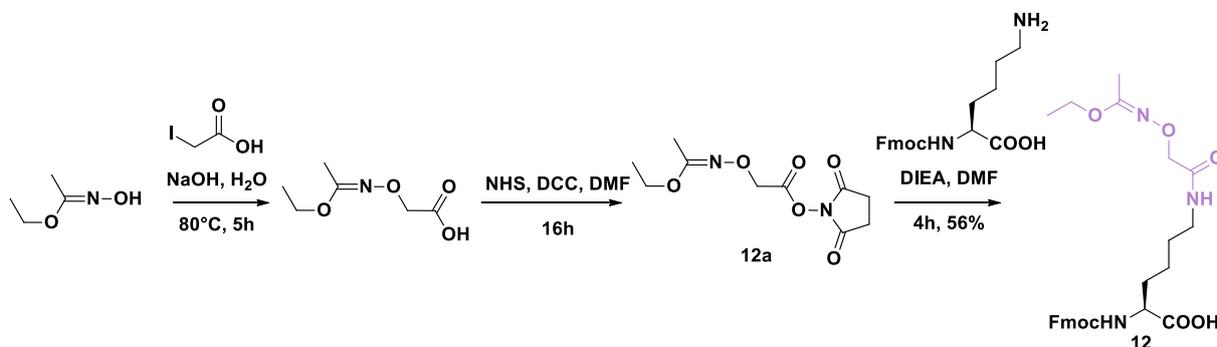


Schéma 4.14 : Synthèse de la Fmoc-Lys(Eei-Aoa)-OH **12**.

- Synthèse de l'acide aminé lysine modifié avec une fonction biotine

Durant la synthèse supportée, la fonction biotine est introduite sur le châssis peptidique sous forme de « building block », Fmoc-Lys(Biot)-OH **13**.<sup>140</sup> Cette dernière est formée d'une lysine portant sur sa chaîne latérale la fonction biotine introduite par liaison amide. De la même manière que précédemment, la fonction acide carboxylique de la biotine est activée au préalable par un groupement *N*-hydroxysuccinimide, en présence de DCC comme agent de couplage. Cette réaction est réalisée dans la DMF durant 16h. La biotine activée **13a** est ensuite introduite sur l'acide aminé Fmoc-Lys-OH dans le DMF en milieu basique. Après 1h de réaction, la lysine fonctionnalisée par le groupement biotine est obtenue par précipitation dans l'éther avec un rendement 80% (Schéma 4.15).

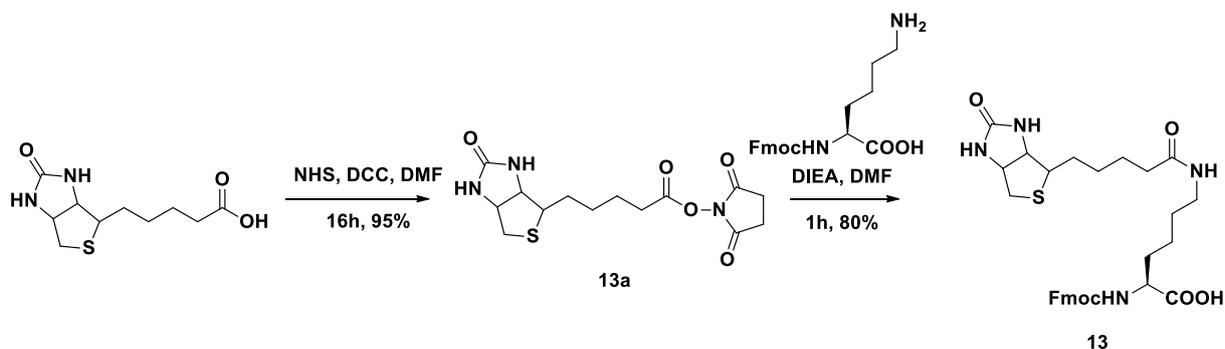


Schéma 4.15 : Synthèse de la Fmoc-Lys(Biot)-OH 13.

### b. Synthèse des différents châssis peptidiques

Le **Schéma 4.16** détaille la préparation des châssis peptidiques **9** et **10**. La synthèse de ces deux peptides est identique, seul l'ajout du neuvième acide aminé diffère. Dans le cas du peptide **9**, c'est une alanine qui est ajoutée alors que pour le peptide **10**, c'est une lysine fonctionnalisée par la biotine. Dans le but d'éviter d'éventuelle dégradation des peptides, ces derniers sont gardés sous leur forme intermédiaire protégée **9c** et **10c**.

La synthèse est réalisée sur support solide en utilisant la stratégie de synthèse au Fmoc/*t*Bu et la résine 2-chlorotrityl. L'élongation de la chaîne peptidique est opérée par le biais d'un synthétiseur automatique de peptide. En fin d'élongation, le peptide linéaire est détaché de la résine en milieu acide doux par une solution de trifluoroéthanol (TFE) et d'acide acétique (AcOH) dans le dichlorométhane (DCM). En effet, les groupements protecteurs Eei sont très sensibles à l'acide trifluoroacétique (TFA), raison pour laquelle la séparation entre le peptide et la résine est effectuée en milieu acide doux. Suite à cela, la cyclisation du peptide linéaire est réalisée en milieu basique et en présence de l'agent de couplage, PyBOP. Cette réaction est réalisée en milieu dilué, à  $10^{-3}$  M, pour favoriser la cyclisation intramoléculaire du châssis peptidique et éviter tout risque de polymérisation du peptide linéaire. Il est à noter que la cyclisation s'effectue sur une glycine en C-terminal. En effet, par son absence de chaîne latérale, la glycine permet d'éviter une racémisation non désirée de l'acide aminé. Les peptides cyclisés **9c** et **10c** sont obtenus par précipitation dans l'éther avec des rendements de 70% pour **9c** et 90% pour **10c**. La déprotection des groupements Eei s'effectue en milieu acide dans un mélange TFA/H<sub>2</sub>O/TIS (50:45:5). L'ajout du triisopropylsilane (TIS) permet de piéger les carbocations créés lors de la déprotection du groupement Eei. La déprotection des groupements Eei est considérée comme quantitative et aucune purification n'est nécessaire.

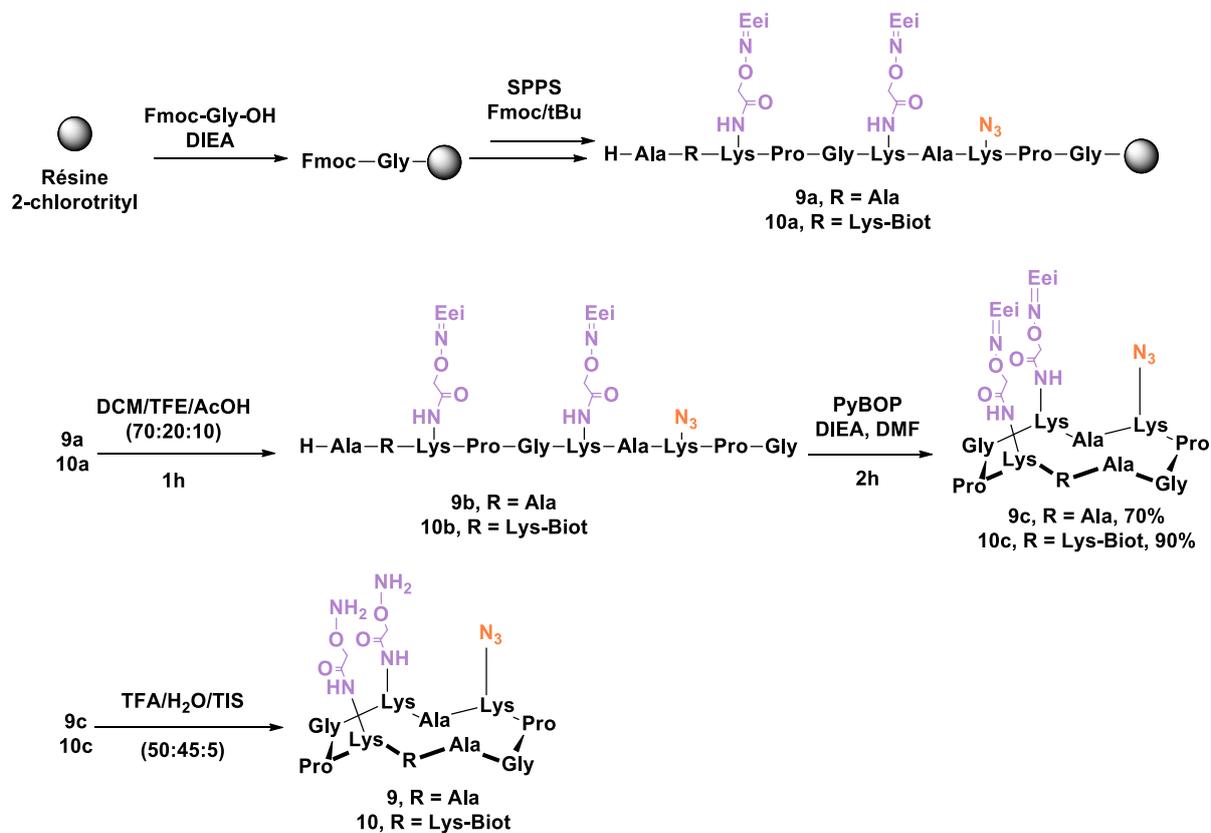
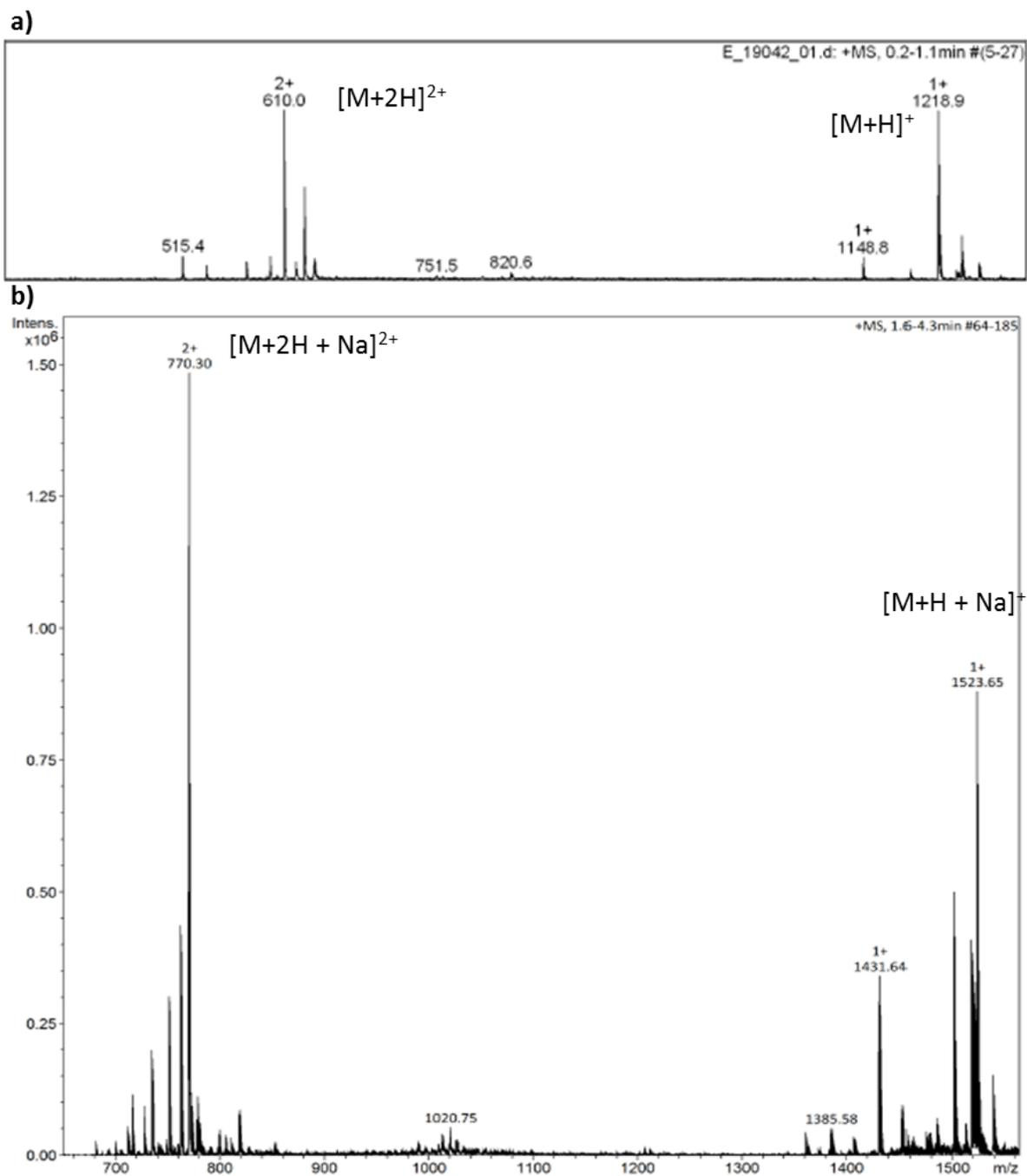


Schéma 4.16 : Synthèse du châssis peptidique 9 et 10.

Une analyse de spectrométrie de masse ESI-MS(+) nous a permis de confirmer l'obtention des peptides synthétisés 9c (Figure 4.10 a) et 10 c (Figure 4.10 b).



**Figure 4.10** : Spectres de masse ESI-MS(+) a) du peptide **9c** et b) du peptide **10c**.

Une fois la synthèse des différents châssis peptidiques réalisée, nous pouvons incorporer les oligonucléotides au sein du châssis peptidique afin de former l'édifice **B4**.

#### 4.2.2.3. Synthèse des oligonucléotides

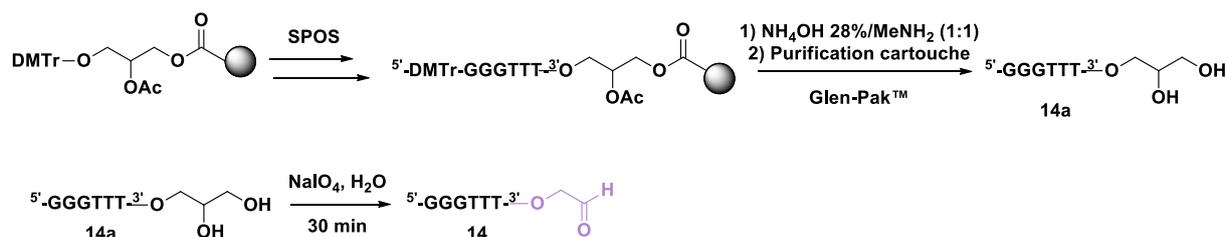
La formation de l'édifice **B4** nécessite l'incorporation d'oligonucléotides sur le châssis peptidique. Nous avons alors préparé les oligonucléotides nécessaires par SPOS.

##### a. Oligonucléotides complémentaires porteurs de la fonction aldéhyde

Les brins porteurs de la fonction aldéhyde et qui seront reliés au châssis peptidique par ligation oxime entre la fonction aldéhyde présente sur l'oligonucléotide et les fonctions oxyamines

portées par le peptide, ont été préparés avec la séquence suivante :  $5'$ -GGGTTX- $3'$  où X représente la fonction aldéhyde. La séquence fonctionnalisée est obtenue *via* l'utilisation de la résine « 3' glyceryl CPG », ce qui permet d'obtenir *in fine* l'oligonucléotide précurseur porteur de la fonction 1,2 diol **14a**. Cette fonction 1,2 diol de l'oligonucléotide est ensuite oxydée en aldéhyde (**Schéma 4.17**).<sup>141</sup>

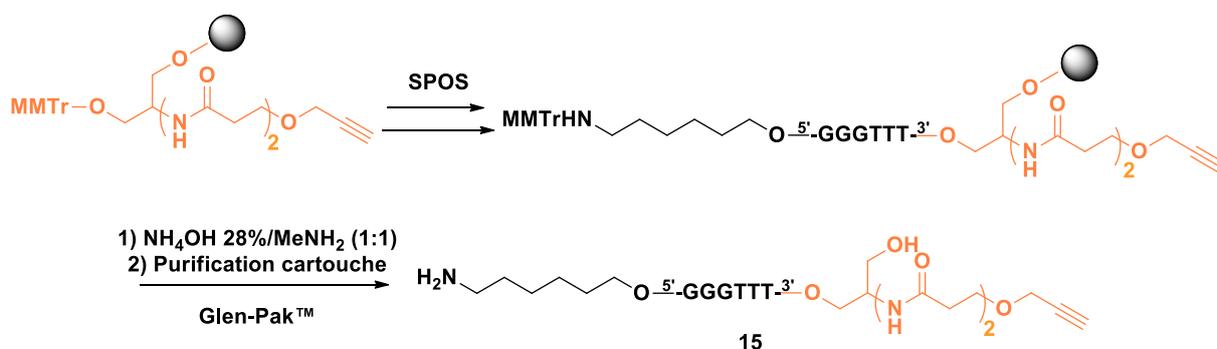
La libération et la déprotection des oligonucléotides sont réalisées par un mélange d'ammoniaque à 28% dans l'eau/méthylamine (1:1) à 60°C pendant 20 minutes. Suite à cela, l'oligonucléotide est purifié sur une cartouche Glen-Pak™. Cette étape de purification permet non seulement d'éliminer les oligonucléotides tronqués présents mais permet également d'enlever le groupement protecteur diméthoxytrityl (DMTr) encore présent sur l'hydroxyle en 5' du dernier nucléotide incorporé, par une solution de TFA à 2%. L'oligonucléotide précurseur **14a** pur obtenu est mis à réagir en présence de périodate de sodium (NaIO<sub>4</sub>) afin de générer la fonction aldéhyde par coupure oxydante du groupement diol. Le sel de périodate et le formaldéhyde formés lors de la réaction sont éliminés sur colonne d'exclusion de taille NAP-25. La réaction est considérée quantitative et l'oligonucléotide **14** obtenu est caractérisé par spectrométrie de masse.



**Schéma 4.17** : Synthèse de l'oligonucléotide porteur de la fonction aldéhyde **14**.

#### *b. Oligonucléotide porteur d'une fonction amine à l'extrémité 5' et d'une fonction alcyne à l'extrémité 3'*

Cet oligonucléotide doublement modifié est le brin où sera ancré le complexe d'Iridium. En effet, la fonction alcyne à l'extrémité 3' permet de fixer l'oligonucléotide sur le châssis peptidique, tandis que la fonction amine sur l'extrémité 5' sera convertie en fonction azoture par une réaction de diazo-transfert. Cette fonction azoture permettra de relier le complexe d'Iridium porteur de la fonction alcyne sur l'oligonucléotide par une seconde réaction de CuAAC. La séquence correspondante,  $5'$ -YGGGTTX- $3'$  (avec X = un groupement alcyne et Y = une fonction amine), est obtenue en utilisant la résine « 3' Alkyne-Modifier Serinol CPG » et le phosphoramidite « 5'-Amino-Modifier C6 ». Tout comme précédemment, la séparation entre l'oligonucléotide et la résine est réalisée par un mélange d'ammoniaque à 28% dans l'eau/méthylamine (1:1) à 60°C pendant 20 minutes. Le groupement protecteur MMTr est éliminé par une solution de TFA à 4% lors de la purification par une cartouche Glen-Pak™ (**Schéma 4.18**). L'oligonucléotide **15** pur est ensuite caractérisé par ES-MS(-).

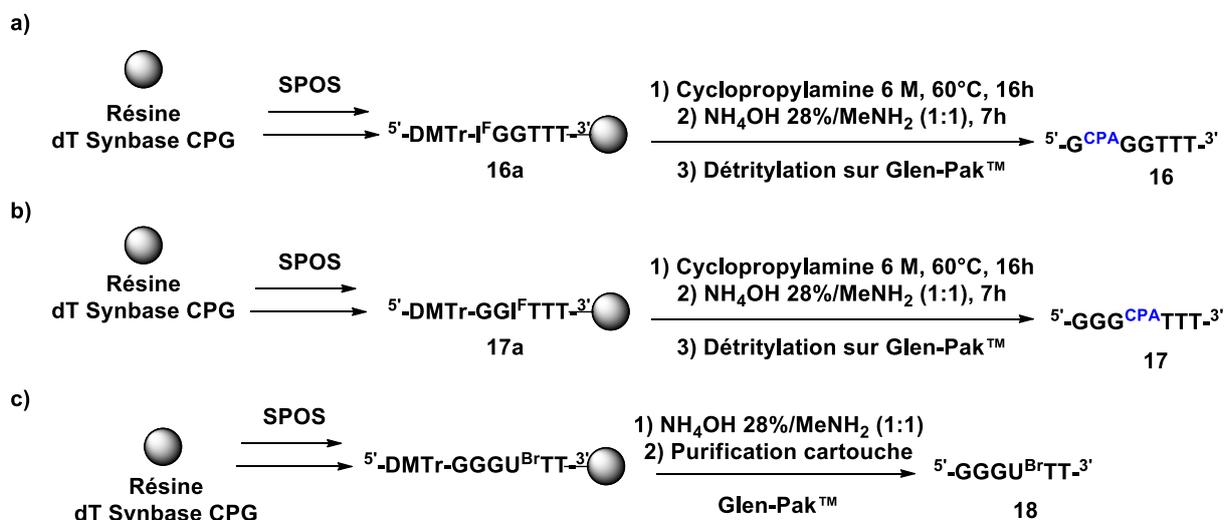


**Schéma 4.18** : Synthèse de l'oligonucléotide doublement modifié qui va porter l'injecteur de charge **15**.

### c. Oligonucléotide porteur de l'accepteur de charge

Pour nos premiers essais d'expérience de transferts de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe contraint, nous avons envisagé d'utiliser une sonde connue et décrite dans la littérature<sup>81</sup> : la 2-cyclopropylamine-2'-désoxyguanosine, dG<sup>CPA</sup>. En effet, comme indiqué dans l'introduction, cette sonde est classiquement utilisée dans les études de transferts de charges positives au sein de l'ADN duplexe.

Avant de synthétiser les oligonucléotides porteurs de la sonde, il faut tout d'abord préparer les oligonucléotides précurseurs. Pour cela, le phosphoramidite modifiée 2-fluoro-2'-desoxyinosine (produit commercial 2-F-di-CE) est incorporé lors de la synthèse par SPOS. Nous avons considéré deux séquences différentes portant la sonde dG<sup>CPA</sup>. D'un côté, nous avons une sonde à l'extrémité 5', c'est-à-dire proche de l'injecteur de charge et avant l'empilement de guanines (**Schéma 4.19 a**, ODN **16**) et de l'autre côté, la sonde est positionnée après l'empilement de guanines (**Schéma 4.19 b**, ODN **17**). Ainsi nous pouvons comparer la différence d'efficacité de transferts de charges avec ces deux séquences d'oligonucléotides.



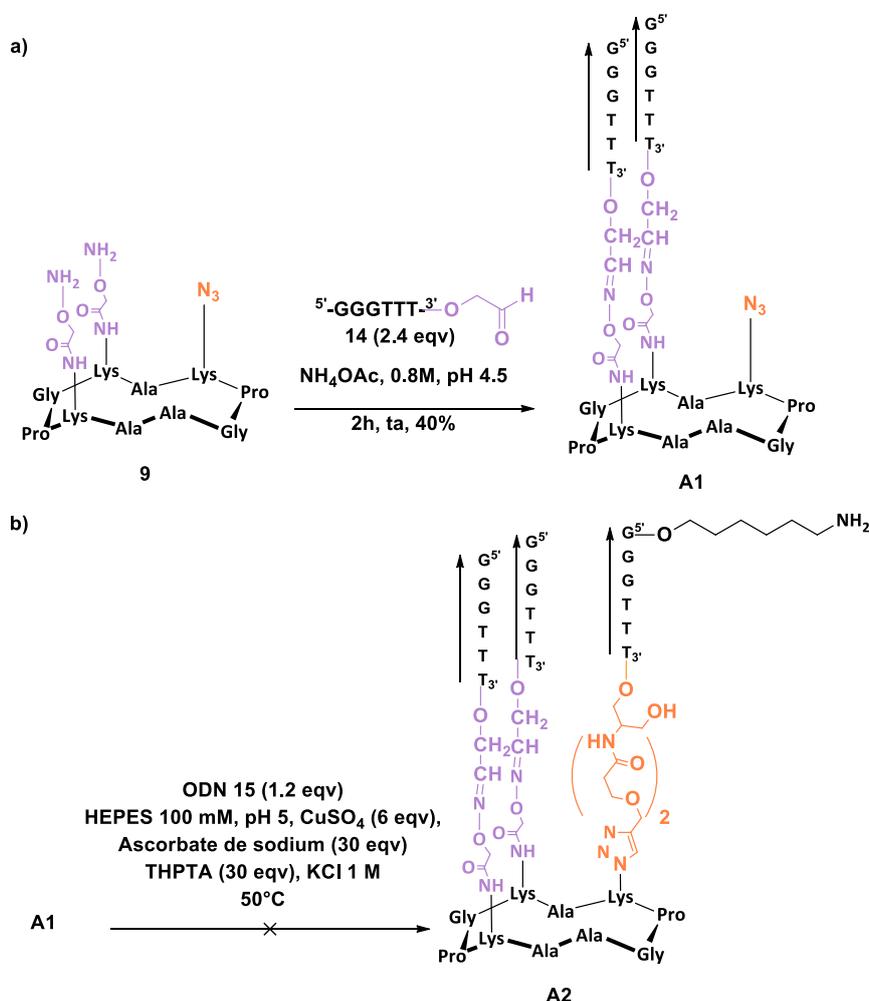
**Schéma 4.19** : Synthèse des oligonucléotides porteurs de la sonde dG<sup>CPA</sup> a) **16**, b) **17** et c) de l'oligonucléotide **18**.

La synthèse par SPOS permet de former les oligonucléotides précurseurs **16a** et **17a**. Suite à cela, les oligonucléotides précurseurs sont mis à réagir en présence de cyclopropylamine 6 M à 60°C pendant 16 h, afin de non seulement incorporer le groupement cyclopropylamine au sein de la séquence mais

aussi de séparer l'oligonucléotide de la résine. Un traitement par une solution de 28% d'ammoniaque aqueux/méthylamine (1:1) permet d'enlever le groupement protecteur *para*-nitrophenyléthyl présent sur l'oxygène en position 6. Le passage de l'oligonucléotide sur la cartouche Glen-Pak™ permet d'enlever le groupement protecteur diméthoxytrityl (DMTr) grâce à une élution en présence de 2% de TFA dans la solution d'élution. Pour finir, une purification par HPLC en phase inverse permet d'éliminer tous les oligonucléotides qui n'ont pas réagi. Ces deux oligonucléotides purs sont caractérisés par ESI-MS(-). Pour éviter une éventuelle décomposition de la sonde, les oligonucléotides sont conservés sous leur forme précurseur **16a** et **17a**. Nous avons par ailleurs préparé l'oligonucléotide **18** par SPOS en incorporant le phosphoramidite modifié 5-bromo-2'-désoxyuridine (**Figure 4.19 c**). Ce brin a été préparé en vue de la formation du brin porteur de la sonde dU<sup>CPA</sup>.

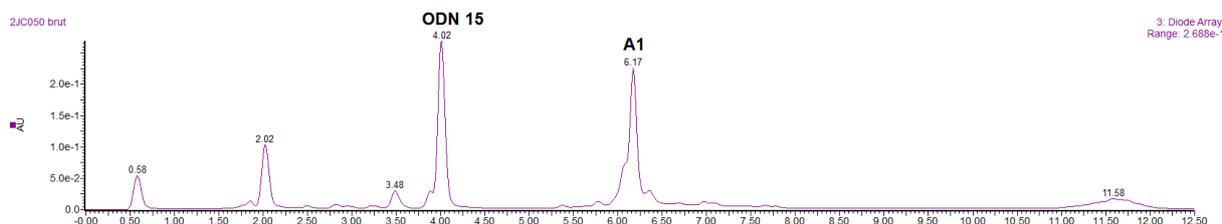
#### 4.2.2.4. Assemblage des conjugués oligonucléotides-châssis peptidique

Dans un premier, les deux oligonucléotides portant la fonction aldéhyde **14** (2.4 eqv) sont ancrés sur le châssis peptidique **9** par une ligation oxime dans un tampon acétate d'ammonium 0.8 M à pH 4.5. Après 2h de réaction à température ambiante, le brut réactionnel est purifié par HPLC en phase inverse, permettant l'obtention du produit intermédiaire **A1** avec un rendement de 40% (**Schéma 4.20 a**). Ce produit intermédiaire A1 a été caractérisé par ESI-MS(-).



**Schéma 4.20** : Synthèse de a) l'édifice **A1** et b) de l'édifice **A2**.

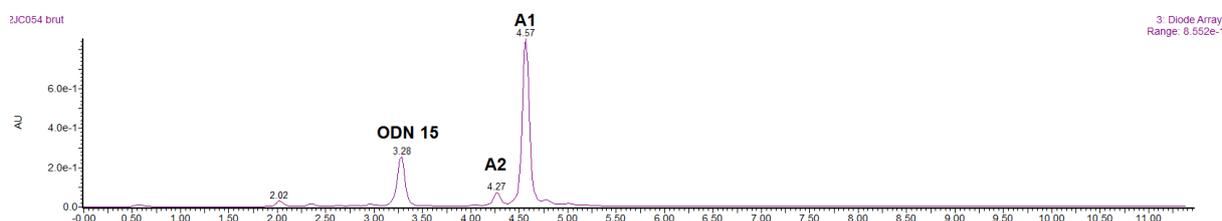
L'étape suivante consiste à ajouter l'oligonucléotide **15** sur l'édifice par le biais d'une réaction de CuAAC entre la fonction azoture de l'édifice **A1** et la fonction alcyne portée par l'oligonucléotide **15** (Schéma 4.20 b). Pour cela, la réaction est réalisée en présence de l'oligonucléotide **15** (1.2 eqv), d'ascorbate de sodium (30 eqv), de sulfate de cuivre (6 eqv), de THPTA (30 eqv), dans un milieu tamponné HEPES 100 mM à pH 5 et KCl 1 M. Le chlorure de potassium est ajouté dans le milieu dans le but de non seulement pré-organiser les oligonucléotides mais aussi « d'écranter » les charges. La réaction est chauffée à 50°C pendant 6h. Cependant, nous constatons qu'aucune conversion n'est observée après 6h de réaction. L'analyse UPLC nous indique que la réaction n'a pas eu lieu : nous observons que la présence des deux produits de départ, l'édifice **A1** et l'oligonucléotide **15** (Figure 4.11).



**Figure 4.11** : Chromatogramme UPLC de la réaction en présence de l'oligonucléotide **15** (1.2 eqv), de l'ascorbate de sodium (30 eqv), de sulfate de cuivre (6 eqv), de THPTA (30 eqv), dans un milieu tamponné HEPES 100 mM à pH 5 et KCl 1 M.

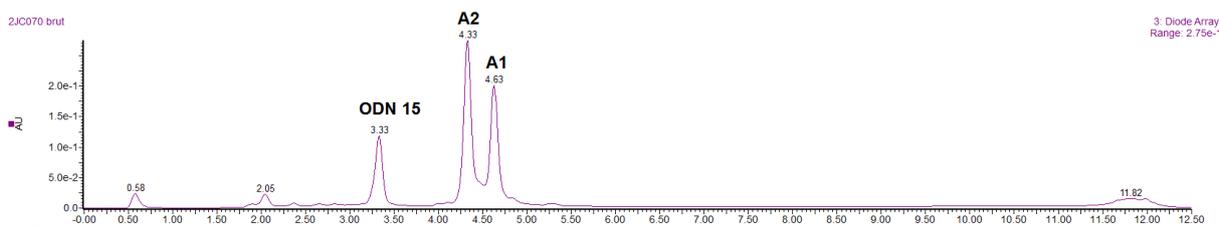
Nous avons alors tenté de modifier certaines conditions afin de favoriser la formation du produit désiré **A2**.

Dans un premier temps, l'effet du pH a été étudié. En présence des mêmes conditions de réaction décrites auparavant mais dans un milieu tamponné HEPES 100 mM à pH 7.9, nous constatons une légère conversion en produit **A2** comme le prouve l'analyse UPLC (Figure 4.12). En effet, la formation du cuprate est favorisée en milieu basique.



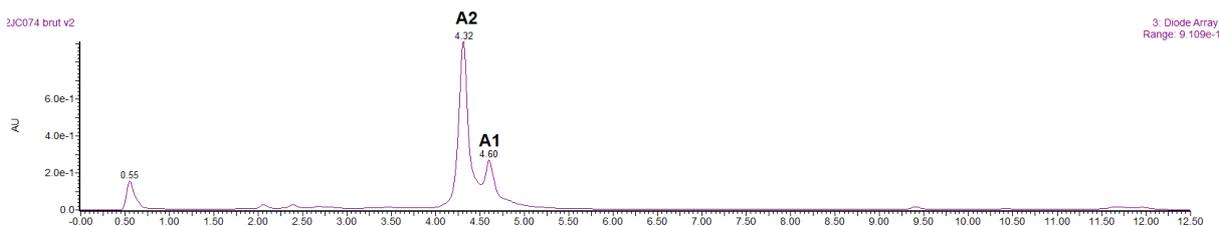
**Figure 4.12** : Chromatogramme UPLC de la réaction en milieu plus basique, à pH 7.9.

Ensuite nous avons étudié l'influence de la présence du chlorure de potassium. Pour cela, une réaction a été réalisée en présence de l'oligonucléotide **15** (1.2 eqv), d'ascorbate de sodium (30 eqv), de sulfate de cuivre (6 eqv), de THPTA (30 eqv), dans un milieu tamponné HEPES 100 mM à pH 7.9, en absence de KCl. Au bout de 7h de réaction à 50°C, une analyse UPLC nous permet de constater que produit **A2** s'est formé avec une meilleure conversion (Figure 4.13).



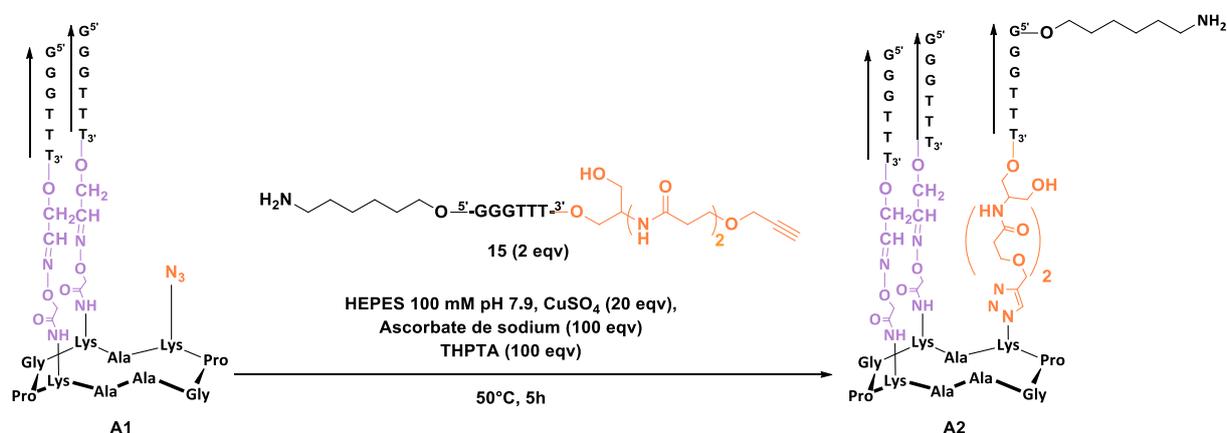
**Figure 4.13** : Chromatogramme UPLC de la réaction en milieu plus basique, à pH 7,9 et sans KCl.

Nous avons aussi tenté d'augmenter le nombre d'équivalent des réactifs de départ suivant : l'ascorbate de sodium (100 eqv), sulfate de cuivre (20 eqv) et THPTA (100 eqv). L'analyse UPLC nous permet de confirmer qu'augmenter le nombre d'équivalent de ces réactifs permet aussi d'obtenir une bonne conversion en produit **A2** (**Figure 4.14**).



**Figure 4.14** : Chromatogramme UPLC avec les nouvelles conditions de réactions : l'oligonucléotide **15** (1.2 eqv), sulfate de cuivre (20 eqv), ascorbate de sodium (100 eqv) et THPTA (100 eqv), dans le tampon HEPES 100 mM à pH 7.9.

Les conditions expérimentales qui permettent l'obtention du produit **A2** avec une bonne conversion sont illustrées dans le **Schéma 4.21**. Cette fois-ci nous ajoutons dans le milieu réactionnel 2 équivalents de l'oligonucléotide **15**, 20 équivalents de sulfate de cuivre, 100 équivalents de d'ascorbate de sodium et 100 équivalents de THPTA, dans le tampon HEPES 100 mM à pH 7.9. Le mélange est chauffé à 50°C pendant 5 heures.



**Schéma 4.21** : Synthèse de l'édifice **A2** en utilisant les nouvelles conditions de réaction.

Nous avons ainsi optimisé la réaction de CuAAC avec le châssis peptidique **9**. Le châssis peptidique **10** a été engagé en appliquant les nouvelles conditions de synthèse, pour former l'édifice **B4**. En effet, c'est à partir de cet édifice que les expériences de transferts de charges au sein du G-quadruplexe contraint seront réalisées.

En gardant les mêmes conditions de réactions pour la ligation oxime (2.4 eqv de l'ODN **14**, dans l'acétate d'ammonium 0.8 M à pH 4.5, réaction à température ambiante pendant 2h puis purification HPLC en phase inverse) et pour la réaction de CuAAC (2 eqv de l'ODN **15**, 20 eqv de  $\text{CuSO}_4$ , 100 eqv d'ascorbate de sodium, 100 eqv de THPTA, dans le tampon HEPES 100 mM à pH 7.9, chauffé à 50°C pendant 5h, puis ajout d'EDTA dans le milieu suivie du dessalage sur colonne d'exclusion stérique), l'édifice intermédiaire **B2** est obtenue après purification sur HPLC en phase inverse, avec un rendement de 16% (Schéma 4.22).

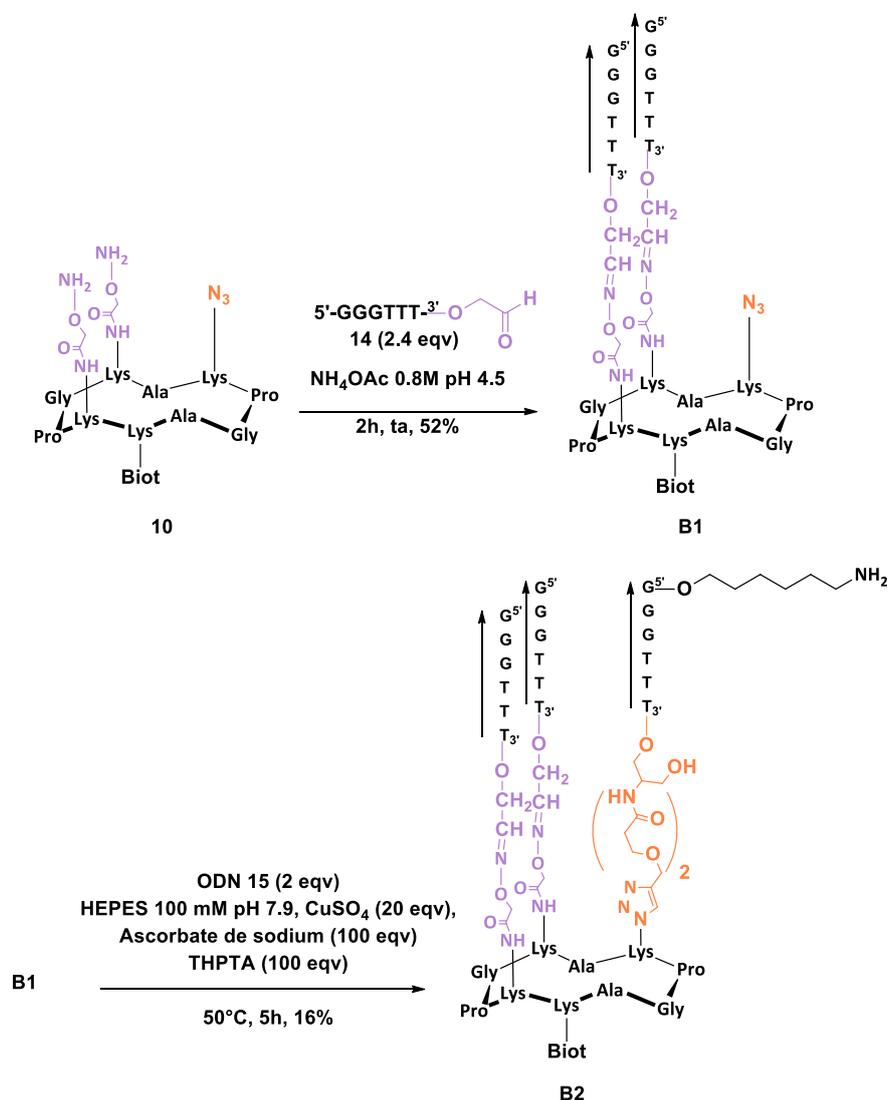
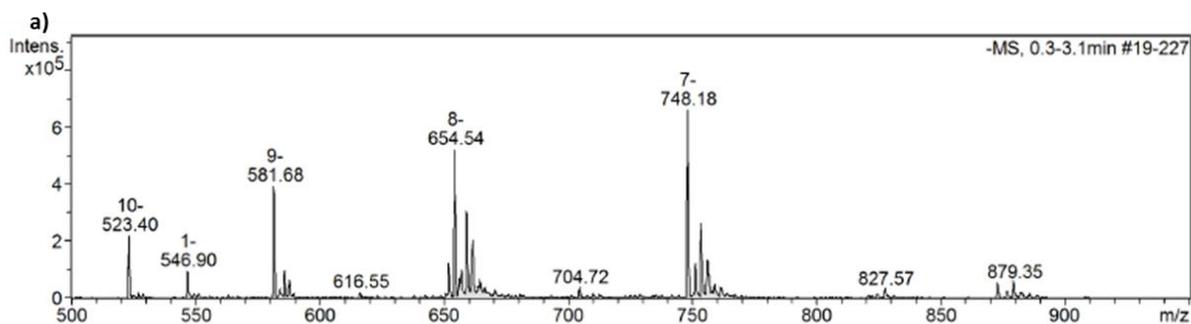
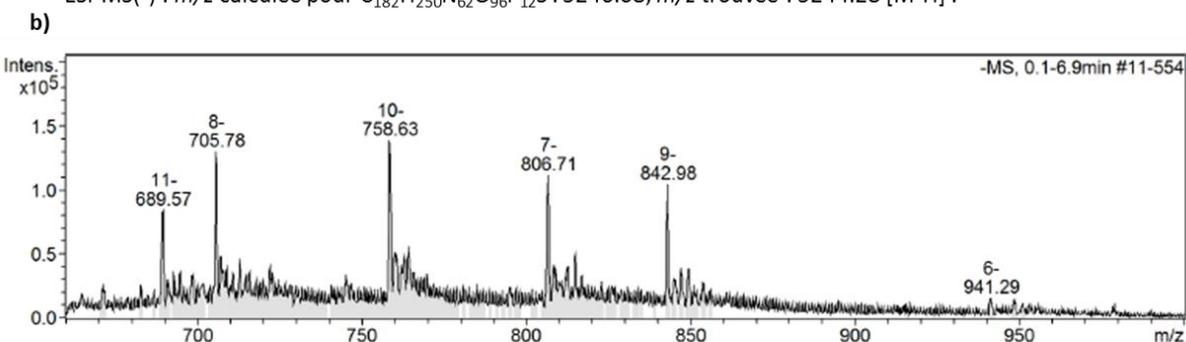


Schéma 4.22 : Synthèse de l'édifice **B2**.

Les édifices intermédiaires **B1** et **B2** ont été caractérisés par spectrométrie de masse ESI-MS (-) nous permettant ainsi d'observer l'incorporation des deux oligonucléotides **14** portant la fonction aldéhyde sur le châssis peptidique **10** par l'addition de 2 \* 1944 Da pour **B1** (Figure 4.15 a). Pour le cas de l'édifice **B2**, nous observons l'addition de 2351 Da (Figure 4.15 b) correspondant à la liaison de l'oligonucléotide **15** sur le châssis peptidique **B1** par CuAAC.



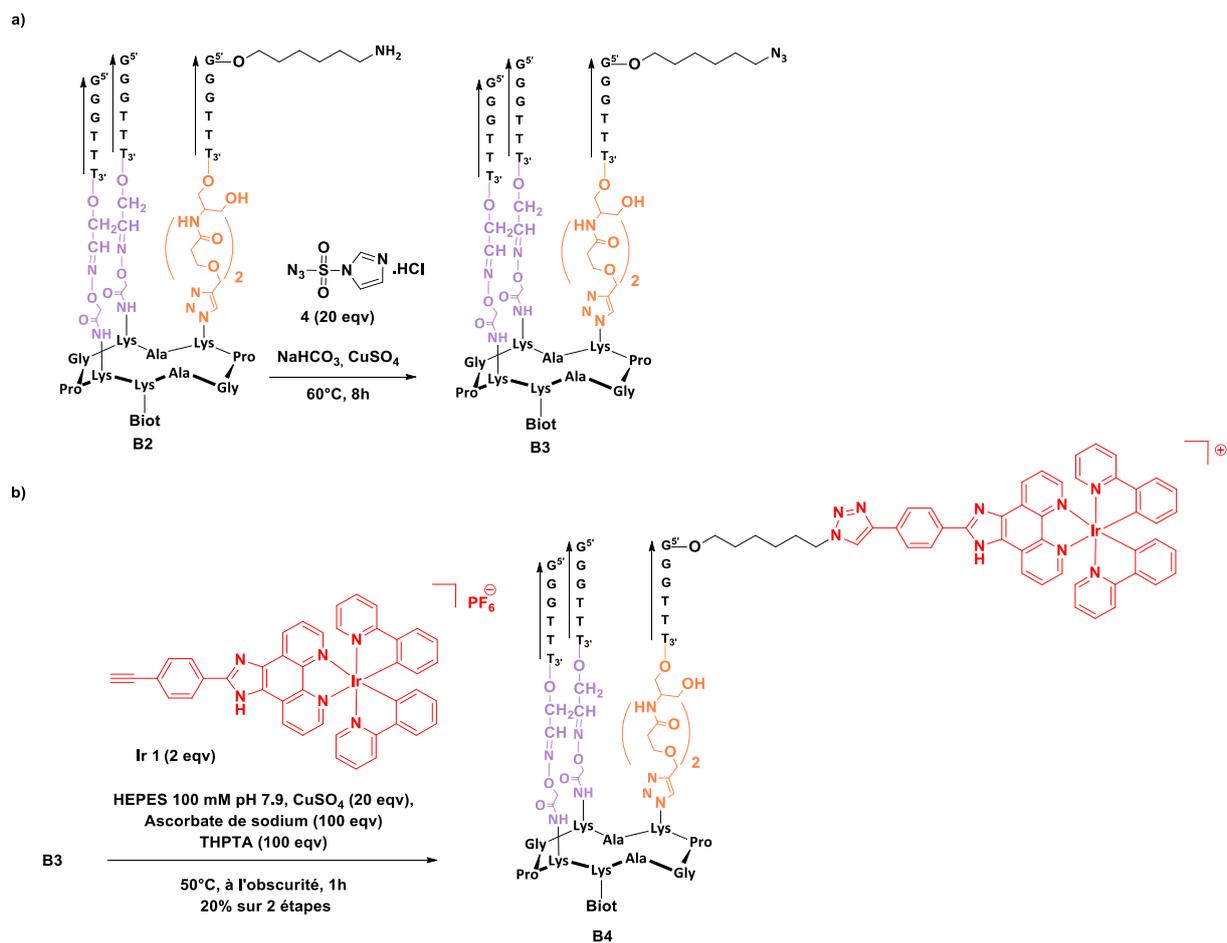
ESI-MS(-) :  $m/z$  calculée pour  $C_{182}H_{250}N_{62}O_{96}P_{12}S$  : 5246.08,  $m/z$  trouvée : 5244.28 [M-H]<sup>-</sup>.



ESI-MS(-) :  $m/z$  calculée pour  $C_{260}H_{359}N_{86}O_{143}P_{19}S$  : 7597.75,  $m/z$  trouvée : 7596.17 [M-H]<sup>-</sup>.

**Figure 4.15** : Spectrométrie de masse ESI-MS(-) a) de l'édifice **B1** et b) de l'édifice **B2**.

Dans le but d'éviter des pertes de produits lors de la purification sur HPLC en phase inverse, nous avons décidé de ne pas purifier la réaction après la première réaction de CuAAC et d'engager le brut réactionnel sur la réaction suivante : la conversion de la fonction amine présente sur l'oligonucléotide, en fonction azoture par une réaction de diazo-transfert (**Schéma 4.23 a**). Cette réaction de diazo-transfert permet par la suite l'incorporation du complexe d'iridium *via* une deuxième réaction de CuAAC entre le complexe possédant la fonction alcyne **Ir 1** et l'édifice portant la fonction azoture **B3** (**Schéma 4.23 b**).

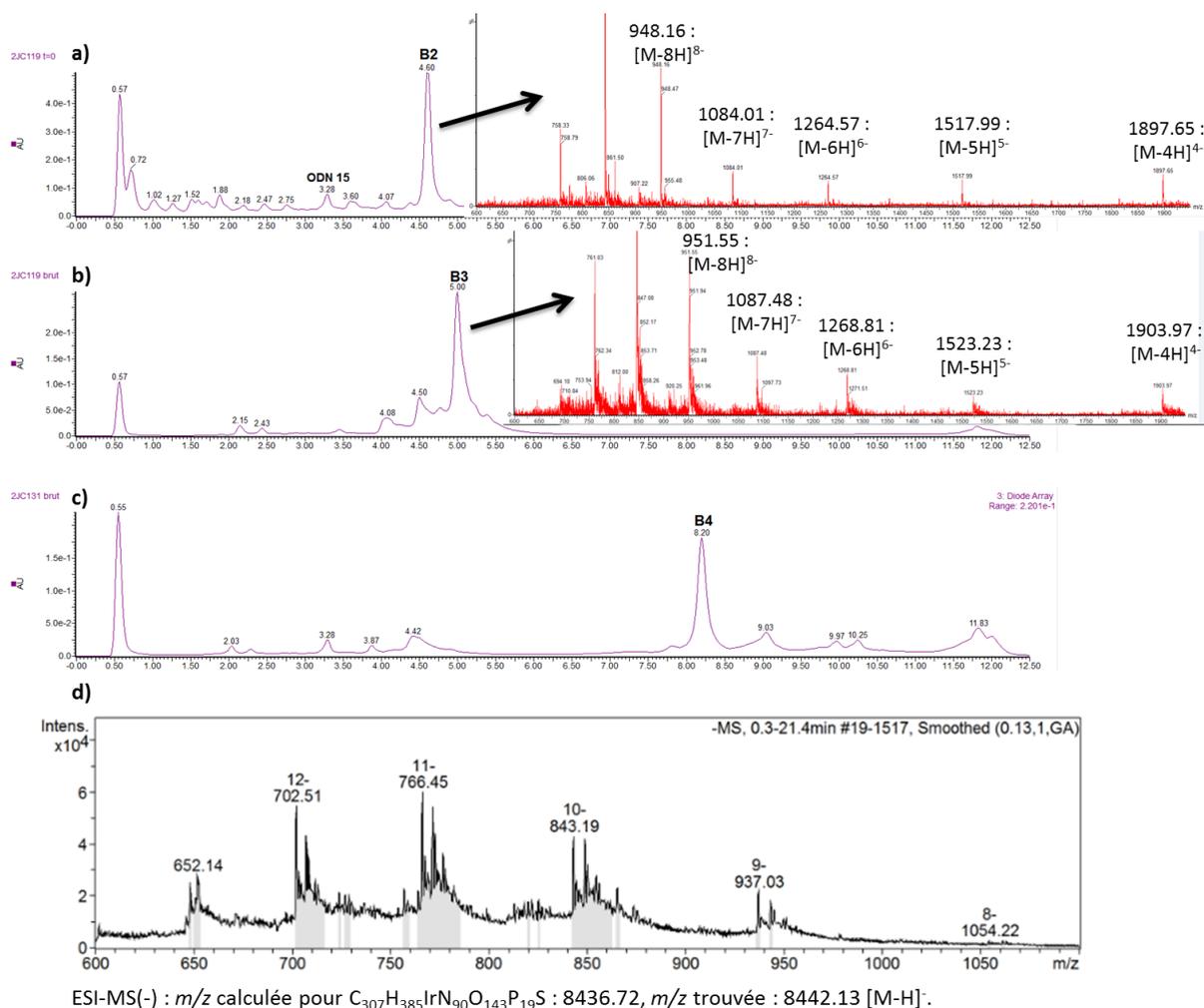


Après la réaction de CuAAC entre l'édifice **B1** et l'oligonucléotide **15**, le brut réactionnel est dessalé sur colonne d'exclusion stérique (NAP-25). L'analyse UPLC-MS du brut réactionnel nous permet de confirmer que le troisième brin d'oligonucléotide s'est bien inséré au sein de l'édifice par une augmentation de masse de 2351 Da correspondant à la masse de l'oligonucléotide ajouté.

Suite à cela, le brut réactionnel contenant l'intermédiaire **B2** (**Figure 4.16 a**) est mis à réagir en présence de l'ISAHC **4**, de bicarbonate de sodium et de sulfate de cuivre. Après 8h de réaction à 60°C, le brut réactionnel est dessalé sur colonne d'exclusion de taille. L'analyse par UPLC-MS montre une différence de temps de rétention et nous indique que la fonction amine est bien transformée en fonction azoture par une augmentation de masse de 26 Da correspondant à la perte de deux hydrogènes et l'ajout de deux atomes d'azotes. Afin d'éviter les pertes de matières lors de la purification par RP-HPLC, le brut réactionnel issu de cette réaction de diazo-transfert n'est également pas purifié et est engagé directement dans la réaction suivante.

La dernière étape de synthèse consiste à ajouter le complexe d'iridium **Ir 1** à l'édifice par une deuxième réaction de cycloaddition cupro-catalysée (CuAAC). Pour cela, le brut réactionnel contenant l'édifice **B3** (**Figure 4.16 b**) est mis à réagir en présence du complexe **Ir 1** (2 eqv) dans les conditions optimisées (20 eqv de  $\text{CuSO}_4$ , 100 eqv d'ascorbate de sodium, 100 eqv de THPTA, dans le tampon HEPES 100 mM à pH 7.9, et chauffé à 50°C pendant 2h à l'obscurité). Une analyse par UPLC-MS montre la formation d'un produit moins polaire (**Figure 4.16 c**) avec une augmentation de la masse moléculaire correspondant à l'ajout du complexe. A la fin de la réaction, de l'EDTA est ajouté dans le milieu réactionnel afin de piéger le cuivre et le brut réactionnel est dessalé sur colonne

d'exclusion stérique avant d'être purifié sur HPLC en phase inverse. Le produit pur est obtenu avec un rendement de 20% sur les deux dernières étapes de synthèse (**Schéma 4.23 b**) et est caractérisé par ESI-MS(-) (**Figure 4.16 d**).



**Figure 4.16** : Chromatogrammes UPLC de a) brut réactionnel après la première réaction de CuAAC, avec le spectre de masse UPLC-MS (-) de **B2**, b) brut réactionnel après la réaction de diazo-transfert, avec le spectre de masse UPLC-MS (-) de **B3** c) brut réactionnel après la deuxième réaction de CuAAC permettant l'ajout du complexe **Ir 1** à l'édifice **B3**, d) spectre ESI-MS(-) de l'édifice **B4** après purification.

## 4.3. Conclusions

### 4.3.1. Partie ADN duplexe

L'incorporation du groupement cyclopropylamine sur la 5-bromo-2'-désoxyuridine ainsi que sur l'oligonucléotide porteur de ce nucléoside modifié a été réalisée avec succès en mettant en jeu un protocole par micro-ondes. Bien qu'il y ait eu des doutes sur l'incorporation du groupement cyclopropylamine sur l'oligonucléotide suite à l'analyse par spectrométrie de masse, l'hydrolyse enzymatique suivi de l'analyse par RP-HPLC a permis de confirmer que le groupement cyclopropylamine s'est bien inséré au sein de l'oligonucléotide.

La préparation du brin complémentaire portant l'injecteur de charge sur deux positions différentes ainsi que la préparation de quatre oligonucléotides présentant la sonde sur différentes positions permet de constituer huit systèmes distincts de duplexe. Ces huit systèmes (détaillés dans le chapitre suivant) nous permettront d'étudier différents paramètres influençant l'efficacité de transferts de charges au sein de l'ADN duplexe.

### 4.3.2. Partie ADN G-quadruplexe

Nous avons envisagé l'utilisation de deux châssis peptidiques dans le but de former le G-quadruplexe contraint. Nous avons dans un premier optimisé les réactions de ligations entre les différents oligonucléotides avec le châssis peptidique **9**. Puis la synthèse de l'édifice cible **B4** a été réalisée à partir du châssis peptidique **10** en utilisant les nouvelles conditions de synthèse. Par ailleurs, nous avons prouvé que la synthèse « multi-étapes » de conjugués oligonucléotides-châssis peptidique est possible sans purification intermédiaire, permettant d'éviter ainsi la perte de matière lors de l'étape de purification sur HPLC semi-préparative en phase inverse.

Les études de transferts de charges au sein des systèmes ADN duplexe et ADN G-quadruplexe seront présentées dans le chapitre suivant.

## 4.4. Section expérimentale

### 4.4.1. Materials and methods

**[Ir(ppy)<sub>2</sub>(ethynyl-phen)].1PF<sub>6</sub> (Ir **6**)** was synthesized according to previously described literature protocol.<sup>135</sup> Reagents were obtained from Activotec (Cambridge, UK), Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Acros (Noisy-le-Grand, France), Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), BioSolve BV (Valkenswaard, Netherlands), Eurogentec (Angers, France), Link Technologies (Glasgow, Scotland), Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) or Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences - VWR, Limonest, France). All solvents and reagents used were of highest purity commercially available.

ESI mass spectra were performed on an Esquire 3000 spectrometer from Bruker or on an Acquity UPLC/MS system from Waters equipped with a SQ Detector 2. Oligonucleotides and conjugates MS analyses were carried out in negative mode. <sup>1</sup>H NMR spectra were obtained with an Avance III Bruker spectrometer.

RP-HPLC analyses were performed on a Waters HPLC system using C18 Nucleosil column (Macherey-Nagel, 100 Å, 250 x 4.6 mm, 5 µm) with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm. A 1 mL/min flow linear gradient was applied. Solvent A1 (50 mM triethylammonium acetate buffer with 5% acetonitrile) and solvent B1 (acetonitrile with 5% water) were used. A stepwise gradient of 0-30% B1 in 20 min followed by 30 to 100% B1 in 10 min was applied for gradient I. A stepwise gradient of 0-70% B1 in 30 min then from 70 to 100% B1 in 10 min was applied for the gradient II. The RP-HPLC purifications of oligonucleotides were performed on a Gilson system with Nucleosil C-18 column (Macherey-Nagel, 100 Å, 250 x 10 mm, 7 µm) using 4 mL/min flow linear gradient (gradient I or II) with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm. Water solvent was of Milli-Q quality. CH<sub>3</sub>CN was HPLC quality.

The course of reactions were monitored by using UPLC-MS system Waters, it includes reverse phase chromatography using Nucleosil C18 column (130 Å, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm) and a detection by UV at 260 nm and 280 nm and by electron spray ionization mass spectrometry. A 0.3 mL/min flow linear gradient with solvent C (triethylamine (15 mM) and hexafluoro-2-propanol (50 mM) in water) and solvent D (triethylamine (15 mM) and hexafluoro-2-propanol (50 mM) in methanol) was used. Several gradients were used: gradient I (0-30% D in 12.5 minutes), gradient II (0-50% D in 12.5 minutes) and gradient III (0-80% D in 12.5 minutes).

The oligonucleotide was obtained from automated DNA synthesis using commercially available phosphoramidites at 1 µmol scale. Cleavage from the resin and deprotection were performed in 28% aqueous ammonia/methylamine (1:1) solution for 20 min at 60°C. The released product was purified on Glen-Pak™ Cartridges and freeze-dried.

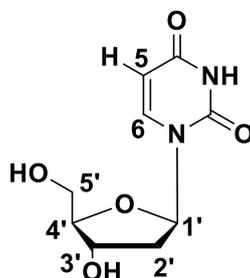
Cleavage of oligonucleotides into 2'-deoxynucleosides upon digestion with phosphodiesterase I and alkaline phosphatase was carried out at 37°C overnight and the results analyzed by RP-HPLC. RP-HPLC analyses were performed on a Waters Alliance HPLC system using Phenomenex synergy fusion column (250 x 4.6 mm, 4 µm) with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm. A 0.4 mL/min flow linear gradient was applied. Solvent A2 (mQ H<sub>2</sub>O), solvent B2 (acetonitrile) and solvent C1 (aqueous ammonium acetate solution, 50 mM) were used. A stepwise gradient of 0-40% B2 in 20 min (solvent C1 is kept constant at 20%) followed by 40% to 80% B2 in 10 min was applied. Water solvent was of Milli-Q quality, CH<sub>3</sub>CN was HPLC quality.

Desalting of oligonucleotides was performed by Size Exchange Chromatography (SEC) on NAP 25 cartridge using manufacturer's protocol. Purification with Glen-Pak™ Cartridges was performed using manufacturer's protocol.

Quantification of oligonucleotides was performed by UV measurements at 260 nm using Nanodrop equipment (Molar extinction  $\epsilon_{260\text{nm}}$  were estimated according to the nearest neighbor model).

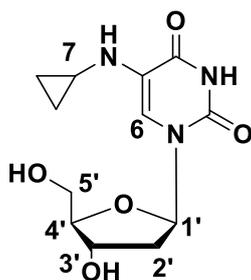
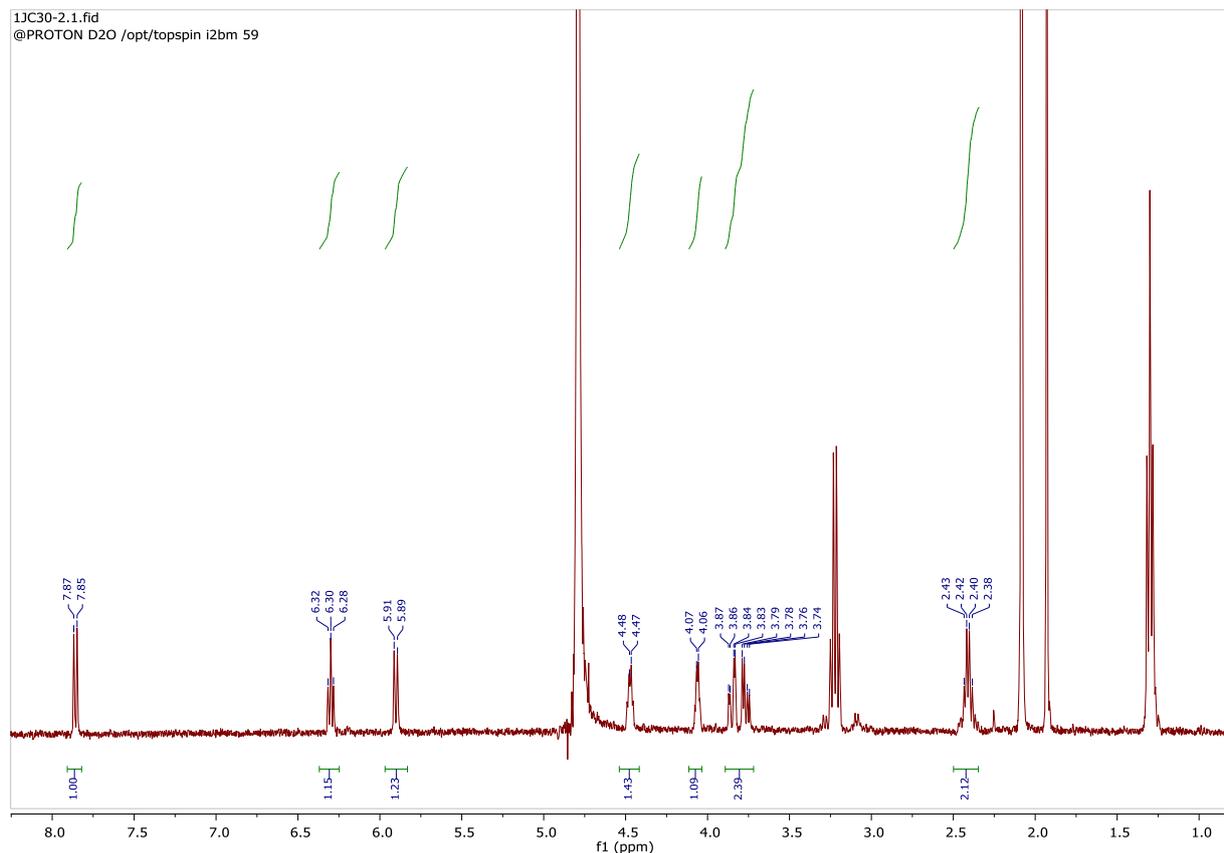
## 4.4.2. Partie expérimentale de la partie ADN duplexe

### 4.4.2.1. Synthetic protocols

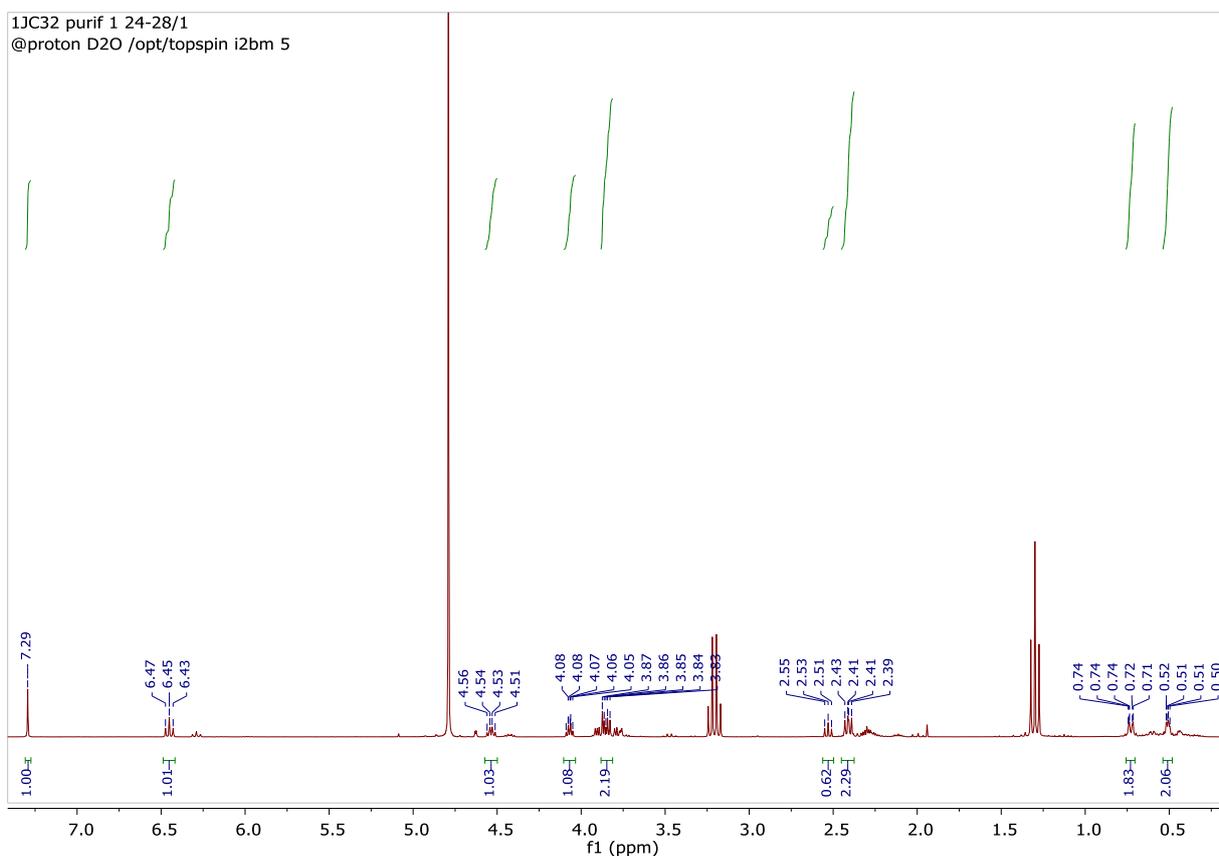


**2'-deoxyuridine 3:** All the solvents were degassed by bubbling argon for 15 min prior to use. In a solution containing 5-bromo-2'-deoxyuridine (31 mg, 0.1 mmol), cyclopropyl boronic acid (17 mg, 0.2 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (195 mg, 0.6 mmol) in 500 µL H<sub>2</sub>O/ACN (6/4) were added a solution of Pd(OAc)<sub>2</sub> (2.2 mg, 0.01 mmol) and 3,3',3''-phosphanetriyltris(benzenesulfonic acid) trisodium salt (TPPTS) (2.8 mg, 0.05 mmol) in 500 µL H<sub>2</sub>O/ACN (6/4). The mixture was degassed a second time through argon for 15 min, then heated at 100°C in the dark overnight. At the end of the reaction, the mixture was cooled down to room temperature and the solvent was evaporated. The crude mixture was purified by RP-HPLC affording pure product **3**. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.86 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H<sub>5</sub>), 6.30 (t,  $J$  = 6.7 Hz,

1H<sub>1'</sub>), 5.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H<sub>6</sub>), 4.52 – 4.37 (m, 1H<sub>3'</sub>), 4.12 – 4.01 (m, 1H<sub>4'</sub>), 3.91 – 3.72 (m, 1H<sub>5'</sub>), 2.54 – 2.32 (m, 1H<sub>2'</sub>). ESI-MS(+): *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 228.07, *m/z* found: 251.06 corresponding to [M+Na]<sup>+</sup>.

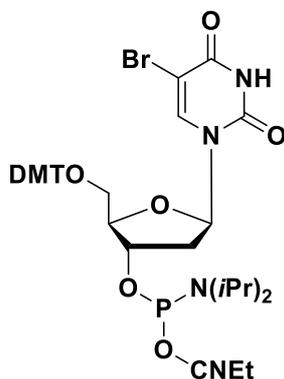


**5-cyclopropylamine-2'-deoxyuridine (dU<sup>CPA</sup>) 2:** 5-Bromo-2'-deoxyuridine (100 mg, 0.33 mmol) was loaded into a Biotage vial microwave reactor and cyclopropylamine (3.3 mL, 0.1 M) was added. The vial was sealed and irradiated at 60°C for 8 hours. At the end of the reaction, cyclopropylamine was co-evaporated (3x) with ACN/MeOH 2% solution. The crude mixture was purified by column chromatography on silica gel (100% DCM to DCM/MeOH 90:10 and 1% TEA) to afford product **2** (63 mg, yield: 68%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.29 (s, 1H<sub>6</sub>), 6.45 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H<sub>1'</sub>), 4.59 – 4.50 (m, 1H<sub>3'</sub>), 4.07 (m, 1H<sub>4'</sub>), 3.96 – 3.71 (m, 2H<sub>5'</sub>), 2.53 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H<sub>7</sub>), 2.41 (dd, *J* = 6.8, 5.3 Hz, 2H<sub>2'</sub>), 0.78 – 0.67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 0.51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>). UPLC-MS(+): *m/z* calcd for C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 283.12, *m/z* found: 284.01 [M+H]<sup>+</sup>.



### Oligonucleotides synthesis.

**1CU5<sup>Br</sup>** (<sup>3'</sup>-TTAAU<sup>Br</sup>GGGTACCA-<sup>5'</sup>): The oligonucleotide was obtained from automated DNA synthesis using commercially available 5-bromo dU Internal Modifier phosphoramidite at 1  $\mu$ mol scale.



Cleavage from the resin and deprotection were performed in ammonia/methylamine (1:1) solution for 30 min at 60°C. The released product was purified on Glen-Pak™ Cartridges and freeze-dried (yield: 54%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 134\ 700\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{137}\text{H}_{170}\text{BrN}_{54}\text{O}_{82}\text{P}_{13}$ : 4364.66,  $m/z$  found: 4365.11 [M-H]<sup>-</sup>.

**1CU10<sup>Br</sup>** (<sup>3'</sup>-TTAATGGGGU<sup>Br</sup>ACCA-<sup>5'</sup>): The same protocol as above was used (yield: 35%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 134\ 700\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{137}\text{H}_{170}\text{BrN}_{54}\text{O}_{82}\text{P}_{13}$ : 4364.66,  $m/z$  found: 4366.98 [M-H]<sup>-</sup>.

**2CU5<sup>Br</sup>** (<sup>3'</sup>-ACCATGGGGU<sup>Br</sup>AATT-<sup>5'</sup>): The same protocol as above was used (yield: 62%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 135\ 300\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{137}\text{H}_{170}\text{BrN}_{54}\text{O}_{82}\text{P}_{13}$ : 4364.66,  $m/z$  found: 4364.07 [M-H]<sup>-</sup>.

**2CU10<sup>Br</sup>** (3'-ACCAU<sup>Br</sup>GGGGTAATT-5'): The same protocol as above was used (yield: 56%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 135\ 300\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{137}\text{H}_{170}\text{BrN}_{54}\text{O}_{82}\text{P}_{13}$ : 4364.66,  $m/z$  found: 4365.04 [M-H]<sup>-</sup>.

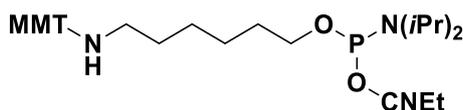
**1CU5<sup>CPA</sup>** (3'-TTAAU<sup>CPA</sup>GGGGTACCA-5'): Bromo containing oligonucleotide precursor **1CU5<sup>Br</sup>** (133 nmol) was loaded into a Biotage vial microwave reactor and cyclopropylamine (333  $\mu\text{L}$ ,  $4.10^{-4}\ \text{M}$ ) was added. The vial was sealed and irradiated at 60°C for 8 hours. The crude product was desalted on NAP-25 column and purified on RP-HPLC and freeze-dried (38 nmol, yield: 29%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 134\ 700\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{140}\text{H}_{176}\text{N}_{55}\text{O}_{82}\text{P}_{13}$ : 4341.79,  $m/z$  found: 4368.09 corresponding to [M-H + Na]<sup>+</sup>.

**1CU10<sup>CPA</sup>** (3'-TTAATGGGGU<sup>CPA</sup>ACCA-5'): The same protocol as above from oligonucleotide **1CU10<sup>Br</sup>** was used (300 nmol, yield: 54%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 134\ 700\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{140}\text{H}_{176}\text{N}_{55}\text{O}_{82}\text{P}_{13}$ : 4341.79,  $m/z$  found: 4368.09 corresponding to [M-H + Na]<sup>+</sup>.

**2CU5<sup>CPA</sup>** (3'-ACCATGGGGU<sup>CPA</sup>AATT-5'): The same protocol as above from oligonucleotide **2CU5<sup>Br</sup>** was used (200 nmol, yield: 37%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 135\ 300\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). UPLC-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{140}\text{H}_{176}\text{N}_{55}\text{O}_{82}\text{P}_{13}$ : 4341.79,  $m/z$  found: 4368 corresponding to [M-H + Na]<sup>+</sup>.

**2CU10<sup>CPA</sup>** (3'-ACCAU<sup>Br</sup>GGGGTAATT-5'): The same protocol as above from oligonucleotide **2CU10<sup>Br</sup>** was used (280 nmol, yield: 79%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 135\ 300\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{140}\text{H}_{176}\text{N}_{55}\text{O}_{82}\text{P}_{13}$ : 4341.79,  $m/z$  found: 4368.12 corresponding to [M-H + Na]<sup>+</sup>.

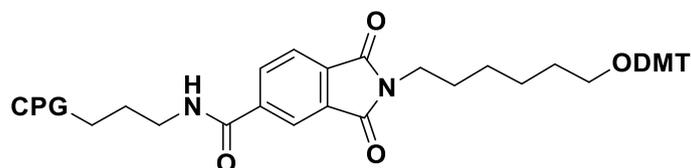
**ODN-5'-NH<sub>2</sub> 5** (3'-TGGTACCCCATTAAX-5' in which X represents the C6-amino linker): Oligonucleotide **5** was obtained from automated DNA synthesis using commercially available 5' amino Modifier C6 phosphoramidite at 1  $\mu\text{mol}$  scale.



Cleavage from the resin and deprotection were performed in ammonia/methylamine (1:1) solution for 30 min at 60°C. The released product was purified on Glen-Pak™ Cartridges and freeze-dried (yield: 20 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 135\ 100\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{142}\text{H}_{187}\text{N}_{51}\text{O}_{85}\text{P}_{14}$ : 4399.82,  $m/z$  found: 4399.50 [M-H]<sup>-</sup>.

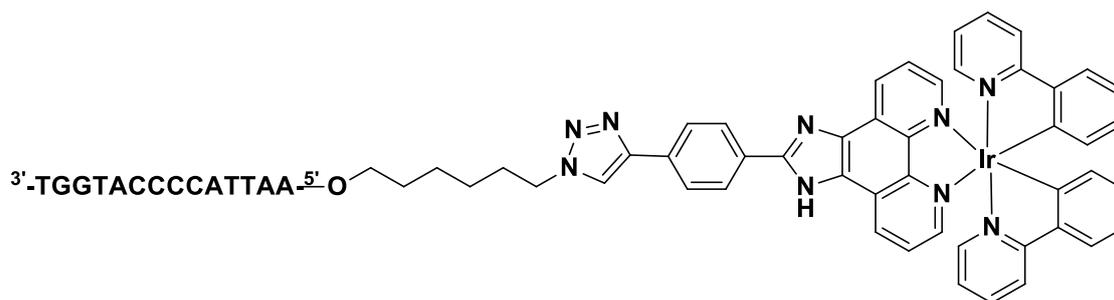
**ODN-5'-N<sub>3</sub> 6** (3'-TGGTACCCCATTAAX-5' in which X represents the C6-azide linker): In an eppendorf containing oligonucleotide **5** (710 nmol), aqueous solutions of NaHCO<sub>3</sub> (510  $\mu\text{L}$ , 102  $\mu\text{mol}$ , 200 mM), CuSO<sub>4</sub> (20  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{mol}$ , 100 mM), imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride **4** (100  $\mu\text{L}$ , 14  $\mu\text{mol}$ , 0.14 M in H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1) were added successively. The mixture was heated at 60°C. At the end of the reaction, the oligonucleotide was desalted on NAP-25 column (no further purification was needed) and freeze-dried (570 nmol, yield: 80%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 135\ 100\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). UPLC-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{142}\text{H}_{185}\text{N}_{53}\text{O}_{85}\text{P}_{14}$ : 4425.81,  $m/z$  found: 4425.0 [M-H]<sup>-</sup>.

**ODN-3'-NH<sub>2</sub> 7** (3'-YAATTACCCCATGGT-5' in which Y represents the C6-amino linker): Oligonucleotide **7** was obtained from automated DNA synthesis using commercially available 3' amino Modifier C6 CPG resin at 1  $\mu\text{mol}$  scale.

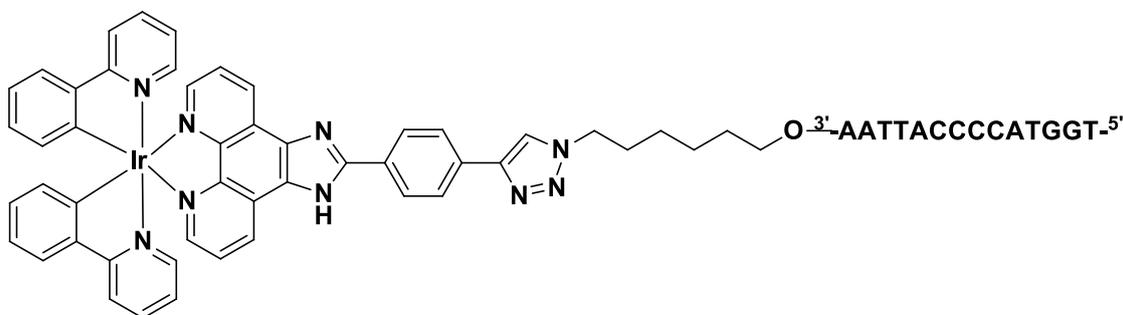


Cleavage from the resin and deprotection were performed in ammonia/methylamine (1/1) solution for 30 min at 60°C. The released product was purified on Glen-Pak™ Cartridges and freeze-dried (yield: 33%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 135\,700\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{142}\text{H}_{187}\text{N}_{51}\text{O}_{85}\text{P}_{14}$ : 4399.82,  $m/z$  found: 4400.02 [M-H]<sup>-</sup>.

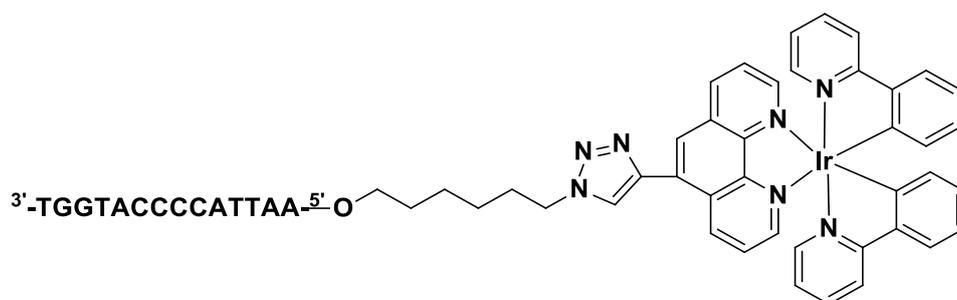
**ODN-3'-N<sub>3</sub> 8** (3'-YAATTACCCCATGGT-5' in which Y represents the C6-azide linker): The same protocol as above from oligonucleotide **7** was used (510 nmol, yield: 76%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 135\,700\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). UPLC-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{142}\text{H}_{185}\text{N}_{53}\text{O}_{85}\text{P}_{14}$ : 4425.81,  $m/z$  found: 4426 [M-H]<sup>-</sup>.



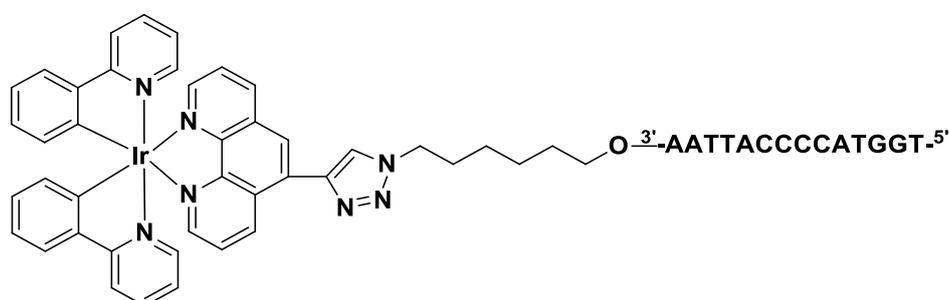
**Conjugate Ir 1-5'**: All the solvents were degassed by bubbling argon for 15 min prior to use. In an eppendorf containing oligonucleotide **6** (370 nmol), water (100  $\mu\text{L}$ ) and DMF (25  $\mu\text{L}$ ) were successively added. Then aqueous solutions of THPTA (183  $\mu\text{L}$ , 4.4  $\mu\text{mol}$ , 24 mM),  $\text{CuSO}_4$  (38  $\mu\text{L}$ , 1.5  $\mu\text{mol}$ , 40 mM), HEPES (150  $\mu\text{L}$ , 100 mM, pH 7.4) were successively added followed by the addition of DMF solution of **Ir 1** complex (134  $\mu\text{L}$ , 1.1  $\mu\text{mol}$ , 3.5 mg in 500  $\mu\text{L}$  of DMF) and 30  $\mu\text{L}$  of aqueous sodium ascorbate solution (7.4  $\mu\text{mol}$ , 250 mM). The reaction was heated at 50°C in the dark for 6h, then the reaction was quenched with 100  $\mu\text{L}$  of 0.5 M EDTA aqueous solution. The crude product was desalted on NAP 25 then purified on RP-HPLC (gradient II) and freeze-dried (160 nmol, yield: 43%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 160\,900\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{185}\text{H}_{213}\text{IrN}_{59}\text{O}_{85}\text{P}_{14}$ : 5247.01,  $m/z$  found: 5248.34 [M-H]<sup>-</sup>.



**Conjugate Ir 1-3'**: The same protocol as above from azide containing oligonucleotide **8** was used (160 nmol, yield: 52%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 161\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{185}\text{H}_{213}\text{IrN}_{59}\text{O}_{85}\text{P}_{14}$ : 5247.01,  $m/z$  found: 5248.35 [M-H]<sup>-</sup>.



**Conjugate Ir 6-5'**: All the solvents were degassed by bubbling argon for 15 min prior to use. In an eppendorf containing oligonucleotide **6** (200 nmol), 100  $\mu\text{L}$  water was added followed by 25  $\mu\text{L}$  of DMF. Then aqueous solutions of THPTA (100  $\mu\text{L}$ , 2.4  $\mu\text{mol}$ , 24 mM),  $\text{CuSO}_4$  (20  $\mu\text{L}$ , 0.8  $\mu\text{mol}$ , 40 mM), HEPES (80  $\mu\text{L}$ , 100 mM, pH 7.4) were successively added followed by the addition of DMF solution of **Ir 6** complex (90  $\mu\text{L}$ , 0.6  $\mu\text{mol}$ , 2.5 mg in 500  $\mu\text{L}$  of DMF) and 16  $\mu\text{L}$  of aqueous sodium ascorbate solution (4  $\mu\text{mol}$ , 250 mM). The reaction was heated at 50°C in the dark for 3h, then the reaction was quenched with 100  $\mu\text{L}$  of 0.5 M EDTA aqueous solution. The crude product was desalted on NAP 25 then purified on RP-HPLC (gradient II) and freeze-dried (26 nmol, yield: 13%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 182\ 100\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{178}\text{H}_{209}\text{IrN}_{57}\text{O}_{85}\text{P}_{14}$ : 5130.97,  $m/z$  found: 5128.29  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .



**Conjugate Ir 6-3'**: The same protocol as above from azide containing oligonucleotide **8** was used (35 nmol, yield: 18%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 182\ 700\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{178}\text{H}_{209}\text{IrN}_{57}\text{O}_{85}\text{P}_{14}$ : 5130.97,  $m/z$  found: 5132.42  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

### 4.4.3. Partie expérimentale de la partie ADN G-quadruplexe

#### 4.4.3.1. General synthetic methods for peptides synthesis

The synthesis was performed on a Syro II synthesizer using Fmoc/*t*Bu strategy on a 2-chlorotrityl resin.

The course of reactions were monitored by using UPLC-MS system waters, it includes reverse phase chromatography using Nucleosil C18 column (130 Å, 2.1 x 50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) and detection by UV at 214 nm and 250 nm and by electron spray ionization mass spectrometry. A 1mL/min flow linear gradient from 95% solvent A (0.1% formic acid in water) and 5% solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile/water: 9/1) to 100% B for 4 minutes was applied.

#### a. General procedure for linear protected peptides synthesis by SPPS

All peptides were synthesized using commercially available 2-chlorotrityl resin (loading of 0.83 mmol/g). Fmoc-Gly-OH (3 eq) was coupled on the resin in anhydrous DCM in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass. pH 8 was adjusted using DIEA. The mixture was stirred for 1h at room

temperature. A DCM/MeOH/DIEA solution (17/2/1, v/v/v) was then added. Fmoc protecting group was removed using three washes with 20% piperidine in DMF (40 mL). The resin loading was monitored by quantification of free dibenzofulvene using UV absorbance at 299 nm (obtained loading of 0.40 mmol/g). The elongation was performed on a Syro II peptide synthesizer using Fmoc/*t*Bu strategy on the above-prepared resin. Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH and Fmoc-Pro-OH amino acids were commercially available. 4 eqv of amino acid were used for each coupling reaction in presence of DIEA and HBTU as activator. Supported peptide was cleaved from the resin using a DCM/TFE/AcOH solution (70/20/10, v/v/v). The solution was evaporated under vacuum and the peptides were precipitated in ether as a white powder. The product was characterized by ESI-MS(+).

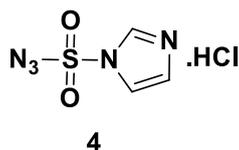
#### *b. General procedure for cyclisation reaction*

Linear peptides were dissolved in DMF to reach a  $10^{-3}$ M concentration and 1.2 eqv of PyBOP was added. The pH was adjusted to 8-9 using DIEA and the solution was stirred at room temperature until the complete peptide cyclisation (UPLC monitoring). The solvent was evaporated under vacuum then the crude peptides were precipitated in ether as a white powder. No further purification was needed. The product was characterized by ESI-MS(+).

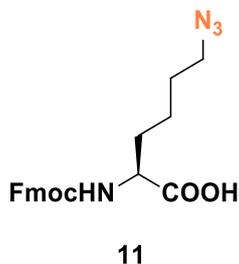
#### *c. General procedure for oxyamine deprotection*

Peptides were dissolved in TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (80/15/5, v/v/v) solution and the mixture was stirred for 16h at room temperature. The solvent was then evaporated under vacuum and the crude peptides were precipitated in ether as a white powder. No further purification was needed.

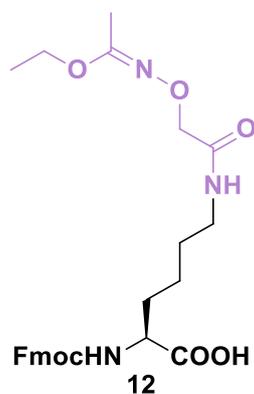
#### 4.4.3.2. Experimental procedures



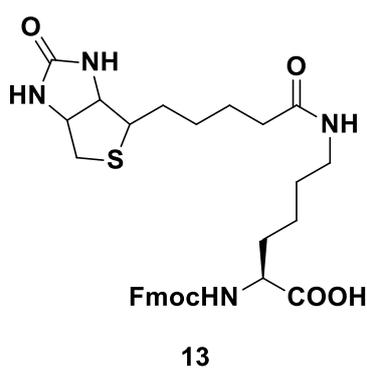
**Imidazole-1-sulfonyl azide 4:** The product was prepared according to previously described literature protocol.<sup>138</sup>



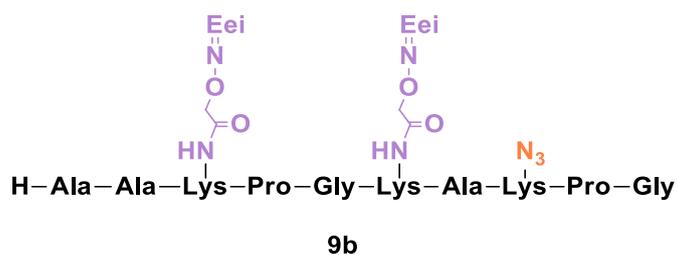
**Fmoc-azidonorleucine 11:** The product was prepared according to previously described literature protocol.<sup>142</sup>



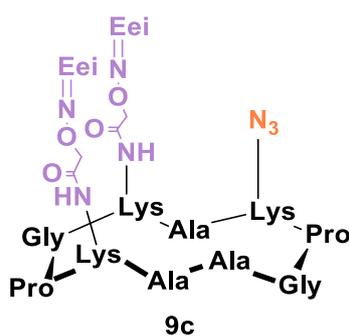
**Fmoc-Lys(Eei-Aoa)-OH 12:** The product was prepared according to previously described literature protocol.<sup>139</sup>



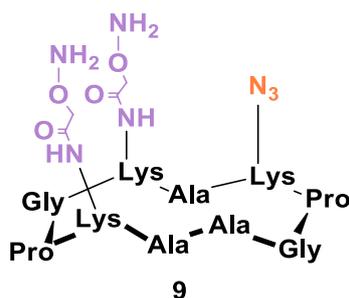
**Fmoc-Lys(Biotin)-OH 13:** The product was prepared according to previously described literature protocol.<sup>140</sup>



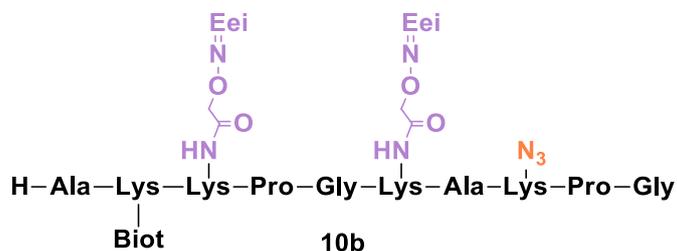
The linear peptide was synthesized using general procedure **4.4.3.1.a** and modified amino acids **11** and **12**. The crude product was used without purification. UPLC-MS(+):  $m/z$  calcd for  $C_{53}H_{90}N_{17}O_{17}$ : 1236.67,  $m/z$  found: 1237.21  $[M+H]^+$ .



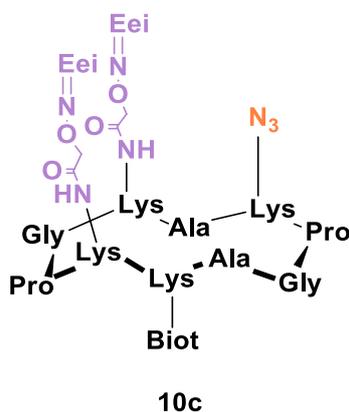
The linear peptide **9b** (50 mg, 40  $\mu$ mol) was cyclized using general procedure **4.4.3.1.b**. The crude product was precipitated in ether, no further purification was needed. The product was freeze-dried to obtain a white powder (34 mg, yield: 70%). ESI-MS(+):  $m/z$  calcd for  $C_{53}H_{87}N_{17}O_{16}$ : 1217.65,  $m/z$  found: 1218.90  $[M+H]^+$ .



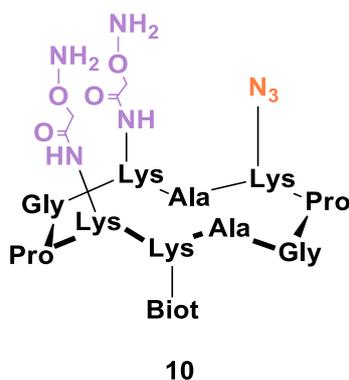
The peptide **9c** (5 mg, 4  $\mu$ mol) was deprotected using general procedure **4.4.3.1.c**. The crude product was used without any further purification. The yield was considered as quantitative. ESI-MS(+):  $m/z$  calcd for  $C_{45}H_{75}N_{17}O_{14}$ : 1078.18,  $m/z$  found: 1078.59  $[M+H]^+$ .



The linear peptide was synthesized using general procedure **4.4.3.1.a** and modified amino acids **11**, **12** and **13**. The crude product was used without purification. ESI-MS(+):  $m/z$  calcd for  $C_{66}H_{112}N_{20}O_{19}S$ : 1520.81,  $m/z$  found: 1519.77  $[M+H]^+$ .



The linear peptide **10b** (50 mg, 33  $\mu$ mol) was cyclized using general procedure **4.4.3.1.b**. The crude product was precipitated in ether, no further purification was needed. The product was freeze-dried to obtain a white powder (44 mg, yield: 90%). ESI-MS(+):  $m/z$  calcd for  $C_{66}H_{108}N_{20}O_{18}S$ : 1501.77,  $m/z$  found: 1523.65  $[M+H + Na]^+$ , HR-MS (+):  $m/z$  calcd for  $[M+2H]^{2+}$ : 751.40084,  $m/z$  found: 751.39981 corresponding to  $[M+2H]^{2+}$ .



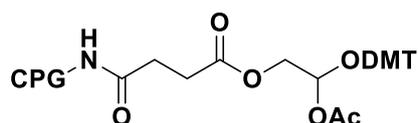
The peptide **10c** (5 mg, 3  $\mu\text{mol}$ ) was deprotected using general procedure **4.4.3.1.c**. The crude product was used without any further purification. The yield was considered as quantitative. ESI-MS(+):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{58}\text{H}_{96}\text{N}_{20}\text{O}_{16}\text{S}$  : 1361.59,  $m/z$  found: 1361.59  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

#### 4.4.3.3. General synthetic methods for oligonucleotides synthesis

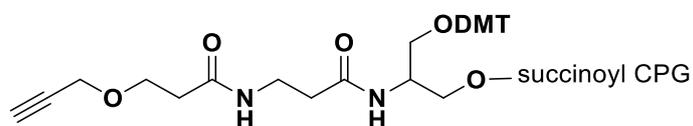
##### a. General procedure for cleavage of the oligonucleotide from the resin and deprotection of the dimethoxytrityl group

The oligonucleotide was obtained from automated DNA synthesis using commercially available phosphoramidites and resins at 1  $\mu\text{mol}$  scale.

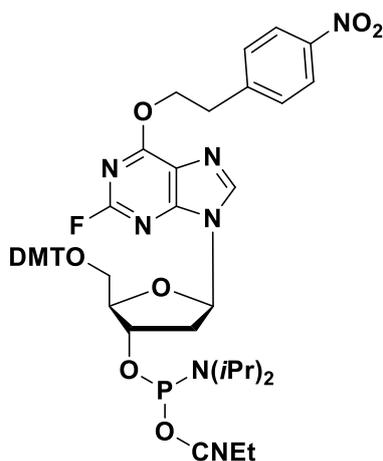
3'-glyceryl CPG resin:



3'-alkyne-modifier serinol CPG resin:



2-fluoro dl Internal Modifier phosphoramidite:



Cleavage from the resin and deprotection were performed in 28% aqueous ammonia/methylamine (1:1) solution for 20 min at 60°C. The released product was purified on Glen-Pak™ Cartridges and freeze-dried.

#### 4.4.3.4. Experimental procedures

**Oligonucleotide 14a** ( $5'$ -GGGTTTX- $3'$  in which X represents the 1,2 diol moiety) was obtained from automated synthesis using a  $3'$ -glyceryl CPG resin at 1  $\mu$ mol scale using general procedure **4.4.3.3.a** and freeze-dried (yield: 50%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 56\ 400\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{63}\text{H}_{83}\text{N}_{21}\text{O}_{42}\text{P}_6$ : 1992.30,  $m/z$  found: 1991.53 [M-H]<sup>-</sup>.

**Oligonucleotide 14** ( $5'$ -GGGTTTX- $3'$  in which X represents the aldehyde moiety): In an eppendorf containing oligonucleotide **14a** (480 nmol), an aqueous solution of  $\text{NaIO}_4$  (3.1 mg, 14.4  $\mu$ mol, 480  $\mu$ L) was added. The reaction was stirred for 30 min at room temperature in dark conditions. Excess of  $\text{NaIO}_4$  was then removed by SEC. The crude was freeze-dried and used without any further purification. The yield was considered as quantitative ( $\epsilon_{260\text{nm}} = 56\ 400\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{62}\text{H}_{79}\text{N}_{21}\text{O}_{41}\text{P}_6$ : 1960.26,  $m/z$  found: 1959.23 [M-H]<sup>-</sup>.

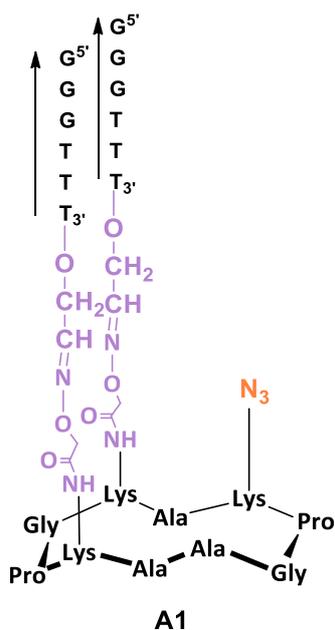
**Oligonucleotide 15** ( $5'$ -YGGGTTTX- $3'$  in which X represents the  $3'$ -alkyne moiety and Y the C6-amino linker) was obtained from automated synthesis using a  $3'$ -alkyne-modifier serinol CPG resin and a  $5'$ -amino-modifier C6 phosphoramidite at 1  $\mu$ mol scale using general procedure **4.4.3.3.a** and freeze-dried (yield: 20%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 56\ 400\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{78}\text{H}_{109}\text{N}_{24}\text{O}_{47}\text{P}_7$ : 2351.66,  $m/z$  found: 2350.53 [M-H]<sup>-</sup>.

**Oligonucleotide 16** ( $5'$ -G<sup>CPA</sup>GGTTT- $3'$ ) was obtained from automated DNA synthesis using commercially available 2-fluoro dl Internal Modifier phosphoramidite (2-F-dl-CE Phosphoramidite) at 1  $\mu$ mol scale. The oligonucleotide on solid support was treated with 6 M aqueous cyclopropylamine and heated at 60°C for 16h to generate the dG<sup>CPA</sup> containing DNA strand and was simultaneously cleaved from the resin. The solvent was evaporated and deprotection was performed in 28% aqueous ammonia/methylamine (1:1) solution for 7h at 60°C. The DMTr group was then removed *via* Glen-Pak™ Cartridges before purification on RP-HPLC (gradient I) and freeze-dried ( $\epsilon_{260\text{nm}} = 56\ 400\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for: 1877.37,  $m/z$  found: 1876.69 [M-H]<sup>-</sup>.

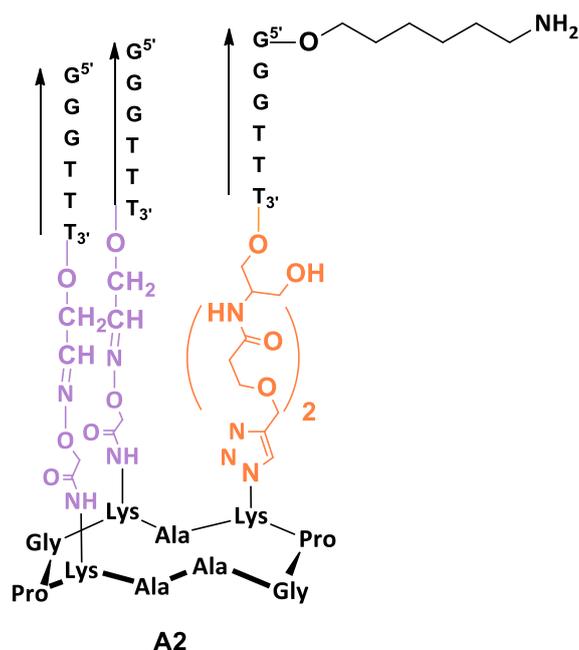
**Oligonucleotide 17** ( $5'$ -GGG<sup>CPA</sup>TTT- $3'$ ): The same protocol as above was used ( $\epsilon_{260\text{nm}} = 56\ 400\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for: 1877.37,  $m/z$  found: 1876.61 [M-H]<sup>-</sup>.

**Oligonucleotide 18** ( $5'$ -GGGU<sup>Br</sup>TT- $3'$ ) was obtained from automated DNA synthesis using commercially available 5-bromo dU internal modifier phosphoramidite at 1  $\mu$ mol scale using general procedure **4.4.3.3.a** and freeze-dried (yield: 60%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 50\ 200\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). UPLC-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{59}\text{H}_{73}\text{BrN}_{21}\text{O}_{37}\text{P}_5$ : 1903.11,  $m/z$  found: 1901.89 [M-H]<sup>-</sup>.

#### 4.4.3.5. Experimental procedures for the preparation of conjugates

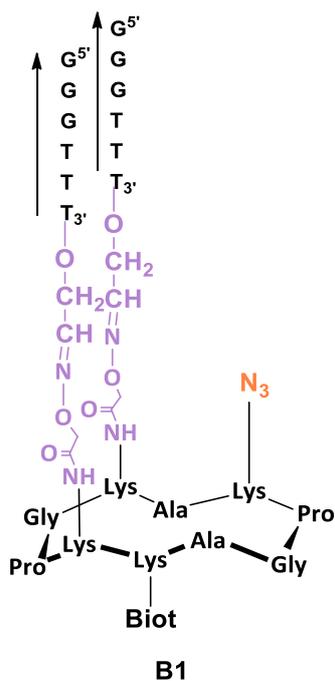


**Conjugate A1:** To an eppendorf containing oligonucleotide **14** (330 nmol in 330  $\mu$ L of 0.8 M ammonium acetate buffer, pH 4.5), an aqueous solution of peptide **9** (95  $\mu$ L, 138 nmol, 1.5 mM) was added. The reaction was stirred for 4h at room temperature then the crude was purified on RP-HPLC (gradient II) and conjugate **A1** was freeze-dried (43 nmol, yield: 30%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 112\,800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{169}\text{H}_{229}\text{N}_{59}\text{O}_{94}\text{P}_{12}$ : 4960.18,  $m/z$  found: 4961.53  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$

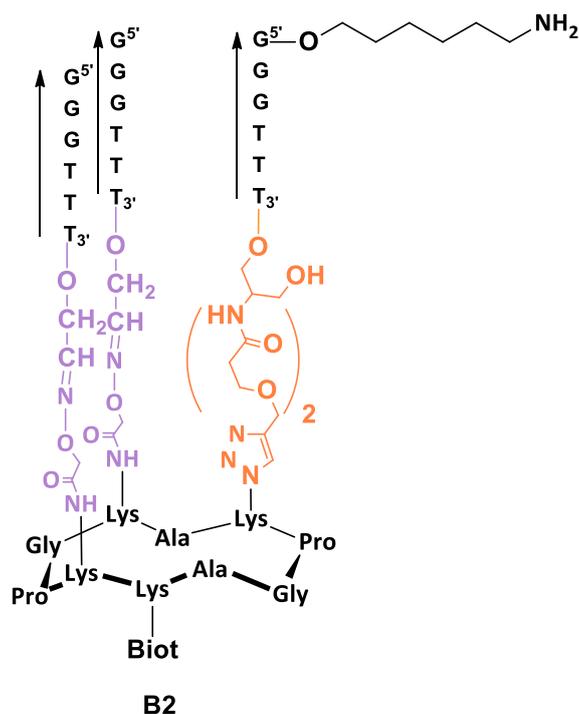


**Conjugate A2:** All the solvents were degassed by bubbling argon for 15 min prior to use. To a solution of azide containing peptide **A1** (24 nmol) in 100  $\mu$ L of HEPES buffer (100 mM, pH 7.9) were added successively aqueous solutions of  $\text{CuSO}_4$  (24  $\mu$ L, 480 nmol, 0.02 M), THPTA (100  $\mu$ L, 2.4  $\mu$ mol, 24 mM). Then aqueous solutions of oligonucleotide **15** (48  $\mu$ L, 48 nmol, 1 mM) and sodium ascorbate (48  $\mu$ L, 2.4  $\mu$ mol, 0.05 M) were added to the previous solution. The reaction was stirred at 50°C for 4h, then the reaction was quenched with 100  $\mu$ L of 0.5 M EDTA aqueous solution. The crude was

desalted on NAP-25 then freeze dried ( $\epsilon_{260\text{nm}} = 169\ 200\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). UPLC-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{247}\text{H}_{338}\text{N}_{83}\text{O}_{141}\text{P}_{19}$ : 7310.68,  $m/z$  found: 7314 [M-H]<sup>-</sup>.

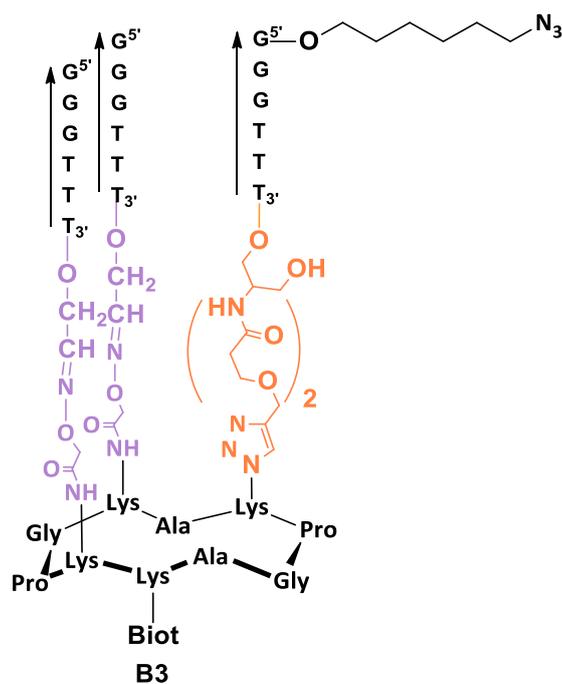


**Conjugate B1:** The oxime ligation was carried out with aldehyde containing oligonucleotide **14** (305 nmol) and peptide **10** (127 nmol) according to synthetic procedure described for the synthesis of **A1** (66 nmol, yield: 52%,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 112\ 800\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{182}\text{H}_{250}\text{N}_{62}\text{O}_{96}\text{P}_{12}\text{S}$ : 5246.08,  $m/z$  found: 5244.28 [M-H]<sup>-</sup>.

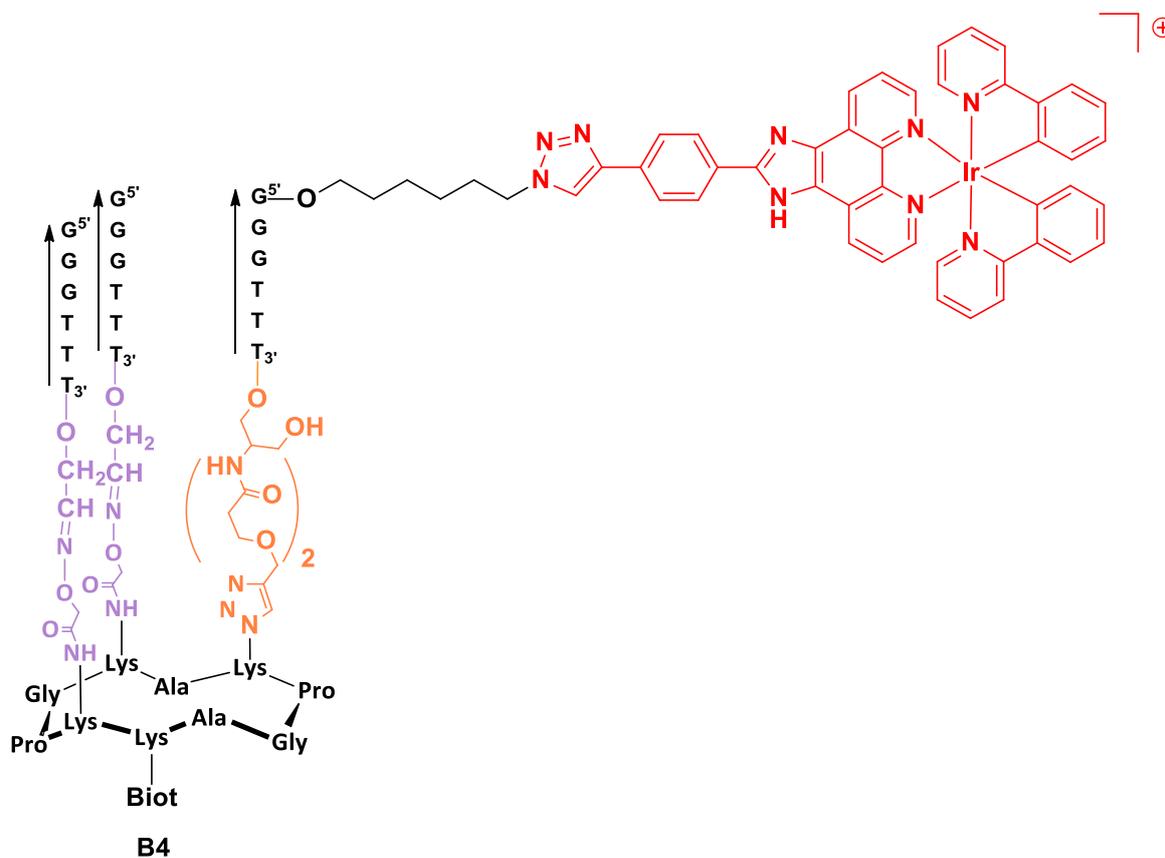


**Conjugate B2:** CuAAC was carried out with alkyne containing oligonucleotide **15** (122 nmol) and azide containing peptide **B1** (61 nmol) according to the synthetic procedure described for the synthesis of

**A2** ( $\epsilon_{260\text{nm}} = 169\,200\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{260}\text{H}_{359}\text{N}_{86}\text{O}_{143}\text{P}_{19}\text{S}$ : 7597.75,  $m/z$  found: 7596.17  $[\text{M-H}]^-$ .



**Conjugate B3:** To an eppendorf containing conjugate **B2** (58 nmol), were added successively solutions of  $\text{NaHCO}_3$  (16  $\mu\text{L}$ , 1.6  $\mu\text{mol}$ , 100 mM in  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  3:1),  $\text{CuSO}_4$  (2  $\mu\text{L}$ , 31 nmol, 0.02 M in  $\text{H}_2\text{O}$ ) and ISAHC **4** (7  $\mu\text{L}$ , 220 nmol, 0.03 M in  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  1:1). The reaction was stirred at  $60^\circ\text{C}$  for 6h then desalted by SEC and freeze-dried. The crude product was engaged in the next reaction without further purification ( $\epsilon_{260\text{nm}} = 169\,200\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). UPLC-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{260}\text{H}_{357}\text{N}_{88}\text{O}_{143}\text{P}_{19}\text{S}$ : 7619.81,  $m/z$  found: 7615  $[\text{M-H}]^-$ .



**Conjugate B4:** All the solvents were degassed by bubbling argon for 15 min prior to use. To an aqueous solution of conjugate **B4** (38  $\mu\text{L}$ , 38 nmol, 1 mM) were added successively aqueous solutions of  $\text{CuSO}_4$  (19  $\mu\text{L}$ , 3.8  $\mu\text{mol}$ , 0.04 M), THPTA (100  $\mu\text{L}$ , 3.8  $\mu\text{mol}$ , 38 mM), HEPES buffer (15  $\mu\text{L}$ , 100 mM, pH 7.9). Then a solution of **Ir 1** in DMF (34  $\mu\text{L}$ , 114 nmol, 3.4 mM) was added followed by an aqueous solution of sodium ascorbate (76  $\mu\text{L}$ , 3.8  $\mu\text{mol}$ , 0.05 M). The reaction was stirred at 50°C for 4h under dark conditions then the reaction was quenched with 100  $\mu\text{L}$  of 0.5 M EDTA aqueous solution. The crude product was desalted on NAP 25 then purified on RP-HPLC (gradient II) and freeze-dried (12 nmol, yield: 20% over two steps,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 194\ 994\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). ESI-MS(-):  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{307}\text{H}_{385}\text{IrN}_{90}\text{O}_{143}\text{P}_{19}\text{S}$ : 8436.72,  $m/z$  found: 8442.13  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

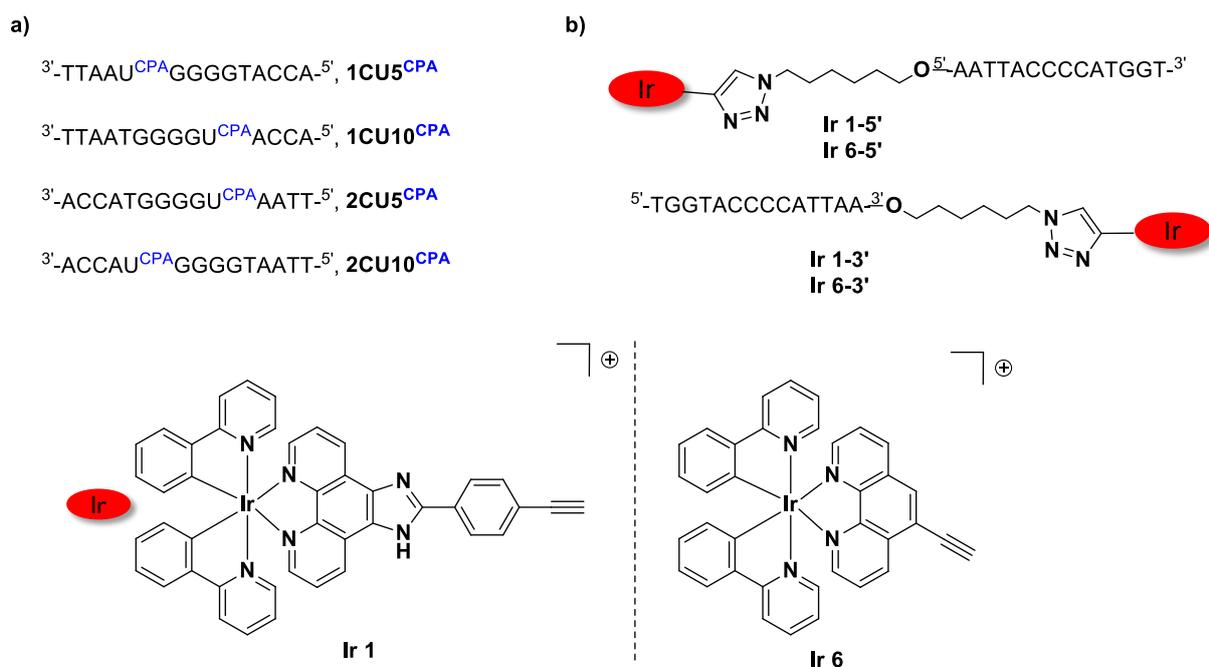
## **Chapitre 5 : Etudes des transferts de charges**

## 5.1. Transferts de charges au sein de l'ADN duplexe

La préparation des différents systèmes d'ADN duplexes a été décrite dans le chapitre précédent. Nous allons nous focaliser sur les études de transferts de charges au sein de l'ADN dans ce chapitre. Ce sous-chapitre est divisé en deux parties : (i) une description des différents systèmes de duplexe d'ADN et (ii) les études de transferts de charges au sein de l'ADN duplexe.

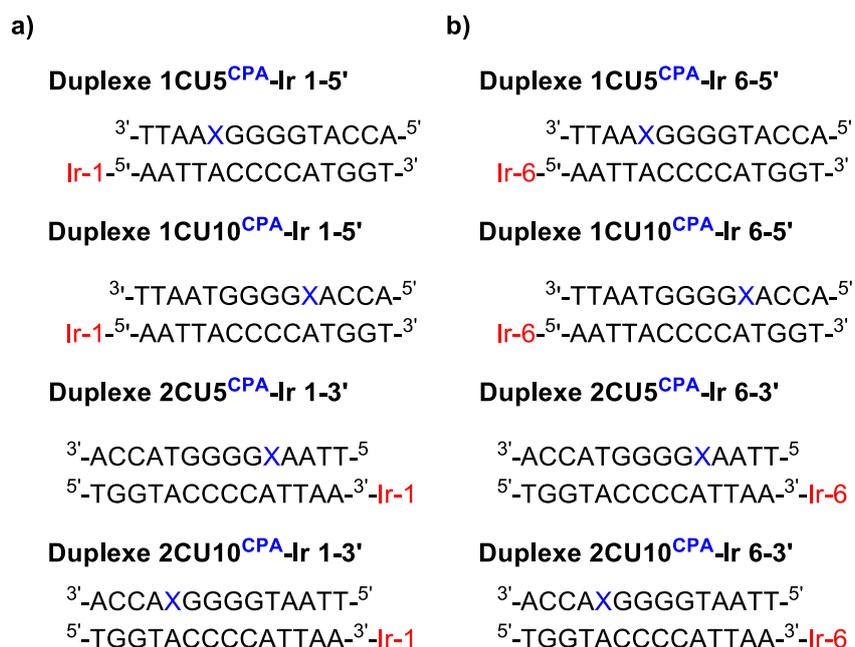
### 5.1.1. Description des différents systèmes d'ADN duplexes

Comme mentionné dans le chapitre précédent, quatre brins d'oligonucléotides porteurs de la sonde dU<sup>CPA</sup> ont été synthétisés (**Figure 5.1 a**) ainsi que les quatre d'oligonucléotides complémentaires porteurs des deux complexes d'iridium **Ir 1** et **Ir 6**<sup>135</sup> sur l'extrémité 3' ou l'extrémité 5' (**Figure 5.1 b**).



**Figure 5.1 :** Représentation a) des quatre oligonucléotides porteurs de la sonde dU<sup>CPA</sup>, b) des quatre oligonucléotides porteur de l'injecteur de charge **Ir 1** ou **Ir 6**.

A partir de ces huit différents oligonucléotides différents, nous pouvons constituer huit systèmes duplexes distincts en fonction de l'injecteur de charge, de la position du complexe d'iridium et de la position de la sonde. La **Figure 5.2 a** présente les différents systèmes d'ADN duplexes constitués en présence de l'oligonucléotide porteur du complexe **Ir 1** tandis que les systèmes duplexes contenant le complexe **Ir 6** sont illustrés dans la **Figure 5.2 b**, avec X représentant dU<sup>CPA</sup>.



**Figure 5.2** : Séquences des différents systèmes de duplexe d'ADN en fonction des complexes incorporés a) Ir 1 et b) Ir 6, avec X = dU<sup>CPA</sup>.

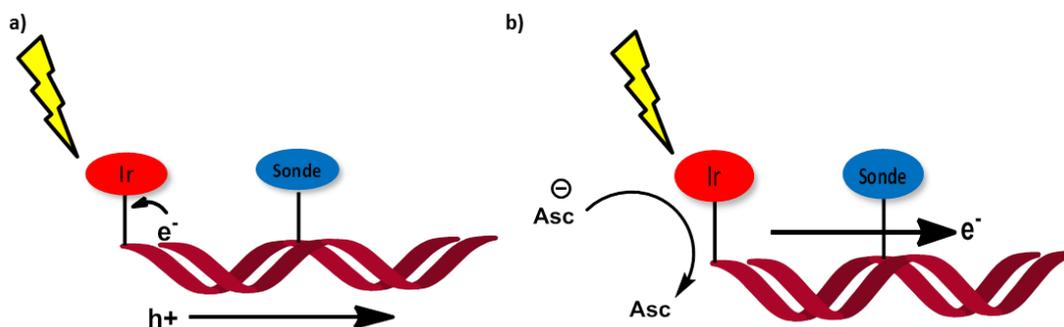
De ce fait, nous pouvons étudier différents paramètres influençant l'efficacité de transferts de charges au sein de l'ADN duplexe :

- L'influence de l'injecteur de charge : comme mentionné dans l'introduction, les complexes d'iridium (III) possèdent des propriétés photophysiques modulables en fonction des ligands présents autour du centre métallique. Ainsi, nous pouvons comparer les différences d'efficacité de transferts de charges entre les deux complexes Ir 1 et Ir 6, partageant les mêmes séquences.
- L'influence de la directionnalité du transfert de charges : le complexe d'iridium est positionné à l'extrémité 5' dans le cas des séquences 1CU5<sup>CPA</sup> et 1CU10<sup>CPA</sup> tandis que pour les séquences 2CU5<sup>CPA</sup> et 2CU10<sup>CPA</sup>, l'injecteur de charge est à l'extrémité 3'. Nous pouvons alors étudier l'influence de la directionnalité du transfert de charges selon la position du complexe sur le simple brin d'ADN qui le porte. En effet, lorsque le complexe est situé à l'extrémité 5', la charge se déplace du sens 5' vers 3'. Alors que si l'injecteur de charge est à l'extrémité 3', la charge migre du sens 3' vers 5'. Nous pouvons de ce fait comparer la différence d'efficacité du transfert de charges du sens 5' vers 3' *versus* 3' vers 5'.
- L'impact de la présence d'un empilement de guanine entre l'injecteur et l'accepteur de charge. Comme la 2'-désoxyguanosine est la base la plus facilement oxydable, il est prévisible que l'efficacité du transfert de charge positive sera atténuée si la sonde se situe après l'empilement de 2'-désoxyguanosine. La sonde se trouve avant l'empilement de guanines pour les séquences 1CU5<sup>CPA</sup> et 2CU5<sup>CPA</sup> alors que pour les séquences 1CU10<sup>CPA</sup> et 2CU10<sup>CPA</sup>, la sonde est située après l'empilement de guanines.
- L'influence du type de charge transféré : les complexes d'iridium (III) sont capables d'induire à la fois le transfert d'une charge négative et le transfert d'une charge positive (cf.

introduction). Ainsi, à partir du même système de duplexe, nous pouvons comparer l'efficacité de ces deux types de charges en changeant les conditions expérimentales.

### 5.1.2. Etudes de transferts de charges

Comme mentionné précédemment, les complexes d'iridium (III) sont capables d'induire un transfert de charge négative ou positive, selon les conditions expérimentales. Dans le cas du transfert de charge positive, sous irradiation, le complexe d'iridium photo-oxyde la base la plus proche, créant ainsi une charge positive sur cette dernière. Cette charge positive migre alors le long de l'ADN jusqu'à se faire piéger par la sonde (**Figure 5.3 a**). Dans le cas du transfert d'électron, de l'ascorbate de sodium est ajouté dans le milieu. Sous irradiation, le complexe d'iridium photo-oxyde l'ascorbate de sodium en large excès dans le milieu et devient mono réduit. Le complexe possède alors un électron excédentaire qui peut se déplacer le long de l'ADN et se faire piéger par la sonde (**Figure 5.3 b**).<sup>78</sup> Comme mentionné dans les chapitres précédents, nous allons incorporer la nouvelle sonde développée (dU<sup>CPA</sup>) au sein des systèmes duplexes afin de prouver que cette dernière est tout aussi capable de détecter le transfert de charges positives que le transfert de charges négatives.



**Figure 5.3 :** Représentation schématique du transfert a) de charge positive, b) d'électron.

La préparation des duplexes d'ADN ainsi que le protocole d'irradiation sont réalisés selon les méthodes décrites dans la littérature.<sup>77</sup> Avant de procéder aux expériences de transferts de charges, il nous faut tout d'abord apparier les deux brins d'oligonucléotides. Pour cela, une solution équimolaire des deux brins complémentaires (100  $\mu$ L, 10  $\mu$ M dans 50 mM Tris HCl, à pH 7.0) est chauffée à 90°C pendant 5 min puis la solution est refroidie à température ambiante sur 3 h. Ensuite cette solution est irradiée pendant 60 minutes à 365 nm (« Black Light Blue Bulb tube lamp », UVA, 8 W). 30  $\mu$ L de cette solution est prélevé aux temps t=0, t=30 min et t=60 min. Une digestion enzymatique en présence de phosphodiesterase I et phosphatase alcaline est réalisée à 37°C pendant une nuit. Pour finir, une analyse par HPLC analytique en phase inverse permet de différencier les différents 2'-désoxynucléosides présents ainsi que de quantifier le pourcentage de décomposition de la sonde (Y). Ce dernier est déterminé par l'équation suivante :

$$Y = 1 - \frac{A_{irr}}{A_{non\ irr}}$$

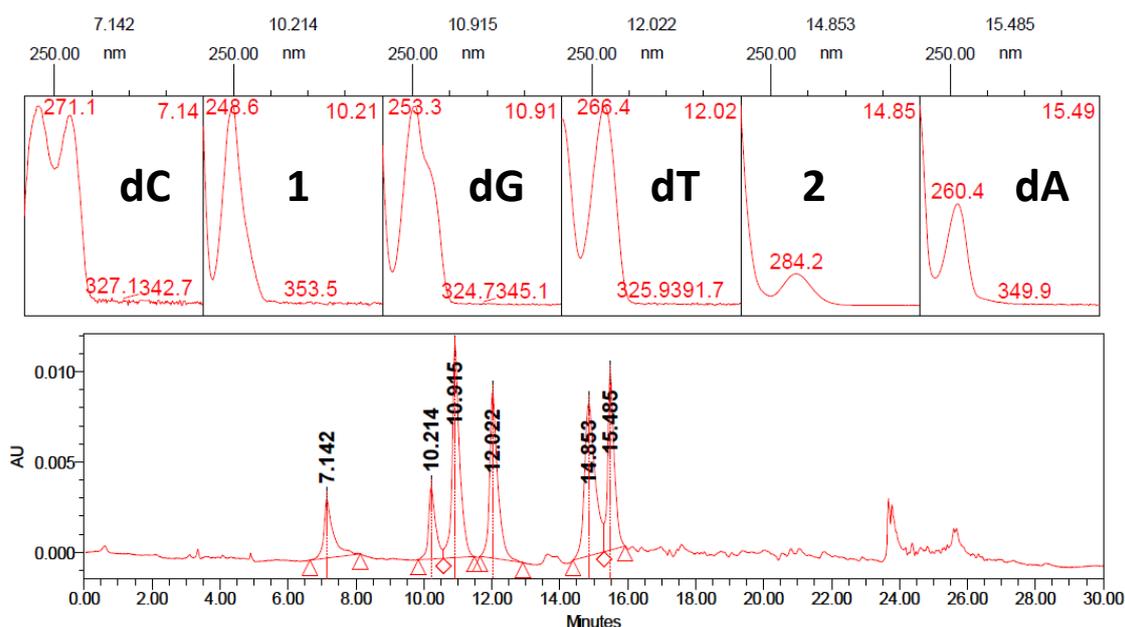
**Equation 5.1**

Avec  $A_{irr}$  et  $A_{non\ irr}$  les aires des pics de la sonde des échantillons irradiés et non irradiés respectivement. Pour chaque échantillon, l'aire du pic de la sonde est normalisée par rapport à l'aire du pic de la 2'-désoxythymidine (servant d'étalon interne) afin de corriger les différences de volume

des échantillons, causées par les fluctuations lors de l'injection des échantillons durant l'analyse HPLC. Les expériences sont reproduites trois fois et les résultats moyennés.

Des expériences de transferts de charges (positives et négatives) sur les quatre duplexes présentés précédemment, en présence des complexes **Ir 1** et **Ir 6**, ont été réalisées en triplicata. Une digestion enzymatique ainsi qu'une analyse RP-HPLC ont été réalisées pour chaque expérience aux temps : t=0, t=30 min et t=60 min.

Cependant, au travers des analyses RP-HPLC des expériences de transferts de charges (après hydrolyse enzymatique des échantillons irradiés), nous nous sommes rendu compte que l'usure de la colonne a rendu les analyses HPLC inexploitables. En effet, la **Figure 5.4** illustre un cas pour lequel les pics s'élargissent et ne sont plus bien séparés et définis. De plus, le pic de la sonde n'est même plus séparé des autres pics. L'état de la colonne HPLC est donc primordial afin d'obtenir des analyses exploitables.



**Figure 5.4** : Exemple de chromatogramme inexploitable, avec 1 un sous-produit de dégradation et 2 un pic issu des enzymes de restriction.

La dégradation de la colonne HPLC n'a malheureusement pas permis d'exploiter correctement des résultats des expériences de transferts de charges pour les huit duplexes décrits précédemment. Les expériences de transferts de charges sur duplexe se sont donc arrêtées à ce stade et n'ont donc pas permis de valider l'utilisation de la nouvelle sonde dU<sup>CPA</sup> 2.

## 5.2. Etudes des transferts de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe

Le détail de la préparation de l'édifice **B4** est décrit dans le chapitre précédent. Ce sous-chapitre se divise en trois parties traitant de : (i) la description des différentes structures G-quadruplexes formées, (ii) la détermination du temps de rétentions des 2'-désoxynucléosides constituant l'oligonucléotide porteur de la sonde dG<sup>CPA</sup>,<sup>81</sup> (iii) les expériences de transferts de charges positives au sein de l'ADN G-quadruplexe de topologie parallèle.

### 5.2.1. Description des différents systèmes G-quadruplexes

Une fois l'édifice **B4** porteur du complexe **Ir 1** préparé, il reste une dernière étape afin de former le G-quadruplexe : l'ajout du dernier brin d'oligonucléotide dans le milieu dans des conditions structurantes. Pour vérifier que l'ajout du quatrième brin permet bien la formation d'un G-quadruplexe à topologie contrôlée, nous allons dans un premier temps utiliser l'édifice intermédiaire **B2** (Figure 5.5 a) purifié que nous allons mettre en présence de l'oligonucléotide **18** (Figure 5.5 b) dans des conditions structurantes afin de former la structure G-quadruplexe.

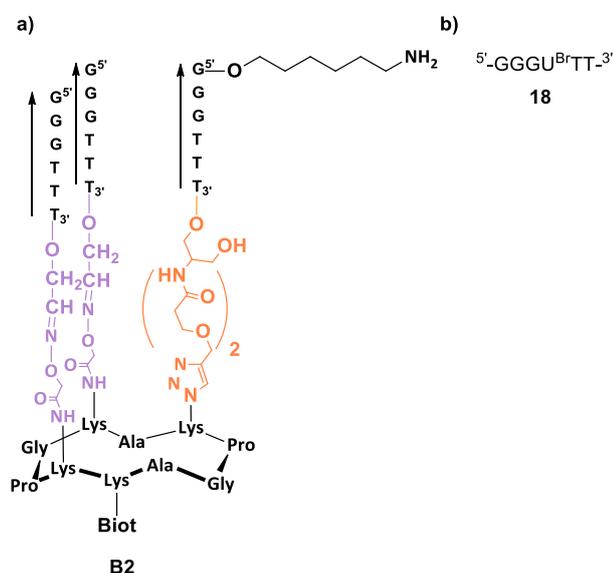
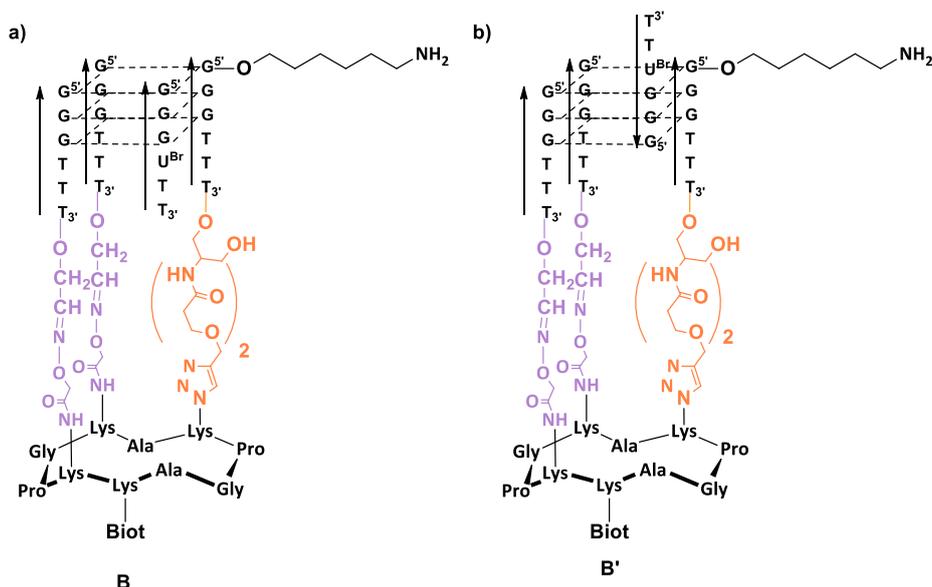


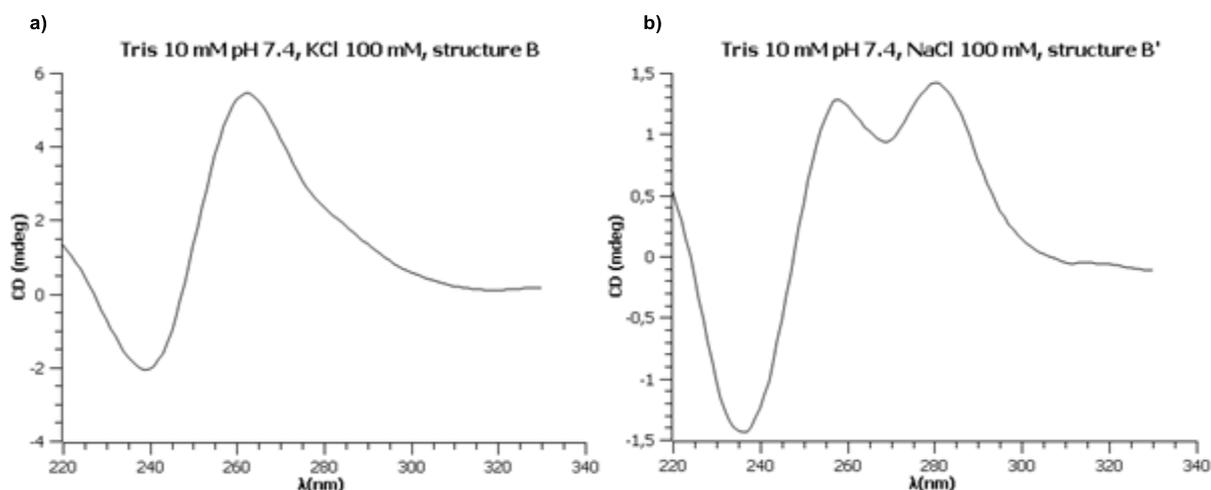
Figure 5.5 : Structure de a) l'intermédiaire **B2** et b) de l'oligonucléotide **18**.

Pour confirmer la formation de la structure G-quadruplexe et vérifier la topologie du G-quadruplexe formé, la technique du dichroïsme circulaire (CD) est utilisée. En effet, les signaux de dichroïsme circulaire permettent d'identifier la topologie adoptée par le G-quadruplexe.<sup>35,36</sup> De ce fait, une solution équimolaire de l'édifice **B2** et de l'oligonucléotide **18** est préparée dans le tampon Tris HCl 10 mM pH 7.4. Afin de vérifier que la structure G-quadruplexe formée peut adopter la topologie parallèle (Figure 5.6 a) et la topologie hybride (Figure 5.6 b) dans des conditions structurantes, deux mesures CD ont été réalisées soit en présence du chlorure de potassium 100 mM soit en présence de chlorure de sodium 100 mM. La préparation des structures G-quadruplexes est décrite dans la partie expérimentale.



**Figure 5.6 :** Structure de l'édifice sous la forme a) parallèle **B** et b) hybride **B'**.

Comme illustré dans la **Figure 5.6**, la topologie du G-quadruplexe est fonction du cation présent dans le milieu. Dans le premier cas, l'édifice **B2** et l'oligonucléotide **18** sont solubilisés dans le tampon Tris HCl 10 mM à pH 7.4, en présence de 100 mM de KCl. En analysant le spectre CD obtenu, nous constatons la présence de deux extrema : un minimum à 240 nm et un maximum à 260 nm (**Figure 5.7 a**) caractéristiques d'une topologie parallèle adoptée par un G-quadruplexe. Tandis que pour le cas où l'édifice **B2** et l'oligonucléotide **18** sont solubilisés dans le tampon Tris HCl 10 mM à pH 7.4 en présence de 100 mM de NaCl, nous observons trois extrema sur le spectre CD correspondant (**Figure 5.7 b**) avec un minimum vers 240 nm et deux maxima vers 260 et 280 nm. Ces extrema sont caractéristiques de la topologie hybride adoptée par un G-quadruplexe.

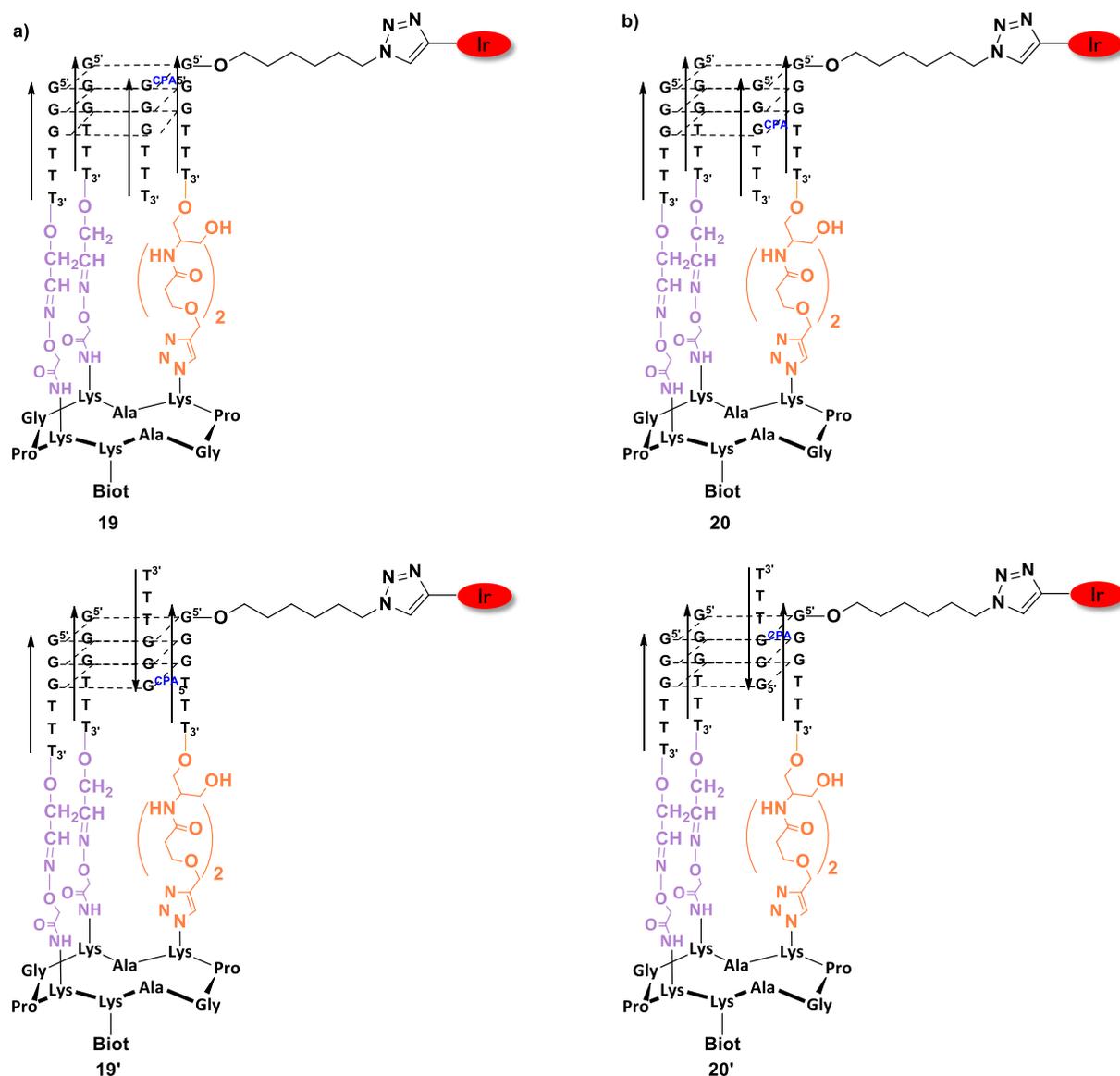


**Figure 5.7 :** Spectres CD à 20°C de l'édifice **B2** en présence de l'oligonucléotide **18** dans des proportions équimolaires dans le tampon Tris HCl 10 mM à pH 7.4 en présence de a) 100 mM de KCl formant la structure **B** et b) en présence de 100 mM de NaCl formant la structure **B'**.

Nous avons ainsi prouvé par expériences CD que (i) le G-quadruplexe est bien formé par ajout du quatrième brin dans les conditions structurantes et que (ii) la topologie du G-quadruplexe formée varie en fonction du cation présent dans le milieu ( $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ ).

Nous pouvons alors préparer différents systèmes G-quadruplexes porteurs du complexe **Ir 1** en fonction de la position de la sonde dG<sup>CPA</sup> présente sur le quatrième brin d'oligonucléotide et du cation présent dans le milieu. Comme mentionné dans le chapitre précédent, nous allons dans un premier temps utiliser la sonde dG<sup>CPA</sup> déjà utilisée pour les études de transferts de charges positives au sein de l'ADN duplexe.<sup>81,94</sup>

La figure 5.8 présente les quatre systèmes G-quadruplexe que nous pouvons former en fonction de l'oligonucléotide porteur de la sonde dG<sup>CPA</sup> et des conditions salines : a) formé à partir de l'oligonucléotide **16** avec une topologie parallèle **19** et une topologie hybride **19'**, b) formé à partir de l'oligonucléotide **17** avec une topologie parallèle **20** et une topologie hybride **20'**.



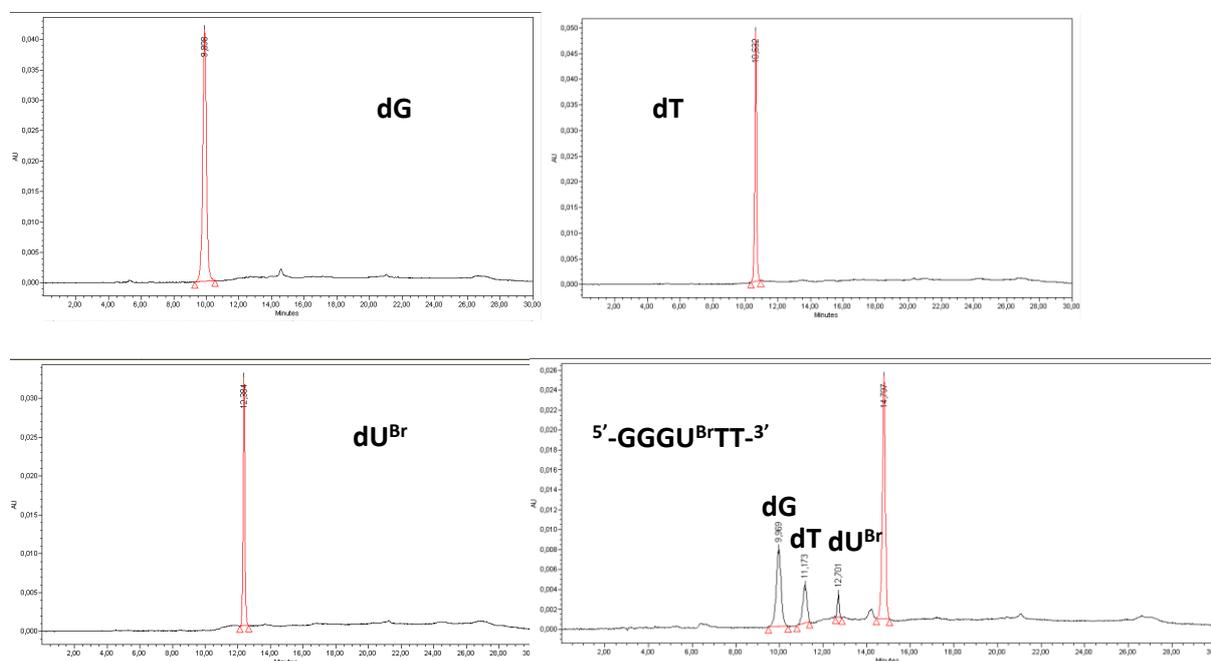
**Figure 5.8 :** Structures des G-quadruplexes porteurs du complexe **Ir 1** formés à partir des oligonucléotides porteurs de la sonde a) avec **ODN 16**, topologie parallèle **19**, hybride **19'**, b) avec **ODN 17**, topologie parallèle **20**, hybride **20'**.

A partir de ces quatre systèmes G-quadruplexes, nous pouvons étudier différents paramètres qui peuvent influencer l'efficacité de transferts de charges : l'effet de la distance entre l'injecteur et l'accepteur de charge ainsi que de la directionnalité de transferts de charges.

## 5.2.2. Détermination du temps de rétention des 2'-désoxynucléosides

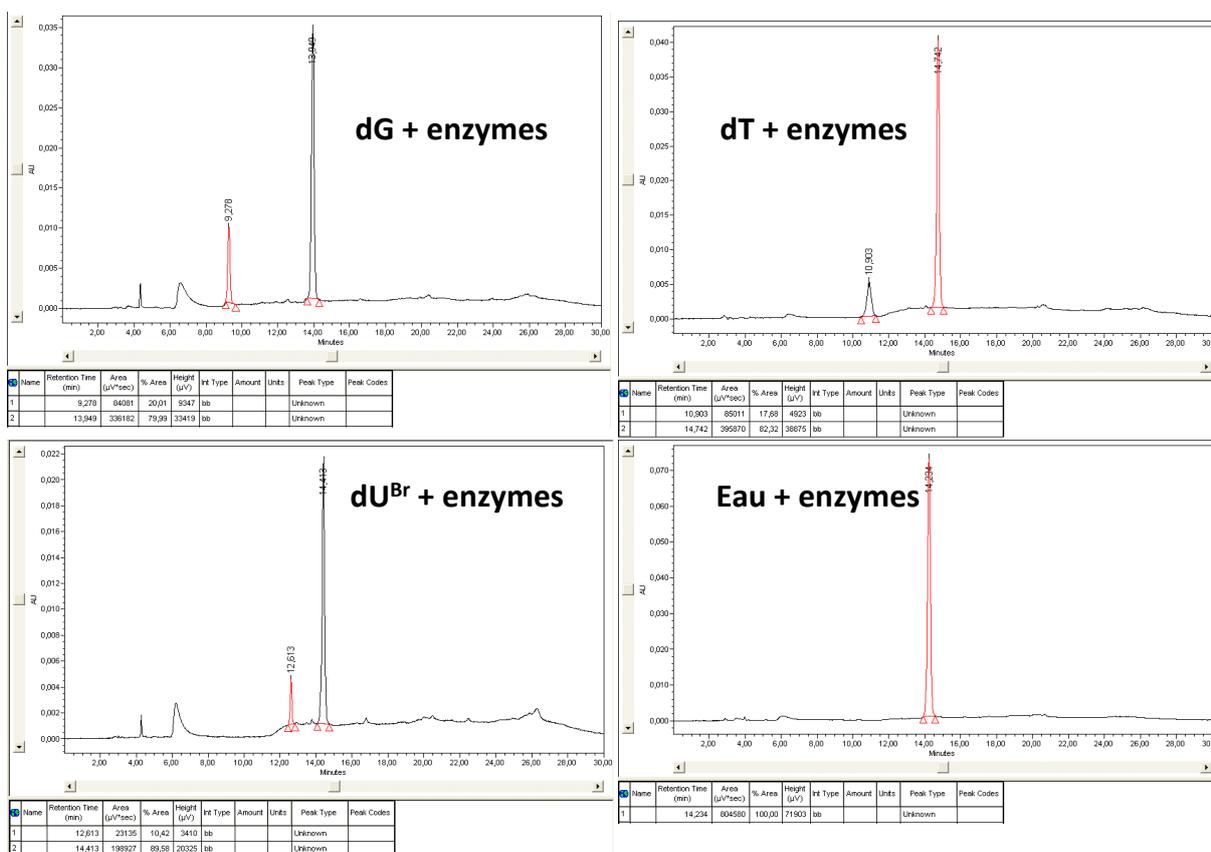
Comme mentionné auparavant, l'état de la colonne chromatographique est très important pour l'obtention de données exploitables. Il est à noter que les analyses RP-HPLC obtenues pour les études sur la partie duplexe ont été réalisées à Louvain-la-Neuve. De retour à Grenoble, il a fallu déterminer à nouveau le temps de rétention des 2'-désoxynucléosides formant la séquence d'oligonucléotide porteur de la sonde dG<sup>CPA</sup> (oligonucléotides **16** et **17**, voir chapitre 4, **Schéma 4.19**, p.118), l'équipement étant différent.

Après hydrolyse enzymatique de ces deux brins d'oligonucléotide, nous nous attendons à trois pics correspondant à dT, dG ainsi qu'au pic de la sonde dG<sup>CPA</sup>. Mais avant de procéder à la digestion enzymatique des oligonucléotides portant la sonde dG<sup>CPA</sup>, nous avons dans un premier temps injecté les deux 2'-désoxynucléosides naturels (dG et dT) ainsi que la 5-bromo-2'-désoxyuridine (dU<sup>Br</sup>), solubilisés dans l'eau, afin de déterminer les temps de rétentions respectifs de ces 2'-désoxynucléosides. Nous avons par la suite procédé à l'hydrolyse enzymatique du brin **18** ainsi que l'analyse RP-HPLC de ce mélange digéré, afin de vérifier la concordance des temps de rétention (**Figure 5.9**).



**Figure 5.9** : Chromatogramme de dG, dT, dU<sup>Br</sup> ainsi que celui de l'oligonucléotide **18** digéré.

Dans l'eau, le pic de la 2'-désoxyguanosine apparaît à 9.9 min, celui de dT à 10.6 min et celui de dU<sup>Br</sup> à 12.4 min. Nous observons bien la présence de ces trois pics dans le mélange de digestion de **18** : dG à 10.0 min, dT à 11.2 min et dU<sup>Br</sup> à 12.7 min. Cependant, nous constatons également l'apparition d'un quatrième pic à 14.8 min. Nous soupçonnons que ce pic provient des enzymes de digestion. Pour vérifier cela, nous avons mis les différents 2'-désoxynucléosides dans les conditions d'hydrolyse enzymatique, puis nous les avons analysés par RP-HPLC (**Figure 5.10**).



**Figure 5.10** : Chromatogramme des différents 2'-nucléosides ainsi que de l'eau dans les conditions d'hydrolyse enzymatique.

A travers ces analyses RP-HPLC, nous constatons bien l'apparition d'un pic supplémentaire après l'ajout des enzymes de digestion. Le pic supplémentaire apparaît à 13.9 min dans l'échantillon contenant la 2'-désoxyguanosine, à 14.7 min dans l'échantillon contenant la 2'-désoxythymidine et à 14.4 min dans le mélange contenant la 5-bromo-2'-désoxyuridine. De plus, dans le but de confirmer de façon non équivoque que ce pic supplémentaire est bien issu des enzymes de digestion, nous avons injecté une solution ne contenant que de l'eau dans les conditions de d'hydrolyse enzymatique. Nous constatons bien la présence d'un pic unique à 14.2 min, confirmant ainsi que ce pic provient des enzymes de digestion.

L'étape suivante consiste à réaliser une hydrolyse enzymatique de l'oligonucléotide **16** afin de déterminer le temps de rétention de la sonde dG<sup>CPA</sup> (**Figure 5.11**). En effet, puisque la sonde dG<sup>CPA</sup> est introduite par « post-fonctionnalisation » à partir du nucléoside modifié 2-fluoro-2'-désoxyinosine, nous ne pouvons obtenir le temps de rétention de dG<sup>CPA</sup> que par digestion enzymatique de l'oligonucléotide qui porte cette dernière.

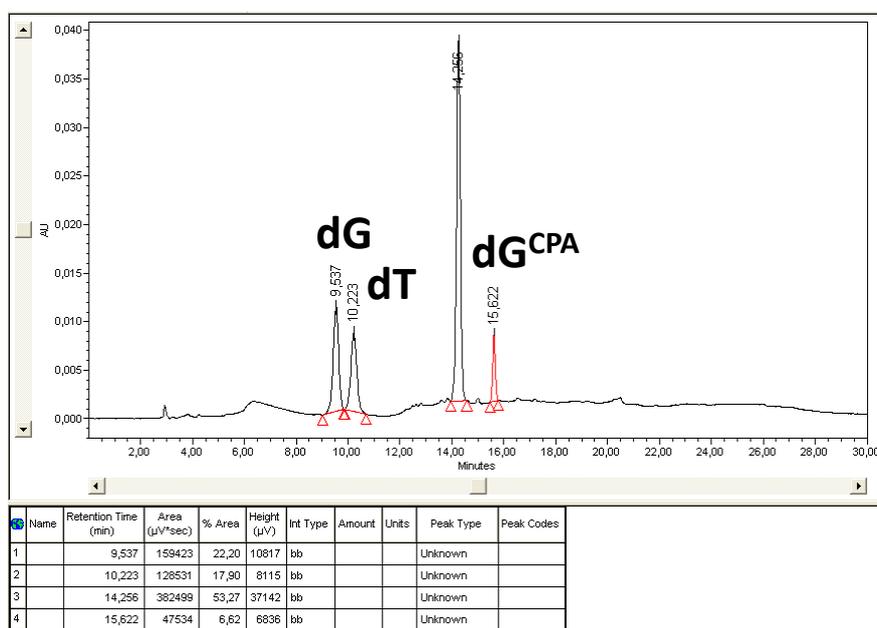


Figure 5.11 : Chromatogramme RP-HPLC de l'oligonucléotide 16 digéré.

Comme attendu, le pic de la 2'-désoxyguanosine apparaît à 9.5 min, le pic de la 2'-désoxythymidine apparaît à 10.2 min, le pic lié aux enzymes de digestion à 14.2 min et finalement le pic de la sonde dG<sup>CPA</sup> apparaît à 15.6 min. Ces résultats sont aussi confirmés par une analyse UPLC-MS (Figure 5.12).

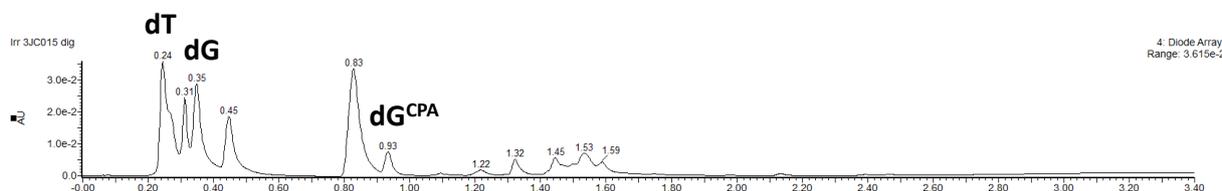
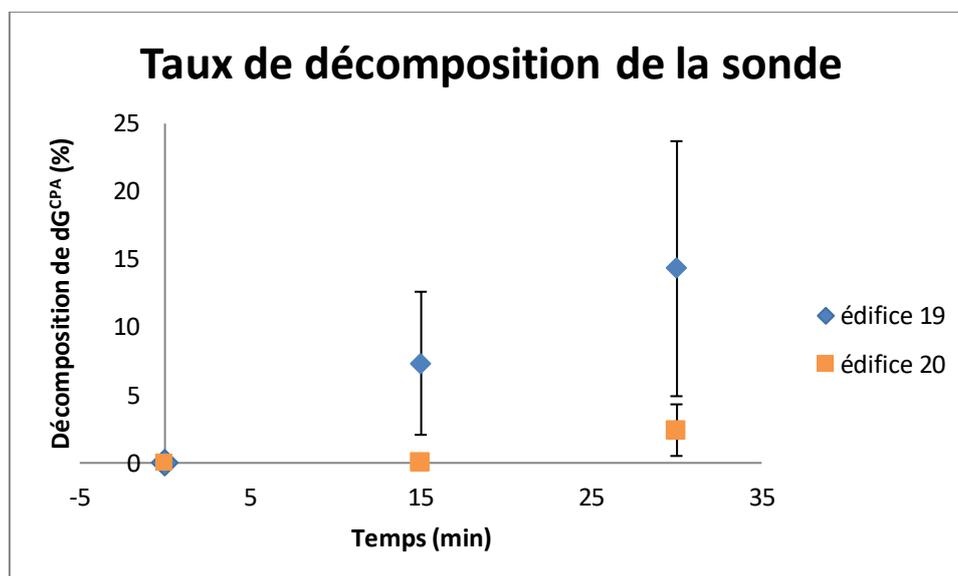


Figure 5.12 : Chromatogramme UPLC-MS du mélange de digestion.

### 5.2.3. Etudes de transferts de charges positives

La structuration de l'édifice G-quadruplexe ainsi que le protocole d'irradiation et d'immobilisation du peptide sur support magnétique de streptavidine sont décrits dans la partie expérimentale.

Nous avons réalisé des expériences de transferts de charges positives en utilisant les structures G-quadruplexes **19** (formées à partir de l'édifice **B4** et l'oligonucléotide **16**, Figure 5.8 a haut) et **20** (formées à partir de l'édifice **B4** et l'oligonucléotide **17**, Figure 5.8 b haut). Le Graphe 5.1 illustre des taux de décomposition de la sonde dG<sup>CPA</sup> en fonction du temps d'irradiation et de l'oligonucléotide.



**Grphe 5.1** : Décomposition de la sonde  $dG^{CPA}$  en fonction du temps avec en bleu représentant l'édifice **19** et en orange représentant l'édifice **20**.

Il est à noter que seul le transfert de charges positives a été étudié, en effet, la sonde  $dG^{CPA}$  est une sonde utilisée pour détecter le transfert de charges positives. De plus, nous avons décidé que les premiers essais de transferts de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe sont réalisés sur des systèmes de topologie parallèle.

Nous observons ainsi deux tendances : lorsque la sonde est proche de l'injecteur de charge, c'est-à-dire à l'extrémité 5' (édifice G4 **19**), le taux de décomposition à 30 min atteint environ 14%. Tandis que dans le cas où la sonde est éloignée de l'injecteur de charge (édifice G4 **20**), c'est-à-dire après l'empilement des 2'-désoxyguanosines et vers l'extrémité 3', le taux de décomposition à 30 min est aux alentours de 2%.

Au vu de ces résultats préliminaires en présence de la sonde  $dG^{CPA}$ , l'efficacité de transferts de charges au sein d'un G-quadruplexe de topologie parallèle dépend de la distance entre l'injecteur et l'accepteur de charge.

Il est à noter par ailleurs que lorsque nous procédons directement à l'hydrolyse enzymatique des structures **19** ou **20** après irradiation, sans effectuer l'étape d'immobilisation du peptide biotinylé sur support magnétique, nous observons des résultats similaires par rapport à ceux obtenus après immobilisation sur support magnétique. Ceci nous laisse penser que l'hydrolyse enzymatique est tout à fait possible en présence du châssis peptidique. Ainsi nous pouvons nous affranchir de l'étape d'immobilisation sur support magnétique de streptavidine.

## 5.3. Conclusions et perspectives

### 5.3.1. Conclusion sur la partie ADN duplexe

L'appariement des quatre oligonucléotides portant la sonde sur des positions différentes avec le brin complémentaire portant les complexes **Ir 1** ou **Ir 6** sur deux positions de l'oligonucléotide nous permet de former huit systèmes de duplexe d'ADN distincts (**Figure 5.2**). A partir de ces différents systèmes d'ADN duplexe, des expériences de transferts de charges positives et négatives

ont été réalisées en triplicata. Les échantillons ont été irradiés pendant 60 minutes et des prélèvements de la solution ont été réalisés aux temps t=0, t=30 min et t=60 min. L'hydrolyse enzymatique de ces aliquotes suivis de l'analyse HPLC en phase inverse nous permet de déterminer le taux de décomposition de la sonde. Cependant, la dégradation de la colonne HPLC n'a pas permis l'exploitation correcte de ces résultats. Les expériences de transferts de charges sur duplexe se sont donc malheureusement arrêtées à ce stade, faute de temps.

Il est à préciser que durant la rédaction du manuscrit de thèse, des expériences préliminaires de transferts de charges positives au sein des systèmes duplexes ont été réalisées en utilisant le complexe **Ir 6** comme injecteur de charges. Les résultats préliminaires pour les systèmes **1CU5<sup>CPA</sup>-Ir 6-5'**, **1CU10<sup>CPA</sup>-Ir 6-5'**, **2CU5<sup>CPA</sup>-Ir 6-3'**, **2CU10<sup>CPA</sup>-Ir 6-3'** sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 5.1**).

Entrée	Système duplexes	Décomposition de la sonde dU <sup>CPA</sup> (%)	
		t=30 min	t=60 min
1	<b>1CU5<sup>CPA</sup>-Ir 6-5'</b>	24	26
2	<b>1CU10<sup>CPA</sup>-Ir 6-5'</b>	4	6
3	<b>2CU5<sup>CPA</sup>-Ir 6-3'</b>	0	0
4	<b>2CU10<sup>CPA</sup>-Ir 6-3'</b>	0	0

**Tableau 5.1** : Taux de décomposition de la sonde dU<sup>CPA</sup> (%) selon le système de duplexe par transferts de charges positives.

Nous remarquons que la sonde dU<sup>CPA</sup> se décompose par un transfert de charges positives. Les résultats suggèrent que l'empilement de guanines entre l'injecteur et l'accepteur de charges atténue nettement l'efficacité de transferts de charges (entrée 1 : sonde avant l'empilement de guanines et entrée 2 : sonde après l'empilement de guanines) et que la directionnalité du transfert de charges influence aussi drastiquement l'efficacité de transferts de charges (entrée 1 : direction 5' vers 3' favorisée et entrée 3 : direction 3' vers 5' : pas de transferts de charges observées). Ces résultats concordent avec les données de la littérature,<sup>143,144</sup> prouvant que la nouvelle sonde dU<sup>CPA</sup> développée est bien capable de détecter le transfert de charges positives. Cependant, nous devons encore réitérer ces expériences afin de confirmer ces résultats. De plus, il nous reste à étudier la capacité de cette sonde à détecter le transfert de charges négatives ainsi qu'étudier les transferts de charges positives et négatives en utilisant le complexe **Ir 1** comme injecteur de charges.

### 5.3.2. Conclusion sur la partie G-quadruplexe

En ce qui concerne la partie G-quadruplexe, nous avons dans un premier temps prouvé par CD que l'édifice **B4** en présence du quatrième brin d'oligonucléotide dans des conditions structurantes, peut générer un G-quadruplexe à topologie contrôlée selon le cation présent dans le milieu. Ceci nous permet alors de former quatre systèmes de G-quadruplexe en fonction de la position de la sonde et de la topologie adoptée par le G-quadruplexe (**Figure 5.8**).

Dans un second temps, nous avons effectué les premières expériences de transferts de charges positives au sein des structures G-quadruplexe de topologie parallèle **19** et **20**.

Nous avons observé deux tendances : lorsque la sonde  $dG^{CPA}$  est proche du complexe d'iridium (III), le taux de décomposition à 30 minutes avoisine les 14% alors que dans le cas où la sonde est éloignée de l'injecteur de charge, le taux de décomposition à 30 minutes est aux alentours de 2%. Cette proximité peut être expliquée par le bras flexible qui porte le complexe d'iridium (III) (*i.e.* la chaîne carbonée portant six carbones), permettant au complexe d'iridium (III) de s'approcher du G4 par empilement  $\pi$ . Cette interaction entre le G4 et le complexe d'iridium (III) est rendue possible par le ligand PIP qui interagit avec les tétrades de guanines par «  $\pi$ -stacking ». <sup>117,145</sup> Nos résultats de transferts de charges au sein de l'ADN G4 semblent concorder avec ceux de la littérature, <sup>95</sup> cependant notre étude est la première qui s'intéresse aux phénomènes de transferts de charges au sein d'un G4 de topologie parallèle et présentant l'injecteur de charge et l'accepteur de charge sur deux brins distincts de l'édifice G-quadruplexe. Il nous faut donc approfondir notre étude avant de pouvoir tirer des conclusions définitives. Nos résultats nous laissent penser que la distance joue un rôle important sur l'efficacité de transferts de charges au sein de G-quadruplexe de topologie parallèle.

### 5.3.3. Perspectives

En ce qui concerne les expériences de transferts de charges au sein de l'ADN duplexe, il nous faut confirmer la capacité de la nouvelle sonde  $dU^{CPA}$  à détecter le transfert de charges. Pour cela, les oligonucléotides  $1CU5^{CPA}$ ,  $1CU10^{CPA}$ ,  $2CU5^{CPA}$  et  $2CU10^{CPA}$  doivent être préparés de nouveau. Pour ensuite former les systèmes d'ADN duplexe représentés dans la **Figure 5.2** avant d'entamer les études de transferts de charges. Les expériences de transferts de charges seront réalisées cette fois-ci à Grenoble. Bien que les expériences préliminaires nous aient permis de confirmer que la sonde est capable de détecter le transfert de charges positives, il nous reste à prouver qu'elle est également capable de détecter le transfert de charges négatives. Nous avons également la possibilité de comparer l'efficacité de transferts de charges entre les deux complexes **Ir 1** et **Ir 6**.

Concernant les études de transferts de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe, nous pouvons pour la première fois étudier l'efficacité de transfert de charges au sein des édifices de topologie hybride contrainte **19'** et **20'**. Cela nous permettra de comparer la différence d'efficacité de transfert de charges des structures de topologie parallèle *versus* hybride, étude qui n'a jamais été encore entreprise auparavant mais rendue possible par l'utilisation du châssis peptidique. De plus, une fois que la sonde  $dU^{CPA}$  aura montré son aptitude à servir en tant qu'accepteur de charge, nous pourrons alors l'incorporer au sein de la structure G-quadruplexe. Ceci nous permettra de comparer l'efficacité de transfert de charges entre les deux sondes  $dG^{CPA}$  et  $dU^{CPA}$  en fonction des deux topologies. Par ailleurs, nous avons eu la confirmation que l'étape d'immobilisation sur support magnétique de streptavidine n'est pas nécessaire, nous pouvons de ce fait initier l'étape d'hydrolyse enzymatique des oligonucléotides sans passer par la phase d'immobilisation sur support magnétique de streptavidine.

## 5.4. Section expérimentale

### 5.4.1. DNA duplex irradiation experiment

Ir–DNA conjugates were prepared by combining equimolar amounts of the desired DNA single strands. Annealing was performed by heating the solution (100  $\mu$ L, 10  $\mu$ M in 50 mM Tris HCl, pH 7.0) to 90°C for 5 min, then slowly cooled down to room temperature over a period of 3 h.

The Ir–DNA conjugates solution (100  $\mu$ L, 10  $\mu$ M in 50 mM Tris HCl, pH 7.0) was irradiated for 60 min at 365 nm (Black Light Blue Bulb tube lamp, UVA, 8 W). Aliquots of 30  $\mu$ L were isolated at t=0, t=30 min and t=60 min. Subsequent cleavage into 2'-deoxynucleosides upon digestion with phosphodiesterase I and alkaline phosphatase was carried out at 37°C overnight and the results analyzed by RP-HPLC. The decomposition yield (Y) of the bases was calculated from **Equation 5.1**:

$$Y = 1 - \frac{A_{irr}}{A_{non\ irr}}$$

**Equation 5.1**

Where  $A_{irr}$  and  $A_{non\ irr}$  are the peaks areas of nucleobases in the irradiated and non-irradiated sample, respectively. In each sample, the peak area of the probe was normalized to that of deoxythymidine (internal standard) to correct for differences in sample amount due to the fluctuations in sample injection to HPLC. The results are averages from at least three repeats.

### 5.4.2. Circular dichroism experiment

Prior to the circular dichroism experiment, G-quadruplex conjugates were prepared by combining equimolar amount of the peptide scaffold **B2** and oligonucleotide **18**. Structuration was performed by heating the solution (100  $\mu$ L, 10  $\mu$ M in 50 mM Tris HCl, pH 7.0, 100 mM KCl or 100 mM NaCl) to 90°C for 5 min, then slowly cooled down to room temperature over a period of 3 h.

### 5.4.3. DNA G-quadruplex irradiation experiment

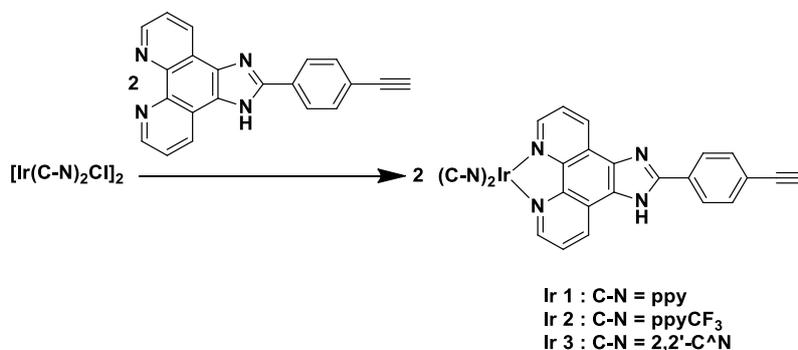
G-quadruplex conjugates were prepared by combining equimolar amount of the peptide scaffold **B4** and the probe containing strand. Structuration was performed by heating the solution (100  $\mu$ L, 10  $\mu$ M in 50 mM Tris HCl, pH 7.0, 100 mM KCl) to 90°C for 5 min, then slowly cooled down to room temperature over a period of 3 h.

The G-quadruplex solution (100  $\mu$ L, 10  $\mu$ M in 50 mM Tris HCl, pH 7.0, 100 mM KCl) was irradiated for 30 min at 365 nm (Black Light Blue Bulb tube lamp, UVA, 8 W). Aliquots of 30  $\mu$ L were isolated at t=0, t=15 min and t=30 min. Peptide immobilization with Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin T1 was performed using manufacturer's protocol. Subsequent cleavage into 2'-deoxynucleosides upon digestion with phosphodiesterase I and alkaline phosphatase was carried out at 37°C overnight and the results analyzed by RP-HPLC. The decomposition yield (Y) of the bases was calculated from **Equation 5.1**. The results are averages from at least three repeats.

## **Chapitre 6 : Conclusions et perspectives**

Le phénomène de transferts de charges au sein de l'ADN duplexe est étudié depuis plusieurs années. De nombreux outils ont été développés afin d'approfondir les connaissances sur ce phénomène, à l'origine de la détection et la réparation de lésions au sein de l'ADN. De nouvelles applications sont aussi envisagées telles que les applications électroniques en utilisant l'ADN comme nano-fils conducteurs ou le domaine de l'informatique en se servant de l'ADN comme unité de stockage informatique. *A contrario*, les études de transferts de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe restent peu nombreuses compte tenu du haut degré de polymorphisme des G4, qui constitue un obstacle de taille. Notre laboratoire a mis au point le concept TASQ afin de pallier ce problème et former une structure G-quadruplexe de topologie contrôlée. Le concept TASQ repose sur un support peptidique rigide sur lequel les oligonucléotides formant le G-quadruplexe sont greffés. Cette liaison oligonucléotides-peptide est rendue possible par des ligations chimiosélectives développées au laboratoire. Dans ce contexte, l'un des objectifs de cette thèse a été de développer une structure G-quadruplexe contraint afin d'étudier le phénomène de transfert de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe de topologie contrôlée. Mais avant d'entamer les travaux sur G-quadruplexe, nous avons commencé par mettre au point une nouvelle sonde et un nouvel injecteur de charge.

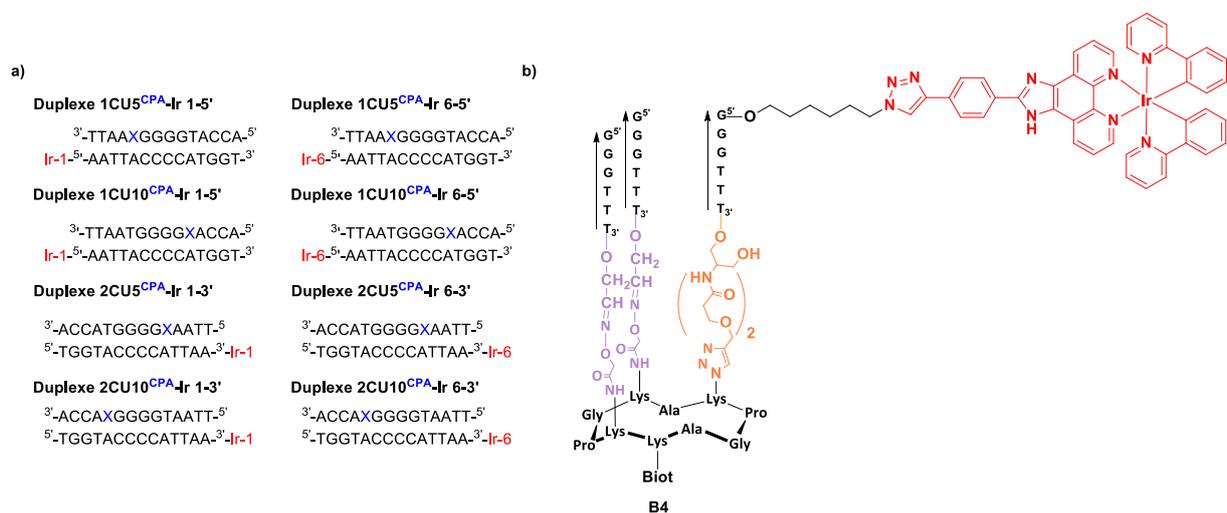
Les deux premiers chapitres présentent le contexte et les objectifs de cette thèse de doctorat. Le troisième chapitre détaille la synthèse et la caractérisation des nouveaux complexes d'iridium (III) qui serviront d'injecteur de charges (**Figure 6.1**). Nous avons déterminé le complexe d'iridium (III) le plus apte à servir en tant qu'injecteur de charge (**Ir 1**). Celui-ci a ensuite été incorporé au sein de structures oligonucléotidiques.



**Figure 6.1** : Synthèse des différents complexes d'iridium (III).

Le chapitre suivant est divisé en deux parties. La première partie détaille le développement de la nouvelle sonde dU<sup>CPA</sup> tout d'abord en série nucléoside puis en série oligonucléotide. Parallèlement au développement de la sonde, le brin d'oligonucléotide complémentaire portant l'injecteur de charge a aussi été synthétisé. Nous avons alors préparé huit oligonucléotides distincts nous permettant de former huit systèmes d'ADN duplexes en fonction de la position de la sonde, de l'injecteur de charge et de la position de l'injecteur de charge (**Figure 6.2 a**).

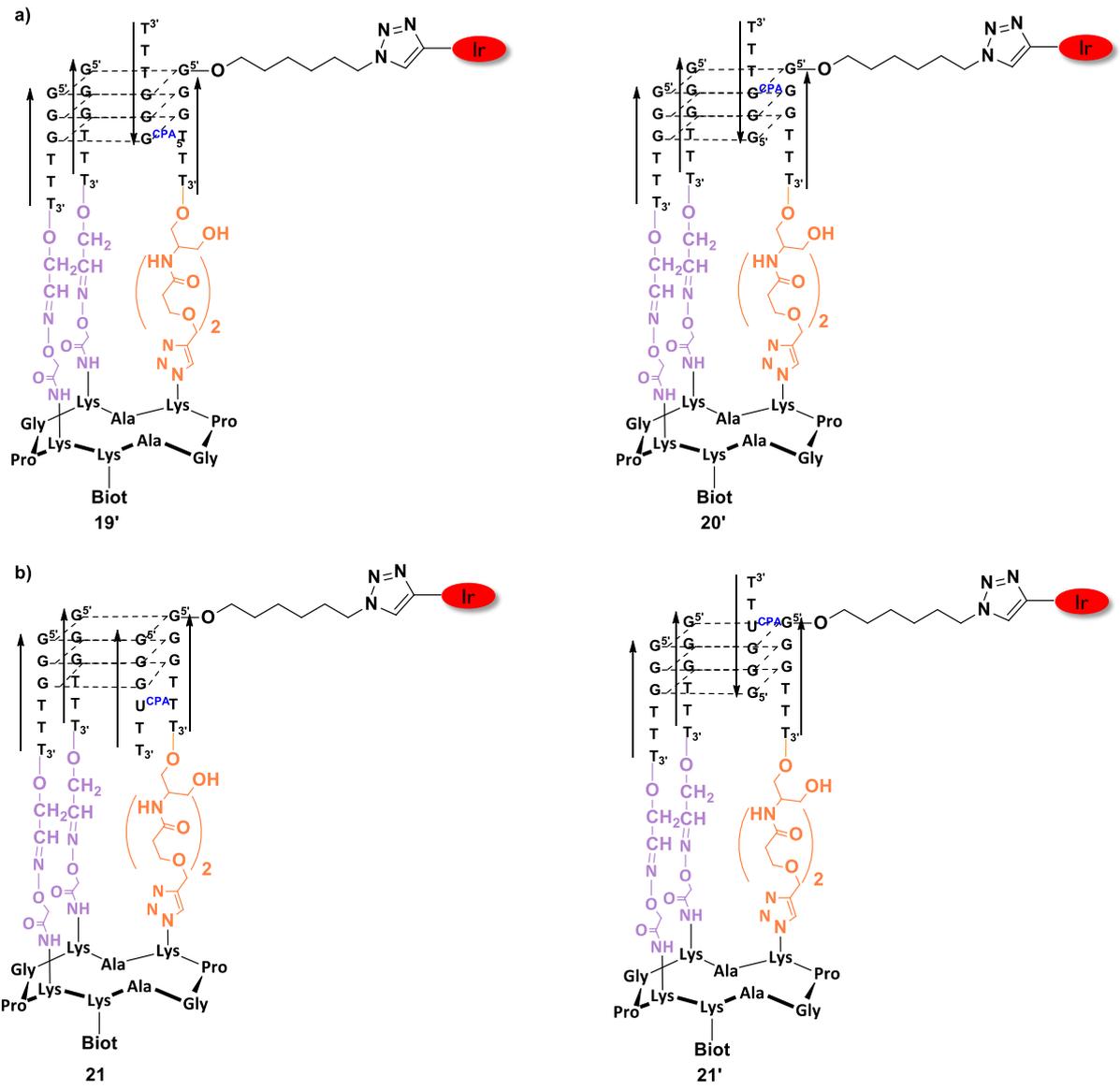
La deuxième partie du chapitre quatre présente la préparation de l'édifice précurseur **B4** en commençant par détailler la préparation du châssis peptidique, de la synthèse des différents oligonucléotides et pour finir l'assemblage des conjugués oligonucléotides-peptide pour former l'édifice précurseur **B4** (**Figure 6.2 b**).



**Figure 6.2** : Représentations a) des différents systèmes d'ADN duplexe préparés, b) de l'édifice intermédiaire **B4**.

Le cinquième chapitre traite d'une part les expériences de transferts de charges au sein de l'ADN duplexe en présence de la nouvelle sonde et du nouvel injecteur de charge et d'autre part, les résultats de transfert de charges positives au sein de l'ADN G-quadruplexe de topologie parallèle, en présence d'une sonde déjà décrite dans la littérature.

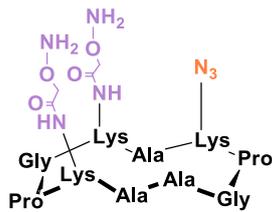
La prochaine étape consiste à étudier le transfert de charges au sein d'une structure G-quadruplexe de topologie hybride en présence de la sonde dG<sup>CPA</sup> : les structures **19'** et **20'** (**Figure 6.3 a**). De plus, une fois que nous aurons prouvé que la nouvelle sonde dU<sup>CPA</sup> est aussi capable de détecter le transfert de charges, nous pourrons alors comparer l'efficacité de transfert de charge entre les deux sondes en fonction de la topologie adoptée par le G-quadruplexe (structures **21** et **21'**, **Figure 6.3 b**).



**Figure 6.3 :** Représentations a) des deux édifices G-quadruplexe de topologie hybride **19'** et **20'**, b) des deux G-quadruplexe en présence de la sonde dU<sup>CPA</sup>, de topologie parallèle **21** et hybride **21'**.

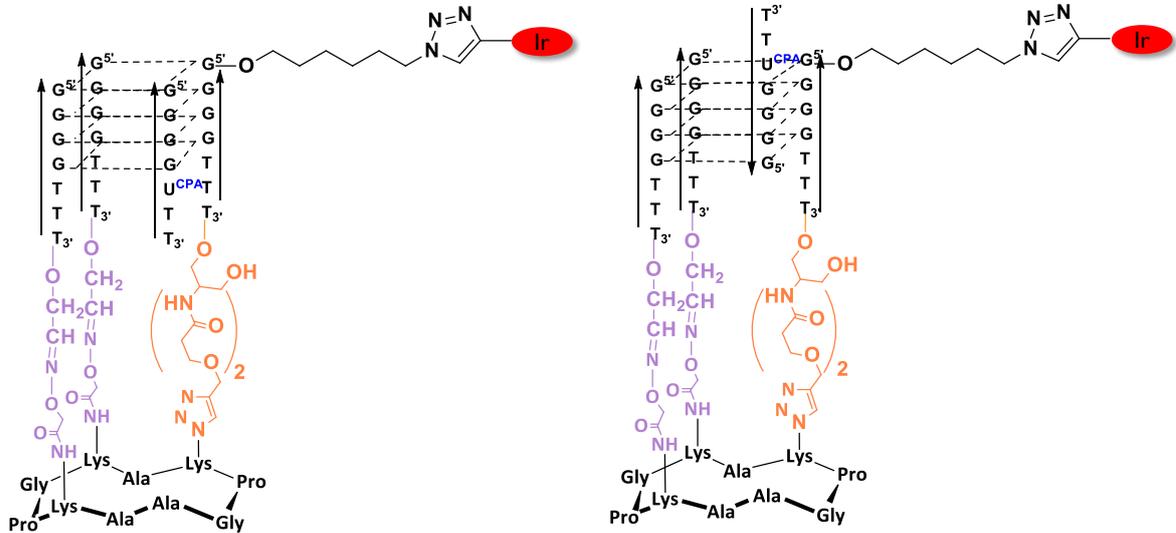
Puisque nous avons vérifié que l'immobilisation sur support magnétique de streptavidine n'est pas nécessaire, nous pouvons ainsi utiliser un châssis peptidique plus simple ne comportant pas de groupement biotine sur la face inférieure de l'édifice (en utilisant le châssis peptidique **9**, **Figure 6.4 a**). Une autre voie d'étude consiste à augmenter le nombre de tétrades de guanines formant la structure G-quadruplexe (**Figure 6.4 b**), nous permettant d'étudier l'influence du nombre de tétrades sur l'efficacité de transfert de charges au sein de l'ADN G-quadruplexe.

a)

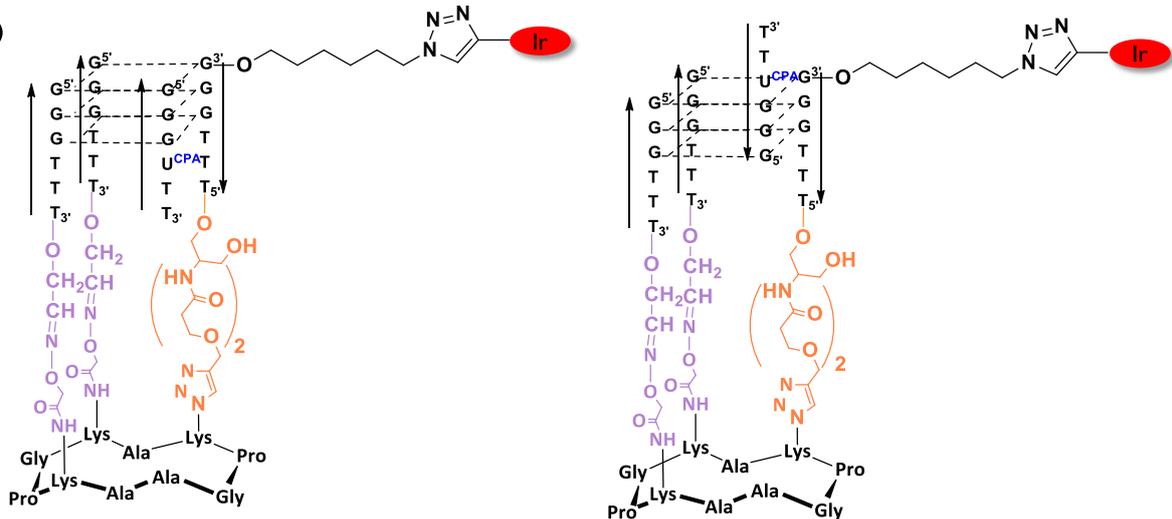


9

b)



c)

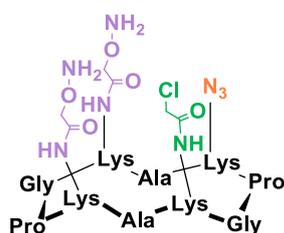


**Figure 6.4 :** Représentations a) du châssis peptidique 9 b) de deux structures G-quadruplexes formées à partir de quatre tétrades de guanines et c) des deux nouveaux G-quadruplexes de topologie hybride et antiparallèle formé à partir du châssis peptidique 9.

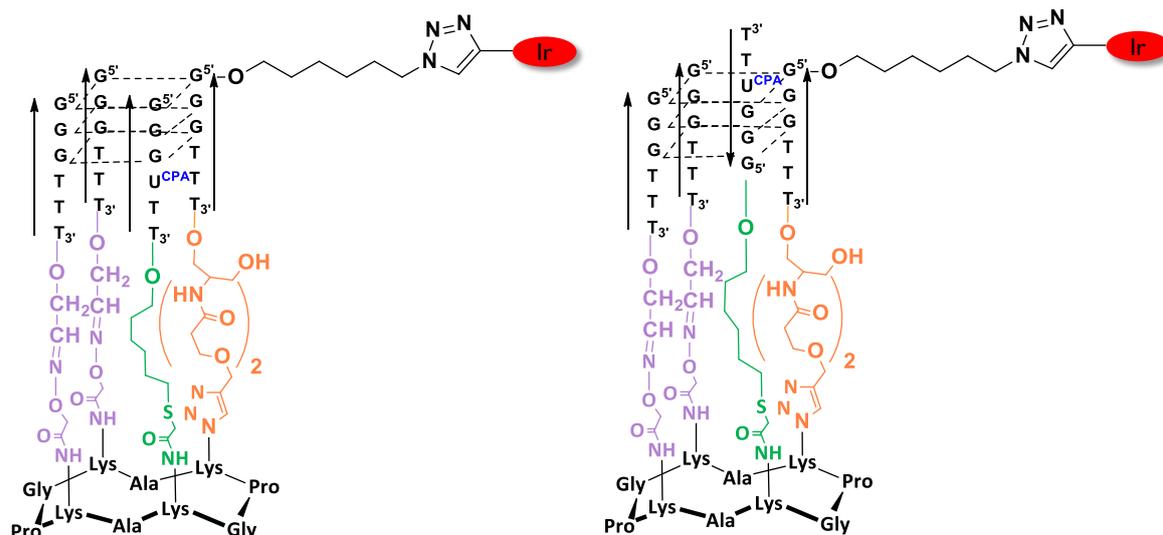
Nous pouvons aussi considérer l'utilisation d'une structure G-quadruplexe avec le brin d'oligonucléotide portant l'injecteur de charge orienté dans l'autre sens, formant ainsi les structures hybride et antiparallèle illustrées dans la **Figure 6.4 c**.

Une autre perspective est de préparer une structure G-quadruplexe de topologie totalement contrôlée, en partant d'un châssis peptidique portant trois fonctions chimiques différentes (**Figure 6.5 a**) afin d'incorporer les quatre oligonucléotides de façon covalente (**Figure 6.5 b**). En utilisant ce type de gabarit peptidique, nous avons la possibilité de fixer la topologie du G4 lors de la synthèse de ce dernier, permettant ainsi de dissocier la dépendance de topologie du G4 en fonction du cation présent lors de la structuration du G4 (topologie parallèle en présence du cation potassium et topologie hybride en présence du cation sodium).

a)



b)



**Figure 6.5** : Représentation a) du châssis peptidique portant trois fonctions chimiques et b) de deux G-quadruplexes de topologie parallèle et hybride formés à partir châssis peptidique proposé.

Au cours de ces travaux de recherche doctorale, nous avons mis en évidence pour la première fois l'existence d'un transfert de charges photo-induit au sein de structures G-quadruplexes contraints portant l'injecteur et l'accepteur de charge sur deux brins d'oligonucléotides différents. De plus, nous avons commencé les études à partir de G-quadruplexes de topologie parallèle. Les marches à gravir restent cependant nombreuses. Ainsi, il reste encore par exemple à étudier l'efficacité de transfert de charges au sein des différentes topologies de G-quadruplexes. Grâce à notre approche, nous avons la possibilité d'étendre les études sur des G4 formés à partir d'empilements de tétrades supérieures à trois guanines. Grâce au concept TASQ, le polymorphisme des G-quadruplexes n'est plus un obstacle aux études de transferts de charges et représente désormais une variable que nous pouvons totalement contrôler, permettant ainsi d'étendre les études de transferts de charges à différentes topologies de G-quadruplexe.

## **Références bibliographiques**

- (1) Church, G. M.; Gao, Y.; Kosuri, S. Next-Generation Digital Information Storage in DNA. *Science* **2012**, *337* (6102), 1628–1628. <https://doi.org/10.1126/science.1226355>.
- (2) Dahm, R. Friedrich Miescher and the Discovery of DNA. *Dev. Biol.* **2005**, *278* (2), 274–288. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.028>.
- (3) Paweletz, N. Walther Flemming: Pioneer of Mitosis Research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2* (1), 72–75. <https://doi.org/10.1038/35048077>.
- (4) Avery, O. T.; MacLeod, C. M.; McCarty, M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. *J. Exp. Med.* **1944**, *79* (2), 137–158. <https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137>.
- (5) 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>.
- (6) Franklin, R. E.; Gosling, R. G. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature* **1953**, *171* (4356), 740–741. <https://doi.org/10.1038/171740a0>.
- (7) Klug, A. Rosalind Franklin and the Discovery of the Structure of DNA. *Nature* **1968**, *219* (5156), 808–810. <https://doi.org/10.1038/219808a0>.
- (8) Phoebus Aaron Theodor Levene 1869–1940. In *Advances in Carbohydrate Chemistry*; Wolfrom, M. L., Tipson, R. S., Eds.; Academic Press, 1957; Vol. 12, pp 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0096-5332\(08\)60202-7](https://doi.org/10.1016/S0096-5332(08)60202-7).
- (9) Wing, R.; Drew, H.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson, R. E. Crystal Structure Analysis of a Complete Turn of B-DNA. *Nature* **1980**, *287* (5784), 755–758. <https://doi.org/10.1038/287755a0>.
- (10) Macgregor, R. B.; Poon, G. M. K. The DNA Double Helix Fifty Years On. *Comput. Biol. Chem.* **2003**, *27* (4–5), 461–467. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2003.08.001>.
- (11) Wang, A. H.-J.; Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J. L.; Boom, J. H. van; Marel, G. van der; Rich, A. Molecular Structure of a Left-Handed Double Helical DNA Fragment at Atomic Resolution. *Nature* **1979**, *282* (5740), 680–686. <https://doi.org/10.1038/282680a0>.
- (12) Wood, B. R. The Importance of Hydration and DNA Conformation in Interpreting Infrared Spectra of Cells and Tissues. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (7), 1980–1998. <https://doi.org/10.1039/C5CS00511F>.
- (13) Travers, A.; Muskhelishvili, G. DNA Structure and Function. *FEBS J.* **2015**, *282* (12), 2279–2295. <https://doi.org/10.1111/febs.13307>.
- (14) Venter, J. C.; et Al. The Sequence of the Human Genome. *Science* **2001**, *291* (5507), 1304. <https://doi.org/10.1126/science.1058040>.
- (15) Cooper, G. M. *DNA Replication*; Sinauer Associates, 2000.
- (16) Hoogsteen, K. The Crystal and Molecular Structure of a Hydrogen-Bonded Complex between 1-Methylthymine and 9-Methyladenine. *Acta Crystallogr.* **1963**, *16* (9), 907–916. <https://doi.org/10.1107/S0365110X63002437>.
- (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) Lilley, D. M. J. Structures of Helical Junctions in Nucleic Acids. *Q. Rev. Biophys.* **2000**, *33* (2), 109–159. <https://doi.org/10.1017/S0033583500003590>.
- (19) Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R. Helix Formation by Guanylic Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1962**, *48* (12), 2013–2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.12.2013>.

- (20) Pinnavaia, T. J.; Marshall, C. L.; Mettler, C. M.; Fisk, C. L.; Miles, H. T.; Becker, E. D. Alkali Metal Ion Specificity in the Solution Ordering of a Nucleotide, 5'-Guanosine Monophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100* (11), 3625–3627. <https://doi.org/10.1021/ja00479a070>.
- (21) Hardin, C. C.; Watson, T.; Corregan, M.; Bailey, C. Cation-Dependent Transition between the Quadruplex and Watson-Crick Hairpin Forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry* **1992**, *31* (3), 833–841. <https://doi.org/10.1021/bi00118a028>.
- (22) Webba da Silva, M. Geometric Formalism for DNA Quadruplex Folding. *Chem. - Eur. J.* **2007**, *13* (35), 9738–9745. <https://doi.org/10.1002/chem.200701255>.
- (23) Dai, J.; Carver, M.; Yang, D. Polymorphism of Human Telomeric Quadruplex Structures. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1172–1183. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.02.026>.
- (24) Henderson, E.; Walk, S. K.; Blackburn, H. Telomeric DNA Oligonucleotides Form Novel Intramolecular Structures Containing Guanine-Guanine Base Pairs. *Cell* **1987**, *51* (6), 899–908. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90577-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90577-0).
- (25) Wang, Y.; Patel, D. J. Solution Structure of the Human Telomeric Repeat d[AG3(T2AG3)3] G-Tetraplex. *Structure* **1993**, *1* (4), 263–282. [https://doi.org/10.1016/0969-2126\(93\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0969-2126(93)90015-9).
- (26) Phan, A. T.; Patel, D. J. Two-Repeat Human Telomeric d(TAGGGTTAGGGT) Sequence Forms Interconverting Parallel and Antiparallel G-Quadruplexes in Solution: Distinct Topologies, Thermodynamic Properties, and Folding/Unfolding Kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (49), 15021–15027. <https://doi.org/10.1021/ja037616j>.
- (27) Dai, J.; Dexheimer, T. S.; Chen, D.; Carver, M.; Ambrus, A.; Jones, R. A.; Yang, D. An Intramolecular G-Quadruplex Structure with Mixed Parallel/Antiparallel G-Strands Formed in the Human BCL-2 Promoter Region in Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (4), 1096–1098. <https://doi.org/10.1021/ja055636a>.
- (28) Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S. Crystal Structure of Parallel Quadruplexes from Human Telomeric DNA. *Nature* **2002**, *417* (6891), 876–880. <https://doi.org/10.1038/nature755>.
- (29) Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Bialis, T.; Jones, R. A.; Yang, D. Human Telomeric Sequence Forms a Hybrid-Type Intramolecular G-Quadruplex Structure with Mixed Parallel/Antiparallel Strands in Potassium Solution. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34* (9), 2723–2735. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl348>.
- (30) Baker, E. S.; Bernstein, S. L.; Bowers, M. T. Structural Characterization of G-Quadruplexes in Deoxyguanosine Clusters Using Ion Mobility Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16* (6), 989–997. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2005.03.012>.
- (31) Baker, E. S.; Bernstein, S. L.; Gabelica, V.; Pauw, E. D.; Bowers, M. T. G-Quadruplexes in Telomeric Repeats Are Conserved in a Solvent-Free Environment. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *253* (3), 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2006.03.016>.
- (32) Yuan, G.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Li, H. Mass Spectrometry of G-Quadruplex DNA: Formation, Recognition, Property, Conversion, and Conformation. *Mass Spectrom. Rev.* **2011**, *30* (6), 1121–1142. <https://doi.org/10.1002/mas.20315>.
- (33) Mergny, J.-L. Thermal Difference Spectra: A Specific Signature for Nucleic Acid Structures. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (16), e138–e138. <https://doi.org/10.1093/nar/gnl134>.
- (34) Carvalho, J.; Queiroz, J. A.; Cruz, C. Circular Dichroism of G-Quadruplex: A Laboratory Experiment for the Study of Topology and Ligand Binding. *J. Chem. Educ.* **2017**, *94* (10), 1547–1551. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00160>.

- (35) Karsisiotis, A. I.; Hessari, N. M.; Novellino, E.; Spada, G. P.; Randazzo, A.; Webba da Silva, M. Topological Characterization of Nucleic Acid G-Quadruplexes by UV Absorption and Circular Dichroism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (45), 10645–10648. <https://doi.org/10.1002/anie.201105193>.
- (36) Tóthová, P.; Krafčíková, P.; Viglaský, V. Formation of Highly Ordered Multimers in G-Quadruplexes. *Biochemistry* **2014**, *53* (45), 7013–7027. <https://doi.org/10.1021/bi500773c>.
- (37) Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Pluckthun, A. In Vitro Generated Antibodies Specific for Telomeric Guanine-Quadruplex DNA React with *Stylonychia Lemnae* Macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (15), 8572–8577. <https://doi.org/10.1073/pnas.141229498>.
- (38) Huppert, J. L. Prevalence of Quadruplexes in the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2908–2916. <https://doi.org/10.1093/nar/gki609>.
- (39) Hanakahi, L. A.; Sun, H.; Maizels, N. High Affinity Interactions of Nucleolin with G-G-Paired RDNA. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (22), 15908–15912. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15908>.
- (40) Sen, D.; Gilbert, W. Formation of Parallel Four-Stranded Complexes by Guanine-Rich Motifs in DNA and Its Implications for Meiosis. *Nature* **1988**, *334* (6180), 364–366. <https://doi.org/10.1038/334364a0>.
- (41) Biffi, G.; Tannahill, D.; McCafferty, J.; Balasubramanian, S. Quantitative Visualization of DNA G-Quadruplex Structures in Human Cells. *Nat. Chem.* **2013**, *5* (3), 182–186. <https://doi.org/10.1038/nchem.1548>.
- (42) Qiu, J.; Chen, S.; Su, L.; Liu, J.; Xiao, N.; Ou, T.-M.; Tan, J.-H.; Gu, L.-Q.; Huang, Z.-S.; Li, D. Cellular Nucleic Acid Binding Protein Suppresses Tumor Cell Metastasis and Induces Tumor Cell Death by Downregulating Heterogeneous Ribonucleoprotein K in Fibrosarcoma Cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2014**, *1840* (7), 2244–2252. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.025>.
- (43) Hahn, W. C. Role of Telomeres and Telomerase in the Pathogenesis of Human Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21* (10), 2034–2043. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.06.018>.
- (44) Greider, C. W.; Blackburn, E. H. Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts. *Cell* **1985**, *43* (2), 405–413. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90170-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90170-9).
- (45) 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>.
- (46) Asamitsu, S.; Obata, S.; Yu, Z.; Bando, T.; Sugiyama, H. Recent Progress of Targeted G-Quadruplex-Preferred Ligands Toward Cancer Therapy. *Molecules* **2019**, *24* (3), 429. <https://doi.org/10.3390/molecules24030429>.
- (47) Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. G-Quadruplexes in Promoters throughout the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (2), 406–413. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1057>.
- (48) Wei, D.; Parkinson, G. N.; Reszka, A. P.; Neidle, S. Crystal Structure of a C-Kit Promoter Quadruplex Reveals the Structural Role of Metal Ions and Water Molecules in Maintaining Loop Conformation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (10), 4691–4700. <https://doi.org/10.1093/nar/gks023>.
- (49) Yang, D.; Hurley, L. H. Structure of the Biologically Relevant G-Quadruplex in The c-MYC Promoter. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2006**, *25* (8), 951–968. <https://doi.org/10.1080/15257770600809913>.

- (50) Li, F.; Zhou, J.; Xu, M.; Yuan, G. Exploration of G-Quadruplex Function in c-Myb Gene and Its Transcriptional Regulation by Topotecan. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107*, 1474–1479. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.010>.
- (51) Ducani, C.; Bernardinelli, G.; Högberg, B.; Keppler, B. K.; Terenzi, A. Interplay of Three G-Quadruplex Units in the *KIT* Promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (26), 10205–10213. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b12753>.
- (52) Wang, K.-B.; Elsayed, M. S. A.; Wu, G.; Deng, N.; Cushman, M.; Yang, D. Indenoisoquinoline Topoisomerase Inhibitors Strongly Bind and Stabilize the *MYC* Promoter G-Quadruplex and Downregulate *MYC*. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (28), 11059–11070. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b02679>.
- (53) Valenta, P.; Nürnberg, H. W. The Electrochemical Behaviour of DNA at Electrically Charged Interfaces. *Biophys. Struct. Mech.* **1974**, *1* (1), 17–26. <https://doi.org/10.1007/BF01022557>.
- (54) Liu, T.; Barton, J. K. DNA Electrochemistry through the Base Pairs Not the Sugar–Phosphate Backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (29), 10160–10161. <https://doi.org/10.1021/ja053025c>.
- (55) Genereux, J. C.; Barton, J. K. Mechanisms for DNA Charge Transport. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (3), 1642–1662. <https://doi.org/10.1021/cr900228f>.
- (56) Treadway, C. R.; Hill, M. G.; Barton, J. K. Charge Transport through a Molecular P-Stack: Double Helical DNA. *Chem. Phys.* **2002**, *281*, 409–428. [https://doi.org/10.1016/S0301-0104\(02\)00447-0](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(02)00447-0).
- (57) Merino, E. J.; Boal, A. K.; Barton, J. K. Biological Contexts for DNA Charge Transport Chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12* (2), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.046>.
- (58) Cadet, J.; Delatour, T.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Pouget, J.-P.; Ravanat, J.-L.; Sauvaigo, S. Hydroxyl Radicals and DNA Base Damage. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **1999**, *424* (1–2), 9–21. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00004-4).
- (59) Burrows, C. J.; Muller, J. G. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (3), 1109–1152. <https://doi.org/10.1021/cr960421s>.
- (60) Rajski, S. R.; Barton, J. K. DNA-Mediated Electron Transfer: A Sensitive Probe of DNA-Protein Interactions. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2000**, *17* (sup1), 285–291. <https://doi.org/10.1080/07391102.2000.10506633>.
- (61) Núñez, M. E.; Noyes, K. T.; Barton, J. K. Oxidative Charge Transport through DNA in Nucleosome Core Particles. *Chem. Biol.* **2002**, *9* (4), 403–415. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00121-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00121-7).
- (62) Fuss, J. O.; Tsai, C.-L.; Ishida, J. P.; Tainer, J. A. Emerging Critical Roles of Fe–S Clusters in DNA Replication and Repair. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2015**, *1853* (6), 1253–1271. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.018>.
- (63) Barton, J. K.; Silva, R. M. B.; O’Brien, E. Redox Chemistry in the Genome: Emergence of the [4Fe4S] Cofactor in Repair and Replication. *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, *88* (1), 163–190. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110644>.
- (64) Tse, E. C. M.; Zwang, T. J.; Bedoya, S.; Barton, J. K. Effective Distance for DNA-Mediated Charge Transport between Repair Proteins. *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5* (1), 65–72. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.8b00566>.
- (65) Arnold, A. R.; Grodick, M. A.; Barton, J. K. DNA Charge Transport: From Chemical Principles to the Cell. *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23* (1), 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.11.010>.
- (66) Zwang, T. J.; Tse, E. C. M.; Barton, J. K. Sensing DNA through DNA Charge Transport. *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13* (7), 1799–1809. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00347>.

- (67) Murphy, C.; Arkin, M.; Jenkins, Y.; Ghatlia, N.; Bossmann, S.; Turro, N.; Barton, J. Long-Range Photoinduced Electron Transfer through a DNA Helix. *Science* **1993**, 262 (5136), 1025–1029. <https://doi.org/10.1126/science.7802858>.
- (68) Tanaka, M.; Elias, B.; Barton, J. K. DNA-Mediated Electron Transfer in Naphthalene-Modified Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (8), 2423–2428. <https://doi.org/10.1021/jo1000862>.
- (69) Gaballah, S. T.; Collier, G.; Netzel, T. L. Charge Transfer Excited-State Dynamics in DNA Duplexes Substituted with an Ethynylpyrenyldeoxyuridine Electron Source and a Fluorodeoxyuridine Electron Trap. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109 (24), 12175–12181. <https://doi.org/10.1021/jp044457x>.
- (70) Wagenknecht, H.-A. Reductive Electron Transfer and Transport of Excess Electrons in DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42 (22), 2454–2460. <https://doi.org/10.1002/anie.200301629>.
- (71) Genereux, J. C.; Wuerth, S. M.; Barton, J. K. Single-Step Charge Transport through DNA over Long Distances. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (11), 3863–3868. <https://doi.org/10.1021/ja107033v>.
- (72) Williams, T. T.; Dohno, C.; Stemp, E. D. A.; Barton, J. K. Effects of the Photooxidant on DNA-Mediated Charge Transport. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (26), 8148–8158. <https://doi.org/10.1021/ja049869y>.
- (73) Núñez, M. E.; Hall, D. B.; Barton, J. K. Long-Range Oxidative Damage to DNA: Effects of Distance and Sequence. *Chem. Biol.* **1999**, 6 (2), 85–97. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(99\)80005-2](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(99)80005-2).
- (74) Arkin, M. R.; Stemp, E. D.; Pulver, S. C.; Barton, J. K. Long-Range Oxidation of Guanine by Ru(III) in Duplex DNA. *Chem. Biol.* **1997**, 12. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90129-0](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90129-0).
- (75) Shao, F.; O'Neill, M. A.; Barton, J. K. Long-Range Oxidative Damage to Cytosines in Duplex DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101 (52), 17914–17919. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408128101>.
- (76) Augustyn, K. E.; Genereux, J. C.; Barton, J. K. Distance-Independent DNA Charge Transport across an Adenine Tract. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46 (30), 5731–5733. <https://doi.org/10.1002/anie.200701522>.
- (77) Elias, B.; Genereux, J. C.; Barton, J. K. Ping-Pong Electron Transfer through DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47 (47), 9067–9070. <https://doi.org/10.1002/anie.200803556>.
- (78) Elias, B.; Shao, F.; Barton, J. K. Charge Migration along the DNA Duplex: Hole versus Electron Transport. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130 (4), 1152–1153. <https://doi.org/10.1021/ja710358p>.
- (79) Fukui, K.; Tanaka, K. Distance Dependence of Photoinduced Electron Transfer in DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 158–161. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980202\)37:1/2<158::AID-ANIE158>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980202)37:1/2<158::AID-ANIE158>3.0.CO;2-L).
- (80) Stemp, E. D. A.; Arkin, M. R.; Barton, J. K. Oxidation of Guanine in DNA by Ru(Phen)<sub>2</sub>(Dppz)<sup>3+</sup> Using the Flash-Quench Technique. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 (12), 2921–2925. <https://doi.org/10.1021/ja963606p>.
- (81) Nakatani, K.; Dohno, C.; Saito, I. Design of a Hole-Trapping Nucleobase: Termination of DNA-Mediated Hole Transport at N<sup>2</sup>-Cyclopropyldeoxyguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (39), 9681–9682. <https://doi.org/10.1021/ja010479a>.
- (82) Dohno, C.; Ogawa, A.; Nakatani, K.; Saito, I. Hole Trapping at N<sup>6</sup>-Cyclopropyldeoxyadenosine Suggests a Direct Contribution of Adenine Bases to Hole Transport through DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (34), 10154–10155. <https://doi.org/10.1021/ja035887o>.

- (83) Cook, G. P.; Greenberg, M. M. A Novel Mechanism for the Formation of Direct Strand Breaks upon Anaerobic Photolysis of Duplex DNA Containing 5-Bromodeoxyuridine. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (42), 10025–10030. <https://doi.org/10.1021/ja960652g>.
- (84) Manetto, A.; Breeger, S.; Chatgililoglu, C.; Carell, T. Complex Sequence Dependence by Excess-Electron Transfer through DNA with Different Strength Electron Acceptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (2), 318–321. <https://doi.org/10.1002/anie.200502551>.
- (85) Juris, A.; Ceroni, P.; Balzani, V. *Photochemistry and Photophysics: Concepts, Research, Applications*; John Wiley and Sons, 2014.
- (86) Flamigni, L.; Barbieri, A.; Sabatini, C.; Ventura, B.; Barigelletti, F. In *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds II*; Balzani, V., Campagna, S., Eds.; Topics in Current Chemistry; Springer: Berlin, Heidelberg, 2007; pp 143–203. [https://doi.org/10.1007/128\\_2007\\_131](https://doi.org/10.1007/128_2007_131).
- (87) Deaton, J. C.; Castellano, F. N. In *Iridium(III) in Optoelectronic and Photonics Applications*; John Wiley & Sons Ltd, 2017; pp 1–69.
- (88) Henwood, A. F.; Zysman-Colman, E. Lessons Learned in Tuning the Optoelectronic Properties of Phosphorescent Iridium( III ) Complexes. *Chem Commun* **2017**, *53* (5), 807–826. <https://doi.org/10.1039/C6CC06729H>.
- (89) Lentz, C.; Schott, O.; Auvray, T.; Hanan, G.; Elias, B. Photocatalytic Hydrogen Production Using a Red-Absorbing Ir(III)–Co(III) Dyad. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (18), 10875–10881. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b00684>.
- (90) Jacques, A.; Schott, O.; Robeyns, K.; Hanan, G. S.; Elias, B. Hydrogen Photoevolution from a Green-Absorbing Iridium(III)-Cobalt-(III) Dyad. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, *2016* (12), 1779–1783. <https://doi.org/10.1002/ejic.201501467>.
- (91) Schultz, D. M.; Yoon, T. P. Solar Synthesis: Prospects in Visible Light Photocatalysis. *Science* **2014**, *343* (6174), 1239176–1239176. <https://doi.org/10.1126/science.1239176>.
- (92) Zanoni, K. P. S.; Coppo, R. L.; Amaral, R. C.; Murakami Iha, N. Y. Ir( III ) Complexes Designed for Light-Emitting Devices: Beyond the Luminescence Color Array. *Dalton Trans.* **2015**, *44* (33), 14559–14573. <https://doi.org/10.1039/C5DT01644D>.
- (93) Shao, F.; Elias, B.; Lu, W.; Barton, J. K. Synthesis and Characterization of Iridium(III) Cyclometalated Complexes with Oligonucleotides: Insights into Redox Reactions with DNA. *Inorg. Chem.* **2007**, *46* (24), 10187–10199. <https://doi.org/10.1021/ic7014012>.
- (94) Shao, F.; Barton, J. K. Long-Range Electron and Hole Transport through DNA with Tethered Cyclometalated Iridium(III) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (47), 14733–14738. <https://doi.org/10.1021/ja0752437>.
- (95) Delaney, S.; Barton, J. K. Charge Transport in DNA Duplex/Quadruplex Conjugates †. *Biochemistry* **2003**, *42* (48), 14159–14165. <https://doi.org/10.1021/bi0351965>.
- (96) Thazhathveetil, A. K.; Harris, M. A.; Young, R. M.; Wasielewski, M. R.; Lewis, F. D. Efficient Charge Transport via DNA G-Quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (5), 1730–1733. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b10265>.
- (97) Wu, J.; Meng, Z.; Lu, Y.; Shao, F. Efficient Long-Range Hole Transport Through G-Quadruplexes. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (56), 13980–13985. <https://doi.org/10.1002/chem.201702478>.
- (98) Teo, R. D.; Rousseau, B. J. G.; Smithwick, E. R.; Di Felice, R.; Beratan, D. N.; Migliore, A. Charge Transfer between [4Fe4S] Proteins and DNA Is Unidirectional: Implications for Biomolecular Signaling. *Chem* **2019**, *5* (1), 122–137. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.09.026>.

- (99) Kogikoski, S.; Paschoalino, W. J.; Cantelli, L.; Silva, W.; Kubota, L. T. Electrochemical Sensing Based on DNA Nanotechnology. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2019**, *118*, 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.021>.
- (100) Bonnat, L.; Bar, L.; Génaro, B.; Bonnet, H.; Jarjayes, O.; Thomas, F.; Dejeu, J.; Defrancq, E.; Lavergne, T. Template-Mediated Stabilization of a DNA G-Quadruplex Formed in the HIV-1 Promoter and Comparative Binding Studies. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (23), 5602–5613. <https://doi.org/10.1002/chem.201700417>.
- (101) Piraux, G.; Bar, L.; Abraham, M.; Lavergne, T.; Jamet, H.; Dejeu, J.; Marcélis, L.; Defrancq, E.; Elias, B. New Ruthenium-Based Probes for Selective G-Quadruplex Targeting. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (49), 11872–11880. <https://doi.org/10.1002/chem.201702076>.
- (102) Jencks, W. P. Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (2), 475–481. <https://doi.org/10.1021/ja01511a053>.
- (103) Kalia, J.; Raines, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (39), 7523–7526. <https://doi.org/10.1002/anie.200802651>.
- (104) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (10), 565–598. <https://doi.org/10.1002/anie.196305651>.
- (105) 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. *Angew. Chem. Int. Ed.* **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).
- (106) Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F. Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide–Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (9), 4207–4220. <https://doi.org/10.1021/cr9001462>.
- (107) Meyer, A.; Spinelli, N.; Dumy, P.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F.; Defrancq, E. Oligonucleotide Sequential Bis-Conjugation via Click–Oxime and Click–Huisgen Procedures. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (11), 3927–3930. <https://doi.org/10.1021/jo100599m>.
- (108) Ma, D.; Tsuboi, T.; Qiu, Y.; Duan, L. Recent Progress in Ionic Iridium(III) Complexes for Organic Electronic Devices. *Adv. Mater.* **2017**, *29* (3), 1603253. <https://doi.org/10.1002/adma.201603253>.
- (109) Lo, K. K.-W.; Zhang, K. Y.; Leung, S.-K.; Tang, M.-C. Exploitation of the Dual-Emissive Properties of Cyclometalated Iridium(III)–Polypyridine Complexes in the Development of Luminescent Biological Probes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47* (12), 2213–2216. <https://doi.org/10.1002/anie.200705155>.
- (110) Lo, K. K.-W. Luminescent Rhenium(I) and Iridium(III) Polypyridine Complexes as Biological Probes, Imaging Reagents, and Photocytotoxic Agents. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (12), 2985–2995. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00211>.
- (111) Zhao, Q.; Yu, M.; Shi, L.; Liu, S.; Li, C.; Shi, M.; Zhou, Z.; Huang, C.; Li, F. Cationic Iridium(III) Complexes with Tunable Emission Color as Phosphorescent Dyes for Live Cell Imaging. *Organometallics* **2010**, *29* (5), 1085–1091. <https://doi.org/10.1021/om900691r>.
- (112) Ramachandra, S.; Polo, F.; Edafe, F.; Schuermann, K. C.; Nijhuis, C. A.; Belser, P.; Reus, W. F.; Whitesides, G. M.; De Cola, L. Luminescent Acetylthiol Derivative Tripodal Osmium(II) and Iridium(III) Complexes: Spectroscopy in Solution and on Surfaces. *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83* (4), 779–799. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-10-11-07>.
- (113) Coe, B. J.; Helliwell, M.; Raftery, J.; Sánchez, S.; Peers, M. K.; Scrutton, N. S. Cyclometalated Ir(III) Complexes of Deprotonated N-Methylbipyridinium Ligands:

- Effects of Quaternised N Centre Position on Luminescence. *Dalton Trans.* **2015**, 44 (47), 20392–20405. <https://doi.org/10.1039/C5DT03753K>.
- (114) Bevernaegie, R.; Marcélis, L.; Laramée-Milette, B.; De Winter, J.; Robeyns, K.; Gerbaux, P.; Hanan, G. S.; Elias, B. Trifluoromethyl-Substituted Iridium(III) Complexes: From Photophysics to Photooxidation of a Biological Target. *Inorg. Chem.* **2018**, 57 (3), 1356–1367. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b02778>.
- (115) Deraedt, Q.; Loiseau, F.; Elias, B. Photochemical Tuning of Tris-Bidentate Acridine- and Phenazine-Based Ir(III) Complexes. *J. Fluoresc.* **2016**, 26 (6), 2095–2103. <https://doi.org/10.1007/s10895-016-1904-2>.
- (116) Weynand, J.; Bonnet, H.; Loiseau, F.; Ravanat, J.; Dejeu, J.; Defrancq, E.; Elias, B. Targeting G-Rich DNA Structures with Photoreactive Bis-Cyclometallated Iridium(III) Complexes. *Chem. – Eur. J.* **2019**, 25 (55), 12730–12739. <https://doi.org/10.1002/chem.201902183>.
- (117) Castor, K. J.; Metera, K. L.; Tefashe, U. M.; Serpell, C. J.; Mauzeroll, J.; Sleiman, H. F. Cyclometalated Iridium(III) Imidazole Phenanthroline Complexes as Luminescent and Electrochemiluminescent G-Quadruplex DNA Binders. *Inorg. Chem.* **2015**, 54 (14), 6958–6967. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00921>.
- (118) Coe, B. J.; Helliwell, M.; Sánchez, S.; Peers, M. K.; Scrutton, N. S. Water-Soluble Ir(III) Complexes of Deprotonated N-Methylbipyridinium Ligands: Fluorine-Free Blue Emitters. *Dalton Trans.* **2015**, 44 (35), 15420–15423. <https://doi.org/10.1039/C5DT02591E>.
- (119) Steenken, S.; Jovanovic, S. V. How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119 (3), 617–618. <https://doi.org/10.1021/ja962255b>.
- (120) Ikuta, N.; Takizawa, S.; Murata, S. Photochemical Reduction of CO<sub>2</sub> with Ascorbate in Aqueous Solution Using Vesicles Acting as Photocatalysts. *Photochem Photobiol Sci* **2014**, 13 (4), 691–702. <https://doi.org/10.1039/C3PP50429H>.
- (121) Zhang, R.; Gao, H.; Ren, Y.; Xiao, Y.; Hu, J.; Cheng, X. Syntheses and Properties of Meso-Substituted Porphyrin Mesogens with Triazole Linkages and Peripheral Alkyl Chains. *Chem. - Asian J.* **2018**, 13 (5), 536–544. <https://doi.org/10.1002/asia.201701666>.
- (122) Sprouse, S.; King, K. A.; Spellane, P. J.; Watts, R. J. Photophysical Effects of Metal-Carbon  $\sigma$  Bonds in Ortho-Metalated Complexes of Ir(III) and Rh(III). *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 6647–6653. <https://doi.org/10.1021/ja00334a031>.
- (123) Hansen, S.; Jensen, H. Microwave Irradiation as an Effective Means of Synthesizing Unsubstituted N-Linked 1,2,3-Triazoles from Vinyl Acetate and Azides. *Synlett* **2009**, 2009 (20), 3275–3276. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1218366>.
- (124) Brouwer, A. M. Standards for Photoluminescence Quantum Yield Measurements in Solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, 83 (12), 2213–2228. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-10-09-31>.
- (125) Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H. Synthesis of Deoxyoligonucleotides on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103 (11), 3185–3191. <https://doi.org/10.1021/ja00401a041>.
- (126) Guo, X.; Ingale, S. A.; Yang, H.; He, Y.; Seela, F. Mercury<sup>II</sup>-Mediated Base Pairs in DNA: Unexpected Behavior in Metal Ion Binding and Duplex Stability Induced by 2'-Deoxyuridine 5-Substituents. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15 (4), 870–883. <https://doi.org/10.1039/C6OB02560A>.
- (127) Wong, J. R.; Shao, F. 8-Cyclopropyl-2'-Deoxyguanosine: A Hole Trap for DNA-Mediated Charge Transport. *ChemBioChem* **2014**, 15 (8), 1171–1175. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402018>.

- (128) Ahmadi, Z.; McIndoe, J. S. A Mechanistic Investigation of Hydrodehalogenation Using ESI-MS. *Chem Commun* **2013**, *49*, 11488–11490. <https://doi.org/10.1039/C3CC46271D>.
- (129) Blakemore, D. Chapter 1: Suzuki–Miyaura Coupling. In *Synthetic Methods in Drug Discovery*; 2016; pp 1–69. <https://doi.org/10.1039/9781782622086-00001>.
- (130) Fang, W.-P.; Cheng, Y.-T.; Cheng, Y.-R.; Cherng, Y.-J. Synthesis of Substituted Uracils by the Reactions of Halouracils with Selenium, Sulfur, Oxygen and Nitrogen Nucleophiles under Focused Microwave Irradiation. *Tetrahedron* **2005**, *61* (12), 3107–3113. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.01.085>.
- (131) Miller, G. P.; Kool, E. T. Versatile 5'-Functionalization of Oligonucleotides on Solid Support: Amines, Azides, Thiols, and Thioethers via Phosphorus Chemistry. *J. Org. Chem.* **2004**, *69* (7), 2404–2410. <https://doi.org/10.1021/jo035765e>.
- (132) Miller, G. P.; Kool, E. T. A Simple Method for Electrophilic Functionalization of DNA. *Org. Lett.* **2002**, *4* (21), 3599–3601. <https://doi.org/10.1021/ol0264915>.
- (133) Chao, J.; Huang, W.-Y.; Wang, J.; Xiao, S.-J.; Tang, Y.-C.; Liu, J.-N. Click-Chemistry-Conjugated Oligo-Angiomax in the Two-Dimensional DNA Lattice and Its Interaction with Thrombin. *Biomacromolecules* **2009**, *10* (4), 877–883. <https://doi.org/10.1021/bm8014076>.
- (134) Lartia, R.; Murat, P.; Dumy, P.; Defrancq, E. Versatile Introduction of Azido Moiety into Oligonucleotides through Diazo Transfer Reaction. *Org. Lett.* **2011**, *13* (20), 5672–5675. <https://doi.org/10.1021/ol202397e>.
- (135) Passays, J.; Rubay, C.; Marcélis, L.; Elias, B. Synthesis and Photophysical Properties of Triazolyl Ir<sup>III</sup> Nucleosides: Synthesis and Photophysical Properties of Triazolyl Ir<sup>III</sup> Nucleosides. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (3), 623–629. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601227>.
- (136) Bonnet, R.; Lavergne, T.; Gennaro, B.; Spinelli, N.; Defrancq, E. Construction of Anti-Parallel G-Quadruplexes through Sequential Templated Click. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (23), 4850–4853. <https://doi.org/10.1039/C4CC09744K>.
- (137) Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (14), 2149–2154. <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>.
- (138) Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V. An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-Sulfonyl Azide Hydrochloride. *Org. Lett.* **2007**, *9* (19), 3797–3800. <https://doi.org/10.1021/ol701581g>.
- (139) Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P. 1-Ethoxyethylidene, a New Group for the Stepwise SPPS of Aminoxyacetic Acid Containing Peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (3), 983–991. <https://doi.org/10.1021/jo701628k>.
- (140) Youn, Y. Improved Peroral Delivery of Glucagon-like Peptide-1 by Site-Specific Biotin Modification: Design, Preparation, and Biological Evaluation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68* (3), 667–675. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.07.009>.
- (141) Edupuganti, O. P.; Singh, Y.; Defrancq, E.; Dumy, P. New Strategy for the Synthesis of 3',5'-Bifunctionalized Oligonucleotide Conjugates through Sequential Formation of Chemoselective Oxime Bonds. *Chem. - Eur. J.* **2004**, *10* (23), 5988–5995. <https://doi.org/10.1002/chem.200400390>.
- (142) Byrne, C.; McEwan, P. A.; Emsley, J.; Fischer, P. M.; Chan, W. C. End-Stapled Homo and Hetero Collagen Triple Helices: A Click Chemistry Approach. *Chem Commun* **2011**, *47* (9), 2589–2591. <https://doi.org/10.1039/C0CC04795C>.
- (143) O'Neill, M. A.; Barton, J. K. Effects of Strand and Directional Asymmetry on Base-Base Coupling and Charge Transfer in Double-Helical DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (26), 16543–16550. <https://doi.org/10.1073/pnas.012669599>.

- (144) Nakatani, K.; Dohno, C.; Saito, I. Chemistry of Sequence-Dependent Remote Guanine Oxidation: Photoreaction of Duplex DNA Containing Cyanobenzophenone-Substituted Uridine. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (46), 10854–10855. <https://doi.org/10.1021/ja9920213>.
- (145) Li, L.; Liu, H.-M.; Liu, X.-K.; Liao, S.-Y.; Lan, Y.-T.; Wu, Q.; Wang, X.-C.; Wang, Q.; Zhang, S.-Y.; Mei, W.-J. A Ruthenium(II) Complex as a Potential Luminescent Switch-on Probe for G-Quadruplex DNA. *RSC Adv.* **2017**, *7* (38), 23727–23734. <https://doi.org/10.1039/C7RA01853C>.

## **Conception et études de transferts de charges au sein d'édifice supramoléculaire à base d'ADN G-quadruplexe**

Les dommages oxydatifs observés au sein de l'ADN sont à l'origine des lésions et mutations au sein du support génétique, pouvant conduire à la formation de cancer. Il a été démontré que la présence d'un continuum  $\pi$ , formé à partir de l'empilement des bases azotées structurant la double hélice de l'ADN, permet le transport de charges au sein de l'ADN duplexe causant ainsi des lésions oxydatives à distance entre un injecteur de charges et un accepteur de charges. Les acides nucléiques riches en guanines peuvent se replier pour former des structures tétramériques appelée G-quadruplexe (G4). Ces structures sont localisées au niveau des télomères et dans les régions promotrices de nombreux gènes, y compris les oncogènes. Il a été proposé que les G4 servent à piéger les transferts de charges positives à l'origine des dommages oxydatives à distance. Cependant, une caractéristique majeure des G4 est leur capacité à adopter différentes topologies, en particulier *in vitro*, rendant ainsi difficile les études de transferts de charges au sein de l'ADN G4. Dans ce contexte, notre laboratoire a mis au point le concept TASQ (pour « Template Assembled Synthetic G-Quadruplex ») afin de former des G4 de topologie définie et contrôlée.

La première partie de notre étude consiste à la synthèse des complexes d'iridium (III) afin de servir d'injecteur de charges et un nouvel accepteur de charge. De plus, la synthèse des différents oligonucléotides formant l'ADN duplexe et G4 ainsi que la plateforme peptidique a été réalisée. Puis dans un second temps, l'injecteur de charges ainsi que l'accepteur de charges ont été introduits dans les différents édifices duplexes et G4. Pour finir, des études de transferts de charges au sein de l'ADN duplexe et G4 ont été entreprises.

Mots clés : G-quadruplexe, complexe d'iridium (III), études de transferts de charges, gabarit cyclodécapeptidique, ligations chimiosélectives

### **Design and studies of charge transport through G-quadruplex DNA architectures**

Oxidative damages occurring in DNA can lead to strand breaks or lesions, resulting in a possible formation of cancer. The stacked aromatics base pairs of DNA are known to be an efficient medium for long distance charge transport between a charge injector and a charge acceptor. Guanines rich nucleic acids can fold into tetrameric G-quadruplexes (G4) structures. G4 motifs are found at telomeric and in promoter regions of numerous genes, including oncogenes. DNA G4s have been proposed to serve as trapping sites for oxidative damages caused by long distance charges transports. However, one major feature of G4s is their capability to adopt a variety of topologies, especially *in vitro*, causing the charges transport studies in G4s difficult. In this context, our laboratory has developed the concept TASQ (for "Template Assembled Synthetic G-Quadruplex") to assemble G4s with a defined and controlled topology.

The first part of our study consisted in the synthesis of iridium (III) complexes acting as the charge injector and a new charge acceptor. Moreover, the synthesis of different oligonucleotides forming the DNA duplexes and G4; and the cyclodecapeptidic scaffold were also carried. In a second part, the charge injector and acceptor were assembled into the different DNA duplexes and G4s assemblies. Finally, charges transport studies were carried out for DNA duplexes and G4s.

Keywords: G-quadruplexes, iridium (III) complexes, charges transfer studies, cyclodecapeptidic scaffold, chemoselective ligation