



HAL
open science

Intercalant d'ADN photosensible : une nouvelle brique d'auto-assemblage supramoléculaire pour des systèmes fonctionnels stimulables et dynamiques

Olivier Abodja

► To cite this version:

Olivier Abodja. Intercalant d'ADN photosensible : une nouvelle brique d'auto-assemblage supramoléculaire pour des systèmes fonctionnels stimulables et dynamiques. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS195 . tel-04198153

HAL Id: tel-04198153

<https://theses.hal.science/tel-04198153>

Submitted on 6 Sep 2023

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.

Sorbonne Université

Ecole Doctorale 388

Laboratoire P.A.S.T.E.U.R. (UMR 8640) - Département de Chimie de l'Ecole Normale
Supérieure d'Ulm

Intercalant d'ADN photosensible : une nouvelle brique d'auto-assemblage supramoléculaire pour des systèmes fonctionnels stimulables et dynamiques

Par Olivier Abodja

Thèse de doctorat en Chimie

Sous la direction du Pr. Damien Baigl

Présentée et soutenue publiquement le 20 Juillet 2023

Devant un jury composé de :

M. Matthieu SOLLOGOUB	Professeur des universités, Sorbonne Université	Président du jury
Mme Min- Hui LI	Directrice de recherche CNRS, ENSCP-PSL	Rapportrice
M. Simon TRICARD	Chargé de recherche CNRS, INSA-Université de Toulouse	Rapporteur
Mme Anne-Françoise MINGOTAUD	Chargée de recherche CNRS, Université Paul Sabatier	Examinatrice
M. Damien BAIGL	Professeur des universités, Ecole Normale Supérieure-PSL	Directeur de thèse

« Ce qu'on n'a jamais mis en question n'a point été prouvé. »

Denis Diderot, *Pensées Philosophiques*, 1746

Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Damien Baigl, d'avoir accepté d'encadrer ce travail durant ces trois années. Je remercie également Sergii Rudiuk et Mathieu Morel pour les discussions scientifiques.

Je remercie ensuite Min-Hui Li et Simon Tricard d'avoir accepté d'être rapportrice et rapporteur de mes travaux de thèse. Je remercie également Anne Françoise Mingotaud et Matthieu Sollogoub d'avoir accepté d'être examinatrice et examinateur lors de ma soutenance de thèse.

Je souhaiterais ensuite remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu collaborer pour mener à bien certaines de mes expériences : Astrid Walrant pour l'ITC, Nadia Touati et Laurent Binet pour la RPE, Christophe Desmarets pour le dichroïsme circulaire et Hélène Bertrand pour les mesures de fluorescence.

Je remercie également tous les membres du laboratoire, doctorants, post-doctorants et ingénieurs de recherche : Saikat, Viswa, Yunzhe, Clémence, Lucie, Barbara, Julien, Laura, Glen, Marina, Farah, Pauline, Salammbô et Kaabir.

Je souhaiterais de même remercier le département de chimie de l'Ecole Normale Supérieure de m'avoir permis d'effectuer mes missions d'enseignement au sein du département durant ces trois années de thèse.

Enfin, je remercie mes amis et ma famille pour le soutien sans faille.

Table des matières

Résumé de la thèse.....	8
Summary of the thesis work.....	9
Introduction générale et organisation du manuscrit.....	10
Abréviations utilisées.....	12

PARTIE A : Auto-assemblage et reconnaissance moléculaire : vers des systèmes stimulables et dynamiques

CHAPITRE A.1- La chimie des interactions intermoléculaires : de la reconnaissance moléculaire à l'autoassemblage supramoléculaire.....15

1) Les interactions non covalentes	19
a) Les interactions par liaison hydrogène et halogène	
b) Les interactions électrostatiques	
c) Les interactions de Van der Waals	
d) Les interactions π	
e) Les interactions hydrophobes	
2) Des interactions non covalentes aux édifices moléculaires : reconnaissance moléculaire et autoassemblage supramoléculaire.....	21
a) Reconnaissance moléculaire	
b) Auto-assemblage supramoléculaire	
α) Auto-assemblages biologiques	
β) Auto-assemblages synthétiques	
3) Des édifices moléculaires aux systèmes stimulables.....	26
a) Molécules entrelacées	
b) Matériaux moléculaires	
4) Conclusion.....	29

CHAPITRE A.2- Systèmes supramoléculaires combinant des molécules photosensibles et de l'ADN ou dérivés d'ADN : émergence des intercalants d'ADN photosensibles.....31

1) Structure chimique de l'ADN.....	33
a) Bases azotées	
b) Des bases azotées au nucléotide	
c) Des nucléotides à la double hélice	
d) Cas de l'ARN	
2) Types de structures supramoléculaires à base d'ADN.....	37
a) Structures basées sur l'appariement des bases Watson-Crick	
b) Structures basées sur l'appariement de Hoogsten : G-quadruplexes	
c) Structurées basées sur l'effet template de l'ADN	
3) Systèmes supramoléculaires photostimulables : utilisation de molécules photosensibles.....	42
4) Systèmes à base d'ADN et dérivés d'ADN photostimulables : émergence des intercalants d'ADN photosensibles.....	45
a) ADN double brin apparié	
α) Modes d'interaction de molécules photosensibles avec l'ADN double brin	
β) Emergence des intercalants d'ADN photosensibles	

b) ADN ou dérivé d'ADN simple brin non apparié	
5) Objectif de la thèse.....	51
Conclusion de la partie A.....	52

PARTIE B : Système ATP/Intercalant d'ADN photosensible AzoDiGua : un nouvel assemblage supramoléculaire multi-stimulable

CHAPITRE B.1- Systèmes supramoléculaires dynamiques à base d'ATP.....59

1) La molécule d'ATP.....	59
a) L'ATP : une molécule aux interactions multiples	
b) Stratégie de développement de systèmes supramoléculaires intelligents à base d'ATP	
2) Détection d'ATP par fluorescence et formation de complexes supramoléculaires.....	60
3) Autoassemblages supramoléculaires à base d'ATP.....	66
a) Stratégie d'autoassemblage supramoléculaire templaté par l'ATP	
b) Autoassemblages supramoléculaires répondant à la présence d'ATP	
c) Autoassemblages d'ATP stimuli-répondants	
4) Positionnement du travail de thèse	77

CHAPITRE B.2- Assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua : synthèse et caractérisation des propriétés.....83

1) Assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua.....	85
a) Présentation	
b) Autoassemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua	
α) Stratégie générale	
β) Préparation des agrégats supramoléculaires ATP/AzoDiGua	
c) Rôle des interactions intermoléculaires π et électrostatiques	
α) Titration de l'AzoDiGua par l'ATP	
β) Influence du pH et du squelette phosphate	
γ) Effet du rapport de charge entre l'ATP et l'AzoDiGua	
d) Propriétés d'agrégation de l'AzoDiGua	
2) Fluorescence de l'assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua.....	96
a) Emission de fluorescence du co-assemblage ATP/AzoDiGua	
b) Sélectivité entre les dérivés de phosphate	
3) Conclusion.....	99

CHAPITRE B.3- Assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua : un coassemblage multi-stimulable et dynamique.....101

1) Coassemblage ATP/AzoDiGua photoswitchable.....	103
a) L'AzoDiGua : une molécule photoisomérisable	
b) Etude photodynamique du coassemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua	
α) Photocontrôle de l'assemblage supramoléculaire entre l'ATP et l'AzoDiGua	
β) Photocontrôle de la fluorescence de l'assemblage ATP/AzoDiGua	
γ) Effet de l'irradiation bleue sur l'assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua	
2) Coassemblage ATP/AzoDiGua répondant à la présence de métaux.....	109

a) Stratégie de désassemblage stimulé par des métaux	
b) Etude dynamique du désassemblage ATP/AzoDiGua induit par le cuivre Cu ²⁺	
α) Etude qualitative macroscopique et microscopique	
β) Etude dynamique par résonance paramagnétique électronique des ions Cu ²⁺	
γ) Modulation de la fluorescence du coassemblage ATP/AzoDiGua par les ions Cu ²⁺	
3) Coassemblage ATP/AzoDiGua répondant à la présence d'une enzyme.....	117
a) Clivage enzymatique des agrégats ATP/AzoDiGua	
b) Modulation de la fluorescence des agrégats ATP/AzoDiGua	
4) Conclusions et ouverture sur la réponse à la complexation hôte-invité.....	120
Conclusion de la partie B.....	122

PARTIE C : Intercalant d'ADN photosensible/cyclodextrine : des pseudo-rotaxanes photodynamiques au contrôle de propriétés variées d'intercalants d'ADN

CHAPITRE C.1- Complexes d'inclusion Azobenzène/Cyclodextrines photosensibles et en interaction avec l'ADN.....125

1) Systèmes supramoléculaires à base de cyclodextrines.....	127
a) Présentation	
b) Systèmes hôte-invité	
α) Propriétés structurales des cyclodextrines	
β) Complexes d'inclusion cyclodextrine/molécule hydrophobe	
2) Systèmes host-guest photosensibles à base de cyclodextrines.....	129
a) Systèmes hôte-invité Azobenzène/Cyclodextrine	
b) Machines moléculaires Azobenzène/Cyclodextrine photosensibles	
α) Propriétés mécaniques	
β) Propriétés biologiques	
γ) Propriétés optiques	
3) Cyclodextrines et ADN.....	133
a) Compaction d'ADN	
b) Positionnement du travail de thèse : vers l'intercalation et l'assemblage d'ADN contrôlés par des cyclodextrines	
α) Stratégie	
β) Objectifs	

CHAPITRE C.2 - Complexe d'inclusion de type pseudo-rotaxane AzoDiGua/α-Cyclodextrine photosensible : Synthèse et caractérisation.....137

1) Etude de l'interaction entre l'AzoDiGua et l'α-cyclodextrine.....	139
a) Caractérisation thermodynamique par ITC	
b) Caractérisation spectroscopique par spectroscopie d'absorption UV-visible	
c) Caractérisation structurale par RMN	
α) Analyse par RMN ¹ H 1D	
β) Analyse par RMN ¹ H ROESY et DOSY 2D	
2) Etude photochimique du complexe d'inclusion AzoDiGua/α-CD.....	145
a) Caractérisation par dichroïsme circulaire et spectroscopie UV-visible: transfert de chiralité photocontrôlé	
b) Caractérisation par spectroscopie de fluorescence : fluorescence photocontrôlée	

3) Conclusions.....	152
CHAPITRE C.3- Complexe d'inclusion AzoDiGua/α-Cyclodextrine : vers des propriétés dynamiques d'assemblage et fusion de l'ADN.....	155
1) Intercalation dynamique de l'AzoDiGua au sein de l'ADN contrôlée par la complexation AzoDiGua/ α -Cyclodextrine.....	157
a) Stratégie générale	
b) Présentation du système ADN <i>Hairpin</i> étudié	
c) Etude de l'effet de la complexation AzoDiGua/ α -Cyclodextrine sur le melting d'ADN	
α) Intercalation de l'ADN par l'AzoDiGua	
β) Effet de l' α -Cyclodextrine sur le melting d'ADN	
2) Etude de l'autoassemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua dynamique en présence d'interactions host-guest.....	163
a) Stratégie générale	
b) Effet de l' α -Cyclodextrine sur l'assemblage ATP/AzoDiGua	
α) Assemblage ATP/AzoDiGua et effet de l'ajout d'une α -cyclodextrine	
β) Etude de la dynamique de désassemblage par dichroïsme circulaire	
γ) Effet sur la fluorescence des agrégats ATP/AzoDiGua	
3) Conclusions et perspectives.....	170
Conclusion de la partie C.....	172

<p>PARTIE D : Influence des interactions intermoléculaires de l'AzoDiGua sur les propriétés photochimiques de la proflavine</p>
--

1) Photochimie supramoléculaire et présentation du projet.....	175
a) Les interactions intermoléculaires au service des propriétés photochimiques	
b) Présentation de la stratégie du travail	
α) La proflavine : un intercalant d'ADN fluorescent	
β) Objectif du travail	
2) Quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua.....	178
a) La proflavine : une molécule fluorophore	
b) L'AzoDiGua : une molécule quencher	
α) Quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua	
β) Mécanisme de quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua	
β .1) Relation de Stern-Volmer	
β .2) Application au quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua	
γ) Photocontrôle du quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua	
3) Contrôle des propriétés de quenching de l'AzoDiGua par les interactions intermoléculaires.....	184
a) Par le coassemblage AzoDiGua/ATP	
b) Par la complexation hôte-invité AzoDiGua/ α -cyclodextrine	
Conclusion de la partie D.....	187
Conclusion générale de la thèse.....	189
Partie expérimentale.....	191
Annexe.....	199
Références.....	213

Résumé de la thèse

Résumé :

Développer des systèmes stimulables est d'un grand intérêt afin de pouvoir contrôler certaines de leurs propriétés. Pour ce faire, l'approche supramoléculaire, basée sur l'utilisation des interactions non covalentes, a été largement explorée pour la synthèse de systèmes dynamiques. Plus spécifiquement, développer des systèmes supramoléculaires stimulables à base de molécules biologiques est particulièrement intéressant pour tirer profit de leurs fonctions.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes ainsi intéressés à des systèmes supramoléculaires à base d'ADN ou dérivés d'ADN stimulables et dynamiques. Pour ce faire, nous avons développé un tout nouveau concept d'autoassemblage supramoléculaire de l'ADN ou dérivés d'ADN qui consiste en l'interaction entre un intercalant d'ADN et un dérivé d'ADN, tels que des nucléotides, ou de l'ADN double brin. Au cours de cette thèse, les propriétés de coassemblage stimuli-répondant entre un intercalant et de l'ADN ou des briques d'ADN ont ainsi été étudiées de manière à fabriquer des systèmes moléculaires stimulables et fonctionnels. L'intercalant d'ADN étudié dans ce travail est l'AzoDiGua. Il s'agit d'un intercalant d'ADN photosensible bolaforme, de type azobenzène, qui est fonctionnalisé par des groupements guanidinium, ayant une affinité chimique avec les groupements phosphate, et qui possède des propriétés de fluorescence induite par agrégation et un caractère amphiphile.

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude de l'assemblage supramoléculaire entre l'AzoDiGua et l'adénosine triphosphate (ATP), un nucléotide d'intérêt biologique. Nous avons montré que ces deux molécules sont capables de s'autoassembler spontanément en solution à température ambiante, dans des conditions biocompatibles sous forme d'agrégats supramoléculaires fluorescents. Ces autoassemblages sont dynamiques, le plus souvent réversibles, et répondent à divers stimuli physique, chimique et biologique tels que la lumière, la présence d'ions métalliques, l'activité enzymatique, ou les interactions hôte-invité par ajout d'une cyclodextrine. Ceci nous a permis de contrôler de manière réversible les propriétés d'assemblage et de fluorescence de ces objets et ainsi de développer un système moléculaire autoassemblé inédit ATP/AzoDiGua fluorescent et multi-stimulable combinant un intercalant d'ADN et un nucléotide.

La deuxième partie de ce travail de thèse a été consacrée à la caractérisation d'un nouveau complexe d'inclusion, type pseudo-rotaxane, entre l'AzoDiGua et une alpha cyclodextrine. Ce complexe d'inclusion s'est avéré être fluorescent, chiral et photoswitchable. Par la suite, nous avons utilisé ce pseudo-rotaxane pour contrôler dynamiquement les propriétés d'hybridation de l'ADN double brin à température constante. Nous avons ainsi pu développer un concept inédit permettant de contrôler les propriétés d'intercalation d'une molécule par la complexation hôte-invité et ainsi de maîtriser l'assemblage de l'ADN de manière isotherme.

Mots clés : Autoassemblage, interactions intermoléculaires, fluorescence, intercalation, ADN, ATP, azobenzène, nucléotide, photocontrôle, systèmes stimulables, chimie hôte-invité, pseudo-rotaxane, cyclodextrines

Summary of the thesis work

Summary :

Developing stimuli-responsive systems is of great interest in order to control their properties. For this purpose, the supramolecular approach, based on non-covalent interactions, has been widely explored to build dynamic systems. Specifically, developing supramolecular systems made of biological molecules is particularly interesting to take advantage of their functions.

During this PhD work, the properties of the assembly between a photosensitive DNA intercalator with different biological molecules have been investigated in order to build functional and stimuli-responsive supramolecular systems. The DNA intercalator studied in this manuscript is the AzoDiGua molecule. It is an azobenzene photosensitive bolaform DNA intercalator which is functionalized at each extremity with guanidinium groups having affinities with phosphate groups, and has aggregation-induced fluorescence properties and an amphiphilic character.

The first part of this thesis was devoted to the study of the co-assembly between AzoDiGua and a biologically-active nucleotide, adenosine triphosphate (ATP). We showed that these two molecules are able to self-assemble in solution in biocompatible conditions into fluorescent supramolecular aggregates. These assemblies were found to be dynamical and highly multi-stimuli-responsive to light, chelation with metals, enzymatic hydrolysis or host-guest complexation. This allowed us to control the fluorescence and the assembling properties of these objects and therefore to build a new ATP/AzoDiGua self-assembled fluorescent and multi-stimuli-responsive system combining a DNA intercalator and a nucleotide.

The second part of this thesis was devoted to the characterization of a new inclusion complex, classified as a pseudo-rotaxane, between AzoDiGua and an alpha cyclodextrin. This inclusion complex turned out to be chiral, fluorescent and photoswitchable. Following this, we used this pseudo-rotaxane to dynamically control the assembling properties of double-stranded DNA at constant temperature. We thus were able to develop a new concept enabling the manipulation of the intercalation of a molecule through host-guest complexation at the supramolecular scale leading to an original control of DNA melting/hybridization at constant temperature.

Key-words : Self-assembly, intermolecular interactions, fluorescence, intercalation, DNA, ATP, azobenzene, nucleotide, photocontrol, stimuli-responsive systems, host-guest chemistry, pseudo-rotaxane, cyclodextrins

Introduction générale et organisation du manuscrit

Développer des systèmes stimuli-répondants est d'un grand intérêt de par leur capacité à moduler leur fonction en réponse à des signaux endogènes ou des stimuli extérieurs^{1,2,3}. Une stratégie largement utilisée pour transformer un système passif en un système dynamique est l'approche covalente. Cette stratégie consiste à lier à un substrat une unité stimuli-répondante telle qu'un photochrome, une molécule répondant au pH, ou une espèce électroactive par modification covalente du substrat^{4,5,6,7,8}. Néanmoins, cette stratégie présente des limites car elle nécessite d'effectuer une modification chimique du substrat pouvant altérer ses propriétés, et s'avère être spécifique à chaque substrat dont les conditions de modification sont propres à chacun. Ainsi, des assemblages stimuli-répondants formés de briques moléculaires liées par des interactions non covalentes sont une alternative intéressante permettant un contrôle dynamique de ces briques sans modification chimique de ces dernières. L'approche non covalente a été largement explorée dans la littérature ayant des applications allant de la détection au relargage de molécules⁹.

Ces assemblages supramoléculaires sont d'un intérêt particulier lorsqu'ils engagent des molécules biologiques, telles que de l'ADN ou des dérivés d'ADN, permettant ainsi de contrôler de manière dynamique leurs fonctions et ainsi fabriquer des systèmes moléculaires intelligents, fonctionnels et stimulables.

Afin de produire de tels systèmes supramoléculaires reconfigurables et dynamiques, de nombreuses approches ont été proposées, basées sur la mise en œuvre d'interactions variées : électrostatiques, hydrophobes, liaisons hydrogène, interaction $\pi - \pi$, complexation, assemblage hôte-invité. Si on souhaite mettre en œuvre des molécules biologiques comme de l'ADN ou des nucléotides dans de tels édifices, et si on souhaite réaliser cela sans modifier ces briques d'intérêt biologique, il faut identifier un partenaire d'auto-assemblage susceptible d'interagir de manière non covalente et dynamique avec celle-ci. Notre équipe a récemment développé une classe de molécules possédant précisément cette propriété : les intercalants d'ADN photosensibles. Ces molécules ont en effet la capacité unique de s'insérer dans la double-hélice de l'ADN de manière photodépendante. Ce phénomène a été utilisé avec succès pour le photocontrôle de l'hybridation et de la fusion de l'ADN à température constante. Pour cette thèse, nous souhaitons explorer une voie inédite consistant à mettre en œuvre les intercalants photosensibles d'ADN avec des molécules partenaires d'intérêt biologiques, notamment des nucléotides comme l'ATP ou l'ADN, afin de construire des édifices supramoléculaires dynamiques et capables de répondre à des stimuli variés. A notre connaissance, cette approche n'a été réalisée qu'une fois, par une précédente post-doctorante de l'équipe, dans un système mettant en œuvre la guanosine monophosphate. Dans cette thèse, nous allons donc pousser beaucoup plus loin cette exploration, en mettant

en œuvre les intercalants photosensibles d'ADN avec des partenaires variés, ATP, ADN, cyclodextrine, afin d'élaborer des auto-assemblages dynamiques d'un nouveau genre, aux propriétés souvent inédites.

Le manuscrit est composé de quatre parties subdivisées en chapitres.

Après avoir brièvement rappelé le concept de chimie supramoléculaire et la diversité des machines moléculaires fonctionnelles et stimulables, la première partie de ce manuscrit, de nature entièrement bibliographique, se focalise sur les systèmes à base d'ADN ou dérivés d'ADN conduisant à l'émergence des intercalants d'ADN photosensibles comme briques moléculaires d'assemblages dynamiques.

La deuxième partie de ce manuscrit se concentre sur les propriétés d'assemblage de dérivés d'ADN. Elle décrit en détail la nature d'un nouvel assemblage supramoléculaire formé entre un intercalant d'ADN photosensible, l'AzoDiGua, et un nucléotide d'importance biologique, l'ATP. Ses propriétés de fluorescence et sa réponse à différents stimuli physique, chimique et biologique sont étudiées en détail afin de développer un matériau moléculaire fonctionnel multi-stimulable.

La troisième partie de ce manuscrit se concentre sur les propriétés d'assemblage de l'ADN double brin. Elle présente avec précision la caractérisation d'un complexe d'inclusion de type pseudo-rotaxane inédit formé entre l'intercalant d'ADN photosensible AzoDiGua et une α -cyclodextrine, polysaccharide cyclique. Les propriétés physico-chimiques de ce pseudo-rotaxane sont ainsi étudiées et analysées. Enfin, l'assemblage dynamique d'ADN stimulé par le pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -cyclodextrine est étudié permettant l'émergence d'un nouveau concept d'hybridation/fusion contrôlé de l'ADN par la complexation intercalant d'ADN/cavité.

Nous avons enfin étudié comment l'AzoDiGua se comportait en présence d'un autre intercalant de l'ADN, la proflavine. Cette étude est décrite dans la quatrième partie. Nous montrons notamment que l'AzoDiGua permet de quencher la fluorescence de la proflavine et comment celle-ci pouvait être contrôlée de manière dynamique par des phénomènes d'auto-assemblage et de complexation hôte-invité.

Abréviations utilisées

RMN : résonance magnétique nucléaire

RPE : résonance paramagnétique électronique

CD : cyclodextrine

ALP : alkaline phosphatase

ITC : titration isotherme par calorimétrie

ADN : acide désoxyribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

ADP : adénosine diphosphate

AMP : adénosine monophosphate

ICD : dichroïsme circulaire induit

PARTIE A : Autoassemblage et reconnaissance moléculaire : vers des systèmes stimulables et dynamiques

Dans cette partie, entièrement bibliographique, nous allons nous intéresser à l'émergence de la chimie supramoléculaire et son utilisation pour développer des complexes hôte-invité et autoassemblages supramoléculaires dynamiques et fonctionnels. L'emphase sera ensuite mise sur les systèmes à base d'ADN ou dérivés d'ADN combinés à des molécules photosensibles permettant de faire émerger les intercalants d'ADN photosensibles. Dans un premier chapitre, nous exposerons la diversité des machines moléculaires stimulables développées ces dernières années et comment tirer profit des interactions intermoléculaires pour fabriquer des matériaux moléculaires dynamiques. Dans un second chapitre, nous présenterons les systèmes à base d'ADN et dérivés d'ADN et comment ces molécules peuvent être combinées à des molécules photosensibles pour développer des systèmes fonctionnels dynamiques faisant émerger une nouvelle classe de briques d'assemblage : les intercalants d'ADN photosensibles.

Plan :

Chapitre A.1 : La chimie des interactions intermoléculaires : de la reconnaissance moléculaire à l'autoassemblage supramoléculaire.....15

Chapitre A.2 : Systèmes supramoléculaires combinant des molécules photosensibles et de l'ADN ou dérivés d'ADN : émergence des intercalants d'ADN photosensibles.....31

CHAPITRE A.1- La chimie des interactions intermoléculaires : de la reconnaissance moléculaire à l'auto-assemblage supramoléculaire

La chimie moléculaire organique et organométallique a pour objectif de lier deux ou plusieurs molécules entre elles par une ou plusieurs liaisons covalentes. Ainsi, les molécules sont attachées les unes aux autres par une mise en commun d'électrons de valence formant un pont, appelé liaison covalente. La chimie supramoléculaire, connue comme la « chimie au-delà de la molécule » se focalise sur l'utilisation des interactions non covalentes pour lier des molécules entre elles afin de fabriquer des édifices complexes et fonctionnels allant de l'échelle moléculaire à l'échelle micrométrique.

En 1987, le prix Nobel de chimie a été décerné aux trois pionniers de cette discipline, Donald J.Cram, Jean Marie Lehn et Charles J. Pedersen pour « leur développement et utilisation de molécules avec des interactions spécifiques et hautement sélectives ». Ceci ouvre la voie à une nouvelle gamme de phénomènes moléculaires divisés chronologiquement en deux volets : la reconnaissance moléculaire, souvent identifiée à la chimie hôte-invité, et l'autoassemblage supramoléculaire, parfois dénommée auto-organisation.

Ce sont tout d'abord les phénomènes de reconnaissance moléculaire qui ont permis de manipuler la matière afin de former des autoassemblages complexes. En 1967, Pedersen montrait pour la première fois que des sels de métaux alcalins pouvaient être solubilisés dans des solvants organiques en présence d'un éther couronne. Ainsi, la notion de complexe hôte-invité est née, concept reposant sur l'association entre un récepteur (hôte) et un substrat cible (invité) qui se reconnaissent sélectivement par des interactions spécifiques. La reconnaissance moléculaire s'est également étendue aux molécules qui par affinité et orientation peuvent s'assembler spontanément et former des assemblages discrets ou infinis plus ou moins complexes par autoassemblage supramoléculaire. Ces concepts fondamentaux ont permis d'expliquer les systèmes chimiques biologiques du monde vivant tels que les interactions drogue-récepteur basées sur la reconnaissance moléculaire ou la maladie d'Alzheimer associée à l'agrégation d'assemblages hiérarchiques de fibrilles de β -amyloïde formées par auto-assemblage.

La plupart des architectures formées par reconnaissance ou auto-assemblage sont programmées pour exercer une fonction tel un instrument que l'on nommera matériau moléculaire. En 2016, le prix Nobel de Chimie est décerné aux chimistes Jean Pierre Sauvage, Sir James Fraser Stoddart et Bernard L.Feringa pour leurs travaux pionniers sur l'utilisation des concepts de la chimie supramoléculaire pour fabriquer des édifices fonctionnels et pilotables appelés machines moléculaires exploitant la réversibilité des interactions intermoléculaires.

La chimie supramoléculaire a pour objectif de trouver des moyens de faire interagir spontanément des molécules entre elles par des interactions spécifiques et réversibles. Basée sur des phénomènes de reconnaissance moléculaire et d'autoassemblage supramoléculaires, cette science vise à assembler entre elles des molécules afin de former des structures complexes, fonctionnelles et dynamiques. Cette approche est basée sur l'assemblage de petites briques moléculaires afin de former des superstructures nano- voire micrométriques et constitue l'approche bottom-up à l'origine des nouveaux matériaux moléculaires intelligents¹⁰.

Plan :

1) Les interactions non covalentes.....	19
a) Les interactions par liaison hydrogène et halogène.....	19
b) Les interactions électrostatiques.....	19
c) Les interactions de Van der Waals.....	19
d) Les interactions π	20
e) Les interactions hydrophobes.....	20
2) Des interactions non covalentes aux édifices moléculaires : reconnaissance moléculaire et autoassemblage supramoléculaire.....	21
a) Reconnaissance moléculaire.....	21
b) Autoassemblage supramoléculaire.....	22
α) Autoassemblages biologiques.....	23
β) Autoassemblages synthétiques.....	24
3) Des édifices moléculaires aux systèmes stimulables.....	26
a) Molécules entrelacées.....	27
b) Matériaux moléculaires.....	28
4) Conclusion.....	29

1) Les interactions non covalentes

Les phénomènes de reconnaissance moléculaire et d'auto-assemblage supramoléculaire sont basés sur des interactions non covalentes réversibles, spécifiques et spontanées entre les briques élémentaires mises en jeu.

a) Les interactions par liaison hydrogène et halogène

L'interaction par liaison hydrogène est à l'origine de la stabilité d'une diversité d'assemblages supramoléculaires dû à sa directionnalité. Il s'agit d'une interaction dynamique entre un atome électronégatif porteur d'un ou plusieurs doublets non liants (le plus souvent l'oxygène O ou l'azote N) et un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif. Il s'agit d'une interaction de type dipôle-dipôle étant donné que l'hydrogène est porteur d'une charge partielle positive et l'atome électronégatif porteur d'une charge partielle négative. Cette interaction est fondamentale pour la structure et conformation des macromolécules biologiques (ADN, protéines) mais également synthétiques (polymères). L'énergie de cette interaction est de l'ordre de 200 kJ.mol^{-1} . Récemment, l'interaction par liaison halogène a permis également le développement d'assemblages moléculaires fonctionnels. Cette interaction a lieu entre un atome d'halogène et un atome électronégatif ayant une forte densité électronique. La figure 1.1 donne un exemple de liaisons hydrogène et halogène formées entre molécules.

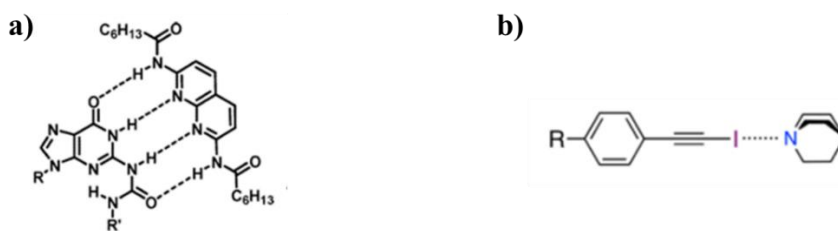


Figure 1.1- a) Réseau de liaisons hydrogène entre des dérivés de pyridines¹¹. b) Liaison halogène entre un dérivé iodé et la quinuclidine¹¹.

b) Les interactions électrostatiques

Cette interaction a lieu entre deux entités chimiques chargées obéissant à la loi de Coulomb. Elles sont non directionnelles et sont attractives pour des espèces de charges opposées et répulsives pour des espèces de même charge. L'énergie de cette interaction varie de 100 à 400 kJ.mol^{-1} et peut être parfois comparable à celle de la liaison covalente.

c) Les interactions de Van der Waals

Les interactions de Van der Waals dérivent d'un potentiel interatomique appelé potentiel de Lennard Jones. Ce sont des interactions attractives qui sont basées sur l'interaction électrostatique entre deux dipôles (permanent, induit ou instantané) et sont parfois appelées interactions dipolaires. Elles se divisent en trois catégories :

l'interaction de Keesom, Debye et London. L'interaction de Keesom a lieu entre deux dipôles permanents (molécules polaires). Il s'agit d'une interaction d'orientation car les dipôles s'alignent dans l'espace de manière à favoriser l'interaction électrostatique attractive entre charges de signe opposé. L'interaction de Keesom est d'autant plus forte que les molécules ont un fort moment dipolaire. L'interaction de Debye a lieu entre un dipôle permanent (molécule polaire) et un dipôle induit (molécule apolaire). Le dipôle permanent crée un champ électrostatique dans l'espace qui va induire un moment dipolaire induit sur la molécule apolaire. Il s'agit d'une interaction d'induction. L'interaction de Debye est d'autant plus forte que la molécule apolaire est polarisable. L'interaction de London est l'interaction universelle et a lieu entre tous les dipôles. Plus précisément, il s'agit d'une interaction entre un dipôle instantané et un dipôle induit (deux molécules apolaires par exemple). A un instant t , le barycentre des charges négatives n'est plus symétrique. Ainsi, le nuage électronique se réorganise de façon à créer un dipôle instantané (par exemple dans une molécule apolaire ne possédant pas de moment dipolaire initial). Ce dipôle instantané va à son tour pouvoir induire un moment dipolaire sur les molécules environnantes et créer un dipôle induit. Ainsi les dipôles instantané et induit pourront interagir. Il s'agit d'une interaction de dispersion. L'énergie des interactions de Van der Waals varie de 10 à 50 kJ.mol⁻¹.

d) Les interactions π

Cette interaction, appelée parfois π - π stacking a lieu entre des molécules possédant des cycles aromatiques capables d'interagir via leur système d'orbitales π . Ce sont des interactions directionnelles et leur énergie est de l'ordre de 50 kJ.mol⁻¹. Une variante de cette interaction concerne l'interaction π -cation qui se développe entre un système π riche en électrons (base de Lewis) et un cation pauvre en électrons (acide de Lewis) (Figure 1.2).

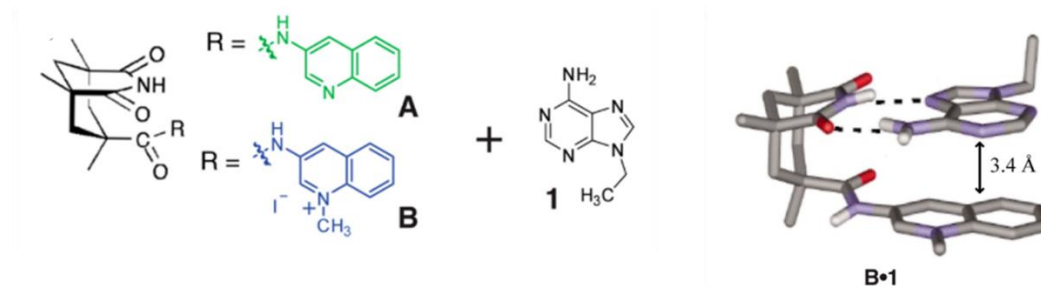


Figure 1.2- Structure cristalline du complexe supramoléculaire B.1 résultant d'interactions π entre les cycles aromatiques et d'interactions π -cation entre les molécules B et 1¹¹.

e) Les interactions hydrophobes

L'effet hydrophobe résulte de l'exclusion de molécules d'eau lorsque ces dernières sont en présence de solutés apolaires. Il peut résulter de deux contributions thermodynamiques : enthalpique et entropique. D'un point de vue entropique, quand les molécules hydrophobes sont solvatées par l'eau, ces dernières sont entourées de molécules d'eau. Ainsi, si le soluté est petit, le réseau de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau n'est

pas rompu. Néanmoins, les molécules d'eau dans la sphère de solvation sont plus figées que dans l'eau libre et elles ont moins d'espace disponible d'où une contribution majoritairement entropique. En revanche, si le soluté hydrophobe est plutôt gros, les molécules vont avoir tendance à s'agréger et former des clusters : ainsi l'espèce solvatée devient plus grosse et le réseau de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau est nécessairement rompu d'où une contribution enthalpique plus importante.

La diversité des interactions non covalentes a ainsi été utilisée par les chimistes pour développer les concepts de reconnaissance moléculaire et d'auto-assemblage supramoléculaire.

2) Des interactions aux édifices moléculaires : reconnaissance moléculaire et autoassemblage supramoléculaire

a) Reconnaissance moléculaire

La reconnaissance moléculaire d'un substrat (invité) par un récepteur moléculaire (hôte) relève de la chimie *host-guest* ou hôte-invité. Elle résulte de l'association sélective et spécifique entre un récepteur et un substrat pour former un complexe hôte-invité. Cette association repose sur le principe de complémentarité stérique : la structure moléculaire et spatiale de l'hôte doit être adaptée à celle de l'invité, favorisant une organisation favorable des différents sites d'interaction et de liaison entre les deux molécules. La pré-organisation de l'hôte pour l'invité permet ainsi de favoriser thermodynamiquement et cinétiquement la reconnaissance entre les deux molécules et de minimiser les coûts énergétiques de changement de structure conformationnelle. Une série de différents types de récepteurs moléculaires a été développée depuis les années 1950 allant de simples complexes à des cages moléculaires (Figure 1.3).

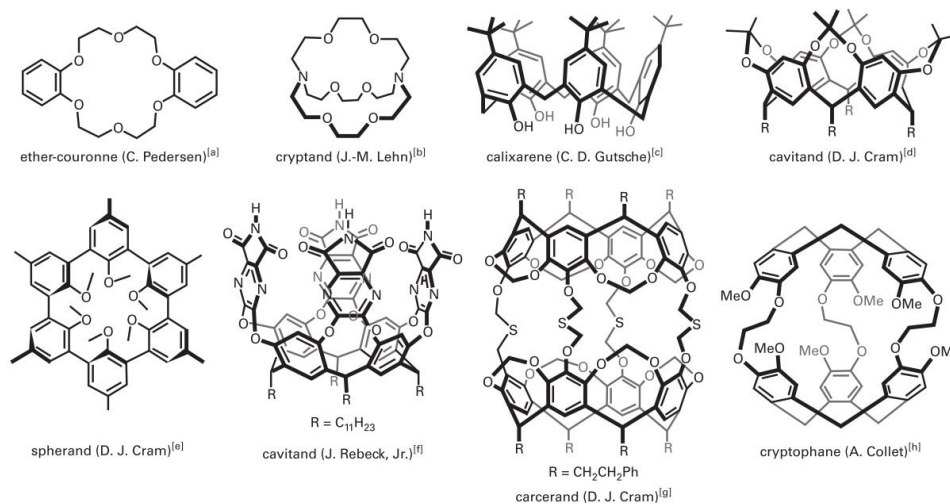


Figure 1.3-Diversité de molécules hôtes servant de base à la synthèse de systèmes *host-guest*¹².

Par la multiplicité des interactions intermoléculaires bien définies dans l'espace entre le substrat et le récepteur, les molécules hôtes permettent la reconnaissance d'une diversité de substrats (atomes ou molécules neutres, cationiques et anioniques) de manière sélective et spécifique (Figure 1.4).

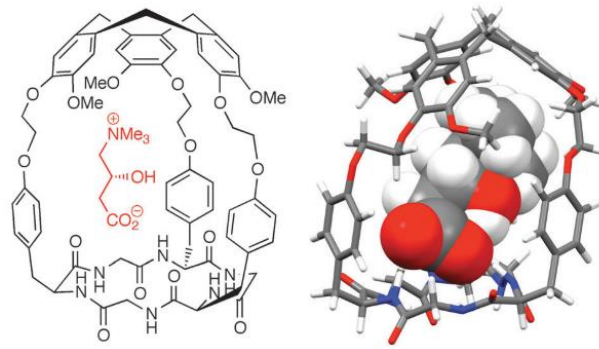


Figure 1.4- Complexe entre le neurotransmetteur taurine zwitterionique et un hémicryptophane dont l'organisation permet une complexation favorable par interaction π -cation et liaisons hydrogène N-H...O¹³.

Les systèmes *host-guest* sont le plus souvent limitées à des petites structures à l'échelle moléculaire. Ainsi, les chimistes ont tiré profit du concept de reconnaissance moléculaire pour aller vers des structures plus complexes et plus étendues appelées autoassemblages supramoléculaires.

b) Auto-assemblage supramoléculaire

La matière complexe du monde vivant et non vivant s'est formée spontanément par auto-organisation et l'organisation de la matière s'effectue à travers les interactions entre unités élémentaires qui contiennent chacune l'information chimique et physique de reconnaissance. L'auto-assemblage supramoléculaire est défini comme l'interaction et l'organisation spontanées, sélectives, réversibles et directionnelles de molécules dans l'espace par des interactions non covalentes en une structure étendue et hiérarchisée. Tel que décrit par Jean-Marie Lehn lors de ses leçons à la *Chaire de chimie des interactions intermoléculaires* du Collège de France, ce processus s'apparente à un « système programmé » et présente trois étapes principales :

- la reconnaissance moléculaire entre les composants conduisant à la sélection des composants adéquats et leur association spécifique
- la croissance par addition progressive de nouveaux composants
- la terminaison quand la structure finale est obtenue

α) Auto-assemblages biologiques

Il existe une variété d'autoassemblages supramoléculaires ordonnées dans le monde vivant et leur auto-organisation en une structure bien précise permet de réguler leurs fonctions biologiques.

La protéine β -amyloïde ($A\beta$) (existant sous la forme 1-40 ou 1-42) est un peptide présent chez l'homme et son auto-organisation est corrélée à certaines pathologies telles que la maladie d'Alzheimer. En effet, ces petites protéines peuvent s'agréger les unes aux autres et former des plaques dans les synapses du cerveau ce qui conduit à un dérèglement du système nerveux central. Les fibrilles de $A\beta$ sont un exemple d'assemblages supramoléculaires biologiques organisées dont la croissance par les interactions non covalentes permet de former des fibres de 20 nm (Figure 1.5)¹⁴.

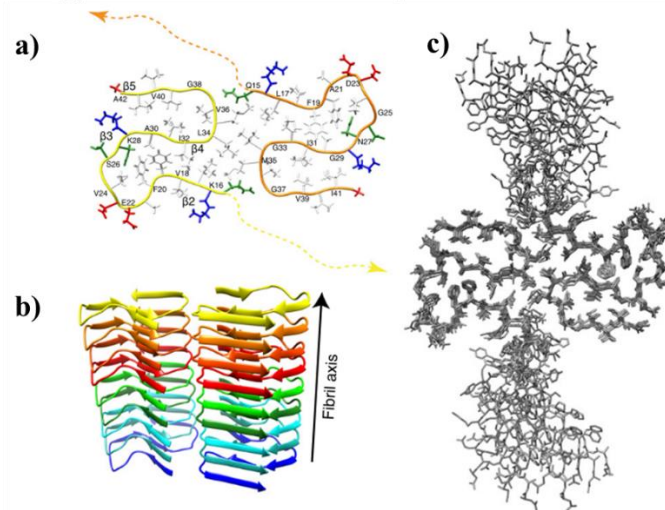


Figure 1.5- Structure 3D des fibrilles A β (1-42). **a)** Structure 3D d'une unité de fibrille A β . En jaune et orange sont représentées deux squelettes symétriques. Les r sides 1-14 sont représentés une ligne pointillée. Les chaines chargées positivement sont en rouge, négativement en bleu, les r sides hydrophobes en blanc et les r sides polaires en vert. Chaque second r sidue est nommé avec une lettre d'un acide amin ¹⁴. **b)** Structure en rubans des fibres amyloides assemblées en neufs unités d'A β ¹⁴. **c)** 10 conformères ayant un rmsd (root mean square deviation) de 0,89  ¹⁴.

Le virus de la mosaïque du tabac (TMV) constitue l'un des premiers virus découverts à la fin du XIXème siècle. Ce dernier s'autoorganise à l'échelle micrométrique en petits bâtonnets qui ont été capables d'être observés par microscopie à transmission électronique. En 1982, le prix Nobel de chimie est décerné à Aaron Klug pour son développement de la microscopie électronique cristallographique et ses découvertes sur la structure des complexes protéines-acides nucléiques. Le virus TMV est composé de 2130 protéines identiques autour d'un brin d'ARN composé de 6400 nucléotides et s'organisent par auto-assemblage supramoléculaire en bâtonnets par empilement de disques nucléoprotéiques. Il infecte de nombreuses espèces de plantes telles que le tabac *Nicotiana tabacum*¹⁵ (Figure 1.6).

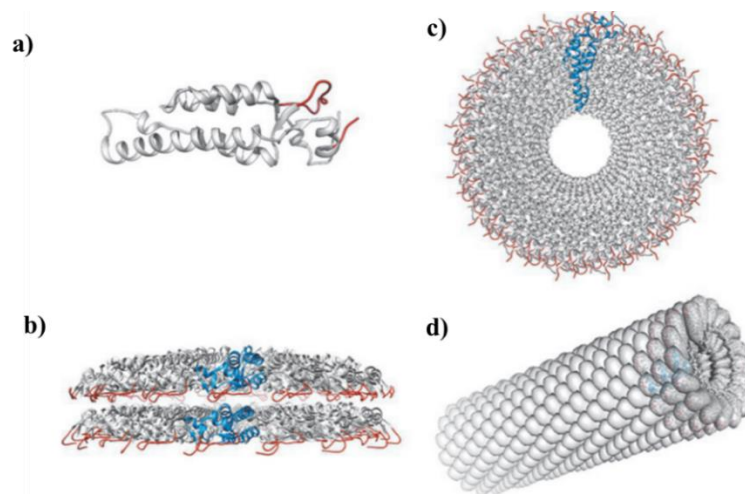


Figure 1.6-a) Structure tertiaire de l'unité de la *coat protein* qui est cod e par l'ARN du TMV¹⁵. **b)** Structure de deux unités de disques empilés du TMV¹⁵. **c)** Vue de dessus de l'hélice nucl oprot ique auto-assembl e¹⁵ **d)** Vue de profil du ruban de TMV auto-assembl ¹⁵.

β) Auto-assemblages synthétiques

En tirant profit des interactions non covalentes spécifiques et sélectives entre les molécules, les chimistes ont été capables de synthétiser une diversité d'assemblages complexes par reconnaissance moléculaire et autoassemblage allant des assemblages inorganiques à organiques.

Les liaisons de coordination entre un centre métallique et des ligands organiques sont une forme d'auto-assemblage supramoléculaire basé sur des interactions non purement covalentes. En choisissant des ligands avec des sites de coordination bien agencés et des métaux de géométrie spécifique, des complexes metal-ligand peuvent se former qui à leur tour peuvent s'assembler avec eux-même par autoassemblage donnant naissance à des structures hiérarchiques complexes et contrôlées stériquement et conformationnellement. Un des exemples pionniers est la formation des hélices en présence de ligands et métaux de transition. Ainsi, sur la figure 1.7, est représentée l'hélice trinuécléaire obtenue par coordination entre les ions Ni^{2+} et le ligand trisbipyridine. Le complexe unitaire entre les ions nickel et l'unité bipyridine s'assemble en hélice pour favoriser la coordination des autres unités bipyridine du ligand¹⁶.

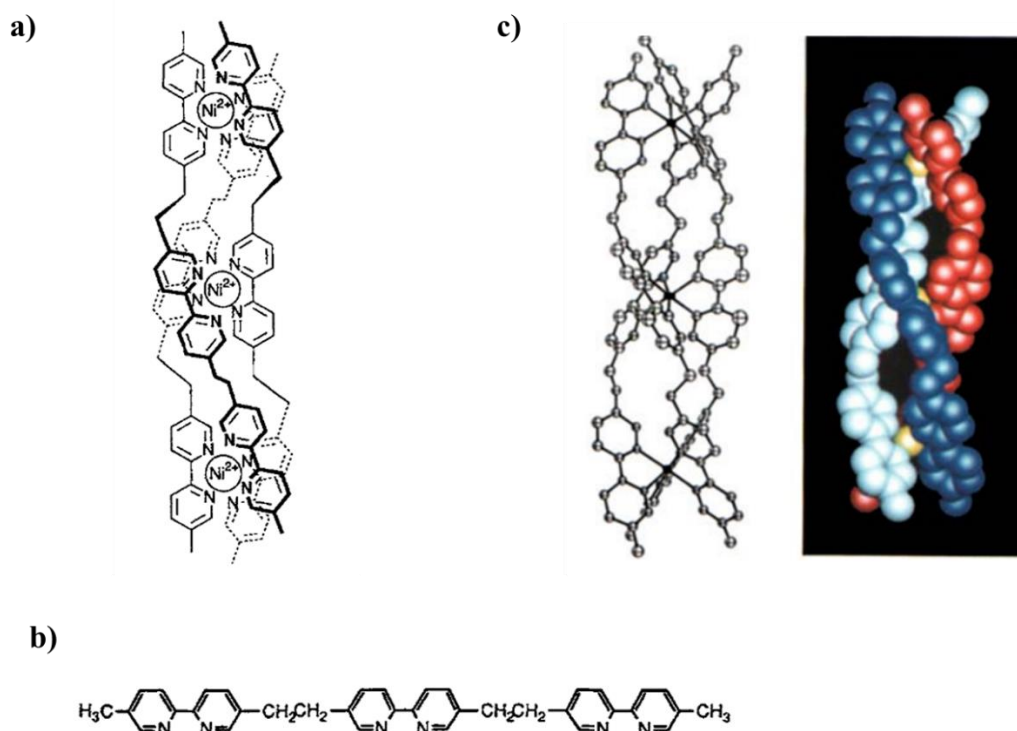


Figure 1.7- a) Hélice trinuécléaire formé par assemblage entre les ions Ni^{2+} et le ligand trisbipyridine¹⁶. b) Structure cristalline de la triple hélice auto-assemblée¹⁶. c) Structure moléculaire du ligand possédant l'unité coordinante bipyridine¹⁶.

De même, en exploitant les sites de coordination de ligands spécifiques, les chimistes ont été capables de développer des structures plus complexes tels que des matériaux poreux dépassant l'échelle moléculaire appelés *metal-organic framework* (MOFs). Par exemple, en choisissant un ligand porphyrine possédant 4 extrémités carboxylates bidentates pouvant complexer chacune un centre métallique, des structures 3D à base

de zinc et de porphyrine ont pu être synthétisées par autoassemblage et polymérisation supramoléculaire (Figure 1.8)^{17,18}.

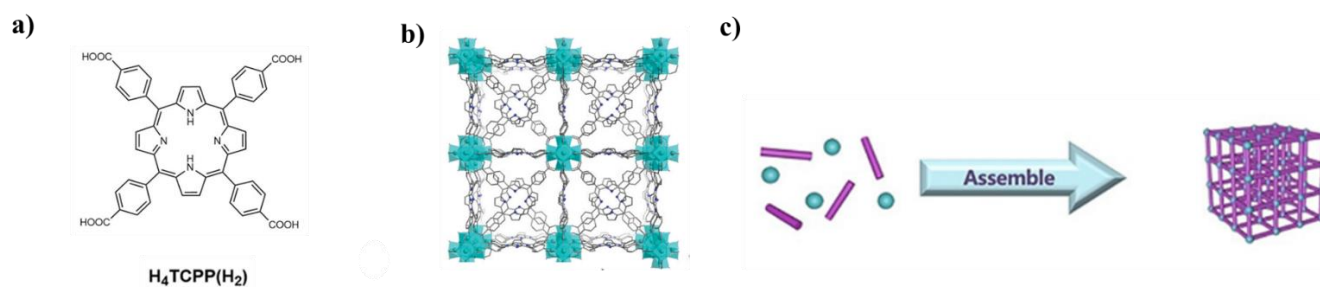


Figure 1.8 – a) Structure moléculaire du ligand porphyrine¹⁸. b) Structure 3D du metal-organic framework MOF-525 obtenu par assemblage entre un ligand porphyrine et des ions Zn^{2+} ¹⁷. c) Strategy *one pot* d'autoassemblage supramoléculaire d'un MOF (en violet est représenté le ligand organique et en bleu est représenté le centre métallique)

17

En plus des assemblages inorganiques formés essentiellement par reconnaissance moléculaire entre des centres métalliques et des ligands organiques de coordination spécifique, une variété d'assemblages purement organiques a pu être développée depuis l'avènement des concepts de la chimie supramoléculaire. Le rôle des interactions par liaison hydrogène et π -stacking est très important dans la construction et la croissance de ces assemblages. En 2002, l'assemblage de molécules possédant une structure alternant des groupements donneurs et accepteurs de liaison hydrogène a permis la synthèse de nanotubes Rosette nanométriques par une répartition intelligente des liaisons hydrogène dans l'espace (Figure 1.9.a, b, c). Sur la figure 1.9.b) est représentée l'unité de base du nanotube obtenue qui ensuite par interactions π permet de former la structure hiérarchique Rosette¹⁹.

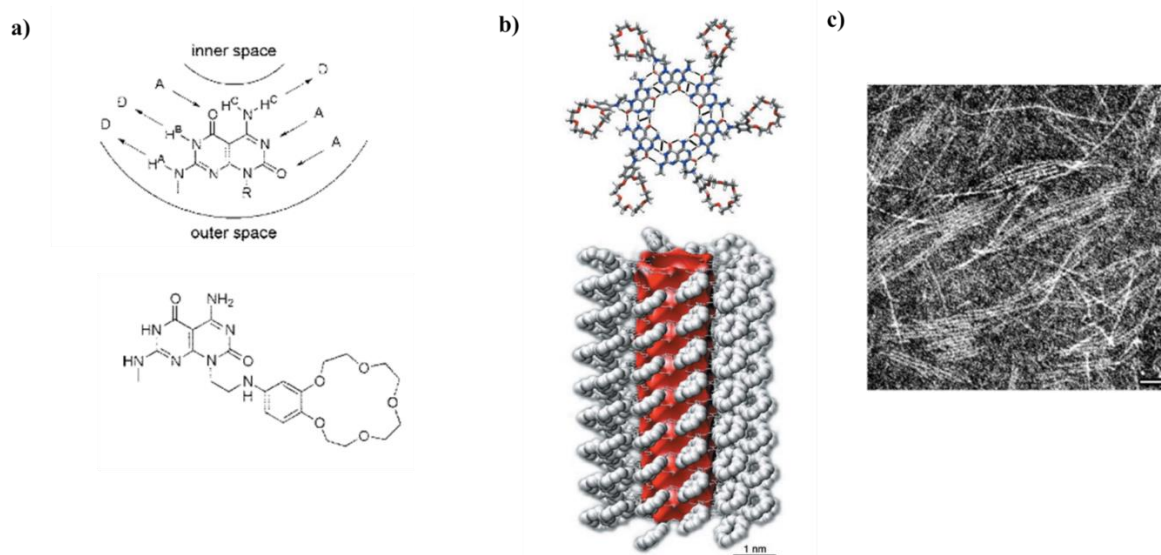


Figure 1.9- a) Structure moléculaire du ligand accepteur (A) et donneur (B) de liaisons hydrogènes¹⁹ b) Unité de base du nanotube de Rosette obtenu par reconnaissance moléculaire spécifique de liaisons hydrogènes intermoléculaires¹⁹ c) Observation au microscope électronique à transmission des nanotubes de Rosette (échelle : 40 nm)¹⁹

3) Des édifices moléculaires aux systèmes stimulables

La compréhension fine ainsi que la manipulation adaptée des interactions non covalentes a permis de synthétiser une variété d'assemblages par reconnaissance moléculaire ou auto-organisation. Etant donné la réversibilité des interactions mises en jeu, les chimistes ont utilisé les différents concepts de la chimie supramoléculaire afin de fabriquer des assemblages fonctionnels et dynamiques appelés machines moléculaires. En 2016, le prix Nobel de chimie est attribué à Jean Pierre Sauvage, Sir James Fraser Stoddart et Bernard L.Feringa pour leurs travaux de recherche sur le développement des machines moléculaires. Lorsqu'un assemblage est formé, ce dernier peut être perturbé par un apport d'énergie ou un stimulus qui va forcer le système à reconfigurer ses interactions de façon à atteindre un état stable. Ainsi, ces assemblages fonctionnels sont appelés machines car ils sont capables de réagir de manière fonctionnelle et contrôler et notamment d'effectuer des mouvements sous l'action de différentes perturbations extérieures physiques (lumière, champ magnétique,...) ou chimiques (pH, oxydoréduction,...).

a) Molécules entrelacées

Les molécules entrelacées sont une gamme de molécules liées entre elles par des interactions non covalentes selon un agencement spatial bien particulier. Elles ont été développées par Stoddart et ses collègues et constituent les toutes premières machines moléculaires fonctionnelles et dynamiques appelées caténanes et rotaxanes²⁰ (Figure 1.10).

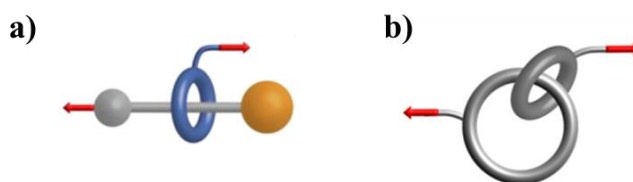


Figure 1.10 – Représentation schématique d'un a) Rotaxane²¹ b) Catenane²²

En 1994, Stoddart parvient à contrôler le mouvement de translation d'un anneau sur un rotaxane (Figure 1.11.a)²⁰. Au départ, le macrocyle (anneau) interagit avec les noyaux aromatiques liés aux amines riches en électrons. En diminuant le pH, les amines sont protonées et par répulsion électrostatique, le macrocyle interagit avec les noyaux aromatiques liés aux oxygènes riches en électrons se situant à l'autre extrémité de l'axe du rotaxane. Ainsi, grâce au pH, l'anneau se déplace le long de l'axe moléculaire et les premières machines moléculaires sont nées²³. De même, Stoddart et ses collègues ont développé un caténane à base de macrocyles coordonnés à un ion Cu^{2+} dont l'un des anneaux est capable d'effectuer des mouvements de rotation par un cycle d'oxydation et réduction des ions cuivre. Le caténane est composé de deux anneaux bien distincts. Le premier possède un seul site de coordination (ligand phénanthroline bidente) et le deuxième en possède deux (ligands phénanthroline bidente et terpyridine tridente). Ainsi, lorsque le cuivre est au degré d'oxydation +II, il est pentacoordiné et l'anneau s'arrange de façon à maximiser sa coordination (par le phénanthroline de

l'anneau 1 et la terpyridine de l'anneau 2 mobile). A l'inverse, lorsque le cuivre est au degré d'oxydation +I, il est de géométrie tétraédrique et l'anneau tourne de façon à favoriser une coordination de 4 (par la phénantroline de l'anneau et de l'anneau 2 mobile) (Figure 1.11.b)²⁴.

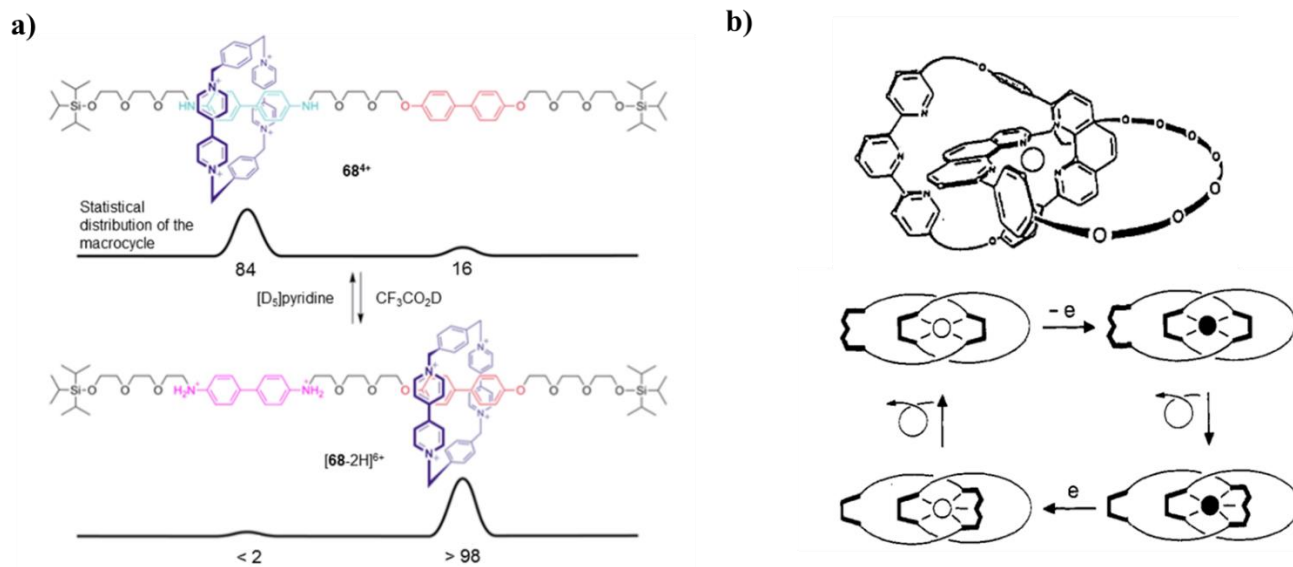


Figure 1.11- a) Navette moléculaire le long de l'axe d'un rotaxane dont le mouvement de translation est contrôlé par le pH²⁰. b) Mouvement de rotation d'un caténane par réduction et oxydation électrochimique du centre métallique de cuivre Cu (le rond blanc représente Cu(I) et le rond noir représente Cu(II))²⁴.

b) Matériaux moléculaires

Le développement de ces machines moléculaires a ouvert la voie à la synthèse et la conception d'architectures fonctionnelles beaucoup plus complexes et réagissant dynamiquement à diverses perturbations. L'objectif est de fabriquer des matériaux intelligents possédant des fonctions nées de l'autoassemblage supramoléculaire ouvrant la voie au domaine de la science des matériaux moléculaires utilisées dans de nombreux domaines tels que l'électronique, la photonique, la catalyse ou encore le magnétisme.

L'électronique moléculaire a pour but d'utiliser les molécules organiques ou inorganiques afin de fabriquer des conducteurs moléculaires. Sur la figure 1.12.a est représentée une stratégie d'autoassemblage de complexes zinc-porphyrine en structures 1D tubulaires ou 2D en feuillets. Les auteurs ont montré que cette stratégie d'autoassemblage un transport de charge très efficace en électronique moléculaire tirant profit des interactions π entre les cycles aromatiques²⁵. De même, le stockage d'information passe par la compréhension fondamentale des propriétés magnétiques de la matière. L'auto-assemblage de centres magnétiques actifs a permis de développer des structures à transition de spin, capable de changer d'états magnétiques sous l'influence de la température par exemple. Ainsi, en 2005, des auteurs ont montré que l'autoassemblage supramoléculaire d'ions Fe^{2+} avec un ligand terpyridine ditopique a permis de fabriquer un polymère de coordination par complexations successives du métal et du ligand. Ce dernier est mis en contact avec un surfactant amphiphile (dihexadecyl phosphate) qui stabilise l'assemblage. Le chauffage de ce système conduit à la fusion des chaînes alkyl qui va

déstabiliser les sites de coordination métal-ligand et donc réduire le champ cristallin du complexe qui devient faible. Ainsi, l'assemblage passe d'un état diamagnétique et paramagnétique et subit une transition bas spin-haut spin thermo-induite et réversible (Figure 1.12.b)²⁶. La reconnaissance moléculaire a également permis de fabriquer des capteurs photochimiques et fluorescents. Sur la figure 1.12.c est représentée la stratégie de capteur on-off de fluorescence. Lorsque la molécule invitée entre dans le récepteur hôte, celle-ci perd sa capacité de fluorescence par confinement dans la cavité. Lorsqu'un analyte ayant une meilleure affinité et spécificité avec la molécule hôte est ajoutée au système, ce dernier réagit de façon à atteindre un état d'équilibre plus stable et tend à complexer cet analyte. Ainsi, la molécule fluorescente est éjectée de la cavité et est capable de fluorescer à nouveau constituant un système de détection photochimique²⁷.

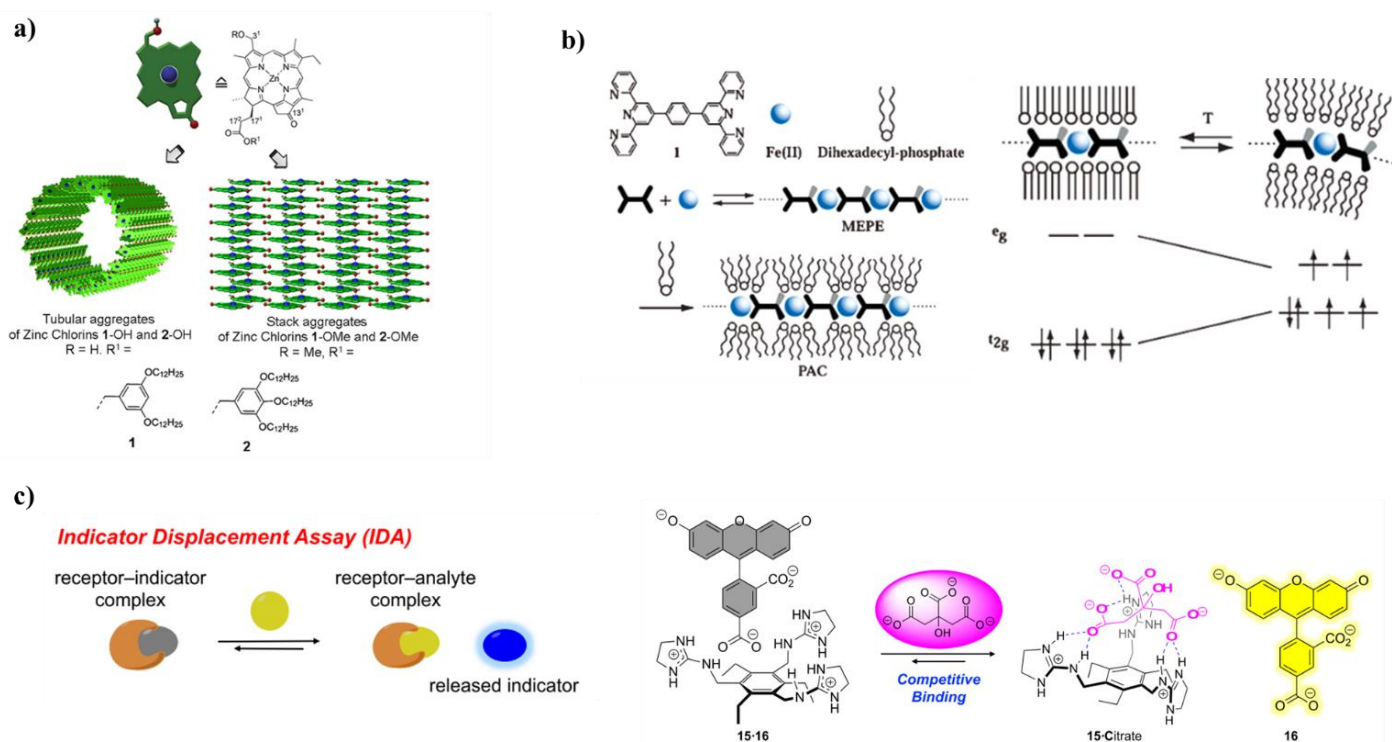


Figure 1.12- a) Auto-organisation de complexes zinc-porphyrine en structures 1D ou 2D possédant une capacité de transport de charge électronique²⁵. b) Système complexe métallo-organique/molécule amphiphile possédant une transition de spin thermo-induite²⁶. c) Capteur supramoléculaire basé sur la reconnaissance spécifique de molécules fluorescentes par des molécules hôtes²⁷.

Ainsi, en exploitant les différentes interactions non covalentes, il est possible de fabriquer des systèmes reconfigurables et dynamiques réagissant à différentes perturbations extérieures et possédant des fonctions acquises par autoassemblage supramoléculaire.

4) Conclusion

La chimie supramoléculaire (chimie au-delà de la molécule) est basée sur l'interaction non covalente spécifique et sélective entre deux ou plusieurs molécules. Ses concepts ont permis de façonner la matière de manière intelligente en assemblant les molécules entre elles par reconnaissance moléculaire et auto-organisation selon un processus spontané et séquentiel. Ces assemblages complexes présentent des fonctions inédites exploitant l'information chimique de chaque brique élémentaire de l'assemblage et sont rapidement reconfigurables lorsque l'état d'équilibre est perturbé par des stimuli physique ou chimique. Ceci a permis de développer des matériaux moléculaires fonctionnels et stimuli-répondants dans différents domaines émergents. Ces autoassemblages sont également présents à l'état naturel dans le monde du vivant et constituent une source d'inspiration pour les chimistes qui tendent à utiliser des molécules biologiques (acides nucléiques, sucres, peptides) pour fabriquer des autoassemblages supramoléculaires dynamiques. Dans le chapitre suivant, nous allons nous intéresser à une molécule biologique en particulier : l'ADN et ses dérivés.

CHAPITRE A.2- Systèmes supramoléculaires combinant des molécules photosensibles et de l'ADN ou dérivés d'ADN : émergence des intercalants d'ADN photosensibles

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une macromolécule biologique qui est le support de l'information génétique des êtres vivants. Cette macromolécule, à la structure chimique bien particulière, a été exploitée par de nombreux scientifiques comme brique de construction d'assemblages supramoléculaires stimulables. Dans ce chapitre, nous décrivons comment la structure chimique particulière et spécifique de l'ADN permet de fabriquer une diversité de structures supramoléculaires. Par la suite, nous nous focaliserons sur les approches explorées pour développer de systèmes à base d'ADN ou dérivés d'ADN photostimulables trouvant des applications allant de la biologie aux matériaux. Enfin, une nouvelle classe de molécules photosensibles, appelée intercalants d'ADN, ayant la capacité d'interagir avec la double hélice de l'ADN de manière photodépendante, sera présentée et permettra d'introduire la stratégie et les objectifs du travail de thèse.

Plan :

1) Structure chimique de l'ADN.....	33
a) Bases azotées.....	33
b) Des bases azotées au nucléotide.....	34
c) Des nucléotides à la double hélice.....	35
d) Cas de l'ARN.....	37
2) Types de systèmes supramoléculaires à base d'ADN.....	37
a) Structures basées sur l'appariement des bases Watson-Crick.....	37
b) Structures basées sur l'appariement de Hoogsten : G-quadruplexes	39
c) Structurées basées sur l'effet template de l'ADN.....	40
3) Systèmes supramoléculaires photostimulables : utilisation de molécules photosensibles.....	42
4) Systèmes à base d'ADN et dérivés d'ADN photostimulables : émergence des intercalants d'ADN photosensibles.....	44
a) ADN double brin apparié.....	44
α) Modes d'interaction de molécules photosensibles avec l'ADN double brin.....	45
β) Emergence des intercalants d'ADN photosensibles.....	46
b) ADN ou dérivé d'ADN simple brin non apparié.....	48
5) Objectif du travail de thèse.....	52

1) Structure chimique de l'ADN

a) Bases azotées

Chaque macromolécule d'ADN est composée d'unités de base moléculaire appelées bases azotées. Elles constituent les blocs moléculaires de construction de cet acide nucléique et ont été découvertes en 1896 par Albercht Kossel. Il existe quatre différentes bases azotées : adénine, thymine, guanine et cytosine. Elles sont divisées en deux catégories de molécules : les purines et les pyrimidines. Les purines sont des composés hétérocycliques qui sont constituées d'un cycle à 6 atomes accolé à un cycle à 5 atomes. Les pyrimidines sont quant à elles des composés hétérocycliques constituées uniquement d'un cycle à 6 atomes. L'adénine (A) et la guanine (G) sont des purines tandis que la cytosine (C) et la thymine (T) sont des pyrimidines. Au sein de la macromolécule d'ADN, les bases azotées sont complémentaires. Ainsi, chaque base s'associe à une autre par paires appelées paires Watson-Crick. Seules deux appariements sont possibles : A-T (ou T-A) et G-C (ou C-G). L'appariement des bases A et T se fait via deux liaisons hydrogène tandis que celui des bases G et C se fait via trois liaisons hydrogène²⁸ (Figure 2.1). Il existe un autre type de paires, appelées Hoogsten, au sein desquelles le réseau de liaisons hydrogène s'établit via les atomes d'azote des cycles à cinq atomes des purines, contrairement aux paires Watson-Crick.

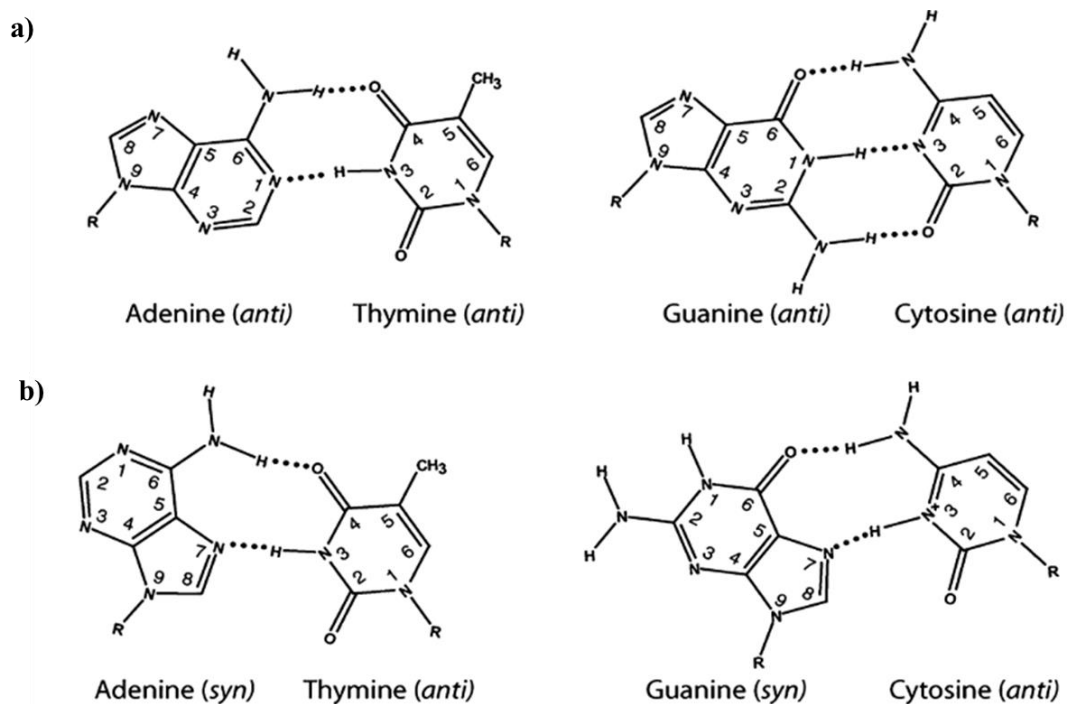


Figure 2.1-Structures moléculaires des bases azotées et appariement **a)** Watson-Crick des bases A-T et G-C par liaison hydrogène²⁸. **b)** Hoogsten des bases A-T et G-C par liaison hydrogène. *Syn* et *anti* font référence à la conformation différente des bases purines entre les paires Watson-Crick et Hoogsten²⁸.

b) Des bases azotées aux nucléotides

L'ADN est constitué d'une répétition d'un motif de base appelé nucléotide. Il est constitué d'un enchainement covalent entre un groupe phosphate, un ose et une base azotée. L'ose est un cycle à 5 atomes, appelé pentose, qui établit une liaison ester avec le groupement phosphate à partir de la fonction alcool en position 5' et une liaison N-osidique avec la base azotée à partir du carbone en position 1'. L'ose de l'ADN ne possède pas de groupe hydroxyle en position 2' d'où son nom de désoxyribose. A l'inverse, l'ose de l'ARN possède un groupe hydroxyle en position 2' d'où son nom de ribose. Chaque brin d'ADN est constitué d'une succession de nucléotides chacun liés par une liaison phosphodiester entre le groupe hydroxyle en position 3' et le groupement phosphate du nucléotide suivant. Un unique brin d'ADN est donc un polymère de nucléotides qui est constitué d'un enchainement covalent ose-phosphate. Cet enchainement au sein d'un brin est appelé séquence de nucléotides (Figure 2.2). On appelle nucléoside l'enchainement covalent d'une base azotée et d'un ribose.

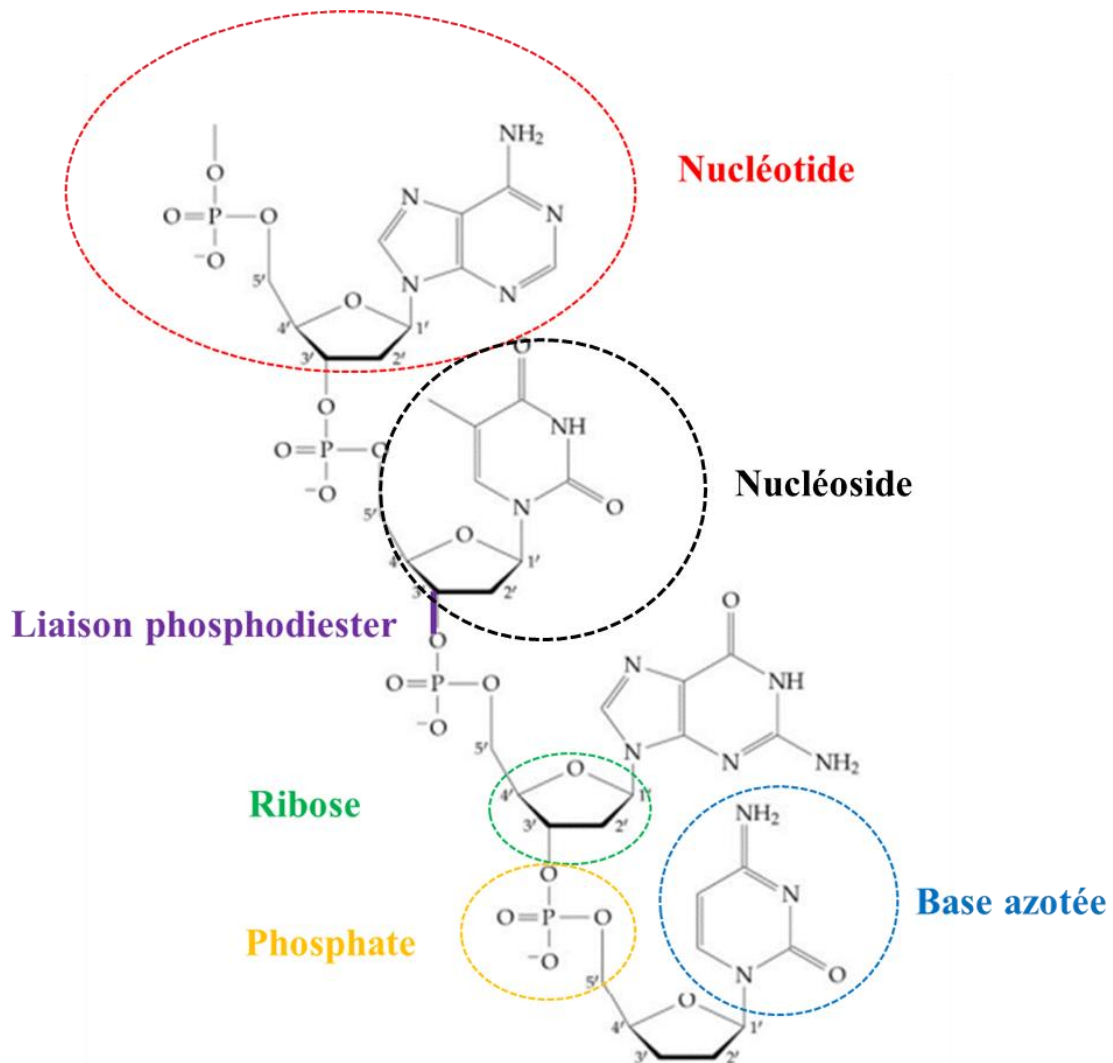


Figure 2.2- Enchainement de nucléotides chacun lié par une liaison phosphodiester au sein d'un brin d'ADN. Adapté de la référence²⁹.

c) Des nucléotides à la double hélice

En 1953, la diffraction des rayons X a permis à Francis H.C. Crick, James D. Watson, Maurice Wilkins et Rosalind Franklin de résoudre la structure de l'ADN en double hélice qu'ils publièrent officiellement à la communauté scientifique cette même année (Figure 2.3.a)^{30,31}.

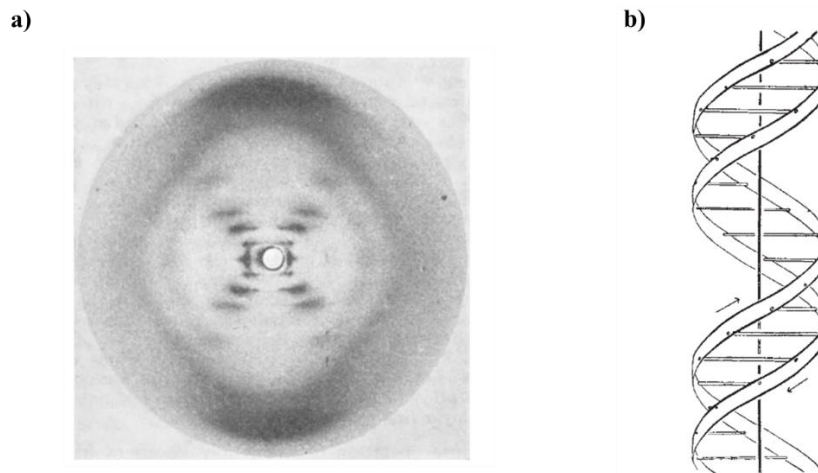


Figure 2.3-a) Cliché de diffraction des rayons X d'ADN B de thymus de veau³⁰. **b)** Structure en double hélice B de l'ADN³¹.

Une macromolécule d'ADN est composée de deux brins d'ADN, séquence de nucléotides, qui sont liés l'un à l'autre par appariement Watson-Crick des bases azotées complémentaires. Ces deux brins s'assemblent sous la forme d'une double-hélice droite appelée forme B. Les groupements phosphate de chaque brin sont situés à l'extérieur de la double hélice et les deux brins s'orientent de façon à minimiser la répulsion électrostatique entre les groupements phosphates et les interactions hydrophobes des bases azotées, l'ADN étant en milieu aqueux. Les bases azotées se situent à l'intérieur de l'hélice et font le pont entre les deux brins tandis que les pentoses font le pont entre les bases intérieures et les phosphates extérieures au sein d'un même brin. La double-hélice a un diamètre de 2 nm correspondant à la distance entre les deux brins. Elle possède un pas de 3,4 nm correspondant à l'enchaînement de dix nucléotides au sein d'un brin. La distance entre deux charges négatives consécutives est de 0,17 nm. La taille de la macromolécule d'ADN dépend du nombre de paires de bases de la séquence de nucléotides. Les ADNs génomiques peuvent varier de 1000 à des milliards de paires de base. Par exemple, l'ADN du chromosome de *E.Coli* possède $4,7 \cdot 10^6$ paires de base et sa taille est de 1,7 mm^{32,33,34}.

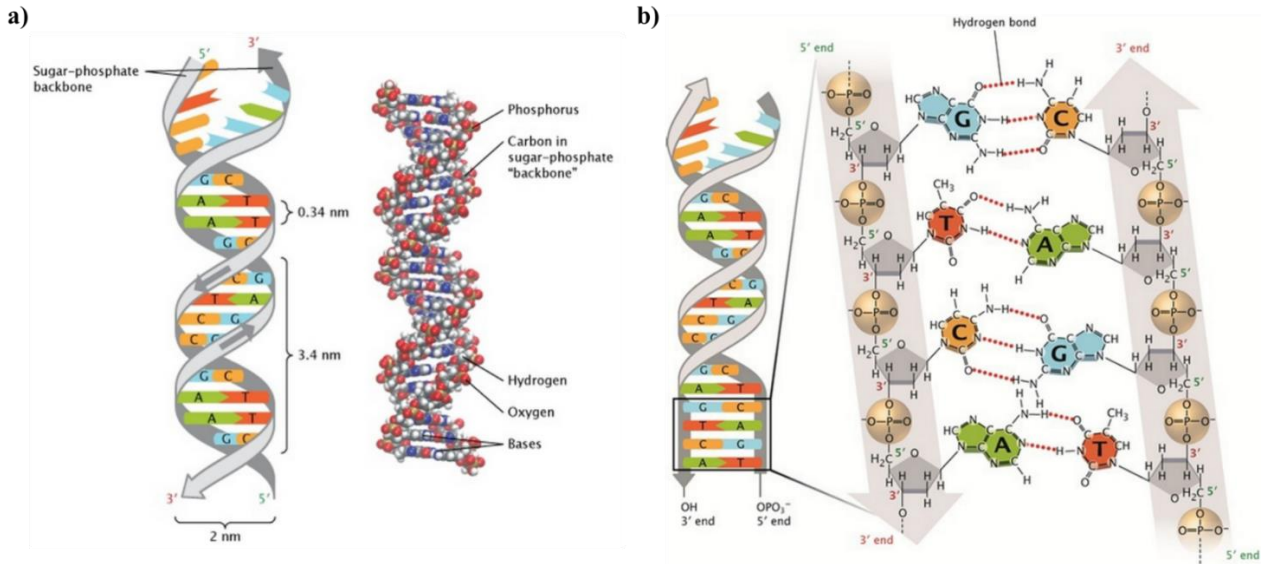


Figure 2.4-a) Représentation schématique d'un ADN B double brin de pas 3,4 nm et de diamètre 2 nm³³. **b)** Représentation schématique de la structure d'un double brin formé par l'enchaînement de nucléotides liés par pont hydrogène via l'appariement Watson-Crick.³³

d) Cas de l'ARN

L'ARN, acide ribonucléique, est un acide nucléique composé que d'un seul brin. Ce brin est, tout comme l'ADN, un enchaînement de nucléotides. Un nucléotide d'un ARN est composé d'un enchaînement covalent entre un phosphate, un ose et une base azotée. L'ose est un pentose, qui établit une liaison ester avec le groupement phosphate à partir de la fonction alcool en position 5' et une liaison N-osidique avec la base azotée à partir du carbone en position 1'. L'ose de l'ARN possède un groupe hydroxyle en position 2' ce qui n'est pas le cas de l'ose de l'ADN, d'où son nom de ribose. Un brin d'ARN est constitué d'une succession de nucléotides chacun liés par une liaison phosphodiester entre le groupe hydroxyle en position 3' et le groupement phosphate du nucléotide suivant. Les bases azotées d'un brin d'ARN sont de 4 types : l'adénine (A), la guanine (G), l'uracile (U) et la cytosine (C). Etant donné que l'ARN est sous forme de simple brin dans les cellules, le polymère a tendance à se replier sur lui-même en formant des paires Watson-Crick intramoléculaires : A-U et G-C.

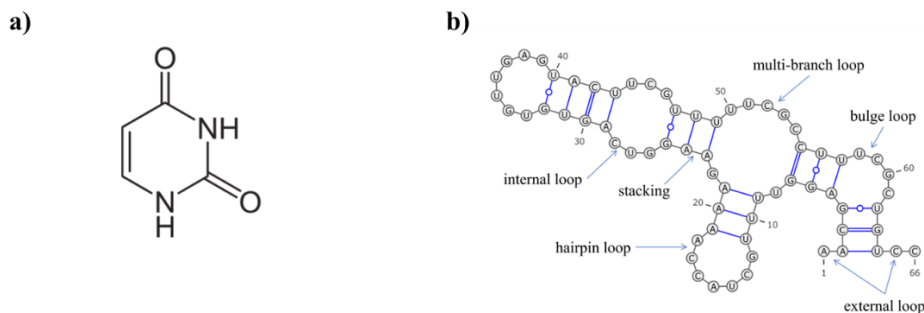


Figure 2.5-a) Structure moléculaire de l'uracile (U) **b)** Repliement par appariement des bases A-U et G-C d'un brin d'ARN³⁵

2) Types de systèmes supramoléculaires à base d'ADN

a) Structures basées sur l'appariement des bases Watson-Crick

L'ADN a permis le développement de structures supramoléculaires étendues basées sur l'appariement des bases Watson-Crick. En 1980, Seeman a proposé pour la première fois d'utiliser l'ADN comme brique de construction de nanostructures de forme et de taille bien définie, ouvrant la voie à l'ère des nanotechnologies d'ADN³⁶. Cette hybridation spécifique et sélective des bases d'ADN a permis à la communauté scientifique de développer des structures mono-, bi- et tridimensionnelles. En effet, deux séquences complémentaires d'ADN vont s'hybrider par appariement des bases azotées complémentaires. Ainsi, en choisissant des ADN simples brins de séquences bien spécifiques, ces derniers vont s'arranger dans l'espace et s'hybrider de façon à respecter l'appariement. Ceci a permis, par exemple, en 1988, de développer la *Holiday Junction* à quatre bras^{37,38} ou en 2008, des cristaux d'ADN à partir d'un motif de répétition en triangles (Figure 2.6)³⁹.

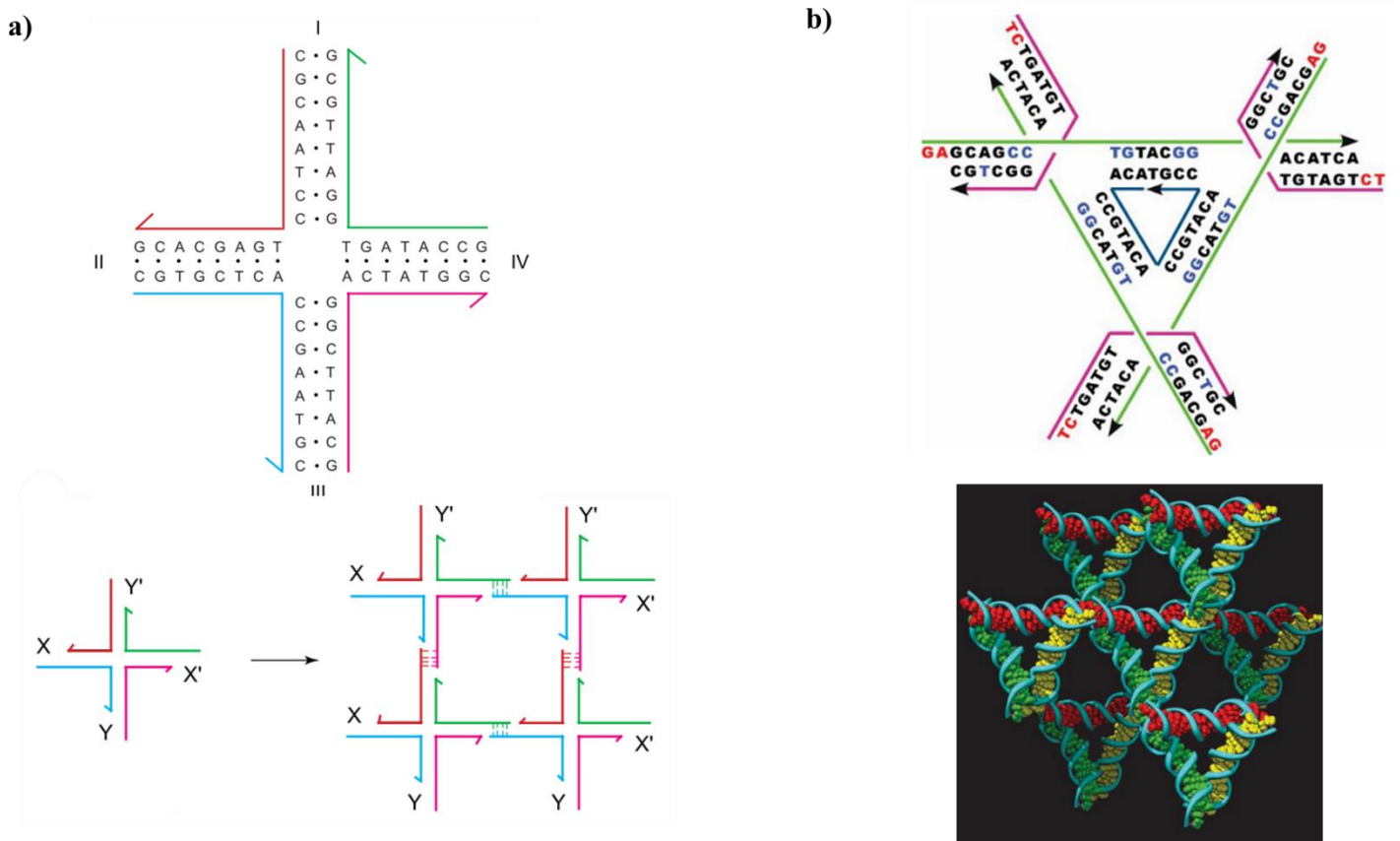


Figure 2.6-a) Appariement des bases d'ADN dans la holiday junction (les traits épais représentent un brin d'ADN) servant de jonction élémentaire pour les nanotechnologies ADN³⁸. **b)** Appariement des bases d'ADN dans un motif triangle (les traits épais représentent un brin d'ADN) permettant la formation de cristaux³⁹.

Cette stratégie d'assemblage programmable de brins d'ADN a conduit au développement fulgurant des nanotechnologies structurales à ADN et la possibilité de programmer la fabrication bottom-up contrôlée de structures aux morphologies et fonctionnalités extrêmement variées, et ce avec une résolution inégalée (Figure 2.7).⁴⁰

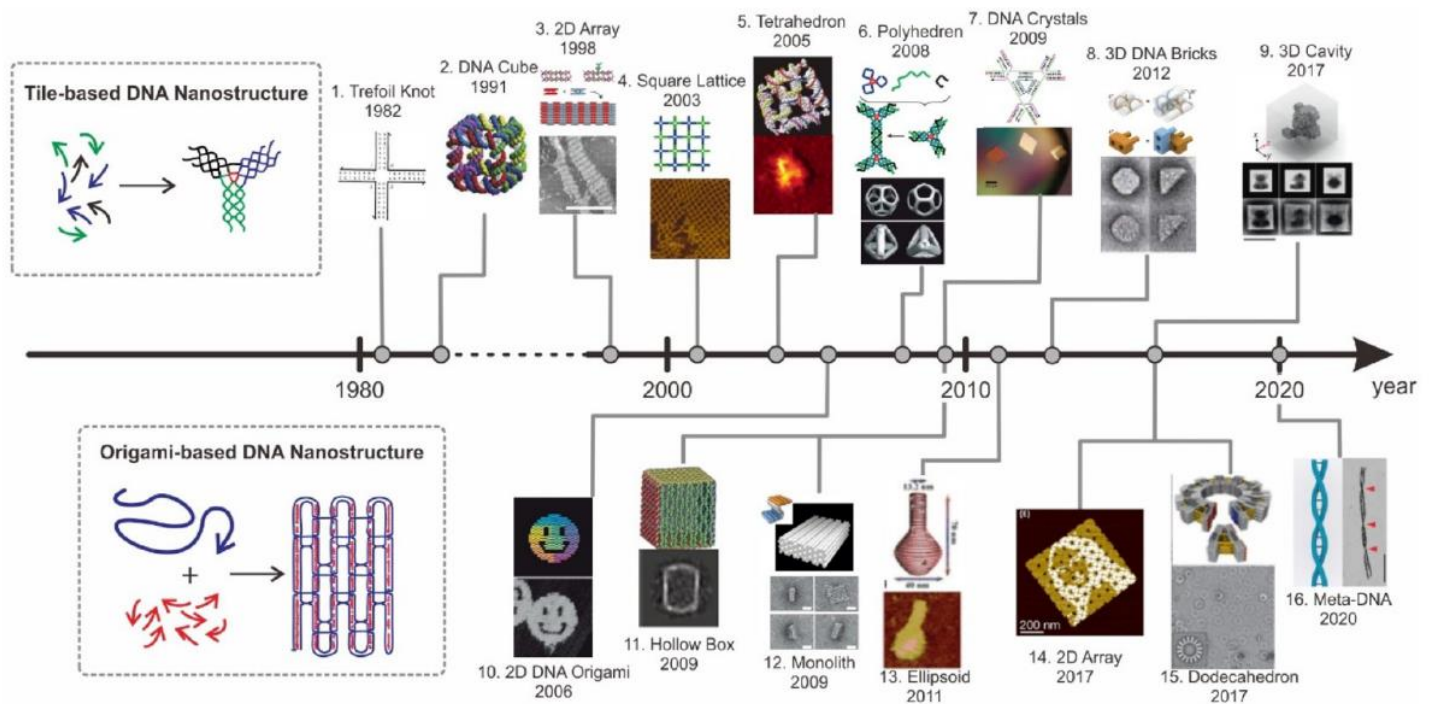


Figure 2.7- Evolution de 1980 à aujourd'hui des types d'assemblages supramoléculaires basés sur l'appariement des bases d'ADN, constituant l'ossature des nanotechnologies structurales à ADN⁴⁰.

b) Structures basées sur l'appariement de Hoogsten

Au-delà de la double hélice, les monobrs d'ADN riches en bases de guanine peuvent s'autoassembler, en présence d'un cation monovalent (K^+ , Na^+ , Li^+), en structures supramoléculaires appelées G-quadruplexes⁴¹. Les G-quadruplexes sont formés par empilement de G-quartets (Figure 2.8.a). Ces complexes sont formés par 4 guanines qui interagissent par un réseau de liaisons hydrogènes spécifiques. L'amine primaire du cycle à 6 interagit avec l'azote du cycle à 5 tandis que l'amine secondaire du cycle à 6 interagit avec l'oxygène du cycle à 6. Ce réseau est préorganisé par la présence du cation monovalent qui organise la structure en G-quartet. Cet appariement des bases guanine par liaisons hydrogène est appelé appariement de Hoogsten⁴². Un G-quadruplex est formé par l'empilement, par interaction π , des G-quartets. Il peut être intramoléculaire ou intermoléculaire. Dans le cas intramoléculaire, le G-quadruplexe est construit par l'assemblage d'un seul et unique brin d'ADN riche en bases guanine tandis que dans le cas intermoléculaire, celui-ci est construit par l'autoassemblage supramoléculaire de plusieurs brins d'ADN (Figure 2.8.b).

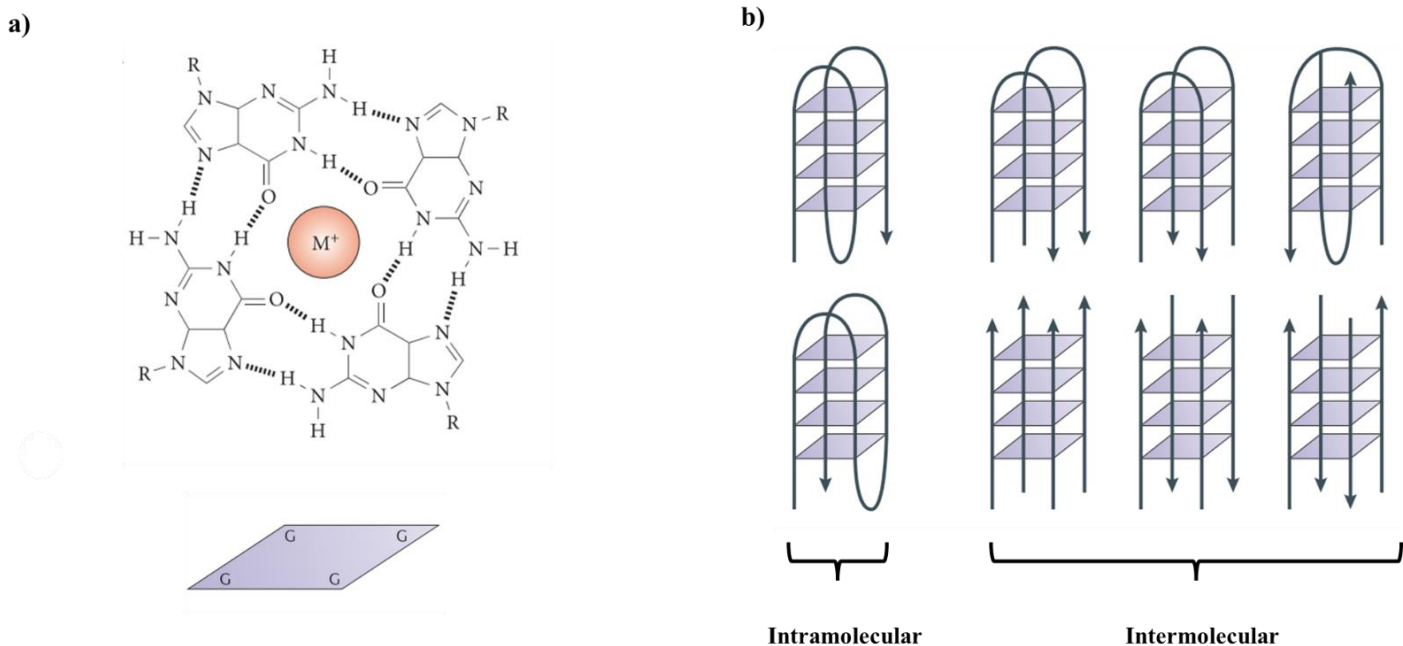


Figure 2.8-a) Structure d'un G-quartet formé par appariement de Hoogsten. M^+ représente le cation central ⁴². **b)** Structure supramoléculaire d'un G-quadruplex intramoléculaire construit à partir d'un brin d'ADN et intermoléculaire construit à partir de plusieurs brins d'ADN⁴².

c) Structures basées sur l'effet template de l'ADN

Certains travaux se sont intéressés à d'autres types d'assemblages qui ne sont pas formés par l'appariement Watson-Crick ou Hoogsten des bases d'ADN mais l'interaction entre un brin d'ADN et une molécule synthétique conjuguée pouvant interagir avec les bases d'ADN. L'ADN est alors utilisé comme un template d'organisation de molécules organiques pouvant interagir avec cette dernière par interactions π , électrostatiques ou liaisons hydrogène. Ainsi, une diversité de travaux ont tenté d'induire des assemblages supramoléculaires à base de brins d'ADN combinés à des molécules organiques π -conjuguées par effet template de l'ADN^{43,44}. En 2007, l'équipe de Schenning s'intéresse au co-assemblage entre un brin d'oligonucléotides de 40 thymines et un chromophore conjugué de naphthalène. Le brin d'ADN de thymidine est capable de former trois liaisons hydrogène avec la molécule invitée conjuguée contenant des purines et des triazines. Ce réseau de liaisons hydrogène en synergie des interactions π entre le template d'ADN de thymines et la molécule conjuguée de naphthalène permet d'organiser la structure en hélice supramoléculaire où 40 naphthalènes sont liés à 40 thymines (Figure 2.9.a). En utilisant la même stratégie d'assemblage, en 2016, l'équipe de Sleiman s'intéresse au co-assemblage entre un petit oligonucléotide composé de 15 unités d'adénine avec de l'acide cyanurique, ayant une structure proche de celle de la thymine ⁴⁵. Les deux molécules s'assemblent en structure hexamérique type « Rosette » formée par un réseau de liaisons hydrogène spécifiques (Figure 2.9.b). Ce co-assemblage a permis

de former des fibres micrométriques dont la croissance est assurée par l'organisation du brin d'ADN autour de l'acide cyanurique selon l'arrangement hexamérique.

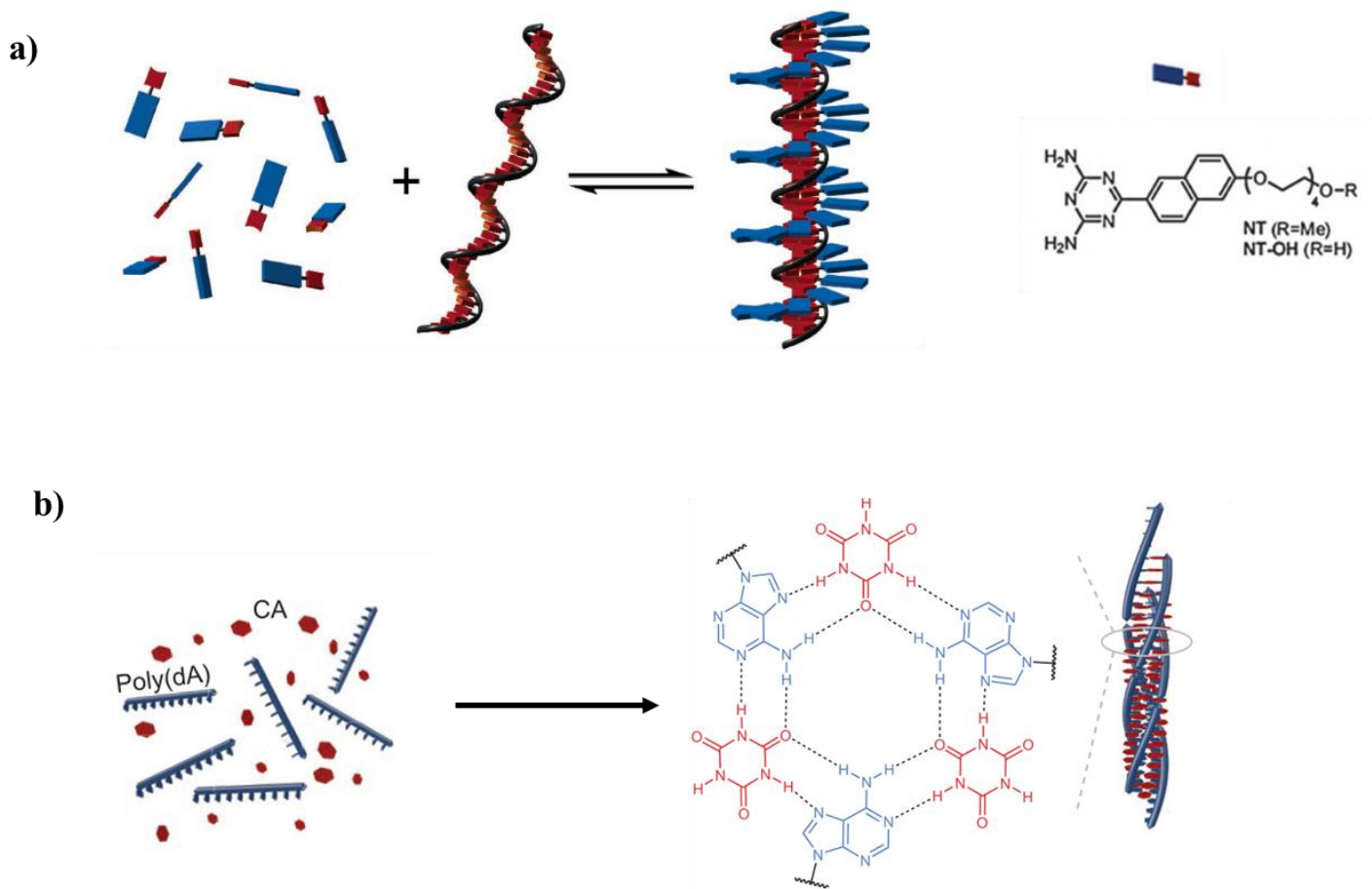


Figure 2.9-a) Assemblage supramoléculaire entre un ADN simple brin de thymines et une molécule π -conjuguée de naphthalène en complexe hélicoïdale. Adapté de la référence⁴⁶. **b)** Autoassemblage supramoléculaire entre l'acide cyanurique (en rouge) et un oligonucléotide riche en adénines (en bleu) en structure hexamérique. Adapté de la référence⁴⁵.

De nombreux travaux de recherche se sont ainsi intéressés à développer des assemblages supramoléculaires à base d'ADN ou briques d'ADN tels que des nanostructures d'ADN basées sur l'appariement Watson-Crick, des G-quadruplexes basés sur l'appariement de Hoogsteen ou encore des assemblages supramoléculaires à base de molécules organiques π -conjuguées par effet template de l'ADN. Néanmoins, la plupart de ces structures sont statiques ou faiblement dynamiques, à moins d'ajouter des brins d'ADN compétitifs selon le principe de déplacement de brin⁴⁷. Ainsi, pour étudier des systèmes dynamiques et contrôlables, la lumière s'est avérée être un stimulus physique très utilisé pour fabriquer des matériaux moléculaires stimulables. En effet, par sa précision spatiotemporelle, sa modularité (longueur d'onde, puissance) et son caractère à distance, une diversité de travaux s'est intéressée au développement de systèmes photocontrôlés à base d'ADN ou de dérivés d'ADN (double-brin, simple-brin, oligonucléotide, nucléotide, nucléobase). Pour ce faire, les auteurs utilisent des

dérivés photosensibles capables d'interagir avec les structures à base d'ADN. Ces molécules ont la capacité de changer de conformation ou de structure chimique sous l'action de la lumière ou possèdent des propriétés de fluorescence modulée par leur interaction avec l'ADN ou briques d'ADN. Nous nous intéresserons plus spécifiquement dans ce chapitre à une molécule photosensible particulière appelée azobenzène, largement explorée dans les travaux de recherche.

3) Systèmes supramoléculaires photo stimulables : utilisation de molécules photosensibles

De nombreux procédés biologiques sont contrôlés par la lumière. La stratégie consiste à faire interagir un chromophore photosensible avec une cible biologique (protéine, acide nucléique). L'absorption d'un photon par le chromophore induit un changement de conformation réversible de la cible biologique permettant de contrôler son activité par l'existence entre deux états. Ainsi, le chromophore induit un switch de fonctions régulées par la lumière d'où le nom de « photoswitch » ou « molécules photoswitchables »⁴⁸. Les chimistes ont développé de nombreuses molécules photosensibles capables de s'isomériser via l'action de la lumière dont les azobenzènes qui, pour leur robustesse, leur photostabilité, leur réversibilité et leur modularité (ajustement des longueurs de d'onde d'excitation et des temps de réponse par substitution chimique), sont les plus majoritairement étudiés (Figure 2.10)^{6,49,50}. Ces molécules sont largement utilisées pour fabriquer des matériaux moléculaires photostimulables^{51,52}.

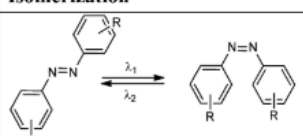
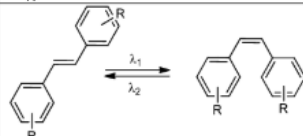
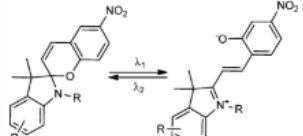
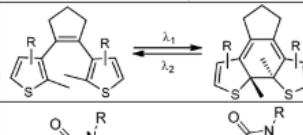
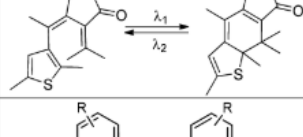
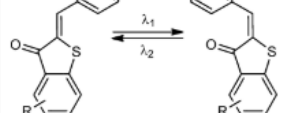
	Photoswitches	Isomerization	λ_1/λ_2
A	Azobenzenes		UV/VIS (ΔT)
B	Stilbenes		UV/UV
C	Spiroyrans		UV/VIS (ΔT) or VIS/UV
D	Diarylethenes		UV/VIS
E	Thiophenefulgides		UV/VIS
F	Hemithioindigos		VIS/VIS (ΔT)

Figure 2.10 – Structure moléculaire des photoswitches capables d'interagir avec des biomolécules (protéines, acides nucléiques)⁶

Les azobenzènes sont des molécules possédant une liaison double N=N sur laquelle sont liées deux groupements phényles substitués. Elles existent sous deux conformations : la conformation *trans* où les groupements se trouvent de part et d'autre de la liaison double et la conformation *cis* où les groupements se trouvent du même côté de cette dernière (Figure 2.11). La conversion du conformère *trans* en *cis* se fait sous l'action de la lumière UV tandis que la conversion du conformère *cis* en *trans* se fait sous l'action de la lumière visible ou du chauffage. L'azobenzène *trans* est plan et a un moment dipolaire nul. Lorsque le *trans* se photoisomérise en sa forme *cis* par l'irradiation UV, la molécule perd sa planéité ; l'angle diédral entre les deux benzènes aromatiques étant de l'ordre de 30°. L'isomérisation s'accompagne également d'une augmentation du moment dipolaire de la molécule ; le moment dipolaire de la forme *cis* est de 3 Debye et celui du *trans*, moyennement nul, est de 0,5 Debye⁵³.

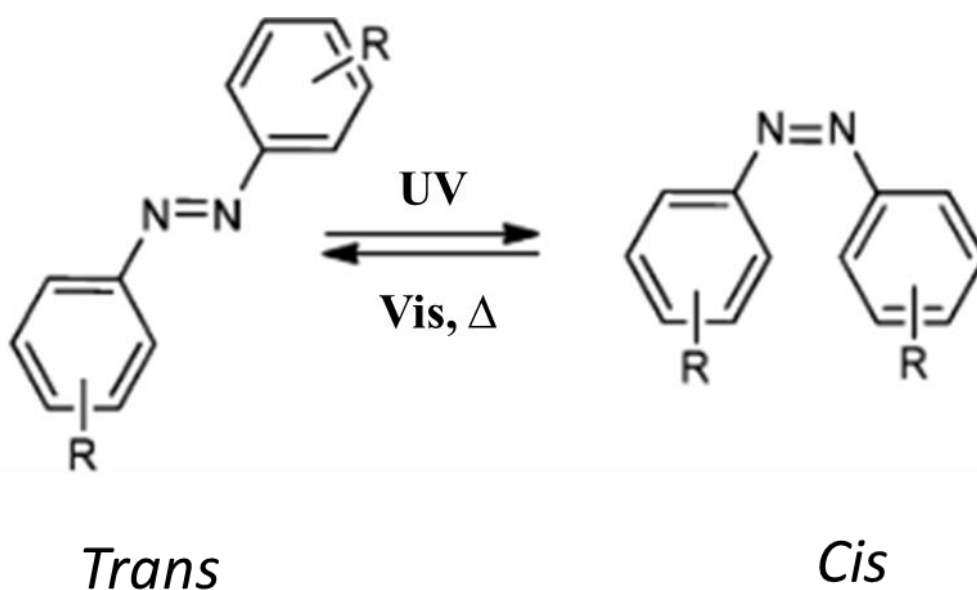


Figure 2.11-Photoisomérisation réversible de l'azobenzène *trans* en *cis*. Adapté de la référence⁶

L'azobenzène possède deux zones d'excitation photochimique. La première, située autour de 320 nm, correspond à la transition intense $\pi-\pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_1$) (Figure 2.12.a) et la deuxième située autour de 430 nm correspond à la transition $n-\pi^*$ ($S_0 \rightarrow S_2$), moins intense car interdite de symétrie (Figure 2.12.a). L'excitation du photochrome dans l'UV provoque la photoisomérisation du *trans* en *cis* par un mécanisme de rotation autour de la liaison N-N ou d'inversion dans le plan de la molécule selon le type de groupements chimiques présents sur le cycle aromatique (Figure 2.12.b). Des études théoriques ont montré que les groupements électrodonneurs augmentent la barrière d'isomérisation selon un mécanisme d'inversion tandis que les groupements électroattracteurs la diminuent⁵⁴. La conformation *cis* peut être convertie en *trans* par irradiation dans le visible (typiquement autour de 420 nm) ou par excitation thermique. Le taux de conversion et la longueur d'onde d'excitation dépendent fortement du milieu environnant (solvant, substituants). Par exemple, les azobenzènes fonctionnalisés par des groupements électrodonneurs et électroattracteurs en para ont un taux de conversion

thermique de *cis* à *trans* plus élevé dans les solvants polaires tandis que les rendements de conversion photochimique de *cis* à *trans* sont plus élevés dans les solvants apolaires⁵⁵. La conformation *trans* de l'azobenzène est beaucoup plus stable que celle en *cis* : la différence d'énergie entre la forme *trans* et *cis* est de 15 kcal.mol⁻¹ (soit environ 0.6 eV)⁵⁴. Les azobenzènes et leurs dérivés ont été largement utilisés pour leur stabilité, leur rapide photoisomérisation à une longueur d'onde spécifique, leur fonctionnalisation chimique aisée mais surtout pour leur changement de conformation et polarité photocontrôlée. Ainsi, ces molécules photoswitchables sont des candidats de choix pour fabriquer des systèmes supramoléculaires à base d'ADN ou dérivés d'ADN photodynamiques. Ces systèmes seront présentés dans la suite de chapitre.

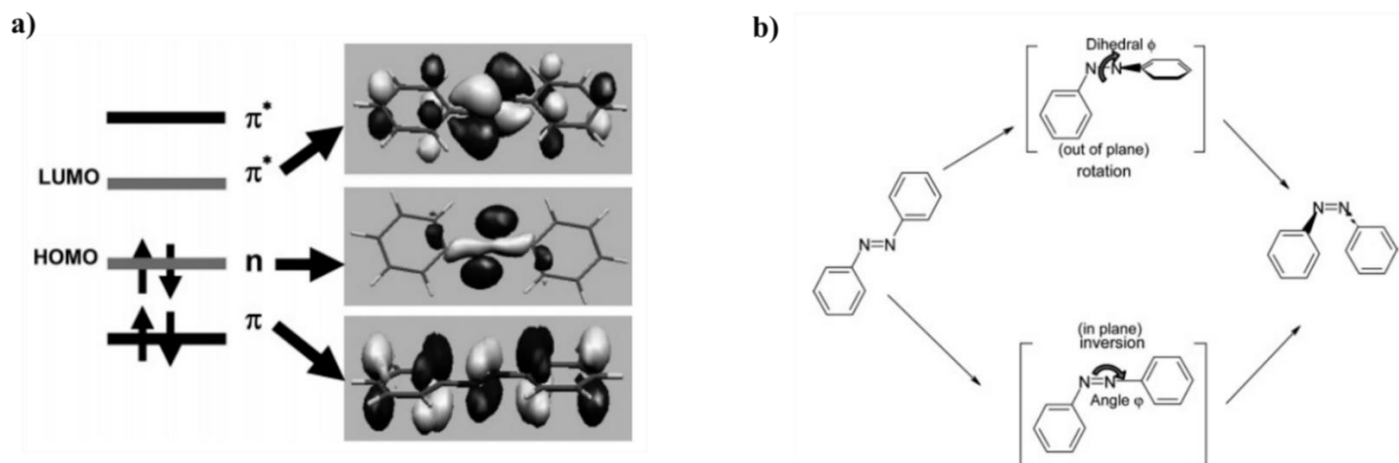


Figure 2.12-a) Orbitales moléculaires de l'azobenzène obtenues par calcul DFT³⁴ b) Mécanismes possibles de photoisomérisation de l'azobenzène *trans* en azobenzène *cis* par un mécanisme de rotation ou d'inversion autour de la liaison N=N⁵⁴

Les azobenzènes ont également été étudiés pour leur propriété de fluorescence induite par agrégation. Ces chromophores sont pour la plupart des composés non fluorescents. Néanmoins, lorsqu'ils s'agrègent par interaction π , ces derniers peuvent émettre des photons par fluorescence induite par agrégation⁵⁶. Ce phénomène est intimement lié à la dynamique de conversion conformationnelle *cis-trans* à l'état excité. La photo-isomérisation des azobenzènes à l'état excité est presque instantanée. Cette conversion conformationnelle ralentit les processus de conversion radiatifs minimisant l'émission de lumière par fluorescence. Néanmoins, le taux de conversion de l'isomérisation *cis-trans* dépend des substituants du benzène. Ainsi, ralentir la photo-isomérisation de l'azobenzène et les autres processus non radiatifs à l'état excité permet le processus radiatif de fluorescence du chromophore⁵⁷. L'agrégation induite par fluorescence est également étroitement liée à la propriété d'agrégation des chromophores en solution. Lorsque ce dernier s'agrège en solution, ses mouvements internes de vibration et rotation sont bloqués⁵⁶. La restriction de ses mouvements intramoléculaires bloque sa conformation et réduit les phénomènes de conversion interne non radiatifs promouvant ainsi la relaxation radiative par fluorescence.

L'équipe de Kunitake publie en 1987 le premier assemblage fluorescent d'azobenzène amphiphile ⁵⁸. La rigidité des azobenzènes au sein d'assemblage supramoléculaire permet de synthétiser des matériaux moléculaires possédant une grande fluorescence dû à l'agrégation des azobenzènes mais sacrifiant leur capacité de photoisomérisation⁵⁹. Ainsi, l'un des principaux enjeux du domaine est d'arriver à réaliser des assemblages supramoléculaires à base d'azobenzènes qui soient à la fois fluorescents et conservant leur photoswitchabilité.

4) Systèmes à base d'ADN ou dérivés d'ADN photostimulables : émergence des intercalants d'ADN photosensibles

Un certain nombre de travaux de recherche s'est intéressé à l'interaction entre des azobenzènes et de l'ADN ou dérivés d'ADN afin de fabriquer des systèmes supramoléculaires photostimulables.

a) ADN double brin apparié

α) Modes d'interaction de molécules avec l'ADN double brin

Certains travaux scientifiques s'intéressent à développer des systèmes supramoléculaires photo-contrôlés à base d'ADN et de molécules photosensibles. De nombreuses molécules organiques ou inorganiques peuvent interagir avec l'ADN double-brin selon deux modes d'interaction non covalente bien spécifiques : le groove-binding et l'intercalation⁶⁰. L'ADN double-brin possède des espaces creux, appelés sillons, entre les brins d'ADN en double hélice. Il existe deux types de sillons : le grand et le petit sillon qui diffèrent uniquement par leur épaisseur (Figure 2.13.a)⁶¹. Le grand sillon a une largeur de 0.2 nm tandis que celle du petit sillon est de 0.1 nm. Ainsi, certaines molécules, telle que la netropsine ou l'anthramycine, peuvent interagir via les sillons de l'ADN (Figure 2.13.b)⁶². Le deuxième mode, le plus répandu, est l'intercalation. Les intercalants d'ADN sont des molécules planes, neutres ou cationiques, et aromatiques, telles que le bromure d'éthidium ou la proflavine, capables d'interagir avec les bases d'ADN par π -stacking et interactions électrostatiques. L'intercalant se positionne à l'intérieur de la double-hélice entre deux bases d'ADN adjacentes et stabilise ainsi cette dernière (Figure 2.13.b) ⁴³.

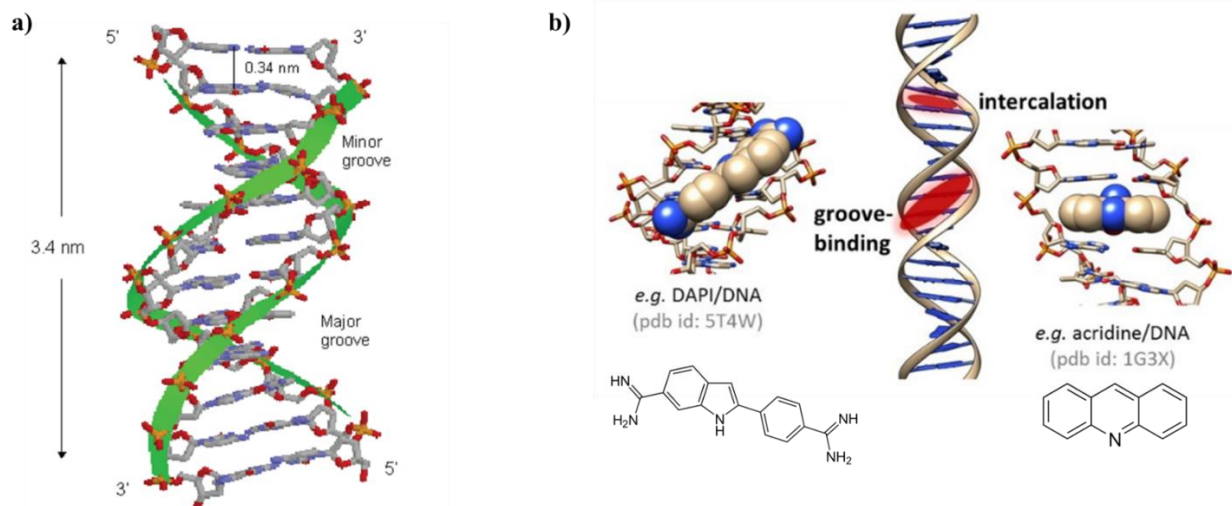


Figure 2.13-a) Représentation de l'ADN double brin et de ses espaces *major* et *minor* groove⁶¹. **b)** Représentation des deux modes d'agents de liaison (DAPI et acridine) avec l'ADN double brin⁴³.

Dans cette première partie, nous nous intéresserons aux intercalants d'ADN azobenzènes photosensibles capables d'interagir avec l'ADN et contrôler l'appariement des brins par leur propriété de photoisomérisation. Ceci a permis de développer des systèmes intelligents à base d'ADN double brin permettant de moduler leur structure secondaire, leur assemblage ou encore leur fluorescence via l'intercalation de molécules photosensibles.

β) Emergence des intercalants d'ADN photosensibles

Certains travaux se sont intéressés à l'interaction entre la double hélice d'ADN et des molécules photosensibles capable de s'intercaler entre les bases d'ADN. Un intercalant d'ADN stabilise le double brin et augmente la température à laquelle l'appariement des bases se brise. Cette température est appelée température de fusion ou température de « melting », notée T_m (Figure 2.14). Pour une température supérieure à T_m , les brins d'ADN ne sont pas appariés tandis que pour une température inférieure à T_m , l'ADN est sous forme d'un double-brin en hélice. Un intercalant d'ADN permet donc de moduler cette température en stabilisant le double brin.

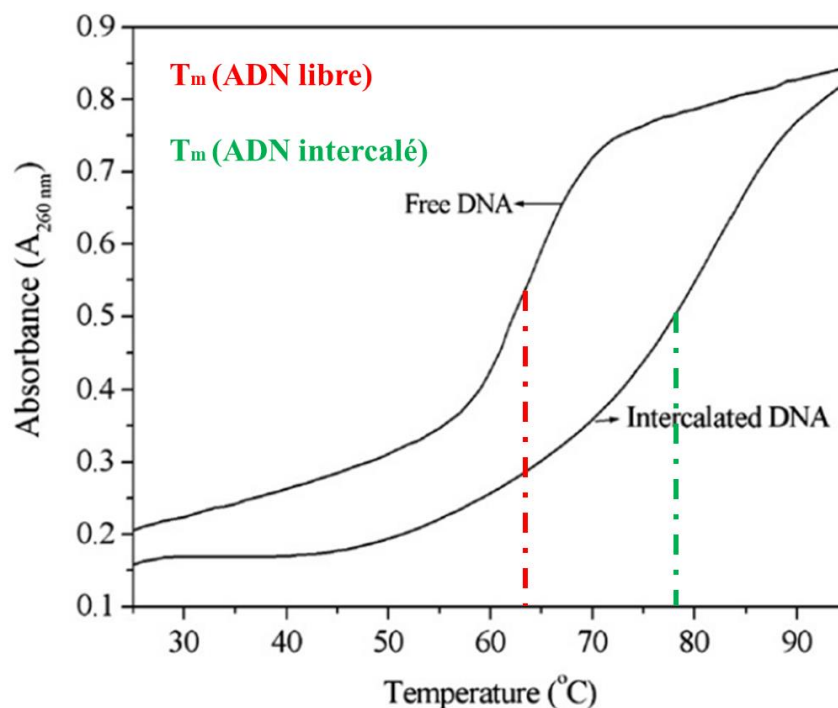


Figure 2.14- Courbe de fusion d'un double brin d'ADN avec et sans intercalant. Adapté de la référence⁶³.

En 2015, notre équipe a synthétisé le premier intercalant générique (indépendant de la séquence de l'ADN) et photosensible de l'ADN, l'AzoDiGua, un azobenzène fonctionnalisé par des groupements guanidinium à chaque extrémité de la molécule (Figure 2.15.a)⁶⁴. Cette molécule photosensible est capable de s'intercaler dans la double hélice d'ADN et de la stabiliser seulement sous sa forme *trans* par interactions π et électrostatiques entre les groupements guanidinium de l'azobenzène et phosphates de l'ADN. La forme *cis*, de par sa géométrie contrainte stériquement, n'est pas capable de s'intercaler aussi efficacement que son homologue *trans*, entre les bases d'ADN et ne stabilise pas le double brin. Ainsi, notre équipe a pu contrôler photochimiquement et réversiblement, à température ambiante, l'appariement des bases d'ADN au sein de la double hélice (Figure 2.15.b). Une molécule similaire mais ne portant qu'un seul groupement guanidinium à l'extrémité de la molécule, l'AzoGua, n'est, quant à lui, pas capable de stabiliser l'ADN double brin aussi efficacement que son homologue AzoDiGua. De la même manière, en 2016, l'équipe de Matczyszyn s'intéresse à l'effet de la photoisomérisation d'un intercalant d'ADN, l'azobenzène Azo-3N, sur la conformation de l'ADN (Figure 2.15.b)⁶⁵. Les auteurs ont montré que la conversion de la forme *trans* en *cis* induisait un changement conformationnel de la structure secondaire de l'ADN qui passe d'une forme en hélice de type B à une forme de type A dû à la différence de planéité entre les formes *trans* et *cis*.

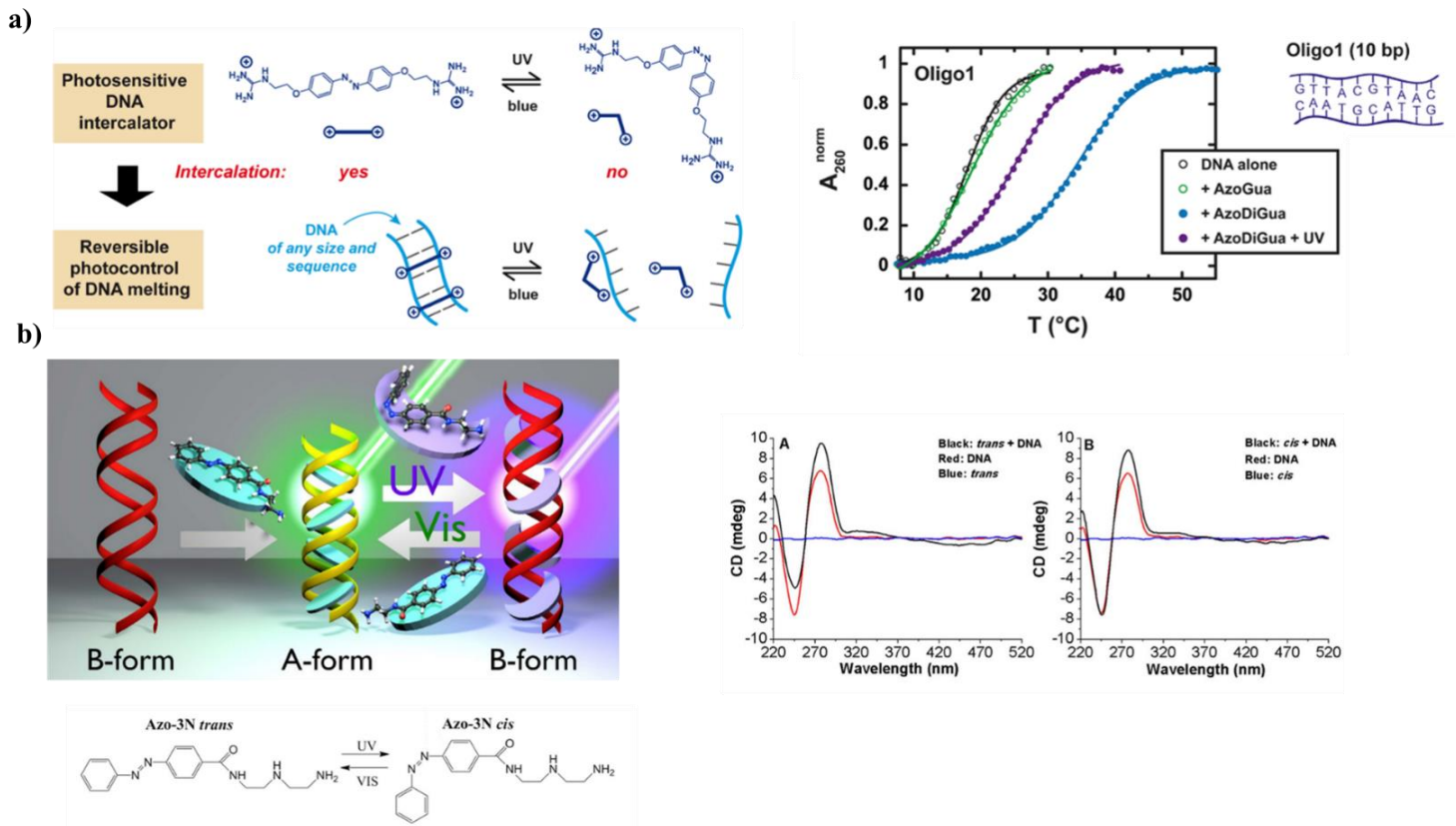


Figure 2.15-a) Photocontrôle de l'appariement de brins d'ADN par l'AzoDiGua⁶⁴. b) Photorégulation de la structure secondaire de la double hélice d'ADN par l'Azo-3N⁶⁵.

Au-delà du photocontrôle de l'assemblage et de la structure secondaire de l'ADN, certains scientifiques se sont également intéressés à la modulation de fluorescence de fluorophores par des intercalants d'ADN photosensibles⁶. En 2018, l'équipe de Matczyszyn a synthétisé un azobenzène, le bis-Azo-4F- capable de se photoisomériser réversiblement dans le domaine du visible et de s'intercaler dans l'ADN (Figure 2.16.a). Cet intercalant a permis de réversiblement contrôler la fluorescence d'un autre intercalant d'ADN, le bromure d'éthidium (EtBr), par effet compétitif (Figure 2.16.b). Le bis-Azo-4F *trans* a une affinité beaucoup plus grande que l'EtBr et s'intercale préférentiellement dans l'ADN. L'EtBr est alors fluorescent n'interagissant pas avec l'ADN. Lorsque le bis-Azo-4F se photoisomérisé sous sa forme *cis*, il se désintercale de l'ADN permettant à l'EtBr de s'intercaler à son tour ayant pour effet un quenching de sa fluorescence (Figure 2.16.b). De la même manière, les auteurs ont pu contrôler le transfert d'énergie par FRET entre un groupement accepteur A et donneur D aux extrémités d'un brin d'ADN apparié par l'intercalation photocontrôlée du bis-Azo-4F (Figure 2.16.c). Sous sa forme *trans*, le bis-Azo-4F s'intercale dans l'ADN et permet le transfert d'énergie par FRET entre A et D, ces derniers étant rapprochés dans l'espace par l'appariement, contrairement à sa forme *cis*. Ainsi, la photoisomérisation du *trans* en *cis* brise l'appariement et provoque une baisse du transfert d'énergie par FRET entre A et D, ces derniers étant davantage éloignés (Figure 2.16.c). Ainsi, les auteurs ont été capable de

moduler la fluorescence et le FRET, respectivement par l'intercalation compétitive et l'appariement photocontrôlé de l'ADN.

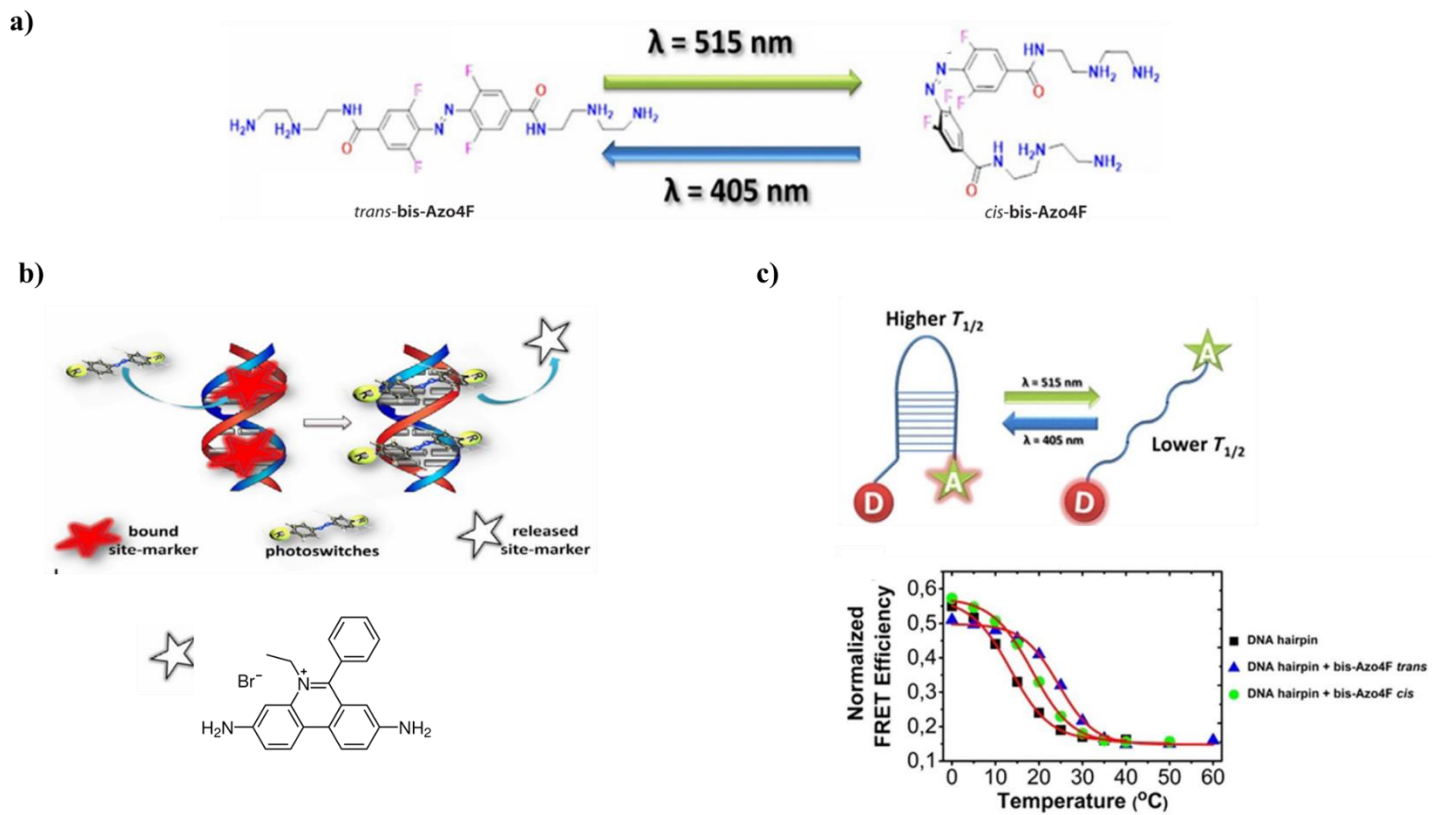


Figure 2.16-a) Photoisomérisation d'un azobenzène fonctionnalisé, le bis-Azo-4F, dans le visible⁶⁶ **b)** Photocontrôle de la fluorescence du bromure d'éthidium (EtBr) par intercalation compétitive⁶⁶ **c)** Photocontrôle du FRET au sein d'un brin d'ADN⁶⁶.

Ces systèmes photostimulables reposent sur l'interaction entre un double-brin d'ADN et un intercalant d'ADN photosensible. Ainsi, certains auteurs se sont intéressés à développer des systèmes photocontrôlés combinant des molécules ou intercalants photosensibles avec des systèmes non appariés sans double hélice tels que des oligonucléotides, G-quadruplexes, nucléotides ou nucléobases.

b) ADN ou dérivé d'ADN simple brin non apparié

La structure secondaire des G-quadruplexes, reposant sur l'appariement de Hoogsteen, intéresse de nombreux scientifiques pour leur ciblage thérapeutique et activité catalytique⁴¹. Un certain nombre de travaux a exploré la capacité de molécules photosensibles d'induire des changements conformationnels de G-quadruplexes et de contrôler des propriétés biologiques. Par exemple, en 2010, l'équipe de Zhou est la première à développer un dérivé d'azobenzène capable de réguler photochimiquement et réversiblement la conformation de G-quadruplexes⁶⁷. Dans ce travail, les auteurs ont montré que le photochrome était capable d'induire le repliement

d'un oligonucléotide riche en guanines en l'absence de sel formant un complexe G-quadruplexe/photochrome (Figure 2.17). Lorsque le dérivé d'azobenzène est irradié par de la lumière UV, ce dernier se photoisomérise et entraîne le dépliement de la chaîne nucléotidique brisant le G-quadruplexe. Les mêmes auteurs ont également essayé d'étudier ce système en présence de sels métalliques mimant les conditions physiologiques mais n'ont pas observé de photodissociation induite par le dérivé d'azobenzène mais seulement un changement de conformation interne du G-quadruplexe⁶⁸. Ceci s'explique possiblement par la stabilisation du G-quadruplexe formé en présence de sels métalliques ne permettant pas à ce dernier d'être sensible au changement de conformation du dérivé d'azobenzène. Les mêmes auteurs ont utilisé ce système pour réguler l'activité enzymatique de la thrombine⁶⁹. Ce contrôle spatiotemporel avec la lumière de l'activité de cette protéine repose sur la reconnaissance sélective entre l'azobenzène et le télomère d'ADN formant le G-quadruplexe (Figure 2.17.b).

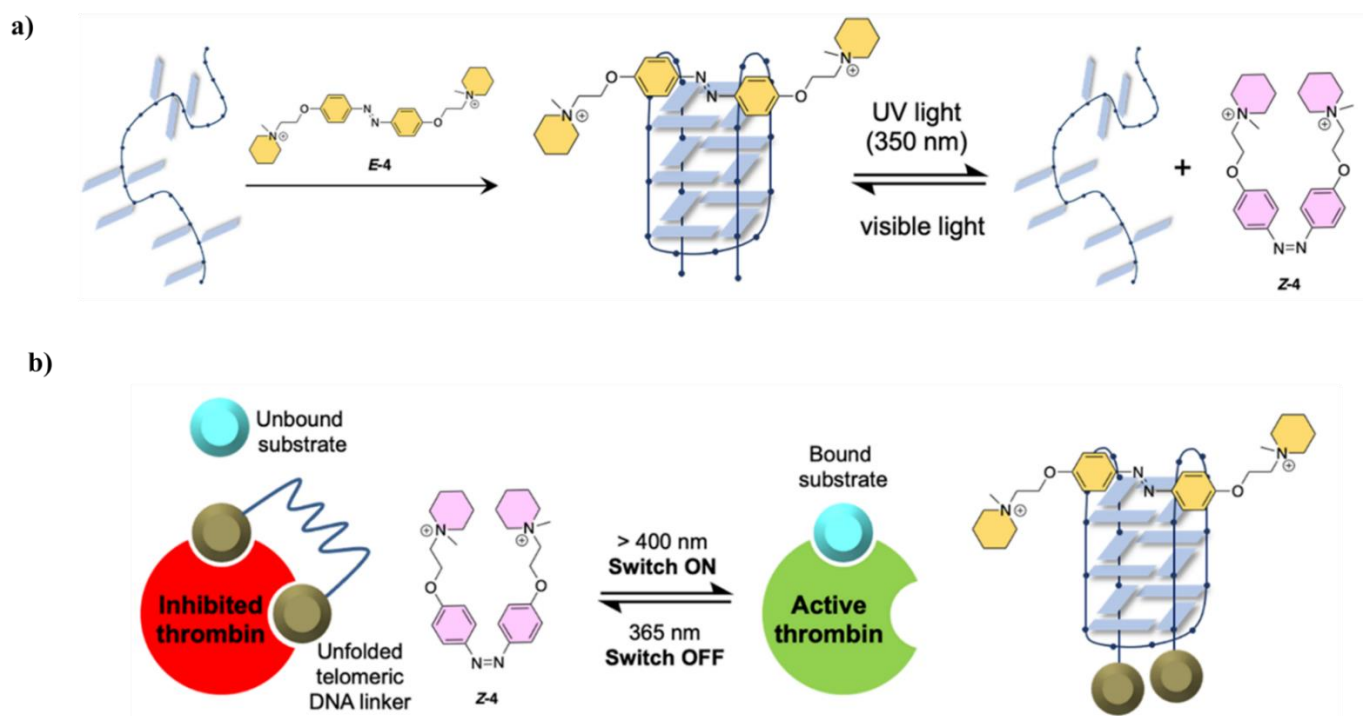


Figure 2.17-a) Photcontrôle de la conformation de G-quadruplexes d'ADN par un dérivé d'azobenzène⁷⁰. **b)** Photorégulation de l'activité biologique de la thrombine⁷⁰.

Si certains auteurs se sont intéressés au photocontrôle conformationnel de structures de G-quadruplexes, d'autres scientifiques se sont interrogés sur la capacité de molécules photosensibles d'induire de la compaction d'un monobrin d'ADN⁷¹. La compaction est un processus au cours duquel l'ADN passe d'une conformation allongée à une conformation compacte. L'expression des gènes est directement impactée par l'état de compaction de l'ADN. Ainsi, lorsque l'ADN est sous forme allongée et non compacte, les étapes de transcription et traduction d'expression de synthèse d'une protéine sont possibles tandis que lorsque l'ADN est compact, celles-ci ne peuvent se réaliser (Figure 2.18.a). Ainsi, certains auteurs ont tenté de synthétiser des

molécules cationiques et photosensibles capables d'induire une compaction photoreversible de l'ADN^{72,73,74,75,76}. Notre équipe a ainsi développé des tensioactifs cationiques et photosensibles capables de photocontrôler la compaction d'ADN⁷². Dans ce travail, les auteurs ont synthétisé un dérivé d'azobenzène, l'AzoTAB, capable de compacter un brin d'ADN T4 par interactions électrostatique et hydrophobe (Figure 2.18.b). L'ADN est compactée par l'AzoTAB *trans* et décompactée par l'AzoTAB *cis* ce qui a permis aux auteurs de photocontrôler l'état de compaction de l'ADN. Cette compaction photocontrôlée a permis de contrôler réversiblement l'expression génétique par la lumière⁷⁷.

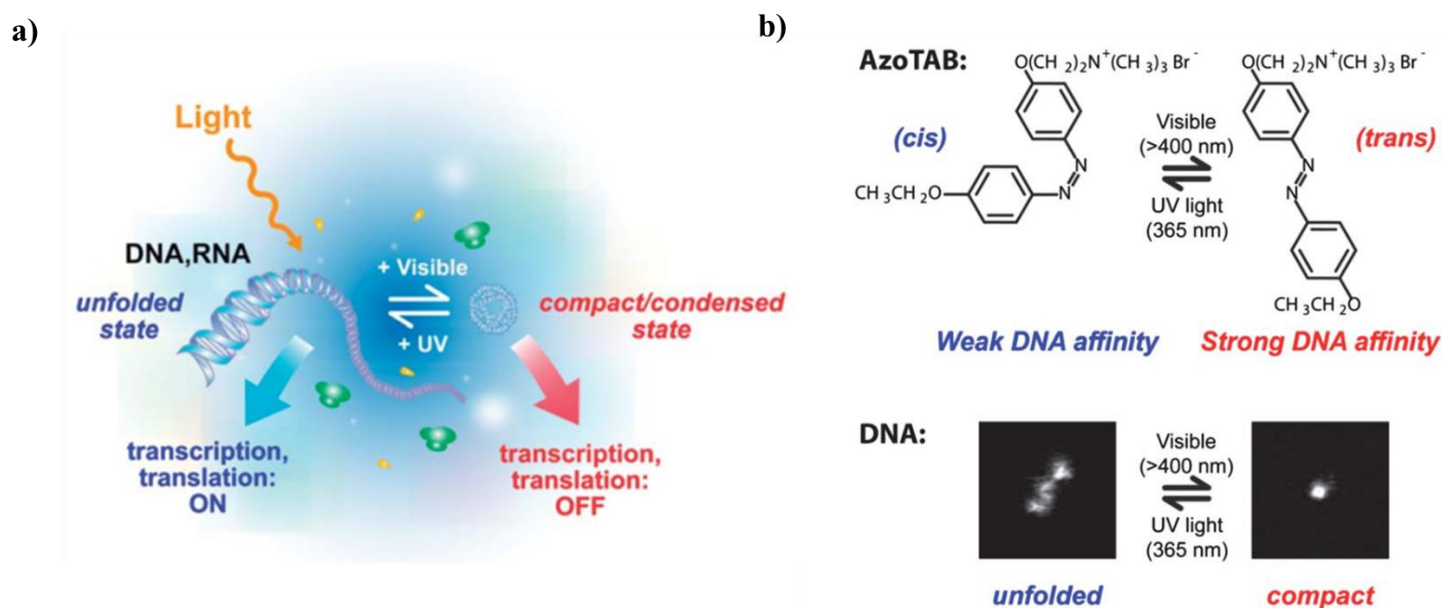


Figure 2.18-a) Schéma du principe de photorégulation de la compaction d'ADN et ses fonctions biologiques de transcription et traduction⁷¹ **b)** Compaction photocontrôlée d'un brin d'ADN T4 par l'AzoTAB⁷¹

Au-delà des structures utilisant de l'ADN double-brin ou des oligonucléotides combinées à des intercalants d'ADN ou molécules photosensibles selon une approche non covalente, très peu de travaux se sont intéressés à l'interaction non covalente entre des intercalants d'ADN photosensibles et des petites briques d'ADN ou dérivés d'ADN telles que des nucléotides ou nucléobases. Récemment, en 2019, notre équipe a développé une nouvelle stratégie permettant d'induire des co-assemblages supramoléculaires entre un intercalant d'ADN photosensible et une nucléobase et ce, en l'absence de double-hélice⁷⁸. Pour ce faire, les auteurs ont fait interagir l'intercalant d'ADN photosensible AzoDiGua avec une nucléobase, la Guanosine MonoPhosphate (GMP) dans l'eau et à pH acide (Figure 2.19.a). En chauffant le mélange puis en le refroidissant progressivement, les deux molécules cristallisent au sein d'un co-assemblage supramoléculaire sous la forme de fils micrométriques (Figure 2.19.c). La diffraction des rayons X de ce co-assemblage a permis de mettre en évidence que l'AzoDiGua et la GMP forme un motif d'intercalation en l'absence de double hélice au sein duquel l'AzoDiGua s'intercale entre 4 nucléobases de GMP (Figure 2.19.b).

De plus, ces fils sont fluorescents étant donné que l'AzoDiGua voit sa conformation bloquée au sein du cristal et peut donc émettre de la lumière par fluorescence induite par agrégation (Figure 2.19.d). Les auteurs ont également réussi à conserver la photoisomérisation de l'AzoDiGua au sein du cristal et à contrôler réversiblement l'assemblage et le désassemblage de la GMP et de l'AzoDiGua par l'irradiation UV et bleu permettant de respectivement convertir le dérivé d'azobenzène *trans* en *cis* et réciproquement (Figure 2.19.e). Ce travail propose une nouvelle approche d'assemblages supramoléculaires consistant à combiner un dérivé d'ADN, ici une nucléobase, avec un intercalant, ici un azobenzène photosensible, en l'absence de double hélice. Ce concept peut probablement s'étendre à d'autres briques d'ADN, tels que des nucléotides par exemple, pour synthétiser des structures supramoléculaires fonctionnelles et stimulables.

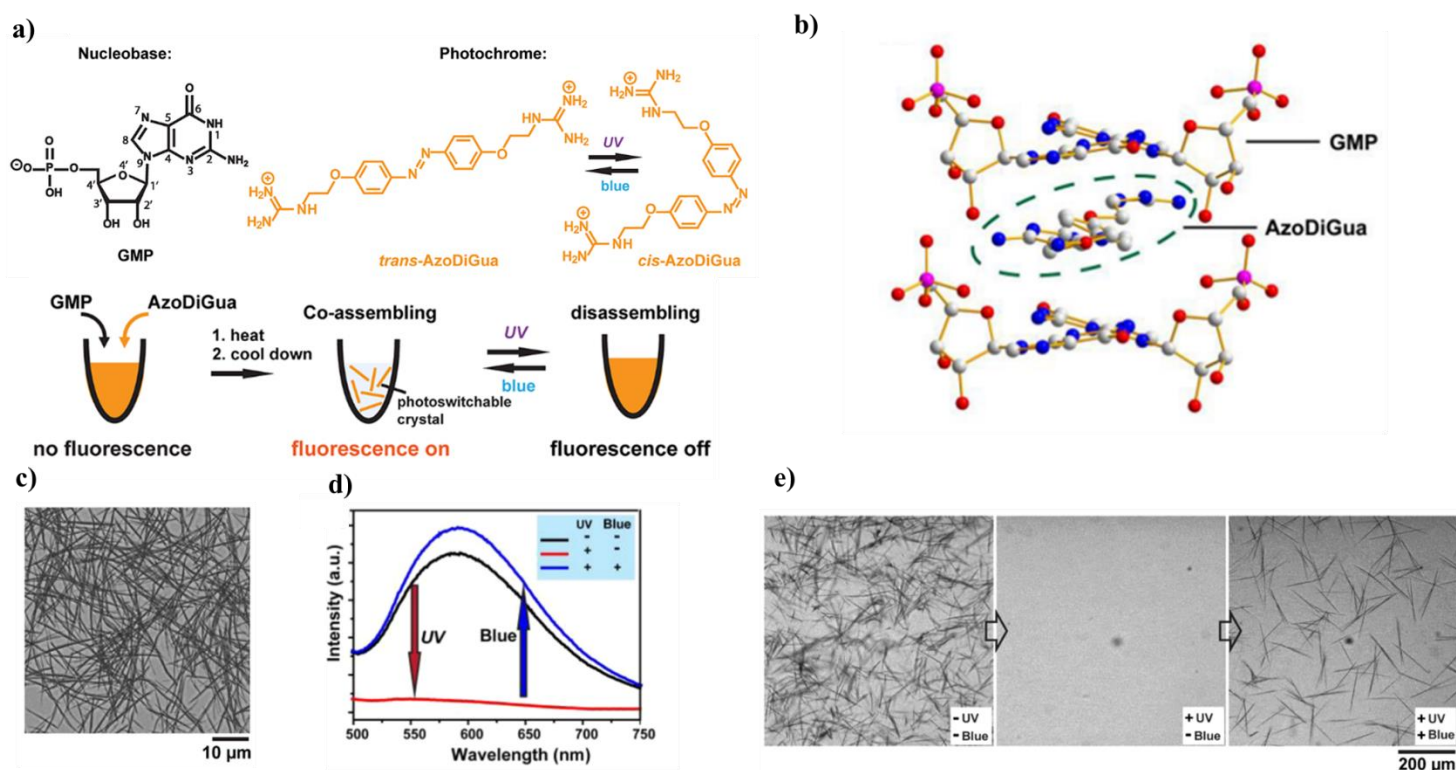


Figure 2.19-a) Structure moléculaire de la Guanosine MonoPhosphate (GMP) et l'AzoDiGua et stratégie de co-assemblage supramoléculaire entre l'AzoDiGua et la GMP. **b)** Structure cristallographique du coassemblage GMP/AzoDiGua **c)** Fils moléculaires micrométriques de GMP/AzoDiGua observés au microscope optique. **d)** Spectre d'émission de fluorescence du co-assemblage GMP/AzoDiGua (Excitation : 400 nm). **e)** Photocontrôle du co-assemblage GMP/AzoDiGua. Figures extraites de la référence⁷⁸.

5) Objectif du travail de thèse

Dans ce travail de thèse, nous proposons deux approches distinctes afin de développer des systèmes stimulables et dynamiques à base d'intercalants d'ADN photosensibles et d'ADN ou dérivés d'ADN.

La première stratégie consiste à étendre le concept découvert par notre équipe consistant en un co-assemblage entre un intercalant d'ADN photosensible et une brique ou dérivé d'ADN. L'intercalant d'ADN photosensible que nous avons étudié est l'AzoDiGua, synthétisé par notre équipe et qui a montré des propriétés d'assemblage supramoléculaire fluorescent avec la nucléobase GMP (2.19.a) ainsi que des propriétés d'intercalation au sein du double brin d'ADN (Figure 2.15.a). La nouvelle brique de co-assemblage que nous avons étudié dans cette thèse est un nucléotide d'une grande importance biologique : l'Adénosine 3'-triphosphate (ATP), molécule énergétique permettant de réguler certaines réactions du métabolisme. Ainsi, dans la première partie de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'interaction entre l'ATP et l'AzoDiGua ainsi que la possibilité de ces deux molécules de former des assemblages supramoléculaires fonctionnels, dynamiques et stimulables.

La seconde stratégie a consisté à contrôler l'intercalation de l'AzoDiGua photosensible de manière dynamique afin de réguler les propriétés d'hybridation/fusion de l'ADN. Pour ce faire, nous nous sommes intéressés à l'ajout d'une interaction supplémentaire qui est la complexation hôte-invité. L'intercalant d'ADN AzoDiGua est une molécule amphiphile permettant, de par sa géométrie et son squelette organique, de se complexer à des cavités spécifiques. Ainsi dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la formation et caractérisation d'un pseudo-rotaxane formé entre une α -cyclodextrine, molécule cyclique possédant une cavité hydrophobe, et l'AzoDiGua, intercalant d'ADN photosensible. Nous avons ensuite utilisé ce pseudo-rotaxane pour contrôler à l'échelle moléculaire les propriétés d'intercalation de l'AzoDiGua, ses propriétés d'autoassemblage supramoléculaire et de fluorescence induite par agrégation.

Conclusion de la partie A

Dans cette première partie, nous avons exposé les lignes directrices du travail de thèse. Après l'avènement des concepts fondamentaux de la chimie supramoléculaire, les scientifiques se sont intéressés à la conception d'une diversité de systèmes stimulables et dynamiques allant de complexes hôte-invité à des autoassemblage supramoléculaires tirant profit de la réversibilité et faiblesse des interactions non covalentes. Fabriquer des assemblages à base de molécules biologiques relève d'un intérêt particulier pour contrôler de manière dynamique certaines de leurs fonctions face à un stimulus extérieur. Parmi elles, l'ADN, acide nucléique, a été largement exploré dans la littérature pour développer des systèmes supramoléculaires dynamiques basés sur l'appariement des bases Watson-Crick, sur l'appariement de Hoogsten d'oligonucléotides riches en guanines ou encore sur un effet template de l'ADN en interaction avec d'autres molécules organiques.

Récemment, les intercalants d'ADN photosensibles ont suscité de l'intérêt pour le développer de systèmes à base d'ADN photo stimulables. Ainsi, faire interagir de l'ADN double brin ou des dérivés d'ADN (nucléotides, nucléobases,..) avec des intercalants d'ADN photosensibles semble être une stratégie prometteuse pour développer des assemblages supramoléculaires fonctionnels et stimulables très peu explorée dans la littérature.

Ce travail de thèse s'articule ainsi autour de deux grands défis. Le premier objectif vise, dans un premier temps, à étendre le concept introduit par notre équipe qui consiste en l'interaction entre un intercalant d'ADN et un dérivé d'ADN au-delà de la double hélice afin de développer des assemblages supramoléculaires fonctionnels, dynamiques et stimulables. Ainsi, nous nous intéresserons tout d'abord, et pour la première fois, à l'interaction entre un intercalant d'ADN photosensible, l'AzoDiGua et une molécule biologique d'intérêt majeur, l'ATP, et les propriétés dynamiques émergentes de cet assemblage d'un nouveau genre. Nous nous intéresserons ensuite à développer une nouvelle méthode permettant de contrôler l'interaction entre un intercalant d'ADN photosensible et un double-brin d'ADN afin de développer des assemblages d'ADN dynamiques. Nous proposerons en particulier un nouveau concept visant à tirer profit pour la première fois des interactions hôte-invité de l'intercalant d'ADN photosensible AzoDiGua avec des molécules hôtes (cyclodextrines), afin de contrôler de manière originale et dynamique les propriétés d'hybridation et de fusion de l'ADN.

PARTIE B

Systeme ATP/Intercalant d'ADN photosensible AzoDiGua : un nouvel assemblage supramoléculaire multi-stimulable

Dans cette partie, nous allons nous intéresser à l'exploration du co-assemblage supramoléculaire obtenu à partir d'un intercalant d'ADN photosensible, l'AzoDiGua et un nucléotide spécifique : l'ATP (adénosine triphosphate), molécule énergétique d'importance biologique. Nous montrons que l'AzoDiGua et l'ATP sont capables de s'auto-assembler en solution spontanément dans l'eau, à température ambiante et à pH physiologique sous la forme d'agrégats supramoléculaires en solution. Ces assemblages sont fluorescents et leur association ainsi que leur dissociation en solution ont pu être contrôlées par différents stimuli tels que la lumière, la chélation, l'activité enzymatique, le pH ou l'inclusion hôte-invité. Ce système moléculaire constitue, à notre connaissance, le premier système auto-assemblé à base d'ATP non modifié et photoréversible. Il démontre également l'intérêt d'utiliser un intercalant d'ADN photosensible comme partenaire de brique d'intérêt biologique pour fabriquer des édifices auto-assemblés, hautement dynamiques et capables de répondre à de nombreux stimuli.

Plan :

Chapitre B.1 : Systèmes supramoléculaires dynamiques à base d'ATP.....57

Chapitre B.2 : Assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua : synthèse et caractérisation des propriétés.....83

Chapitre B.3 : Assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua : un coassemblage multi-stimulable et dynamique.....101

CHAPITRE B.1- Systèmes supramoléculaires dynamiques à base d'ATP

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à la diversité des assemblages supramoléculaires à base d'ATP étudiés dans divers travaux de recherche. L'Adénosine 3'-triphosphate (ATP) est un nucléotide énergétique nécessaire au bon fonctionnement de nombreuses réactions métaboliques. Ainsi, de nombreux auteurs ont utilisé cette molécule biologiquement active comme brique de construction d'assemblages moléculaires fonctionnels et dynamiques. Après avoir présenté les divers assemblages fonctionnels à base d'ATP, nous présenterons les objectifs du travail de thèse.

Plan :

1) La molécule d'ATP	59
a) L'ATP : une molécule aux interactions multiples.....	59
b) Stratégie de développement de systèmes supramoléculaires intelligents à base d'ATP.....	60
2) Détection d'ATP par fluorescence et formation de complexes supramoléculaires.....	60
3) Autoassemblages supramoléculaires à base d'ATP.....	66
a) Stratégie d'autoassemblage supramoléculaire templaté par l'ATP.....	66
b) Autoassemblages supramoléculaires répondant à la présence d'ATP.....	70
c) Autoassemblages d'ATP stimuli-répondants.....	73
4) Positionnement du travail de thèse.....	77

1) La molécule d'ATP

a) L'ATP : une molécule aux interactions multiples

L'Adénosine 3'-triphosphate (ATP) est une molécule biologique composée d'un ribose lié à un groupement triphosphate en position 4' et une base adénine en position 1'. La molécule d'ATP, de par sa structure chimique, est une molécule multifonctionnelle permettant d'établir de multiples interactions intermoléculaires favorisant la reconnaissance moléculaire et l'auto-assemblage supramoléculaire avec d'autres molécules judicieusement choisies (Figure 3.1 a.). Le groupement triphosphate est hydrophile et possède 4 groupements ionisables. L'ATP possède ainsi 4 pKa (0.9, 1.5, 2.3 et 7.2) et l'état de charge de l'ATP dépend fortement du pH et de la capacité des groupements hydroxyle liés au phosphore à se ioniser lorsque le pH du milieu augmente. Ainsi, à pH physiologique, l'ATP est sous forme ATP^{4-} où tous les hydroxyles des phosphates sont déprotonés. En diminuant le pH, l'ATP réduit son état d'ionisation (Figure 3.1.b). Ces groupements chargés négativement permettent ainsi d'établir des interactions électrostatiques multiples avec des molécules organiques cationiques. De même, ces interactions électrostatiques favorisent la chélation de métaux (magnésium, calcium, fer,...) via le ligand ATP multidentate. La base adénine, quant à elle, est un hétérocycle aromatique pyrimidine capable d'établir des liaisons hydrogène via les azotes du cycle à 5, chacun porteur d'un doublet non liant, et l'amine pendante du cycle 6. De même, par l'aromaticité de l'hétérocycle, la base adénine est capable de se lier à d'autres molécules porteuses de cycles aromatiques par interactions π . Cette partie aromatique de la molécule constitue un site multiple d'interactions π et par liaison hydrogène mais également d'interactions hydrophobes car faiblement polaire. Le groupement triphosphate et la base adénine sont tous les deux reliés par un D-ribose de polarité modérée et porteurs de deux carbones asymétriques en position 2' et 3' ouvrant la possibilité de former des assemblages chiraux (Figure 3.1)⁷⁹.

D'un point de vue biologique, l'ATP est une molécule énergétique permettant la régulation de nombreuses réactions métaboliques et dont l'énergie est stockée dans les liaisons phosphates. Afin de libérer cette énergie chimique, l'ATP s'hydrolyse en ADP (adénosine diphosphate) et en un groupement phosphate. Cette réaction a une enthalpie libre standard $\Delta G^0 = -30,5 \text{ kJ/mol}$ ($-7,3 \text{ kcal/mol}$) et a lieu en continu dans les cellules. Ces dernières sont capables de régénérer l'ATP à partir d'ADP par phosphorylation⁸⁰.

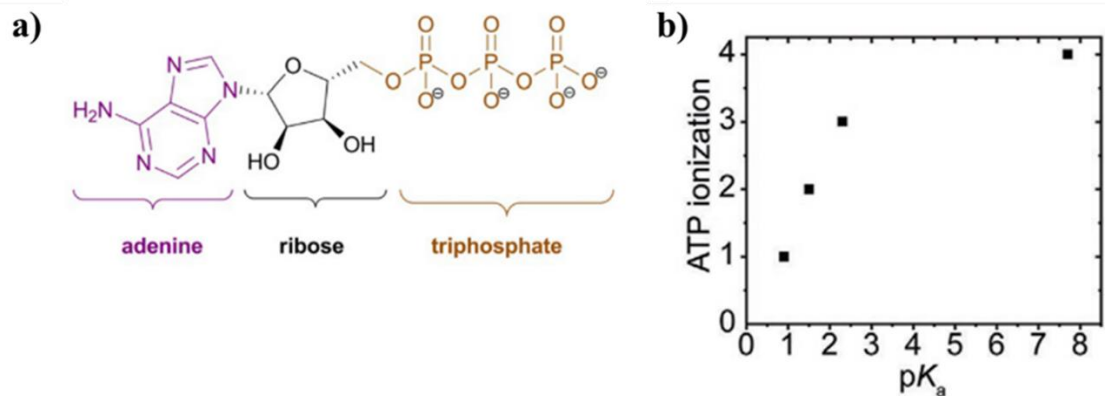


Figure 3.1- a) Structure moléculaire de l'Adénosine Triphosphate (ATP)⁷⁹ **b)** Charge électrique totale de l'ATP en fonction du pH ⁷⁹

b) Stratégie de développement de systèmes supramoléculaires intelligents à base d'ATP

Les caractéristiques moléculaires de l'ATP constituent les principes de base du design d'auto-assemblages supramoléculaires exploitant l'ATP comme composant. Ainsi différentes stratégies ont été développées par divers travaux de recherche pour tirer profit des interactions moléculaires apportées par l'ATP. Différentes structures ont été développées allant de complexes supramoléculaires accepteur-récepteur à des co-assemblages supramoléculaires complexes. Ainsi, quatre stratégies ont été développées par la communauté scientifique afin de développer des systèmes supramoléculaires intelligents (Figure 3.2). Le premier axe consiste à détecter l'ATP, essentiellement par fluorescence, par formation de complexes supramoléculaires de type host-guest. La deuxième stratégie utilise l'ATP comme brique de construction de co-assemblages supramoléculaires avec une ou plusieurs molécules organiques. La troisième stratégie consiste à utiliser l'ATP comme une perturbation forçant un assemblage déjà formé à se reconfigurer vers un nouvel état d'équilibre plus stable. La dernière stratégie exploite l'ATP comme une brique de construction dynamique répondant à un stimulus extérieure permettant au système de se reconfigurer voire de se désassembler (Figure 3.2)⁸¹.

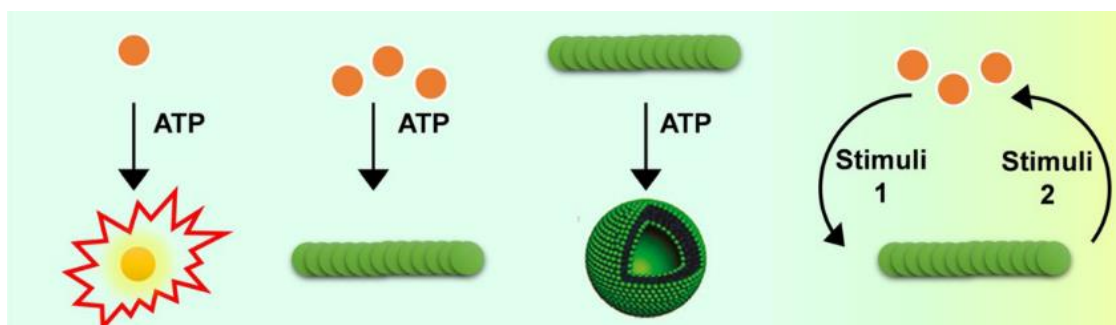


Figure 3.2- Variété d'approches de synthèse de systèmes supramoléculaires intelligents à base d'ATP (en orange est représentée la molécule organique s'assemblant avec l'ATP) ⁸¹

2) Détection d'ATP par fluorescence et formation de complexes supramoléculaires

L'ATP participe à de nombreuses activités physiologiques et sa concentration est corrélée à certaines conditions pathologiques. Ainsi, sa détection sélective dans les milieux cellulaires et tissulaires est importante.

Pour ce faire, les scientifiques ont développé des sondes organiques capables de s'associer à l'ATP par reconnaissance moléculaire par synergie des interactions π , électrostatiques ou hydrogène dans les gammes de concentration d'ATP en milieu biologique (variant de 1 à 20 mM). Parmi la diversité des modes de détection de l'ATP, la fluorescence s'avère être une méthodologie efficace dû à sa sélectivité, sensibilité et son suivi temporel. Ainsi, une variété de sondes fluorescentes porteuses de charges positives et motifs aromatiques a été synthétisée et s'est avérée capable d'interagir sélectivement avec l'ATP par formation d'un complexe supramoléculaire⁸².

Les sondes organiques possédant plusieurs motifs pyrène ont été largement explorées dû à leur capacité de former des excimères^{83,84}. Les excimères sont des dimères de molécules qui n'existent qu'à l'état excité et dont la fluorescence est modifiée par rapport au monomère dû à la réorganisation orbitale à l'état excité. La formation d'un excimère de pyrène est expliqué en Figure 3.3. Tout d'abord, une molécule de pyrène Py initialement à l'état fondamental est promue vers un état excité S_1 . Ce dernier se relaxe vers un état excité Py^* plus stable par conversion interne. Lorsque cette molécule de pyrène à l'état excité rencontre une seconde molécule de pyrène dans son état électronique fondamentale, ces deux molécules s'associent sous la forme d'un complexe dimérique $(Py-Py)^*$ appelé excimère d'énergie à l'état excité plus basse que le monomère. Ainsi le pyrène monomérique a une émission de fluorescence variant de 370 à 400 nm tandis que le pyrène dimérique sous la forme d'excimère a une émission de fluorescence centrée vers 485 nm⁸⁴.

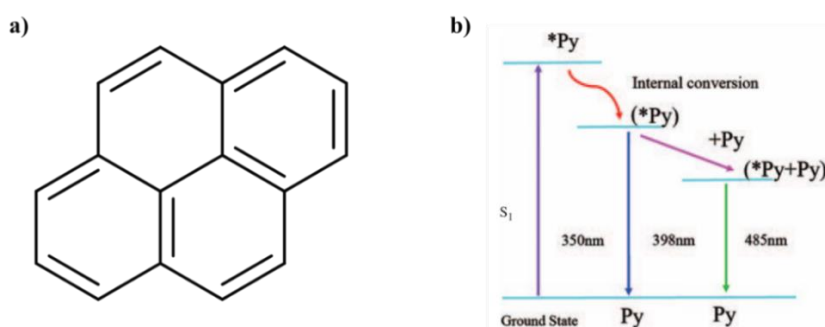


Figure 3.3- a) Structure moléculaire du pyrène⁸⁴ b) Mécanisme de formation d'excimères de pyrène à l'état excité⁸⁴

Ainsi, certains travaux ont exploité cette molécule afin de synthétiser des sondes fluorescentes sélectives d'ATP à base de pyrène^{85,86}. En 2009, le groupe de Yoon synthétise une sonde soluble en phase aqueuse sous la forme d'une pince construite en deux parties⁸⁶. Une première est composée de deux unités imidazolium chargées positivement. Chaque molécule d'imidazole est reliée à une unité pyrène (Figure 3.3.a). L'originalité de ce système réside dans sa sélectivité entre l'adénosine mono, di et triphosphate mais surtout entre les différents nucléosides triphosphatés (UTP, GTP, CTP, TTP et ATP) à pH physiologique. Lorsque la sonde interagit avec l'ATP, la bande d'émission de fluorescence de l'excimère à 485 nm voit son intensité diminuer tandis que la bande d'émission de fluorescence du monomère entre 370 et 400 nm voit son intensité augmenter. Cet effet hyperchrome de la bande relative au monomère n'est pas observé pour les autres dérivés de nucléosides triphosphatés ainsi que les dérivés d'adénosine mono, di et triphosphates. Cette observation

s'explique par l'interaction particulière de l'ATP avec la sonde organique. Tout d'abord, le noyau aromatique de l'adénine s'intercale entre les deux bases de pyrène par interactions π empêchant la formation d'un excimère à l'état excité expliquant le quenching de fluorescence de l'excimère et l'augmentation de l'intensité de fluorescence du monomère de pyrène lorsque la sonde interagit avec l'ATP. A l'inverse, les auteurs postulent que la guanine, la cytosine, la thymine et l'uracile interagissent avec les imidazoles par l'extérieur de la pince via des interactions par liaisons hydrogène expliquant la faible intensité de fluorescence du monomère de pyrène (Figure 3.3.b). Utilisant cette sélectivité entre les nucléosides triphosphates, les auteurs ont été capables de discriminer les dérivés d'adénosine mono (AMP), di (ADP) et triphosphates (ATP). En effet, le squelette phosphate interagit par interactions électrostatiques avec les imidazoles de la pince. Ainsi, la force de l'interaction électrostatique, et par conséquent la force de la complexation, diminue du dérivé triphosphate au dérivé monophosphate. Ainsi, le rapport d'intensités de fluorescence de l'excimère (478 nm) et du monomère (375 nm) est plus élevé pour l'ATP que pour l'ADP et l'AMP (Figure 3.4 c et d).

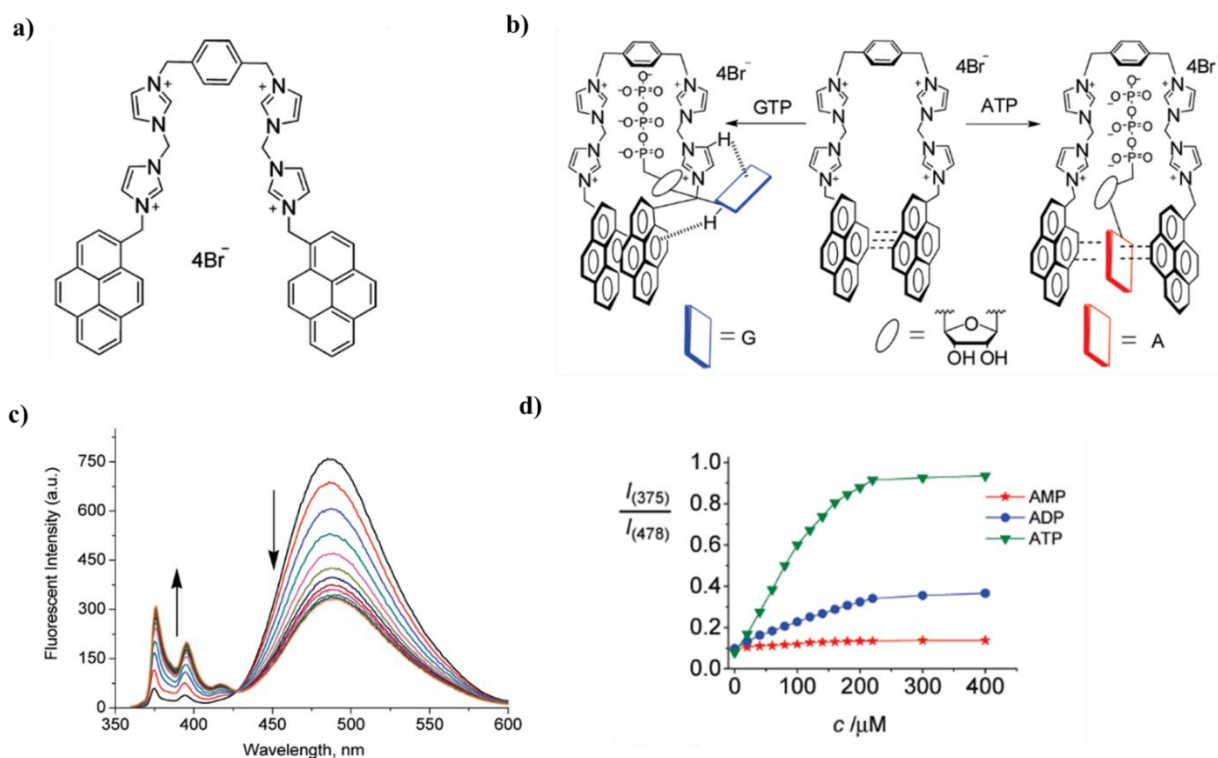


Figure 3.4-a) Pince moléculaire $A^{4+}Br^{4-}$ fluorescente pour la reconnaissance sélective d'ATP **b)** Mode d'association entre la pince et une molécule d'ATP par interactions π et électrostatiques et une molécule de GTP par liaisons hydrogène **c)** Spectre d'émission de fluorescence de la pince $A^{4+}Br^{4-}$ ($[A^{4+}Br^{4-}] = 10 \mu M$, Excitation : 345 nm) en présence d'ATP de concentration croissante **d)** Rapport d'intensité de fluorescence entre le monomère pyrène (375 nm) et l'excimère de pyrène (478 nm) en présence de concentrations croissantes d'Adénosine monophosphate (AMP), diphosphate (ADP) et triphosphate (ATP) . Figures adaptées de la référence ⁸⁶

Certains auteurs se sont intéressés à la capacité de former des complexes supramoléculaires par des systèmes multi-interactions. Tout d'abord, certains travaux ont tenté de développer des systèmes se basant à la fois sur des liaisons covalentes et des interactions intermoléculaires avec le récepteur. En 2016, le groupe de Chang a

développé une sonde composée d'un cœur de Rhodamine B fonctionnalisé avec un acide phénylboronique ⁸⁷. En tirant profit de la capacité que les acides phénylboroniques ont de réagir réversiblement avec les diols du ribose par une interaction covalente et que l'adénosine et les phosphates interagissent avec la partie Rhodamine B par des interactions électrostatiques et π , les auteurs ont développé une approche multi-sites permettant de contrôler la fluorescence de la sonde. En effet, la coopérativité entre l'interaction covalente et intermoléculaire permet l'ouverture du cycle ce qui augmente la fluorescence de la sonde (Figure 3.5). Cette sonde a été utilisée pour détecter sélectivement et rapidement l'ATP en milieu cellulaire dans les mitochondries et s'est avérée être biocompatible et capable de pénétrer les membranes⁸⁷.

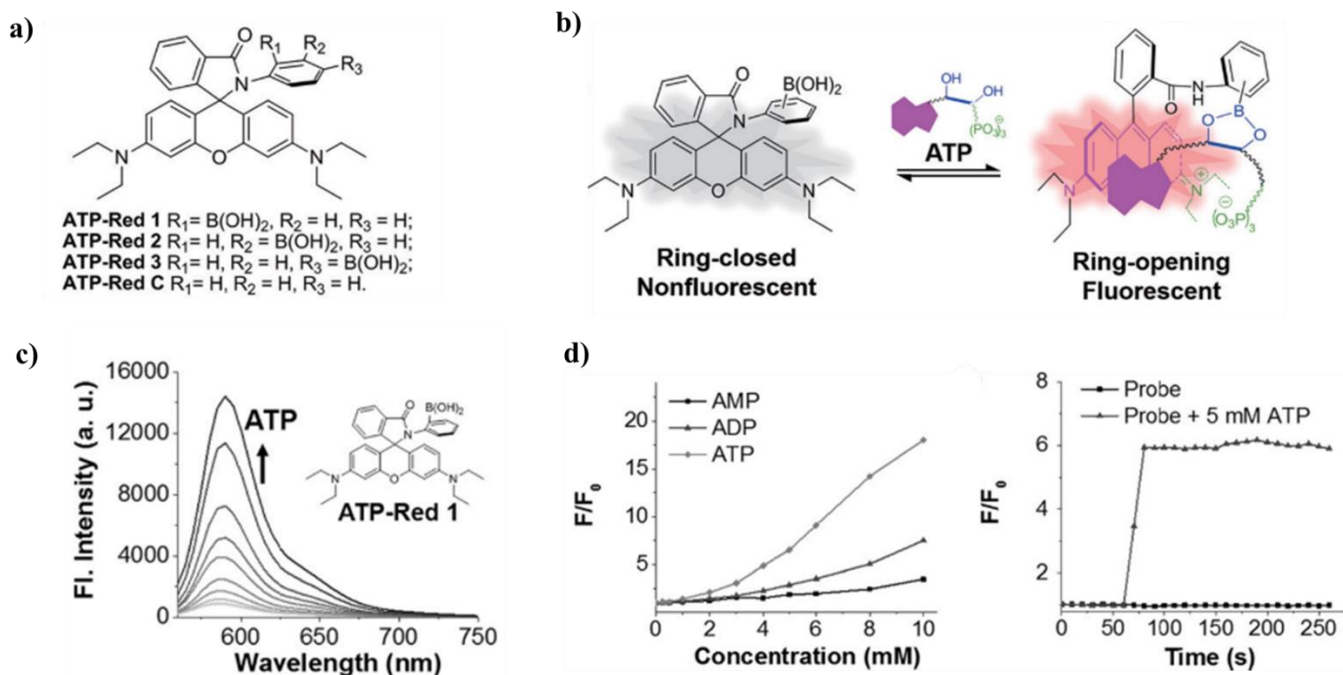


Figure 3.5-a) Structure moléculaire de la sonde d'ATP b) Mécanisme de la réponse photochimique de la sonde en présence d'ATP c) Spectre d'émission de fluorescence (Excitation : 510 nm) de la sonde ATP-Red 1 (10 μ M) en présence de concentrations croissantes d'ATP (0-10 mM) d) Evolution de l'intensité de fluorescence (Excitation : 510 nm, Emission : 590 nm) de la sonde ATP-Red 1 (10 μ M) en présence d'AMP, ADP et ATP . Figures adaptées de la référence ⁸⁷

Puis, d'autres travaux ont tenté d'utiliser des interactions multiples entre l'ATP et des molécules organiques souvent sous la forme d'agrégats moléculaires dont les propriétés de fluorescence sont modulées en présence d'ATP. En effet, certaines molécules, de par leur squelette organique, ont la propriété de s'agréger en solution par synergie d'interactions hydrophobes, π et hydrogène. Ainsi, une diversité de complexes supramoléculaires de type agrégats ont été développés afin de détecter l'ATP en milieu cellulaire par modulation de la fluorescence. En 2014, Yang développe un chromophore de triaryle de bore capable de s'assembler avec l'ATP sous forme d'agrégats moléculaires ⁸⁵. L'agrégation du chromophore cause le plus souvent son quenching de fluorescence par des transferts d'énergie interchromophores (*aggregation-caused quenching ACQ*) (Figure 3.6.a). Néanmoins, en présence d'ATP, la molécule se réarrange en interagissant avec l'adénosine par interaction π et

liaisons hydrogène et avec les phosphates par interactions électrostatiques. Ainsi, sous l'action de l'effet hydrophobe, l'ATP et le chromophore s'agrègent et l'intensité de fluorescence de ce dernier augmente par ajout croissant d'ATP (Figure 3.6.b). De manière assez similaire à la pince moléculaire de pyrène présentée ci-avant, la reconnaissance de l'ATP par le chromophore est sélective de l'ATP vis-à-vis de l'ADP et l'AMP. En effet, les dérivés diphosphate et monophosphate provoquent une augmentation de fluorescence beaucoup moins importante que le dérivé triphosphate et ainsi n'arrivent pas à éviter le quenching du chromophore par agrégation et s'assembler avec ce dernier (Figure 3.6.c). Cette sonde a été utilisée pour différencier la concentration d'ATP présente dans la membrane et le cytosol. De même, Cao et Kim développe une sonde amphiphile d'imidazole capable de s'auto-assembler en micelles en solution provoquant une faible intensité de fluorescence du fluorophore dû à des transferts d'énergie au sein des groupements dansyl (Figure 3.6.d)⁸². Par ajout croissant d'ATP, la fluorescence du composé amphiphile augmente progressivement dû à l'organisation supramoléculaire de l'ATP avec le fluorophore par interaction π , électrostatique et hydrogène empêchant le quenching du composé par agrégation (Figure 3.6.d).

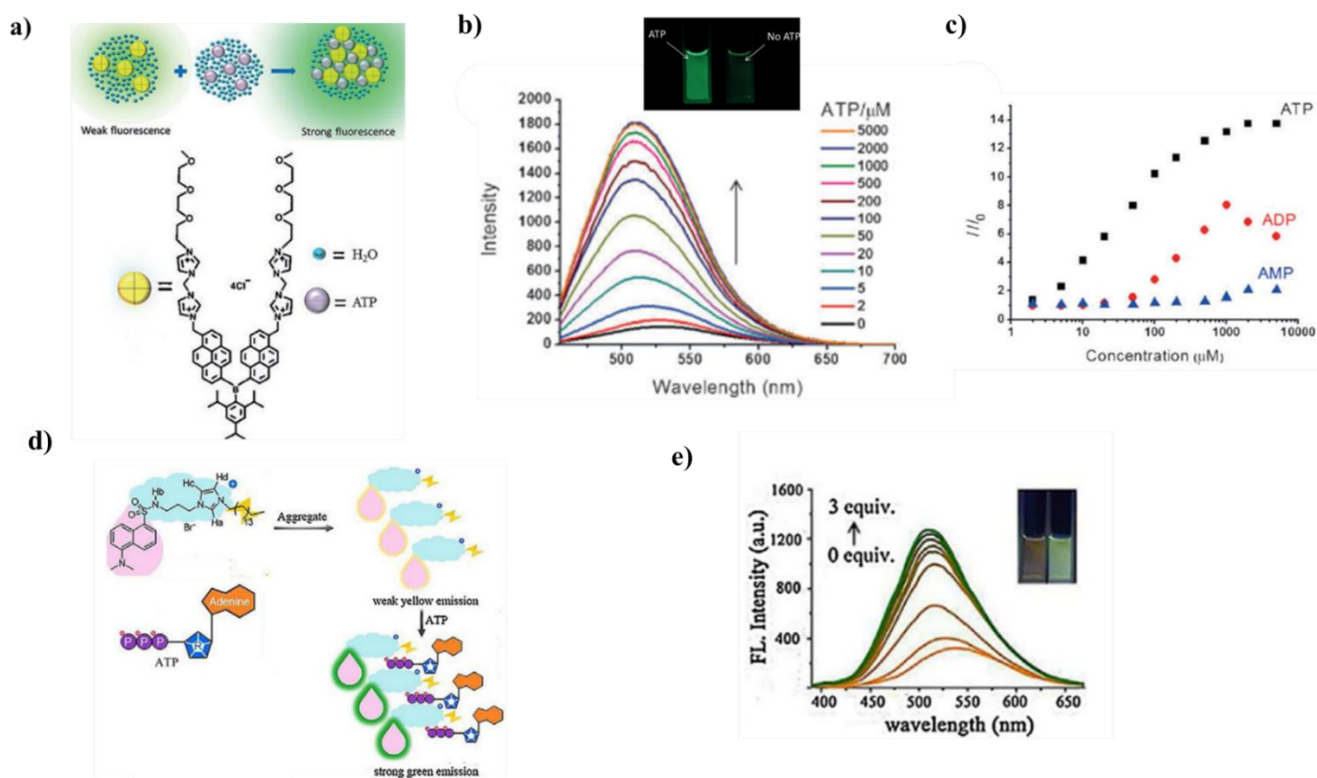


Figure 3.6-a) Structure moléculaire du chromophore triaryl de bore interagissant avec l'ATP⁸⁵ b) Spectre d'émission de fluorescence du chromophore triaryl de bore (10 μ M, Excitation : 440 nm) en présence de quantité croissante d'ATP⁸⁵ c) Intensité de fluorescence du chromophore de triaryl de bore (10 μ M, Excitation : 440 nm, Emission : 510 nm) en présence de quantité croissante d'ATP, ADP et AMP⁸⁵ d) Assemblage d'un fluorophore à base de dansyl avec l'ATP⁸² e) Spectre d'émission de fluorescence du fluorophore à base de dansyl en présence de quantité croissante d'ATP⁸².

Les polymères ont été également très utilisés pour la formation de complexes supramoléculaires avec la molécule d'ATP. Ainsi, des sondes à base de dérivés de polythiophènes conjugués ont été synthétisés et testés pour la reconnaissance moléculaire sélective et spécifique d'ATP^{88,89,90,91}. Les travaux de recherche utilisant les polythiophènes exploitent le fait que ces polymères contrôlent leurs propriétés d'émission par leur conformation et les interactions entre les chaînes. Ainsi, par exemple, en 2005, le groupe de Shinkai a synthétisé une sonde hydrosoluble polymérique dérivée de polythiophènes (Figure 3.7.a) capable de reconnaître sélectivement l'ATP par fluorescence. Lorsque le polymère n'interagit pas avec l'ATP, une intensité de fluorescence est mesurable dû aux polythiophènes. Cependant, lorsque ce polymère est mis en contact de la molécule d'ATP, un complexe supramoléculaire se forme causant un quenching de fluorescence par agrégation du polymère en présence d'ATP via des interactions π , électrostatiques et hydrophobes (Figure 3.7 c et d). Ce quenching de fluorescence est beaucoup moins important pour l'ADP et pour l'AMP ce qui permet de détecter l'ATP sélectivement (Figure 3.7.b)⁸⁸. Cette stratégie basée sur le quenching par agrégation en présence d'ATP a été étendue à d'autres types de polythiophènes. Ainsi, plus récemment en 2015, l'équipe de Lu publie un travail assez similaire et développe une sonde d'ATP à base de polythiophènes fonctionnalisés avec de l'anthracène⁹⁰. L'ajout d'ATP provoque un quenching de fluorescence du polythiophène qui s'agrège en présence d'ATP par synergie des interactions électrostatiques, π et hydrophobes formant un complexe supramoléculaire. Une sélectivité est obtenue entre l'ATP, l'ADP et l'AMP étant donné que le quenching est davantage plus efficace pour l'ATP en quantité équimolaire avec le polymère que pour l'ADP et l'AMP.

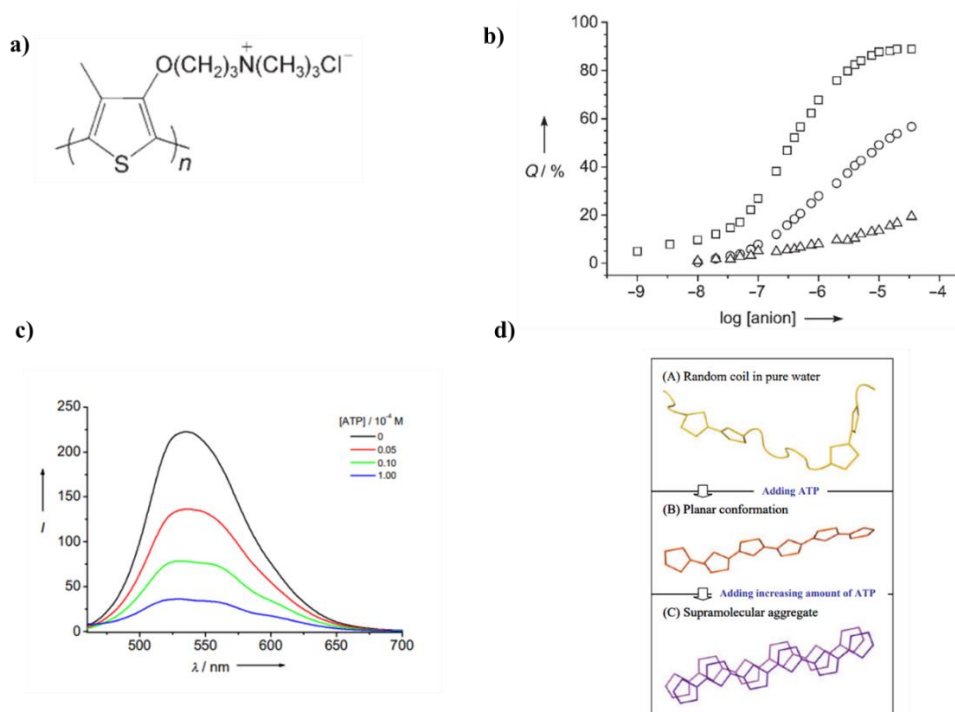


Figure 3.7-a) Structure moléculaire du polymère porteur d'un motif polythiophène **b)** Pourcentage de quenching de fluorescence du polymère (5 μ M, Emission : 529 nm, Excitation : 435 nm) en présence de concentrations croissantes en ATP (carré), ADP (rond) et AMP (triangle) **c)** Spectre d'émission de fluorescence du polymère (100 μ M, Excitation : 435 nm) en présence de différentes concentrations d'ATP. Figures adaptées de la référence⁸⁸

3) Auto-assemblages supramoléculaires à base d'ATP

a) Stratégies d'autoassemblage supramoléculaire templaté par l'ATP

L'approche moléculaire a permis la synthèse de divers complexes supramoléculaires capables de s'assembler sélectivement avec l'ATP et de moduler leurs propriétés de fluorescence par la complexation. Certains auteurs se sont intéressés à utiliser la molécule d'ATP comme un template pour fabriquer des auto-assemblages supramoléculaires complexes fonctionnels de dimension beaucoup plus étendue. Ainsi, divers travaux de recherche ont tenté de développer des matériaux moléculaires synthétisés à partir du co-assemblage supramoléculaire entre l'ATP et une molécule partenaire judicieusement choisie.

En 2014, l'équipe de Subi J. Georges publie une structure hélicoïdale de polymères supramoléculaires auto-assemblée par reconnaissance moléculaire entre l'ATP et le naphthalene diimide portant deux groupements dicopylamine de zinc(II) (ZnNDPA) aux extrémités du chromophore (Figure 3.8.a)⁹². En mettant le ZnNDPA en contact avec l'ATP, le chromophore s'auto-assemble par synergie des interactions π entre les noyaux aromatiques de naphthalène fonctionnalisés, de l'attraction électrostatique entre les centres métalliques Zn^{2+} et l'ATP anionique ainsi que de l'effet hydrophobe des motifs aromatiques. Les auteurs ont montré que l'empilement du chromophore achiral templaté par l'ATP homochirale présentait un effet Cotton sur son signal de dichroïsme circulaire typique d'une chiralité en hélice de type P. A l'inverse, l'organisation supramoléculaire du chromophore en présence d'ADP ou AMP conduit à une chiralité hélicoïdale de type M (Figure 3.8.b et c) mettant en évidence le rôle des interactions électrostatiques dans l'organisation spatiale de l'empilement en hélice du chromophore. En 2019, l'équipe de Schanze décrit l'autoassemblage supramoléculaire entre une porphyrine cationique (Figure 3.8.d) et de l'ATP dans l'eau en fibres hélicoïdales chirales de taille nanométrique⁹³. Le processus d'autoassemblage est gouverné d'une part par les interactions électrostatiques entre les chaînes ammoniums cationiques et les phosphates de l'ATP anioniques et d'autre part par les liaisons hydrogènes entre les groupements N-H de la fonction amide de la porphyrine et les hydrogènes de l'adénosine de l'ATP. Les études photophysiques en fluorescence et absorbance ont montré que l'interaction entre la molécule d'ATP et la porphyrine conduisait à un effet hypochrome de la bande de Soret de la porphyrine en absorbance et à un quenching de fluorescence de cette dernière. Ces résultats montrent que les porphyrines s'agrègent au sein des fibres hélicoïdales et mettent en lumière l'importance des interactions π dans le processus d'autoassemblage. Le spectre de dichroïsme circulaire de la porphyrine cationique en présence d'ATP a montré un signal typique d'une chiralité hélicoïdale M (gauche) confirmant le co-assemblage en hélice de l'ATP avec la porphyrine. Ce processus d'auto-assemblage a été étendu à d'autres nucléotides triphosphates tels que l'UTP, la CTP et la GTP montrant également un signal de chiralité en hélice mais beaucoup moins intense que celui de l'ATP (Figure 3.8.f).

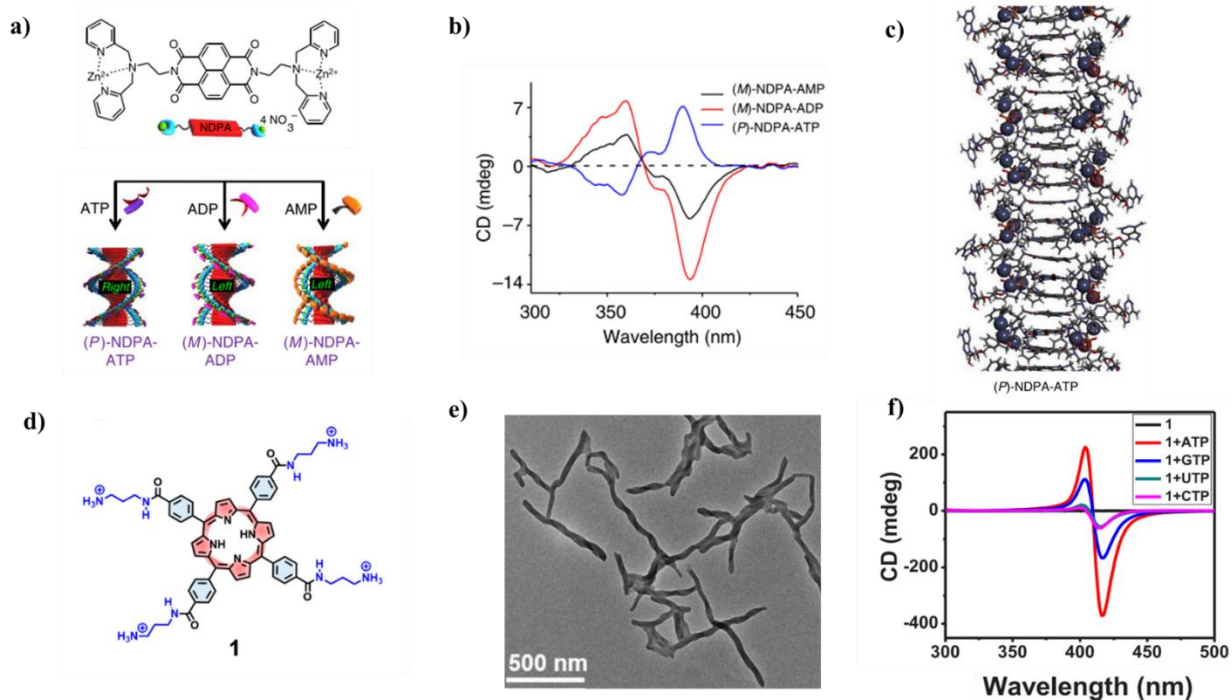


Figure 3.8-a) Structure moléculaire de ZnNDPA s'assemblant avec l'ATP, l'ADP ou l'AMP en hélice supramoléculaire de chiralité définie (M ou P)⁹² b) Spectre de dichroïsme circulaire de ZnNDPA en présence d'ATP, ADP et AMP⁹² c) Représentation de l'empilement à une dimension du chromophore ZnNDPA en présence d'ATP en hélice (P)⁹² d) Structure moléculaire de la porphyrine cationique **1** s'assemblant avec l'ATP⁹³ e) Observation au microscope électronique à transmission des hélices chirales d'ATP/Porphyrine ⁹³ f) Spectre de dichroïsme circulaire de **1** en présence de différents nucléotides triphosphates (ATP, GTP, UTP et CTP)⁹³

En plus des assemblages supramoléculaires organiques, les scientifiques se sont intéressés au développement d'aptamères d'ADN ou d'ARN capables de se lier à l'ATP. Les aptamères sont des petits oligonucléotides d'ARN ou ADN monobrin capables de se lier spécifiquement à une cible (molécule organique, peptide, protéine)⁹⁴. L'aptamère d'ADN à 27 nucléotides pour l'ATP est celui qui a été le plus étudié depuis sa publication en 1995 par Huizenga et Szostak ⁹⁵. L'aptamère contient deux régions riches en bases guanine et deux résidus adénosines. Les régions riches en bases guanine s'empilent l'une avec l'autre en G-quartet et les résidus adénosines invariants se positionnent par interactions π entre la face supérieure du G-quartet et les deux petites séquences de bases appariées (Figure 3.9.a). Ellington étudie en 2000 cette structure et propose deux sites de fixation de l'ATP au sein de l'aptamère de constante de dissociation $K_d=10^{-6}$ M (Figure 3.9.a) ⁹⁶. Ainsi, les aptamères peuvent s'auto-assembler avec l'ATP en changeant leur structure secondaire permettant de fabriquer des matériaux intelligents. Deux stratégies ont été développées afin d'assembler des aptamères avec de l'ATP. La première (*Internal aptamer*) consiste à faire interagir un monobrin d'aptamère avec une ou plusieurs molécules d'ATP se fixant sur le site de liaison de l'aptamère. Cette interaction conduit à un repliement de la chaîne nucléotidique de l'aptamère. En 2012, l'équipe de Mao étudie le repliement et le dépliement d'un aptamère d'ADN en présence d'ATP et montre que la stabilité mécanique des aptamères liés à l'ATP était beaucoup plus grande que celle des aptamères sans le ligand (Figure 3.9.d) ⁹⁷. La deuxième

stratégie (*Split aptamer*) consiste à assembler deux aptamères d'ADN s'hybridant par ajout d'ATP. Cet assemblage repose sur le fait que la constante d'association entre un brin d'aptamère et l'ATP est beaucoup plus faible que celle de deux brins associés d'aptamères et l'ATP. Ainsi, en 2017, l'équipe de Jayawickramarajah étudie l'assemblage de deux brins d'aptamères d'ADN s'hybridant en présence d'ATP (Figure 3.9.c). Un brin d'ADN est fonctionnalisé à son extrémité 5' par un complexe hôte-invité de cucurbit[7]uril complexant un inhibiteur de protéine. L'autre brin est fonctionnalisé par une molécule d'adamantane ayant une constante d'association avec le calixarène plus grande que celle de l'inhibiteur de protéine. Ainsi, par ajout d'ATP, les deux aptamères s'hybrident et provoquent la complexation de l'adamantane avec le cucurbit[7]uril libérant ainsi l'inhibiteur de protéine. Cette étude constitue un exemple de complexation compétitive et fonctionne davantage par augmentation progressive de la concentration en brin d'aptamère d'ADN fonctionnalisé avec l'adamantane ⁹⁸.

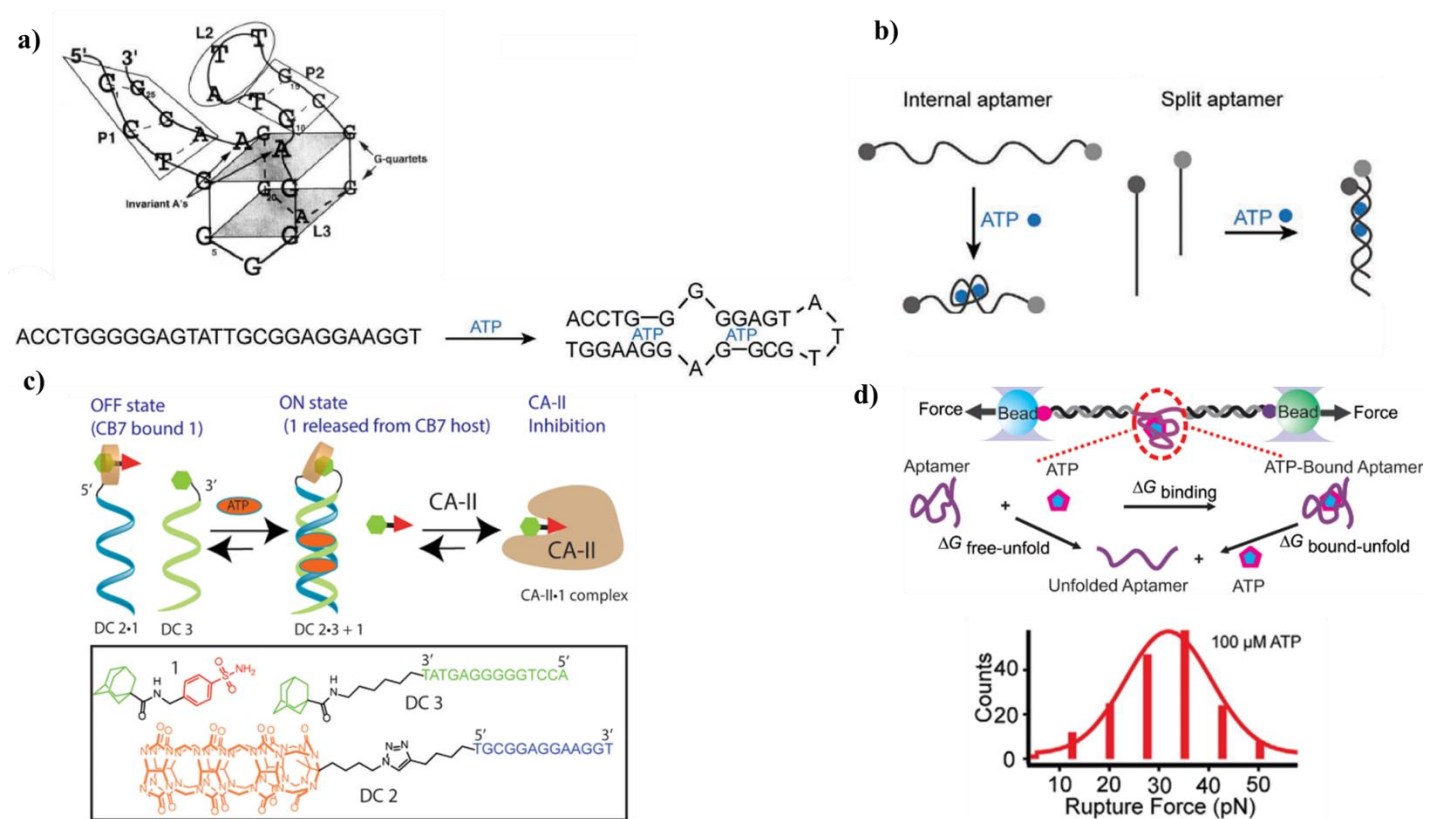


Figure 3.9 – a) Structure modèle de l'aptamère d'ADN sélectif de l'ATP et représentation schématique de l'interaction ATP-Aptamère d'ADN. P1 et P2 représentent les brins d'ADN appariés. L1 et L2 représentent les bases non appariées. Les rectangles gris représentent les deux faces du G-quartet. Les résidus adénosine sont représentés par des flèches « *Invariant A's* »^{79,95} b) Stratégies moléculaires d'assemblages d'aptamères d'ATP ⁷⁹ c) Split d'aptamères d'ADN induit par l'ATP pour le relargage d'un inhibiteur de protéine ⁹⁸ d) Repliement mécanique d'aptamères d'ATP⁹⁷

Les polymères ont également été explorés pour former des co-assemblages avec l'ATP^{81,99,100}. Les polymères amphiphiles multichargés ont une grande probabilité de reconnaissance par l'ATP étant donné la densité

électronique négativement chargée des phosphates et l'aspect amphiphile de la molécule d'ATP. Ainsi, en 2010, l'équipe de Zhang publie l'autoassemblage supramoléculaire d'une molécule d'ATP avec un copolymère à bloc constitué d'un bloc de polyéthylène glycol (PEG) et d'un bloc de chlorure de poly-L-Lysine¹⁰⁰. Ce copolymère est entièrement hydrophile au départ. Lorsque la partie PLKC est complexée avec l'ATP, celle-ci devient hydrophobe. PEG reste hydrophile. Ainsi ce copolymère devient amphiphile d'où une auto-organisation en micelle dans l'eau. (Figure 3.10.a). De même, en 2016, l'équipe de Prins publie l'autoassemblage d'un tensioactif, possédant un complexe chargé positivement à l'extrémité de sa chaîne carbonée, avec l'ATP en vésicules nanométriques⁹⁹. Le tensioactif, initialement sous forme de micelles en solution, interagit avec l'ATP par interactions électrostatiques et réorganise sa structure micellaire en une vésicule par effet hydrophobe des chaînes alkyles (Figure 3.10.b)

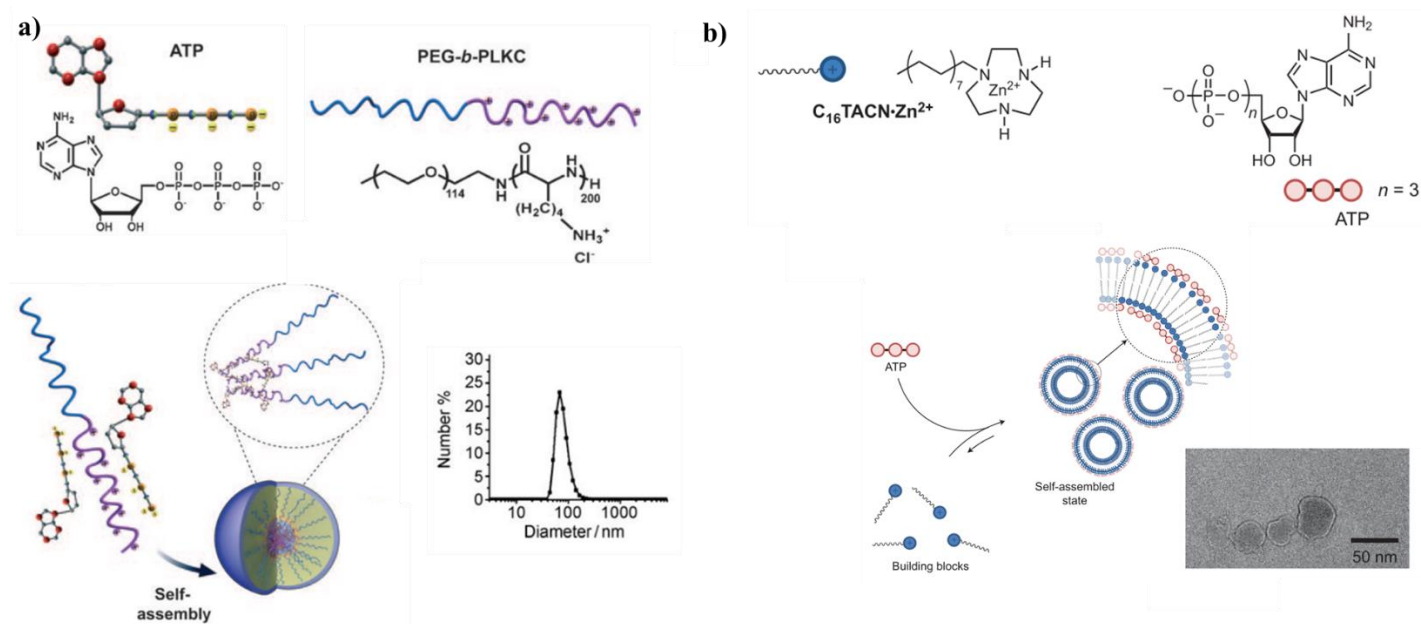


Figure 3.10- a) Stratégie d'autoassemblage supramoléculaire d'un polymère amphiphile PEG-b-PLKC avec l'ATP en vésicules nanométriques¹⁰⁰ b) Stratégie d'autoassemblage supramoléculaire d'un tensioactif $C_{16}TACN.Zn^{2+}$ avec l'ATP en vésicules nanométriques⁹⁹

Ainsi, deux principales stratégies ont été développées jusqu'ici pour synthétiser des autoassemblages supramoléculaires à base d'ATP. La première consiste à faire interagir l'ATP avec une molécule organique (complexe, molécule, polymère) possédant des interactions spécifiques. L'ATP est donc utilisée comme un template permettant de réorganiser le système de façon à maximiser les interactions entre cette molécule organique et lui-même donnant naissance à des autoassemblages complexes étendus. La deuxième stratégie consiste à designer des aptamères d'ADN ou ARN capable de se lier sélectivement à l'ATP. Ainsi, l'interaction entre ces brins permet de fabriquer des assemblages aptamère-ATP ayant une forte constante d'association. Ceci a conduit à développer des matériaux moléculaires intelligents fonctionnels auto-assemblés se reconfigurant à l'échelle supramoléculaire en présence d'ATP ou utilisant l'ATP comme brique stimuli-répondante. Cette approche est détaillée dans les deux paragraphes suivants.

b) Autoassemblages supramoléculaires répondant à la présence d'ATP

Certains scientifiques se sont intéressés à la possibilité de l'ATP d'induire une réorganisation supramoléculaire d'autoassemblages déjà formés. Cette approche a été très utilisée pour la libération contrôlée de substances biologiquement actives et tirent profit des différentes propriétés chimiques de l'ATP.

En 2013, l'équipe d'Aida développe des nanotubes protéiques capables de se désassembler et libérer une substance active en présence d'ATP¹⁰¹. Les nanotubes sont formés par polymérisation du bloc GroEL_{MC}. Le bloc GroEL_{MC} est synthétisé en traitant le mutant GroEL_{Cys} portant 14 résidus cystéine (Cys) avec un maléimide fonctionnalisé avec spirobenzopyrane MC à pH physiologique. GroEL_{MC} est ainsi capable de polymériser par ajout d'ions magnésium Mg²⁺ qui coordine le ligand MC et joue le rôle de pont entre deux ligands aux extrémités de deux blocs GroEL_{MC} (Figure 3.11. a et b). Ainsi, des structures nanométriques en fils sont obtenues (Figure 3.11.c). Par ajout d'ATP, la structure se désassemble en petits blocs GroEL_{MC} par complexation du pont Mg²⁺ avec la molécule d'ATP portant quatre charges négatives chacune localisées sur un oxygène des phosphates. Ce désassemblage s'accompagne d'un mouvement mécanique du polymère qui tend à se briser avec la décoordination du magnésium des ligands MC (Figure 3.11. b et c). Ce matériau a été utilisé comme un hôte capable d'encapsuler des molécules invitées telles que des substances biologiquement actives. Par ajout d'ATP, ce système est capable de relarguer ces dernières par désassemblage du complexe hôte-invité.

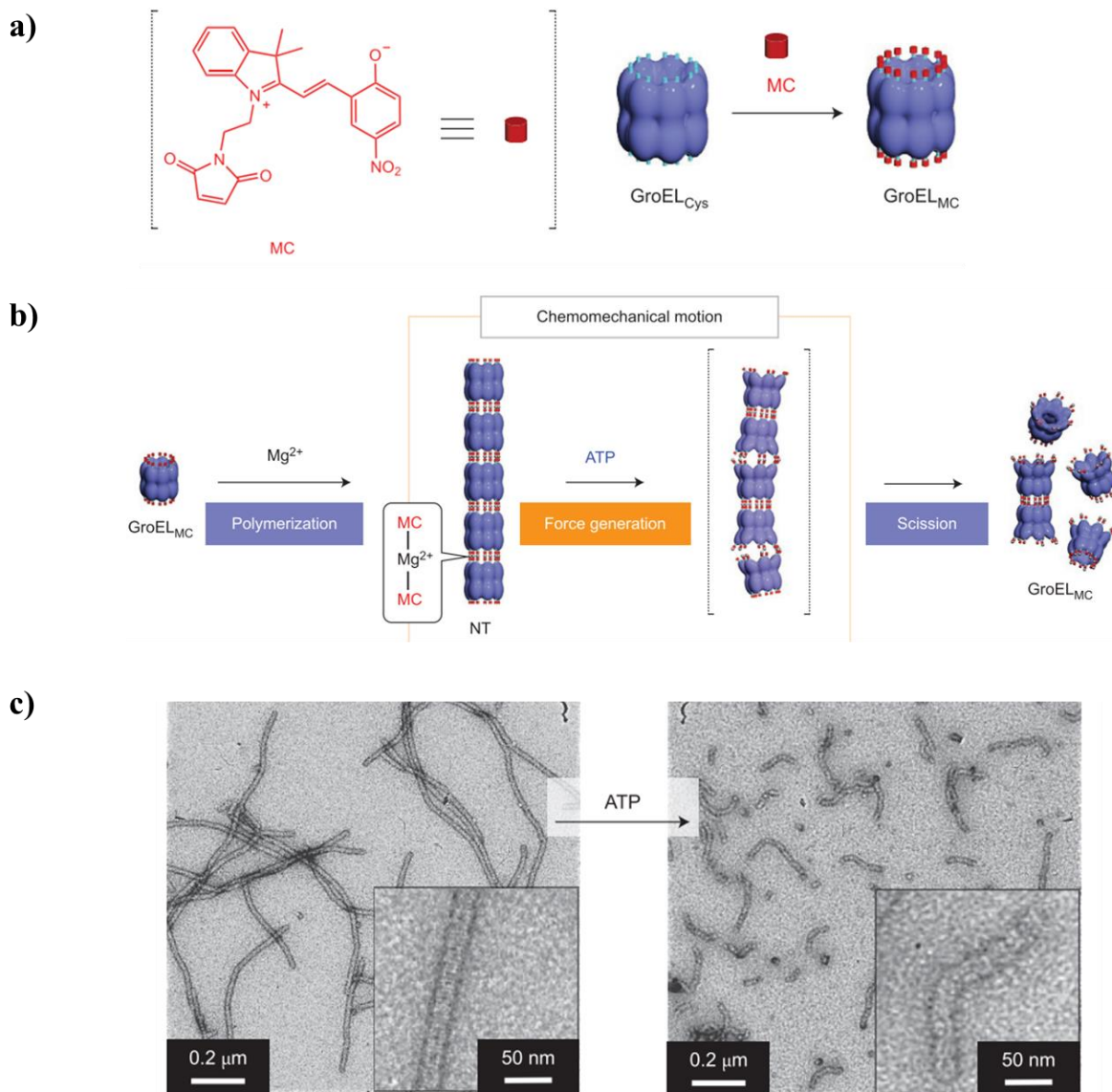


Figure 3.11-a) Fonctionnalisation du mutant GroEL_{Cys} par le maléimide de spirobenzopyrane MC pour former le monomère GroEL_{MC} **b)** Stratégie de polymérisation supramoléculaire de GroEL_{MC} par complexation des ligands MC avec les ions Mg²⁺ et désassemblage chimio-mécanique du nanotube NT par action de l'ATP **c)** Observation au microscope électronique à transmission des nanotubes NT avant et après ajout d'ATP. Figures adaptées de la référence¹⁰¹

Les aptamères ont également été largement explorés pour répondre à la présence d'ATP et fabriquer des systèmes moléculaires intelligents. Ces derniers ont vu leurs principales applications dans la libération contrôlée de substances biologiquement actives. En 2014, l'équipe de Gu publie un système supramoléculaire capable de relarguer en présence d'ATP, la doxorubicine (Dox) qui est un agent anticancéreux (Figure 3.12)¹⁰². Deux aptamères d'ADN spécifiques de l'ATP sont hybridés en double-brin. Au sein de ce double-brin d'ADN, la Dox s'intercale entre les bases appariées guanine-cytosine. Ainsi, par ajout d'ATP, les aptamères se complexent à l'ATP et se désappariant permettant de désintercaler la Dox et libérer la molécule anticancéreuse. Cette libération s'avère efficace à forte concentration d'ATP. Afin de compenser la mauvaise

efficacité de pénétration cellulaire des doubles brins d'ADN chargés négativement, ces derniers ont été neutralisés par des peptides chargés positivement, le tout encapsulé au sein d'un nanogel permettant la pénétration du double-brin neutralisé au sein de la cellule riche en ATP et le relargage de la Dox dans le cytosol et le noyau cellulaire (Figure 3.12).

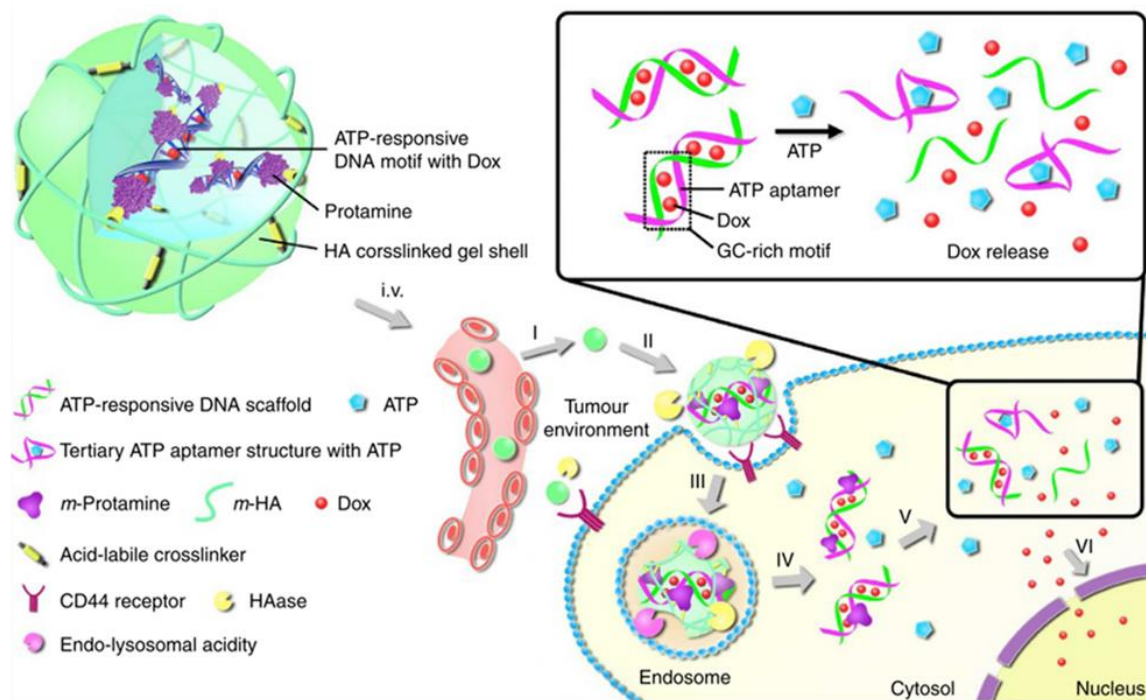


Figure 3.12-Représentation schématique de la libération contrôlée de doxorubicine Dox par ajout d'ATP au sein d'un nanogel d'aptamères d'ADN ¹⁰²

Cette stratégie de désassemblage d'aptamères d'ADN par l'ATP a été utilisée afin de développer des sondes moléculaires fluorescentes à base d'aptamères spécifiques de l'ATP. En 2008, l'équipe de Tan assemble deux aptamère d'ADN avec un brin d'ADN complémentaire par appariement des bases. L'aptamère et le brin d'ADN sont chacun fonctionnalisés par un fluorophore F (6-carboxyfluorescein ou 6-FAM) et un quencher Q (black hole quencher 1 ou BHQ 1) ¹⁰³. Les deux brins appariés sont liés par une chaîne flexible de polyéthylène glycol (PEG) (Figure 3.13.a). En l'absence d'ATP, Q et F sont proches, de par l'hybridation intramoléculaire des bases d'ADN et la fluorescence du fluorophore est éteinte (Figure 3.13.c). En présence de concentrations croissantes d'ATP, la conformation de l'aptamère hybridée se modifie de manière à se lier spécifiquement à l'ATP (Figure 3.13.a). Ainsi, l'hybridation intramoléculaire des bases d'ADN se rompt éloignant le quencher du fluorophore et permettant à ce dernier de fluorescer (Figure 3.13.c). Cette approche tout-en-un conjugue l'aptamère, l'oligonucléotide complémentaire ainsi que les groupements moléculaires permettant la détection par le signal de transduction photochimique.

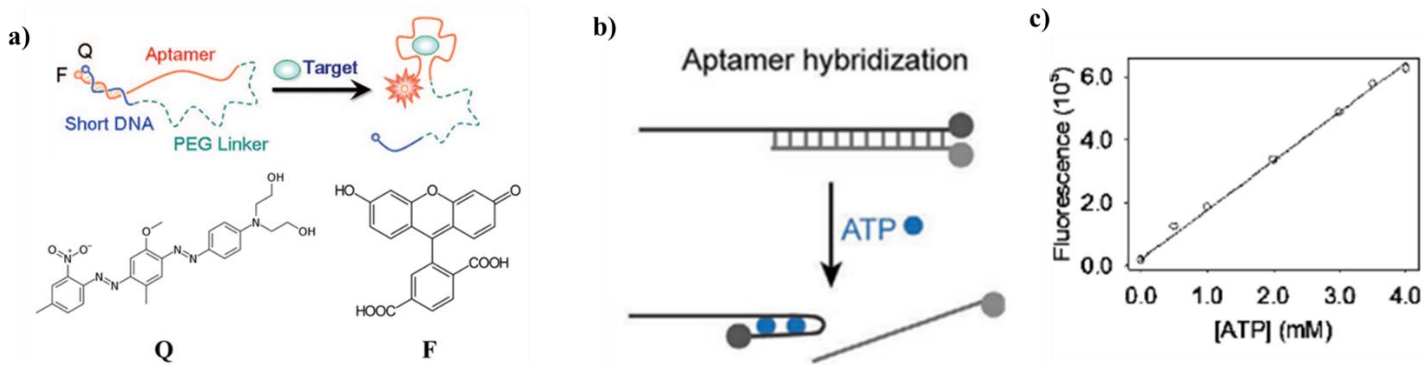


Figure 3.13- a) Représentation schématique de l'aptamère lié à l'oligonucléotide complémentaire et relié par une chaîne PEG ciblant l'ATP. Q représente le quencher (6-FAM) et F le fluorophore (BHQ 1) ¹⁰³ b) Stratégie de désappariement d'un duplex d'ADN par complexation d'un aptamère et l'ATP ⁷⁹ c) Intensité de fluorescence du fluorophore F en présence de concentrations croissantes d'ATP ¹⁰³

c) Autoassemblages dynamiques à base d'ATP stimuli-répondants

L'ATP est capable d'induire une diversité d'autoassemblages supramoléculaires avec d'autres briques telles que des complexes, des molécules organiques ou des aptamères. Outre l'intérêt d'utiliser une molécule biologique importante pour la détection ou le contrôle de procédés biochimiques, l'ATP constitue également une brique stimuli-répondante de par ses propriétés chimiques et biologiques. Fabriquer des systèmes dynamiques et stimuli-répondants est un champ de recherche fondamentale et appliquée pour fabriquer des matériaux intelligents capables de réagir réversiblement à un stimulus et dont la fonction (relargage, fluorescence, chiralité,...) peut être dynamiquement contrôlée.

L'une des principales caractéristiques de l'ATP exploitée pour fabriquer des systèmes stimuli-répondants est la réponse enzymatique des triphosphates de l'ATP en présence d'une enzyme clivante. Ainsi, une diversité d'autoassemblages supramoléculaires à base d'ATP ont été étudiés pour leur réponse fonctionnelle par action d'une enzyme capable de dégrader l'ATP et ainsi perturber l'état d'équilibre de l'assemblage. Les phosphatases ont été largement utilisées pour dégrader l'ATP. Ainsi, divers travaux ont utilisé la réponse de l'ATP à divers enzymes. En 2018, l'équipe de Subi J. George montre l'autoassemblage supramoléculaire d'un complexe bimétallique de zinc portant un motif central π -conjugué avec l'ATP en hélice chirale par synergie des interactions π et électrostatiques¹⁰⁴. En l'absence d'ATP, le chromophore existe sous son état d'agrégation stable (*dormant state*) (Figure 3.13.a). Lorsque l'hélice chirale est en présence d'apyrase, celle-ci se désassemble instantanément, l'apyrase étant capable d'hydrolyser l'ATP en ADP et en AMP. Ainsi, par réaction enzymatique, le système est capable d'exister réversiblement entre deux états : un état d'agrégation non assemblé du chromophore et un état assemblé sous forme d'hélice chirale de ce dernier en présence d'ATP. En 2016, l'équipe de Prins étudie l'autoassemblage supramoléculaire d'un tensioactif portant une extrémité de complexe de Zn^{2+} chargée positivement avec de l'ATP en vésicules nanométriques⁹⁹. En l'absence d'ATP, le tensioactif s'assemble sous forme de petites micelles en solution par effet hydrophobe et interactions

électrostatiques. Lorsque le vésicule est en présence d'apyrase, ce dernier se désassemble et le système reforme les micelles de tensioactifs. Ainsi, tout comme l'hélice précédemment mentionnée, le système moléculaire oscille entre un état non assemblé du tensioactif sous forme de micelles et un état assemblé sous forme de vésicules en présence d'ATP (Figure 3.13.b).

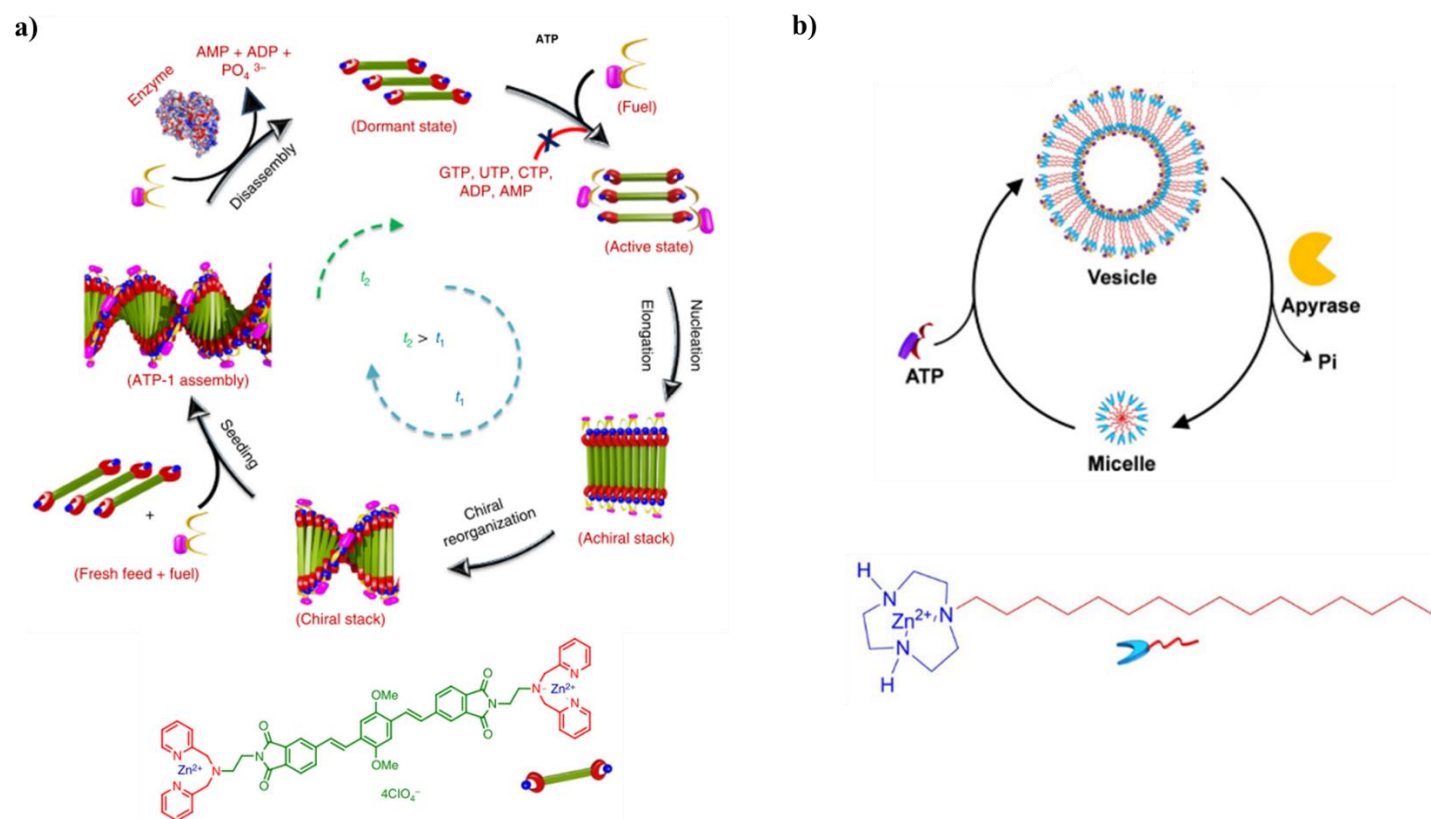


Figure 3.14-a) Désassemblage d'une hélice chirale formée par l'ATP et un chromophore π -conjugué en présence d'apyrase ¹⁰⁴ **b)** Désassemblage d'un vésicule formé par l'ATP et un tensioactif cationique en présence d'apyrase ^{99,81}

Certains travaux ont utilisé cette stratégie enzymatique pour contrôler l'émission de fluorescence de composants moléculaires photoactifs s'assemblant avec l'ATP. En 2021, l'équipe de Tian publie l'autoassemblage d'un dérivé cationique d'anthracène avec l'ATP sous forme d'hélices micrométriques¹⁰⁵. Les dérivés d'anthracène ont une capacité d'agrégation en solution et possède une forte émission de fluorescence dans le jaune lorsqu'ils s'agrègent tandis que le monomère possède une forte émission de fluorescence dans le vert. Lorsque le monomère s'assemble avec l'ATP, des agrégats d'ATP/anthracène se forment au sein de l'hélice, par interactions π et électrostatiques, conduisant au quenching de fluorescence du dérivé d'anthracène. Par ajout d'alkaline phosphatase, capable d'hydrolyser l'ATP en adénosine et trois groupements phosphate, l'assemblage d'ATP/anthracène se désassemble par dégradation de la molécule d'ATP et libère le dérivé d'anthracène cationique capable de s'agréger par interaction π entre les motifs aromatiques et de fluorescer (Figure 3.15.a). Ainsi, les auteurs ont été capable de contrôler la fluorescence d'un dérivé d'anthracène par co-assemblage et hydrolyse enzymatique. De la même manière, en 2013, l'équipe de Yam synthétise un complexe cationique de platine Pt(II) coordonné à un ligand terpyridine ¹⁰⁶. Les auteurs montrent que l'ATP est capable

d'induire l'assemblage supramoléculaire de ce complexe par synergie des interactions métal-métal Pt..Pt , des interactions π entre les motifs aromatiques de la sphère de coordination et interactions électrostatiques entre les charges des phosphates de l'ATP et le complexe cationique. Le complexe de platine Pt(II) possède une faible intensité de fluorescence dans le proche infrarouge (780 nm). Lorsque le complexe s'agrège en présence d'ATP, une forte intensité de fluorescence à cette même longueur d'onde est mesurée (Figure 3.15.b). Par action de l'ATPase, enzyme capable d'hydrolyser l'ATP en ADP, l'interaction entre l'ATP et le complexe est rompue provoquant la dissolution de l'assemblage supramoléculaire et la perte de fluorescence dans le proche infrarouge. En effet, ce travail met en lumière l'interaction spécifique entre le complexe et l'ATP, capable d'induire l'assemblage tandis que l'ADP n'a pas d'interactions électrostatiques aussi fortes que son homologue triphosphate pour induire l'assemblage. Les auteurs ont donc utilisé ce système de détection par fluorescence pour suivre l'activité enzymatique des ATPases.

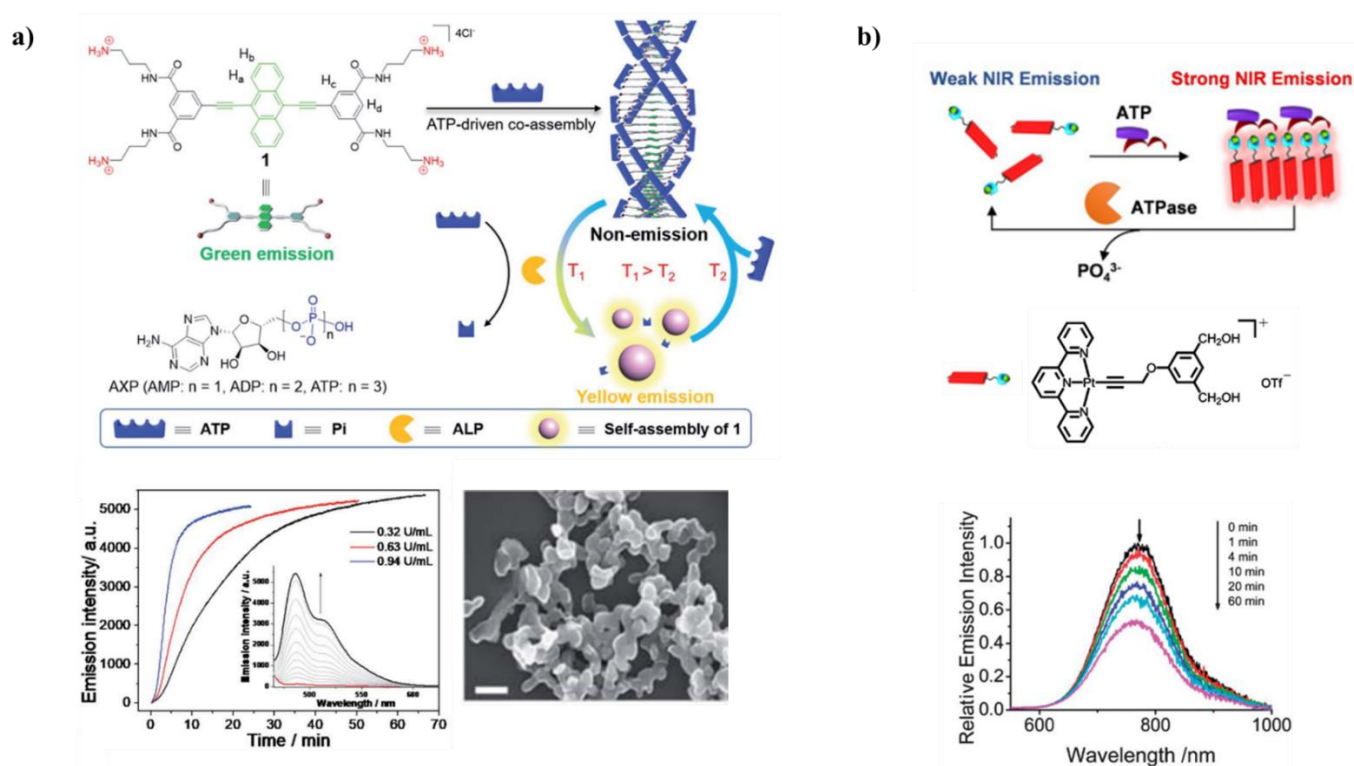


Figure 3.15-a) Autoassemblage supramoléculaire d'un dérivé cationique d'antracène avec l'ATP et contrôle par l'enzyme ALP de l'émission de fluorescence par agrégation du chromophore (Emission : 484 nm, Excitation : 420 nm)
¹⁰⁵ **b)** Assemblage supramoléculaire d'un complexe de platine Pt(II) induit par l'ATP et contrôle par l'enzyme ATPase de l'émission de fluorescence dans le proche infrarouge du complexe ¹⁰⁶

La température a également été utilisée comme un stimulus dynamique d'assemblages supramoléculaires à base d'ATP. En effet, les interactions intermoléculaires sont sensibles à la température du milieu et en modifiant ce paramètre, certains travaux ont été capables de cristalliser des assemblages. En 2005, l'équipe de Kimizuka étudie le co-assemblage thermo-contrôlé entre un dérivé substitué de thiocarboyanine cationique

(Figure 3.16.a) et l'ATP par synergie des interactions π et électrostatiques¹⁰⁷. Les molécules s'autoassemblent les unes avec les autres sous forme de fils nanométriques (Figure 3.16.c). Les auteurs ont été capables de réversiblement désassembler et réassembler les molécules par chauffage et refroidissement progressif du mélange des deux espèces (Figure 3.16.b et d).

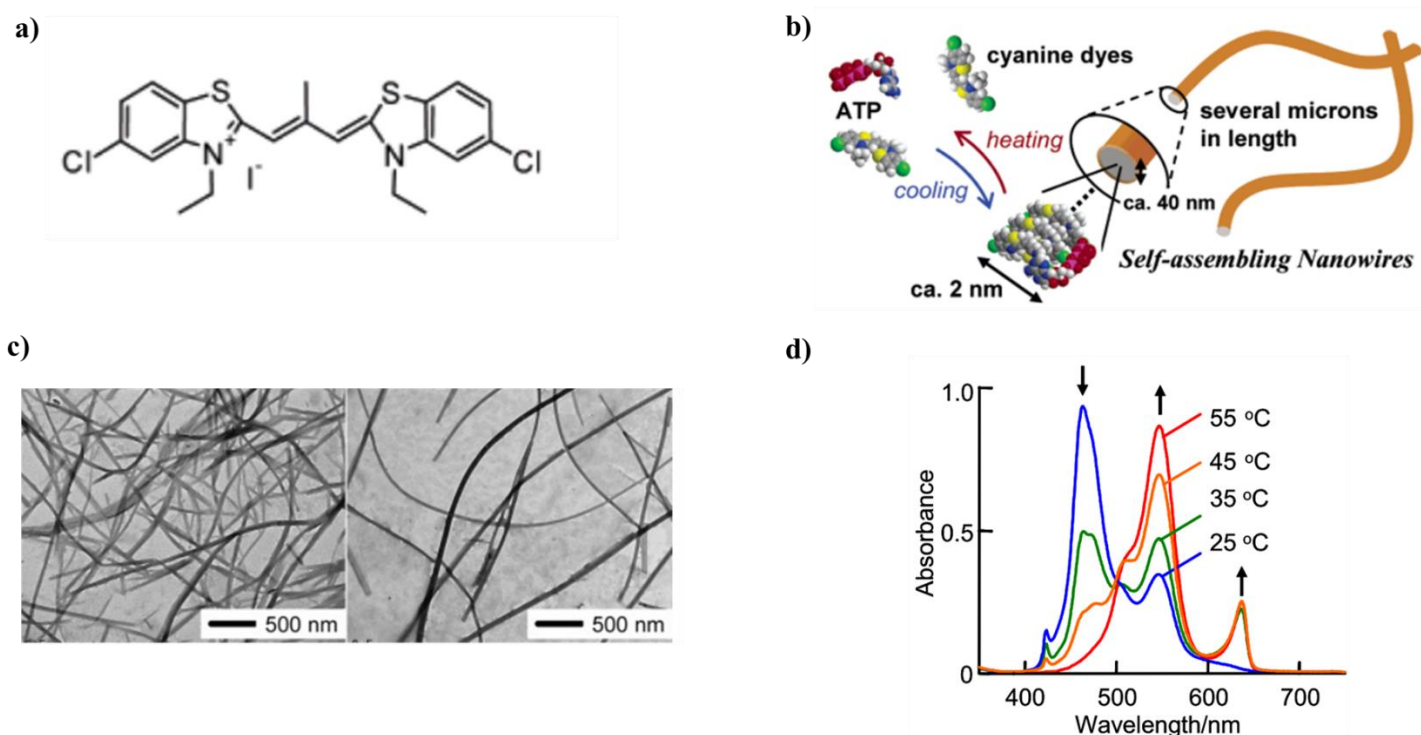


Figure 3.16-a) Structure moléculaire du chromophore substitué de thicyanine s'assemblant avec l'ATP **b)** Stratégie d'autoassemblage moléculaire thermo-contrôlée **c)** Observation au microscope électronique à transmission des nanofils supramoléculaires assemblés (gauche : assemblage formé après mélange à température ambiante, droite : réassemblage des fils après refroidissement du mélange chromophore/ATP initialement chauffé à 55°C **d)** Suivi spectroscopique du réassemblage supramoléculaire par refroidissement progressif du mélange chromophore/ATP initialement chauffé à 55°C . Figures adaptées de la référence ¹⁰⁷

L'ATP a également des propriétés chélatantes de par les charges négatives localisées sur les oxygènes des groupements phosphates ¹⁰⁸. Ainsi, divers travaux ont tiré profit de ses propriétés de complexation avec des acides de Lewis. En 2013, l'équipe de Wu étudie la complexation supramoléculaire dans l'eau entre un polythiophène et l'ATP par synergie des interactions π et électrostatiques ¹⁰⁹. Cette complexation provoque un π -stacking des polythiophènes causant leur quenching de fluorescence (Figure 3.17.a). Lorsque les ions cuivre sont ajoutés au complexe, ces derniers sont chélatés par l'ATP brisant ainsi son interaction avec le polythiophène cationique et provoquant une augmentation de l'intensité de fluorescence du polymère. Dans le même esprit, en 2013, l'équipe de Yam étudie les propriétés de fluorescence d'un assemblage formé entre un complexe platiné de terpyridine et l'ATP décrit ci-avant (Figure 3.15.b) ¹⁰⁶. Lorsque l'assemblage supramoléculaire est en présence de concentrations croissantes d'ions Mg^{2+} , l'intensité de fluorescence du complexe assemblé diminue progressivement dû à la complexation de l'ATP avec le magnésium brisant ainsi

son interaction avec le complexe de platine (Figure 3.17.b). A l'inverse, lorsque l'EDTA est ajouté au milieu, l'intensité de fluorescence du complexe platiné de terpyridine augmente et l'assemblage supramoléculaire se reforme. En effet, l'EDTA a une forte affinité de complexation avec les ions Mg^{2+} et son ajout permet de décoordonner l'ATP qui, à son tour, peut s'assembler à nouveau avec le complexe. Ce travail constitue un exemple de complexations compétitives pour former des assemblages supramoléculaires dynamiques à base d'ATP.

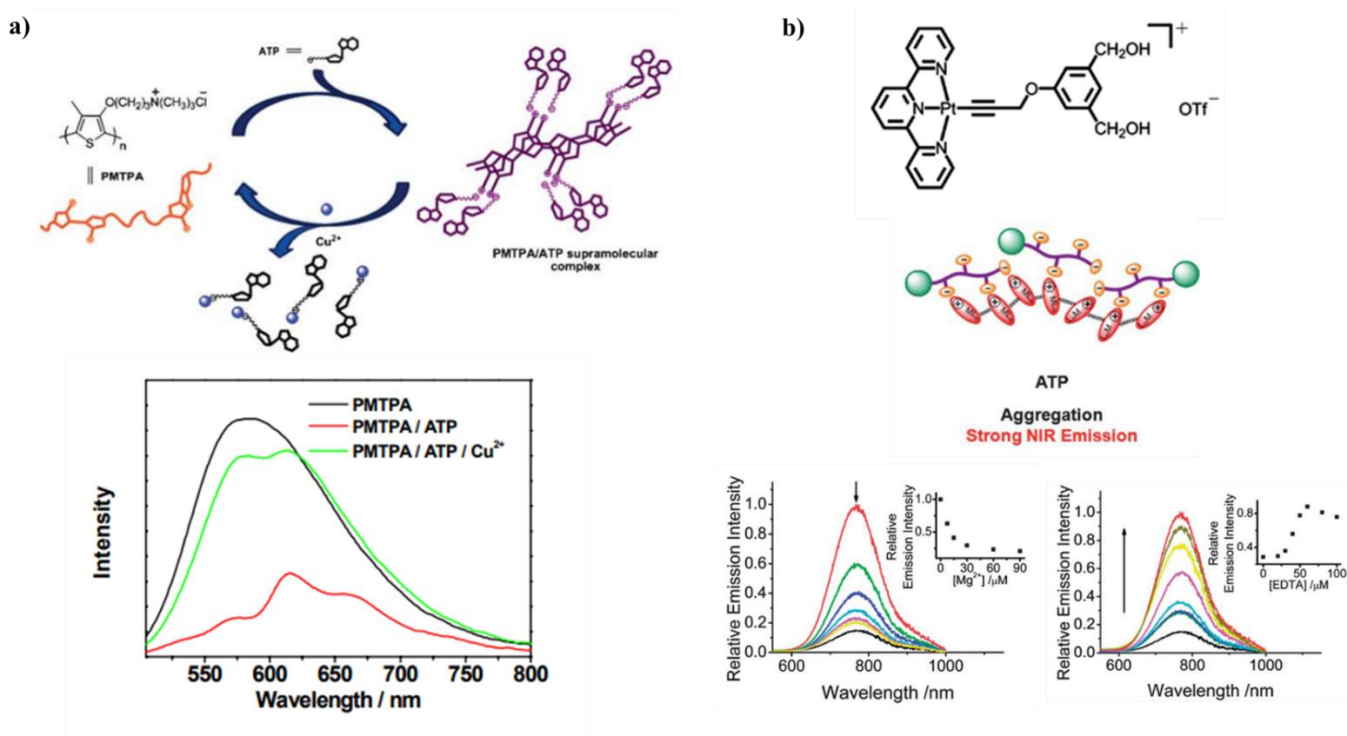


Figure 3.17 -a) Contrôle de l'intensité de fluorescence d'un co-assemblage supramoléculaire dérivé de polythiophène/ATP par complexation (Excitation : 490 nm)¹⁰⁹ **b)** Contrôle de l'intensité de fluorescence d'un assemblage supramoléculaire de complexe platiné de terpyridine templaté par l'ATP par complexation compétitive d'ions Mg^{2+} avec l'ATP et l'EDTA ¹⁰⁶

4) Positionnement du travail de thèse

On a vu qu'il existe un grand nombre de systèmes supramoléculaires auto-assemblés à base d'ATP, dynamiques et capables de répondre à différents stimuli, notamment l'activité enzymatique (via l'hydrolyse de l'ATP), la température ou la présence/l'ajout d'ions métalliques (via la chélation). De manière notable, alors que la lumière constitue un stimulus particulièrement intéressant pour le contrôle spatio-temporel à distance, sa biocompatibilité et sa modularité (longueur d'onde, puissance), à notre connaissance aucun édifice supramoléculaire à base d'ATP photostimulable n'a été décrit jusque-là. Avec l'objectif de relever ce défi, nous proposons dans cette thèse d'étudier l'interaction entre l'ATP et un intercalant d'ADN photosensible : l'AzoDiGua. Il s'agit d'un azobenzène fonctionnalisé avec deux extrémités guanidinium ayant une forte affinité avec les phosphates nucléotidiques ¹¹⁰. Ainsi, nous pensons que faire interagir cet intercalant d'ADN

avec l'ATP pourrait permettre la réalisation d'un assemblage supramoléculaire dynamique et photostimulable. De plus, au-delà des propriétés de chélation et d'hydrolyse enzymatique de l'ATP, l'AzoDiGua possède des propriétés d'agrégation induite par fluorescence (via la présence du groupement azobenzène) et, de par sa structure amphiphile bolaforme, pourrait être engagé dans des systèmes host-guest. Nous anticipons ainsi qu'un auto-assemblage ATP/AzoDiGua permettrait de réaliser des structures dynamiques auto-assemblées inédites, fluorescentes et capables de répondre à des stimuli multiples, comme la lumière, l'ajout d'ions métalliques, l'activité enzymatique ou l'inclusion hôte-invité par la présence de cyclodextrines. A notre connaissance, aucun assemblage supramoléculaire photostimulable, fluorescent et dynamique impliquant l'ATP n'a été étudié dans la littérature.

De plus, très peu de dérivés de guanidinium ont été explorés par la communauté scientifique quant à leur capacité de s'assembler avec la molécule d'ATP. A notre connaissance, seuls trois dérivés synthétiques de guanidinium capables d'induire un assemblage supramoléculaire avec l'ATP ont été publiés (Figure 3.18)^{110, 111, 112, 113}. Ces systèmes sont rapidement présentés ci-après.

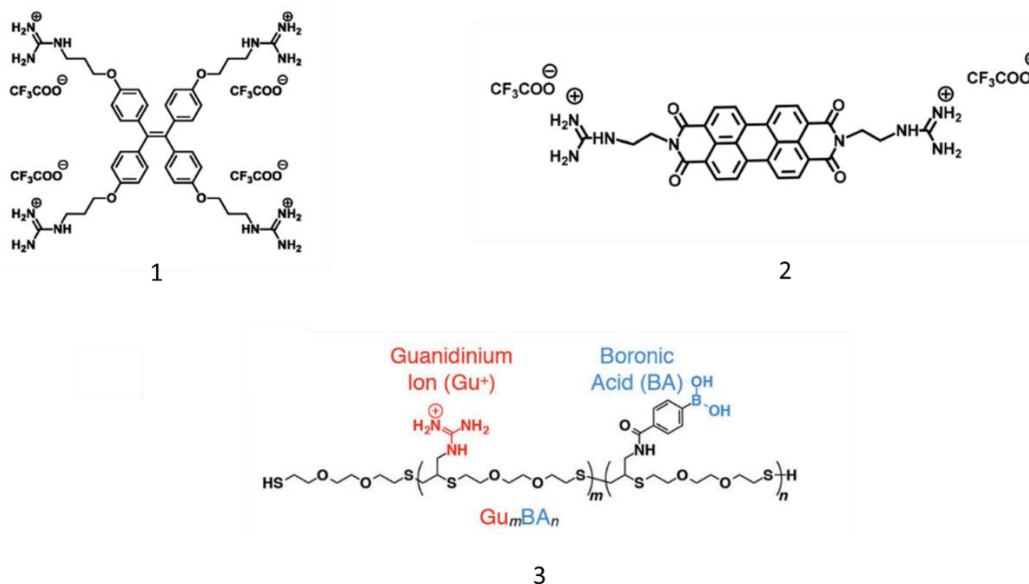


Figure 3.18- Seuls dérivés synthétiques de guanidinium publiés à ce jour comme étant capables de s'autoassembler avec l'ATP^{111, 112, 113}

En 2012, les auteurs ont synthétisé un tétraphényléthène du guanidinium (Figure 3.19.a) ayant la capacité d'induire un co-assemblage supramoléculaire avec l'ATP à l'échelle nanométrique (Figure 3.19.b)¹¹². Ce chromophore a des propriétés de fluorescence induite par agrégation. Ainsi, en s'assemblant avec l'ATP par synergie des interactions π et électrostatiques, ce dernier est capable de fluorescer en présence d'ATP (Figure 3.19.c). Cette reconnaissance est sélective de l'ATP comparé à l'ADP et l'AMP pour lesquels la fluorescence induite par agrégation est très limitée (Figure 3.19.c).

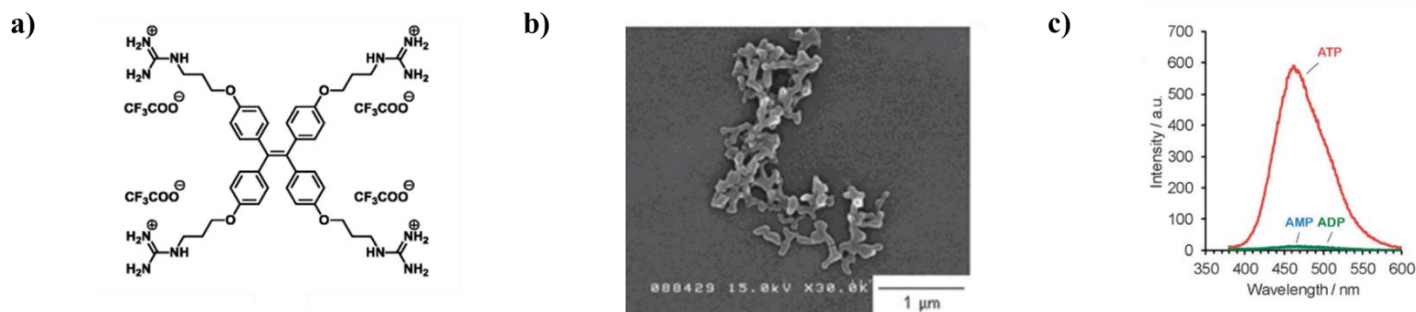


Figure 3.19-a) Structure moléculaire du tétraphényléthène de guanidinium¹¹² b) Co-assemblage supramoléculaire entre l'ATP et le tétraphényléthène du guanidinium c) Spectre de fluorescence du tétraphényléthène de guanidinium en présence d'ATP, ADP et AMP (Excitation : 365 nm)¹¹²

En 2014, cette même équipe synthétise un pérylène de guanidinium (Figure 3.20.a) ayant également la capacité d'induire un co-assemblage supramoléculaire avec l'ATP¹¹¹. Ce chromophore fluorescent possède des propriétés de quenching induit par agrégation. Ainsi, en l'absence d'ATP, le pérylène est sous la forme d'un monomère non agrégé en solution et est fluorescent dans le bleu (520 nm). En présence d'ATP, le dérivé de pérylène de guanidinium s'autoassemble avec l'ATP et s'agrège par synergie des interactions π et électrostatiques avec l'adénosine aromatique et les phosphates de l'ATP. Ainsi, l'agrégation des pérylènes provoque le quenching de fluorescence de ce dernier (Figure 3.20.b et c.) Cette reconnaissance est également sélective de l'ATP comparé à l'ADP et l'AMP pour lesquels le quenching de fluorescence est beaucoup plus faible (Figure 3.20.c).

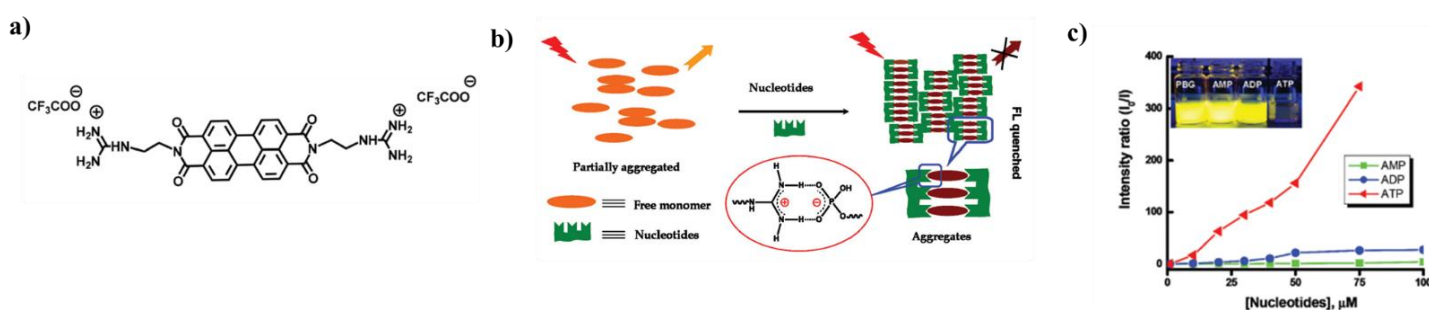


Figure 3.20-a) Structure moléculaire du dérivé de pérylène de guanidinium¹¹¹ b) Stratégie de quenching de fluorescence du pérylène par co-assemblage supramoléculaire avec l'ATP¹¹¹ c) Quenching de fluorescence du pérylène (PBG) en présence d'ATP, ADP et AMP¹¹¹

En 2016, l'équipe de Taida s'intéresse à la modulation de l'activité enzymatique de la trypsine (Trp) par autoassemblage supramoléculaire de l'ATP avec un polymère fonctionnalisé par des groupements guanidinium et acide boronique (Figure 3.21.a)¹¹³. La trypsine peut être désactivée par interaction avec le polymère qui adhère à la surface de l'enzyme provoquant la formation d'agglomérats de trypsine et inhibant l'activité enzymatique (Figure 3.21.b). Lorsque les agglomérats sont en présence d'ATP, le polymère n'adhère plus à la surface de l'enzyme de par son interaction préférentielle avec l'adénosine et les phosphates. Les

groupements guanidinium interagissent par interaction électrostatique avec les phosphates de l'ATP et l'acide boronique se lie de manière covalente avec les deux groupements hydroxyle du ribose de l'ATP (Figure 3.21.a).

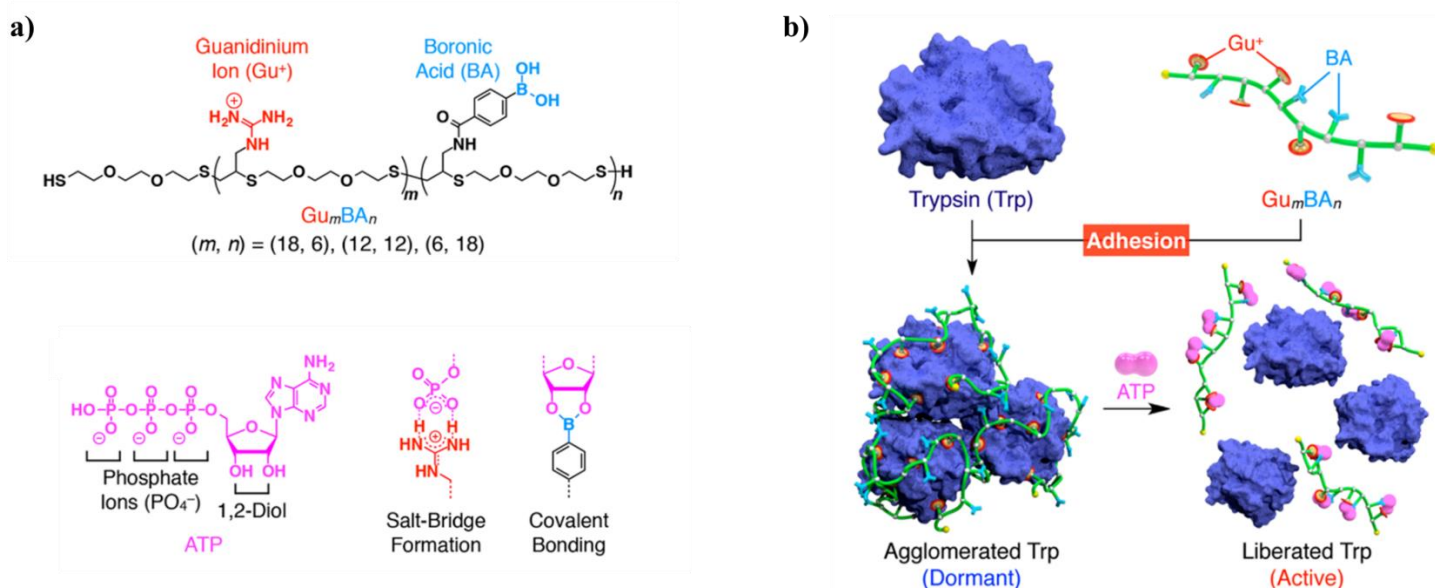


Figure 3.21-a) Structure moléculaire du polymère Gu_mBA_n fonctionnalisé par un groupement guanidinium pouvant se lier de manière non covalente avec les phosphates de l'ATP et l'acide boronique pouvant se lier de manière covalente avec les hydroxyles du ribose de l'ATP¹¹³ **b)** Illustration de la stratégie de modulation de l'activité enzymatique de la Trypsine par co-assemblage entre Gu_mBA_n et l'ATP¹¹³

Certains travaux scientifiques se sont intéressés au relargage photostimulé d'ATP par une approche covalente¹¹⁴. Cette méthode, dite de photocage, consiste à lier l'ATP de manière covalente à une molécule organique pouvant se dissocier par irradiation lumineuse. Cette molécule organique est souvent lipophile afin de pouvoir traverser la membrane. Ainsi, l'ATP lié à la cage peut traverser la membrane et par irradiation lumineuse, la liaison covalente entre l'ATP et la cage se brise permettant de libérer le nucléotide (Figure 3.22.a). Cette méthodologie de photostimulation repose entièrement sur une approche covalente. A notre connaissance, aucune approche non covalente combinant un azobenzène, intercalant d'ADN, et de l'ATP, n'a été exploré dans la littérature. En 2021, seul un travail proposant la formation d'un complexe trimoléculaire entre un dérivé d'azobenzène de zinc, une γ -cyclodextrine et de l'ATP a été étudiée pour la détection d'ATP. Ce complexe moléculaire, fonctionnant par reconnaissance moléculaire, permet de se lier par coordination aux phosphates de l'ATP. Néanmoins, aucune étude photodynamique n'a été menée sur ce complexe moléculaire (Figure 3.22.b)¹¹⁵ et aucun assemblage supramoléculaire étendu à base d'azobenzène et d'ATP stimuable n'a été étudié jusqu'ici.

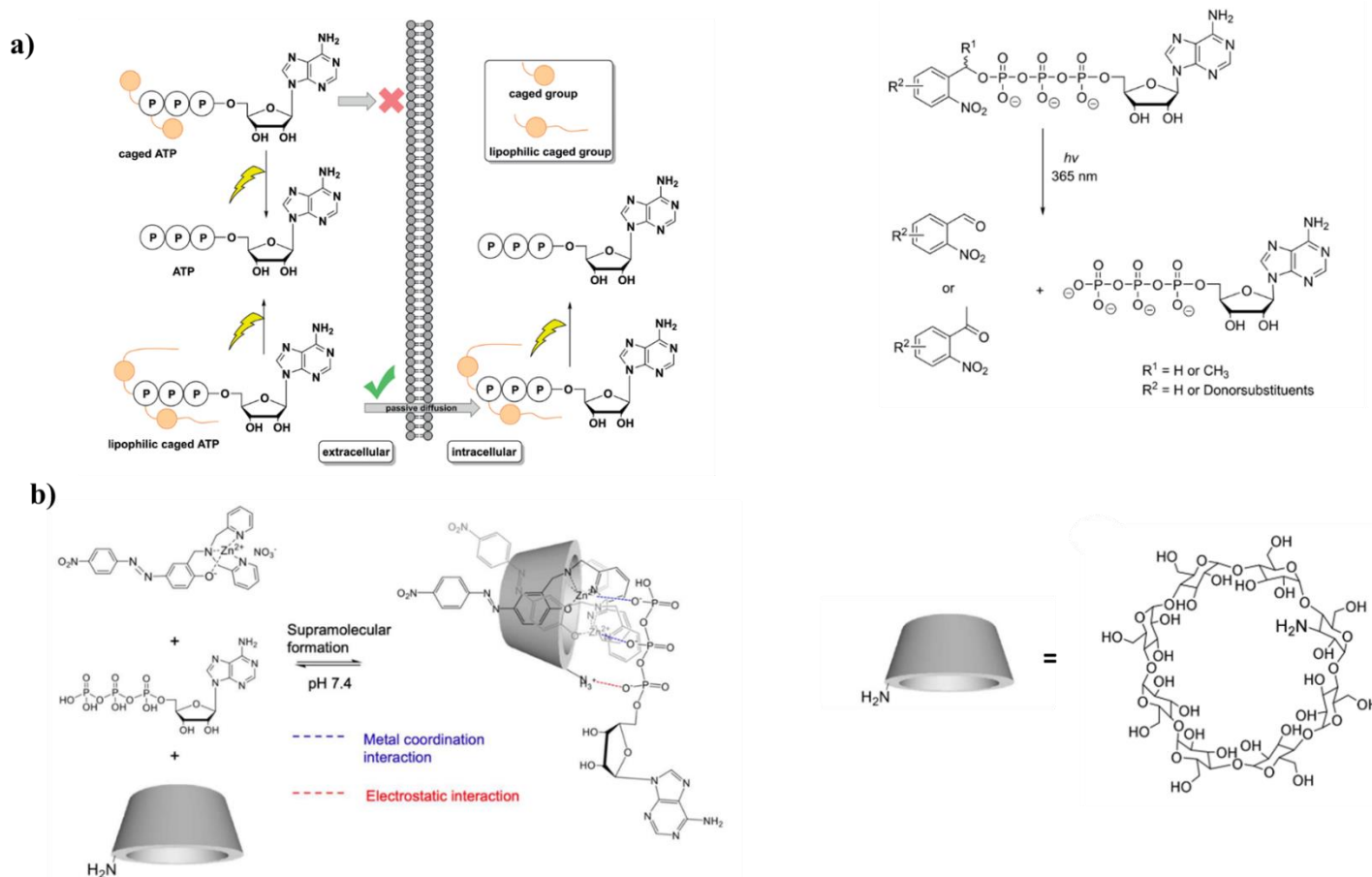


Figure 3.22-a) Stratégie de relargage d'ATP photocagé ¹¹⁴**b)** Complexe supramoléculaire entre un dérivé d'azobenzène de zinc, l'ATP et une γ -NH₂ cyclodextrin pour la détection d'ATP ¹¹⁵

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la diversité des assemblages supramoléculaires stimulables à base d'ATP développés par la communauté scientifique. Au cours de cette thèse, nous avons ainsi étudié les propriétés d'assemblage de l'ATP avec une nouvelle brique : un intercalant d'ADN photosensible, l'AzoDiGua. Après avoir caractérisé la nature de l'assemblage, nous avons ensuite étudié sa réponse à une variété de stimuli permettant de contrôler dynamiquement l'assemblage ATP/AzoDiGua en tirant profit des propriétés de l'ATP (substrat enzymatique, ligand chélate) et de l'AzoDiGua (molécule photoswitchable et amphiphile).

CHAPITRE B.2-Assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua : synthèse et caractérisation des propriétés

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à un nouveau système auto-assemblé combinant un azobenzène intercalant d'ADN, l'AzoDiGua, ayant des propriétés de fluorescence induite par agrégation, et l'ATP, un nucléotide d'importance biologique majeure. Ces deux molécules s'auto-assemblent spontanément en solution pour former des agrégats supramoléculaires micrométriques et fluorescents, dans des conditions douces (pH physiologique, dans l'eau solvant et à température ambiante), par synergie des interactions électrostatiques et π .

Plan :

1) Assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua.....	85
a) Présentation.....	85
b) Autoassemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua.....	85
α) Stratégie générale.....	85
β) Préparation des agrégats supramoléculaires ATP/AzoDiGua.....	86
c) Rôle des interactions intermoléculaires π et électrostatiques.....	89
α) Titration de l'AzoDiGua par l'ATP.....	89
β) Influence du pH et du squelette phosphate.....	91
γ) Effet du rapport de charge entre l'ATP et l'AzoDiGua.....	93
d) Propriétés d'agrégation de l'AzoDiGua.....	94
2) Fluorescence de l'assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua.....	96
a) Emission de fluorescence du co-assemblage ATP/AzoDiGua.....	96
b) Sélectivité entre les dérivés de phosphate.....	99
3) Conclusion.....	99

1) Assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua

a) Présentation

Les deux molécules étudiées dans ce chapitre sont l'AzoDiGua et l'ATP (Figure 4.1). L'AzoDiGua est un azobenzène composé de deux groupements guanidinium cationiques hydrophiles aux extrémités de chaque bras organique. L'AzoDiGua s'apparente donc à une molécule amphiphile de type bolaforme et est aisément soluble dans l'eau. Cette molécule a été synthétisée par notre laboratoire et a la propriété de s'intercaler dans l'ADN de manière photodépendante⁶⁴. L'ATP est un nucléotide composé d'une base adénine, d'un ribose et de trois groupements phosphate dont l'état de charge dépend du pH considéré.

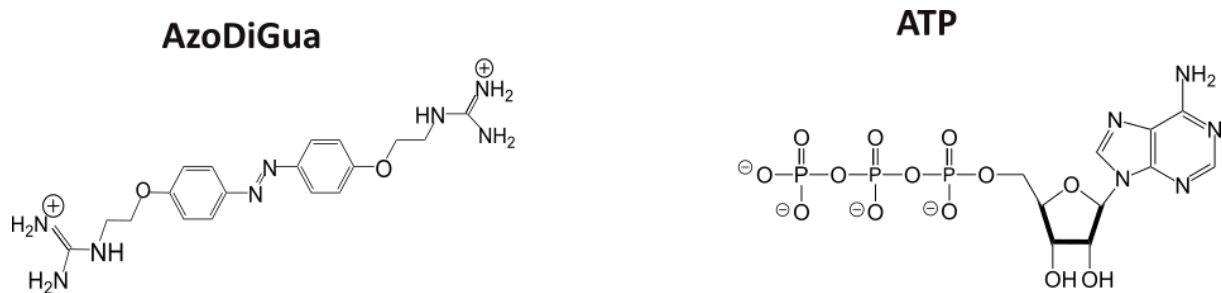


Figure 4.1- Structures moléculaires de l'AzoDiGua et de l'ATP à pH = 7.4.

b) Autoassemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua

α) Stratégie générale

Dans ce chapitre B.2, nous montrons que l'AzoDiGua et l'ATP ont la capacité de s'autoassembler en solution sous la forme d'agrégats supramoléculaires étendus, fluorescents et multi-stimuli répondants. L'étude des différents stimuli sera détaillée dans le chapitre B.3. Pour ce faire, ces deux molécules ont été mélangées dans l'eau, à pH physiologique (pH = 7.4) à température ambiante et s'autoassemblent spontanément sous forme d'agrégats micrométriques en quelques minutes sous l'action de différentes interactions intermoléculaires. Ces agrégats s'avèrent être stimulables et ont la capacité de se désassembler sous l'action de différents stimuli nous ayant ainsi permis de contrôler certaines de leurs propriétés (Figure 4.2).

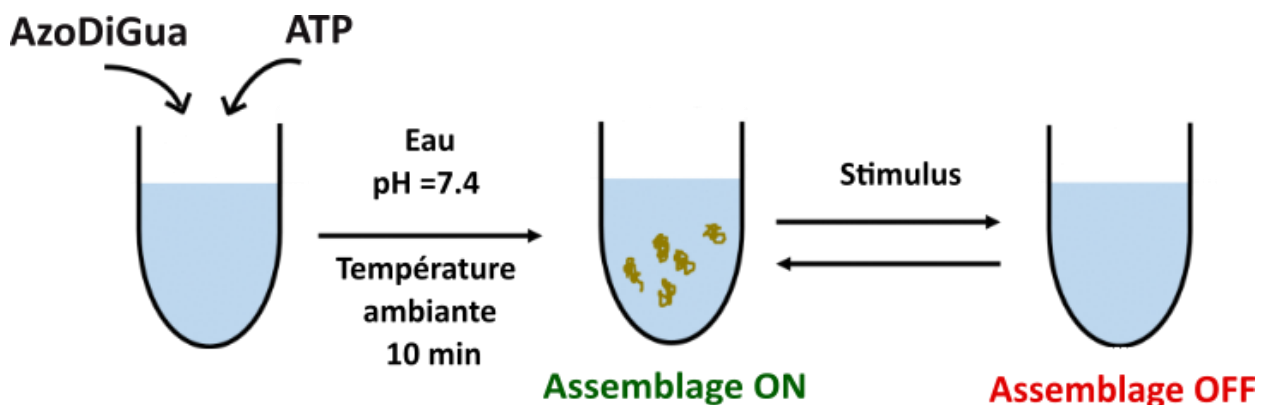


Figure 4.2- Représentation schématique de la stratégie générale d'assemblage dynamique entre l'AzoDiGua et l'ATP

β) Préparation des agrégats supramoléculaires ATP/AzoDiGua

Dans une solution aqueuse à pH physiologique tamponnée ($[\text{Tris HCl}] = 50 \text{ mM}$, $\text{pH} = 7.4$), l'ATP (1 mM) et l'AzoDiGua (1 mM) sont mélangés, en proportions équimolaires, à température ambiante. La concentration de l'ATP a été choisie pour être proche des concentrations intracellulaires et ainsi avoir une approche biocompatible. Après homogénéisation du mélange, ce dernier devient instantanément trouble (Figure 4.3.a). Ce mélange a été observé au microscope optique une dizaine de minutes après avoir mélangé l'AzoDiGua et l'ATP. Des agrégats supramoléculaires micrométriques en solution sont formés (Figure 4.3.b). Ces derniers sont soumis à une agitation moléculaire et tendent à s'agréger entre eux (**Vidéo 1** en annexe). Ils n'ont pas de forme ou structure spécifique mais l'aspect trouble de la solution est caractéristique de leur formation. Les agrégats atteignent une taille moyenne de $25 \mu\text{m}$ après une dizaine de minutes de mélange.

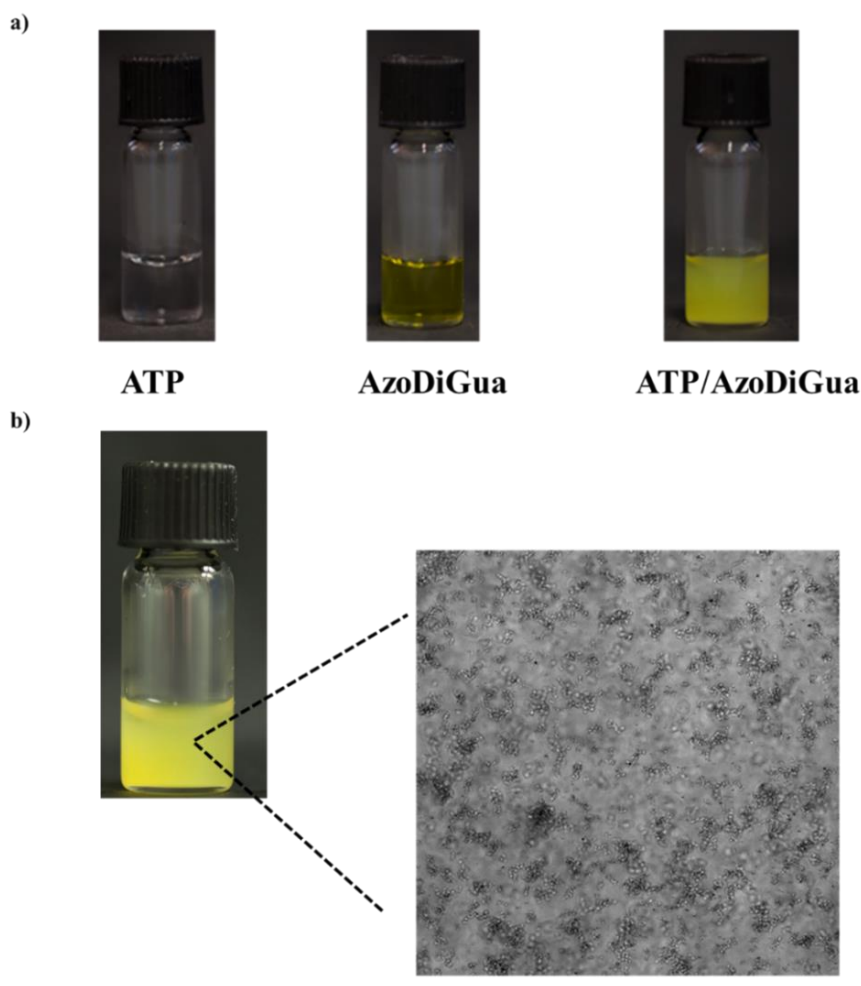


Figure 4.3- a) Photographies d'une solution d'ATP (gauche), d'AzoDiGua (milieu) et d'un mélange équimolaire ATP/AzoDiGua après 10 min d'incubation à température ambiante (droite). b) Observation au microscope optique par transmission de la suspension d'agrégats supramoléculaires d'ATP/AzoDiGua après 10 min de mélange entre l'ATP et l'AzoDiGua. Conditions : $[\text{ATP}] = 1 \text{ mM}$; $[\text{AzoDiGua}] = 1 \text{ mM}$; température ambiante. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux $[\text{Tris-HCl}] = 50 \text{ mM}$ ($\text{pH} = 7.4$). La barre d'échelle représente $20 \mu\text{m}$.

Une étude temporelle a été menée afin de suivre la croissance du co-assemblage entre l'ATP et l'AzoDiGua (Figure 4.4). Les premiers agrégats sont formés dans les premières minutes de mélange et s'agrègent progressivement entre eux (**Vidéo 1** en annexe).

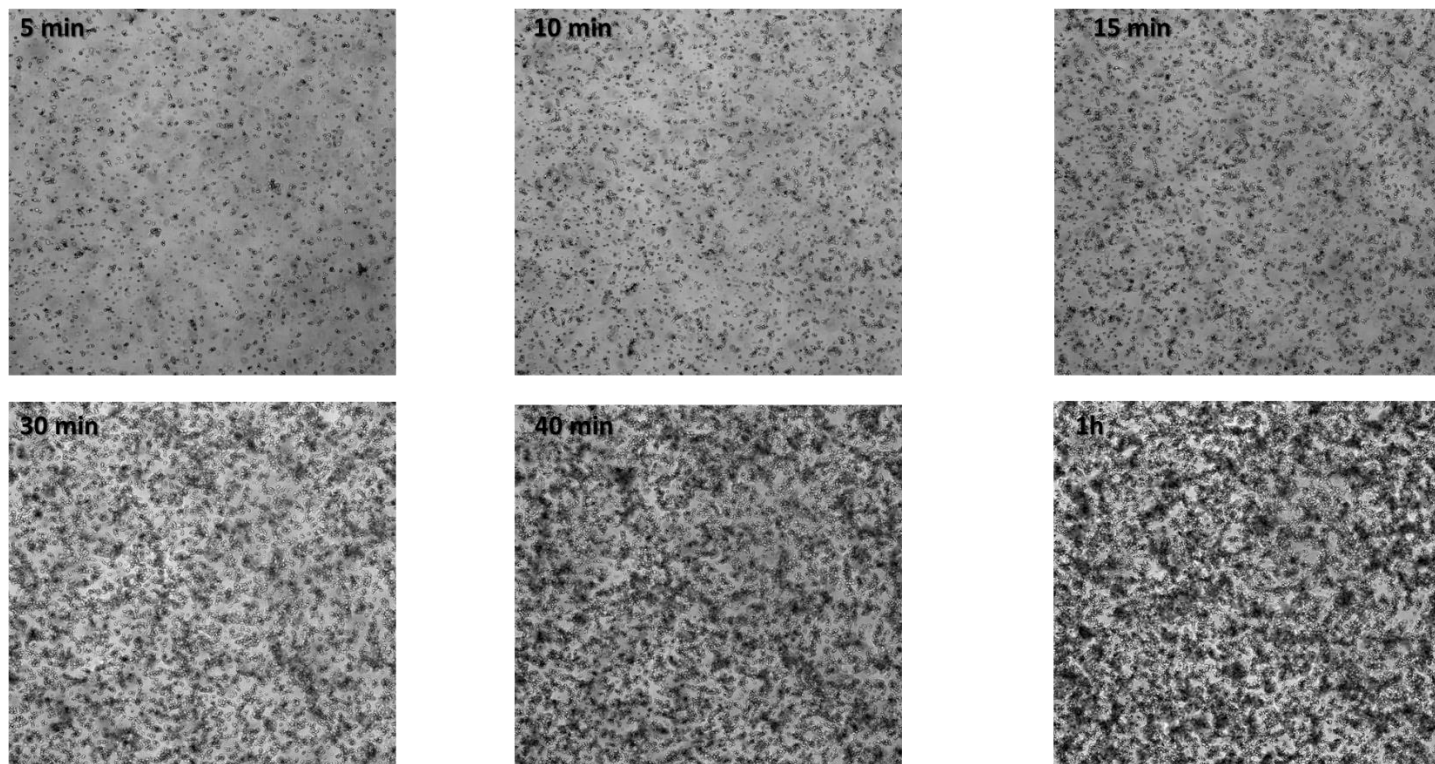


Figure 4.4- Observation au microscope optique par transmission du mélange ATP/AzoDiGua après 5 minutes, 10 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 40 minutes et 1h d'incubation. Conditions : [ATP] = 1 mM ; [AzoDiGua] = 1 mM; température ambiante. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux [Tris-HCl] = 50 mM (pH = 7.4). La barre d'échelle représente 20 μm .

Des agrégats présentant des similarités morphologiques ont été décrits récemment en 2020¹¹⁶. Ces agrégats micrométriques étaient obtenus par autoassemblage supramoléculaire entre l'ATP et un polymère poly-arginine de 100 monomères présentant des groupements guanidinium (Figure 4.5.b). Ceci montre l'intérêt d'utiliser des groupements guanidinium pour former des co-assemblages avec l'ATP. Par contre, basés uniquement sur des interactions électrostatiques, ces structures ne présentaient pas de propriétés de réponse à un stimulus ni de fluorescence. Dans cette thèse, nous explorons pour la première fois l'utilisation d'un partenaire de l'ATP à base de guanidinium et d'un motif azobenzène, afin d'obtenir des propriétés de photoréponse et de fluorescence.

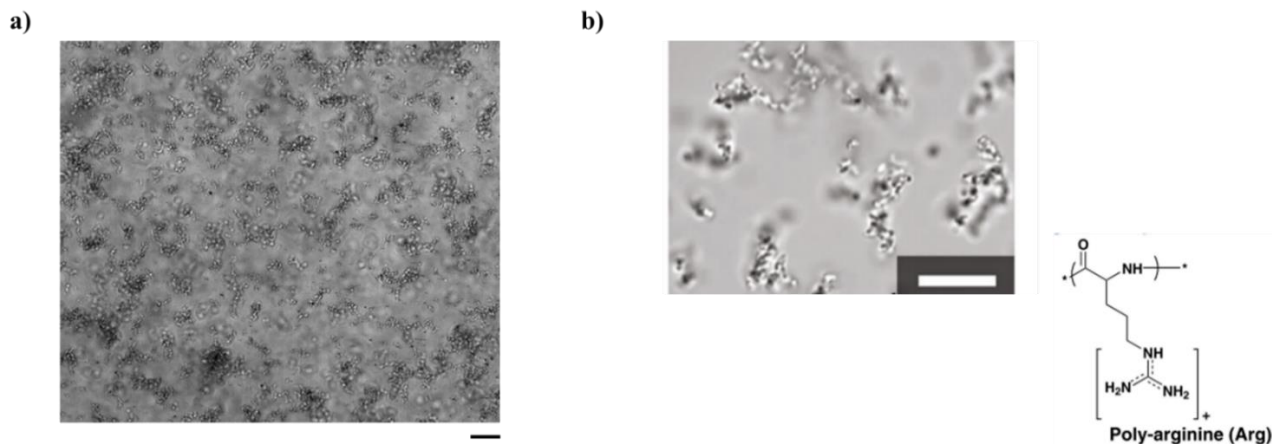


Figure 4.5- a) Observation au microscope optique par transmission des agrégats supramoléculaires d'ATP et d'AzoDiGua étudiés dans cette thèse. Conditions : [ATP] = 1 mM ; [AzoDiGua] = 1 mM; 10 min de mélange à température ambiante. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux [Tris-HCl] = 50 mM (pH = 7.4). La barre d'échelle représente 20 μm . b) Résultats récents de la littérature présentant des agrégats supramoléculaires d'ATP et de poly-arginine (n=100) (Echelle : 10 μm)¹¹⁶.

c) Rôle des interactions intermoléculaires π et électrostatiques

α) Titration de l'AzoDiGua par l'ATP

Afin d'élucider les interactions intermoléculaires à l'origine de la reconnaissance moléculaire entre l'ATP et l'AzoDiGua, une titration de l'AzoDiGua par l'ATP par spectroscopie UV-visible a été menée. L'AzoDiGua *trans* est composée de deux bandes d'absorption (Figure 4.6.a). La première bande principale se situe à 360 nm et correspond à une transition électronique π - π^* . La deuxième se situe dans l'UV lointain à 245 nm. L'AzoDiGua *trans* possède un coefficient d'extinction molaire $\epsilon_{\text{AZD}} = 2.10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Lorsque l'AzoDiGua est en présence d'ATP, un effet hypochrome et bathochrome est observé pour, respectivement, la bande à 360 nm et à 245 nm de l'AzoDiGua. En effet, lorsque le rapport $r = [\text{ATP}]/[\text{AzoDiGua}]$ augmente progressivement, l'intensité de la bande à 360 nm diminue alors que l'ATP n'absorbe pas à cette longueur d'onde (Figures 4.6.b, 4.7.a, 4.7.c). De même, l'intensité de la bande à 245 nm augmente, dû à l'augmentation croissante de la concentration en ATP, et un léger effet bathochrome est observé (Figures 4.7.b, 4.7.d). Ces effets spectroscopiques, hypochrome et bathochrome, prouvent qu'une interaction entre l'ATP et l'AzoDiGua s'établit. L'effet spectroscopique est localisé sur des transitions électroniques impliquant des orbitales π ce qui justifie une interaction π - π favorable entre la partie aromatique de l'adénosine de l'ATP et les cycles aromatiques de l'AzoDiGua à l'origine de l'autoassemblage supramoléculaire entre l'ATP et l'AzoDiGua.

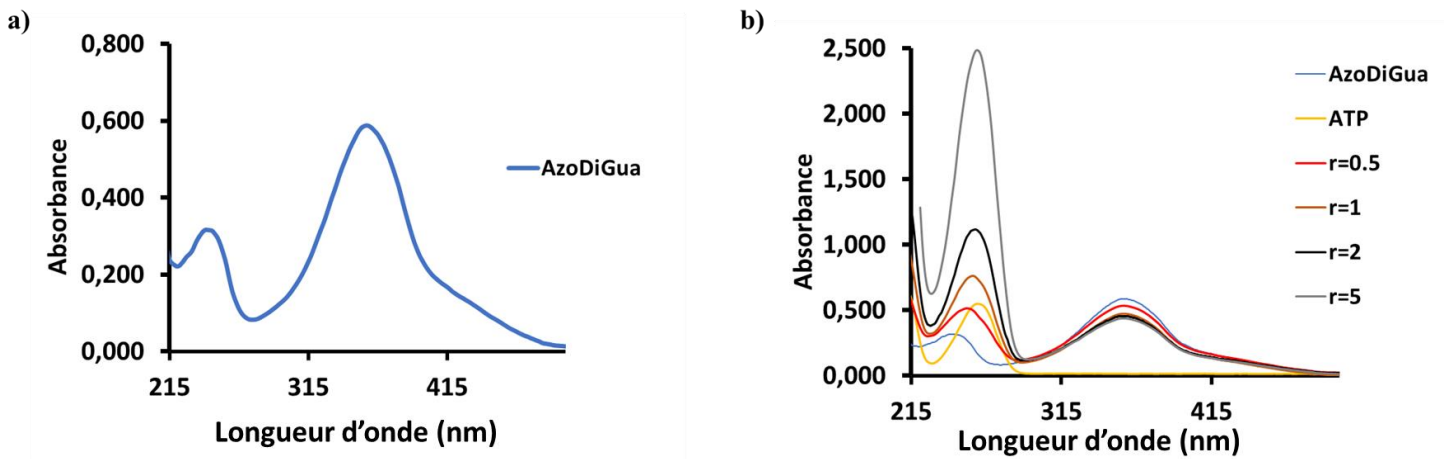


Figure 4.6- a) Spectre d'absorbance d'une solution aqueuse d'AzoDiGua b) Titration de l'AzoDiGua en présence de différents ratios $r = [ATP]/[AzoDiGua]$. Conditions : $[AzoDiGua] = 25 \mu M$. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux $[Tris-HCl] = 50 \text{ mM}$ ($pH = 7.4$).

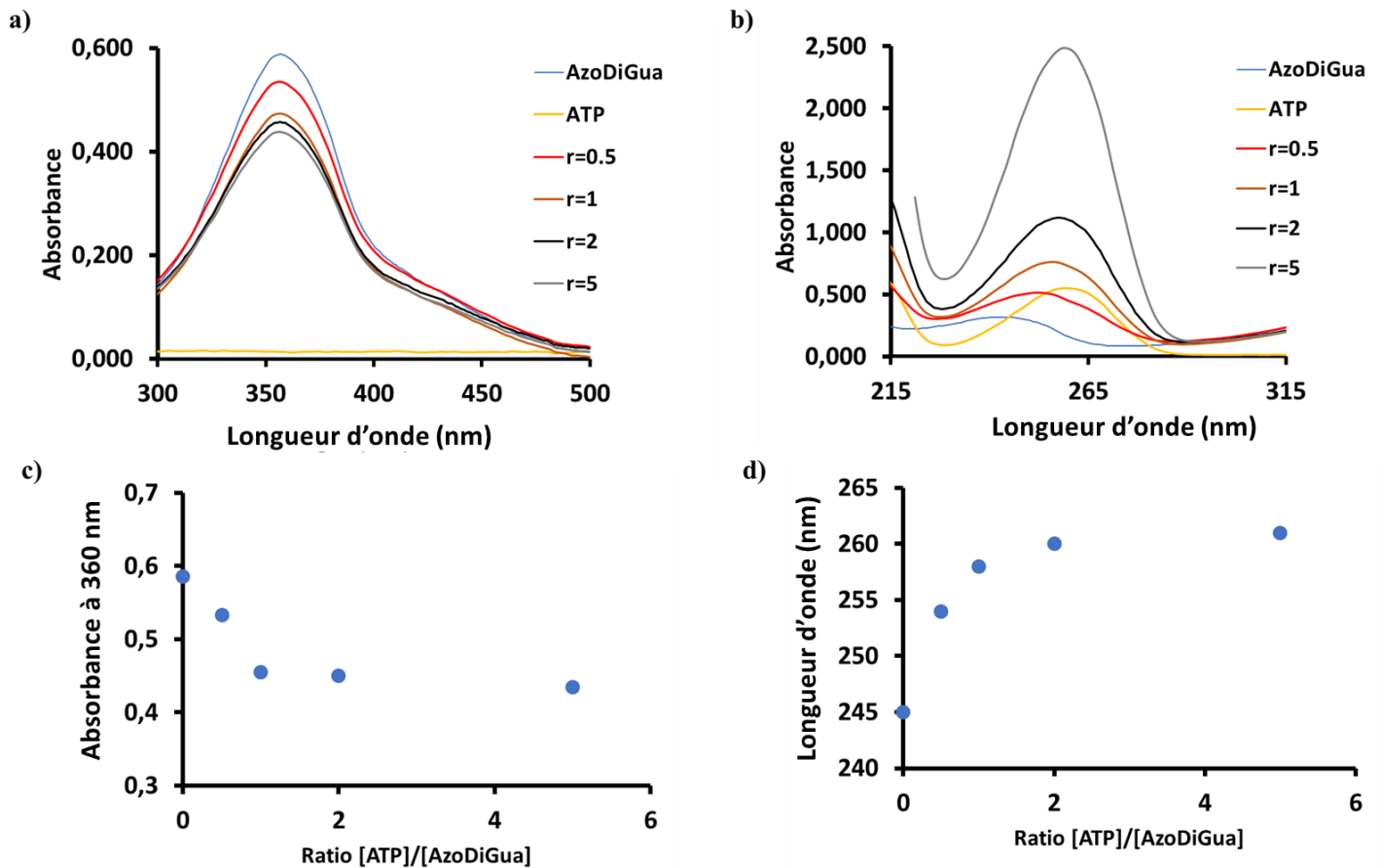


Figure 4.7- a) Titration de l'AzoDiGua en présence de différents ratios $r = [ATP]/[AzoDiGua]$ dans la région 300-500 nm. b) Titration de l'AzoDiGua pour différents ratios r dans la région 215-315 nm. c) Evolution de l'absorbance à 360 nm en fonction du ratio r pour la bande d'absorption à 360 nm. d) Evolution de la longueur d'onde au maximum d'absorbance en fonction du ratio r . Conditions : $[AzoDiGua] = 25 \mu M$. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux $[Tris-HCl] = 50 \text{ mM}$ ($pH = 7.4$).

Le spectre d'absorbance de la suspension ATP/AzoDiGua après 10 minutes d'incubation dans les conditions d'auto-assemblage ($[ATP] = [AzoDiGua] = 1 \text{ mM}$) présente une bande d'absorption principale à 360 nm correspondant à l'AzoDiGua (Figure 4.8). Cette bande est de plus faible intensité que l'AzoDiGua libre comme étudiée précédemment. L'assemblage possède également une deuxième bande à 261 nm de longueur d'onde au maximum d'absorbance légèrement supérieure à la bande de l'AzoDiGua libre située vers 245 nm ce qui est cohérent avec la titration à basse concentration d'AzoDiGua menée précédemment.

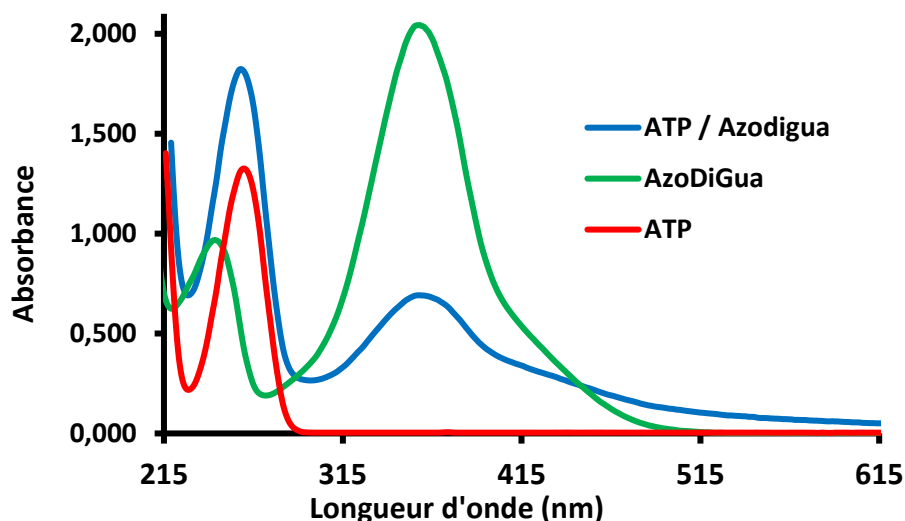


Figure 4.8- Spectre d'absorbance du co-assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua. Conditions : $[ATP] = 1 \text{ mM}$; $[AzoDiGua] = 1 \text{ mM}$; 10 min de mélange à température ambiante. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux $[Tris-HCl] = 50 \text{ mM}$ ($\text{pH} = 7.4$).

β) Influence du pH et du squelette phosphate

L'influence des groupements phosphate a été étudiée en substituant l'ATP par l'ADP (adénosine diphosphate) et l'AMP (adénosine monophosphate). L'adénosine diphosphate est composée de deux groupements phosphate tandis que l'adénosine monophosphate est composée de deux groupements phosphate (Figure 4.9).

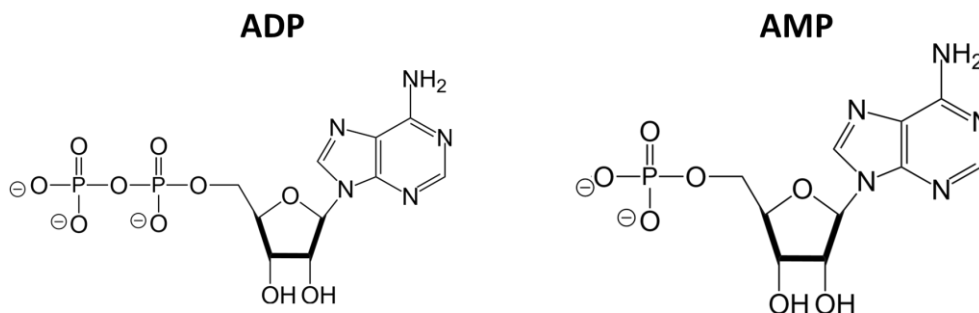


Figure 4.9- Structures moléculaires de l'adénosine diphosphate (ADP) et de l'adénosine monophosphate (AMP)

De la même manière que pour l'ATP, l'AzoDiGua (1 mM) a été mis en présence d'ADP (1 mM) et d'AMP (1 mM) dans l'eau, à température ambiante et à pH physiologique ([Tris HCl]=50 mM, pH=7.4). Le mélange ADP/AzoDiGua (Figure 4.10.b) conduit à une solution moins trouble que celle de l'ATP (Figure 4.10.a). De plus, l'observation au microscope optique a révélé que la présence d'agrégats qui sont plus petits et beaucoup moins agrégés (Figure 4.10.b) que ceux obtenus avec l'ATP (Figure 4.10.a). Le mélange AMP/AzoDiGua ne conduit pas à une solution trouble et aucun assemblage n'est observé au microscope optique (Figure 4.10.c). Ces résultats montrent l'importance du nombre de phosphate par brique en interaction avec l'AzoDiGua pour former des assemblages supramoléculaires étendus.

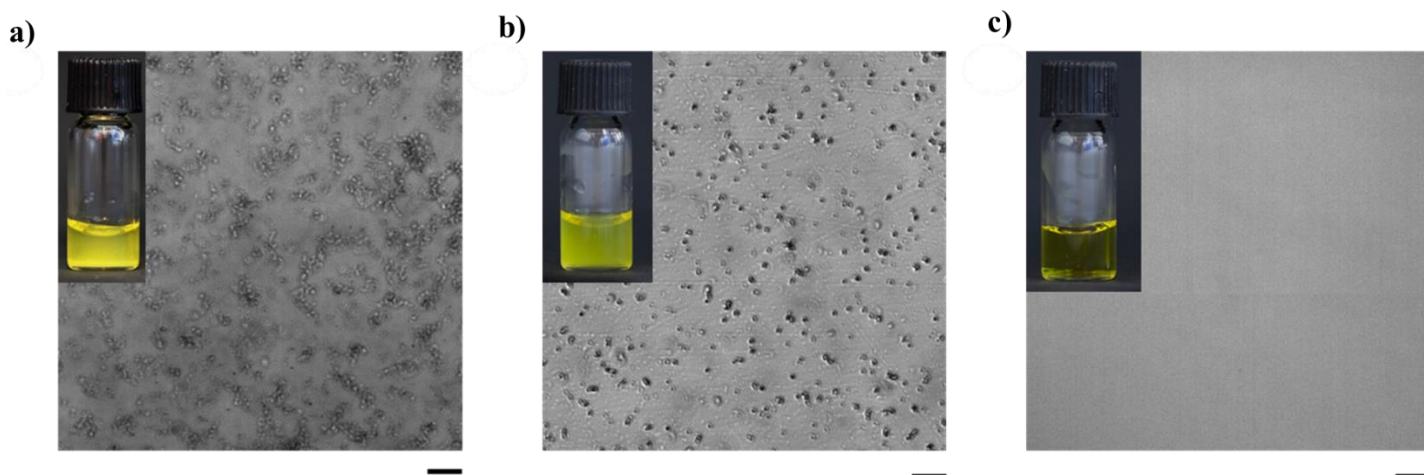


Figure 4.10- Photographie (insert) et observation au microscope optique par transmission (image principale) du mélange **a)** ATP/AzoDiGua **b)** ADP/AzoDiGua **c)** AMP/AzoDiGua. Conditions : [ATP] ou [ADP] ou [AMP] = 1 mM ; [AzoDiGua] = 1 mM; 10 min de mélange à température ambiante. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux [Tris-HCl] = 50 mM (pH = 7.4).

Le pH permet également de contrôler l'état d'ionisation des phosphates de l'ATP. Ainsi, à pH acide (pH= 2.0), l'ATP est sous forme ATP^{2-} (de charge -2) tandis qu'à pH physiologique (pH= 7.4), l'ATP est sous forme ATP^{4-} (de charge -4) (Figure 3.1). Lorsque l'ATP et l'AzoDiGua sont mis en contact à pH=2.0, aucun assemblage supramoléculaire n'est observé au microscope optique et la solution d'agrégats ATP/AzoDiGua n'est pas trouble (Figure 4.11). Cette observation met en évidence le rôle de la charge du squelette phosphate de l'ATP dans le co-assemblage ATP/AzoDiGua et ainsi l'importance des interactions électrostatiques attractives entre les guanidinium de l'AzoDiGua et les phosphates de l'ATP.

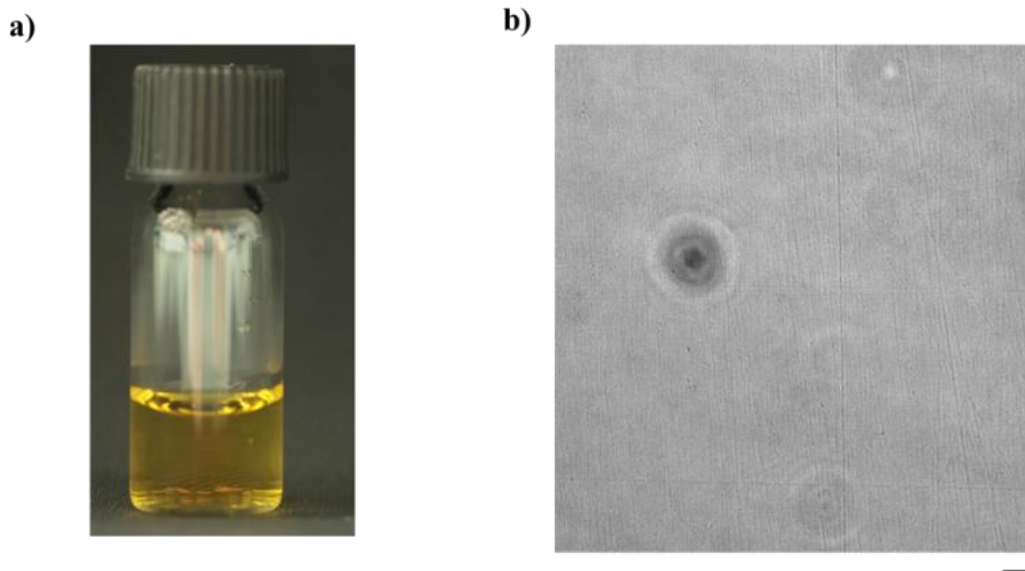


Figure 4.11- a) Photographie d'une solution d'AzoDiGua en présence d'ATP à pH = 2.0 b) Observation au microscope optique de la même solution. Conditions : [ATP] = 1 mM ; [AzoDiGua] = 1 mM; 10 min de mélange à température ambiante.

L'effet du pH ainsi que du squelette de phosphate met en évidence le rôle important des interactions électrostatiques entre l'AzoDiGua (de charge +2) et de l'ATP (de charge -4).

Γ) Effet du rapport de charge entre l'ATP et l'AzoDiGua

L'ATP est sous forme ATP^{4-} à pH physiologique et l'AzoDiGua est sous forme AzoDiGua^{2+} . Ainsi, l'influence du rapport molaire de charge qu'on note Q , quotient molaire entre les charges apportées par l'ATP et celles par l'AzoDiGua, sur la formation du co-assemblage a été étudiée. Les observations ont été réalisées après 10 minutes de mélange entre l'ATP et l'AzoDiGua. Les rapports $Q = 2$ (condition de la thèse, mélange équimolaire) et $Q = 1$ donnent sensiblement des agrégats supramoléculaires de taille comparable (d'une dizaine de micromètres). Aucune différence majeure n'a été observée (Figure 4.12.a et b). Néanmoins, pour un rapport $Q = 0.5$, c'est-à-dire pour un excès de charges positives dû à l'AzoDiGua, les agrégats formés sont beaucoup plus petits (de l'ordre de $5 \mu\text{m}$) (Figure 4.12.c).

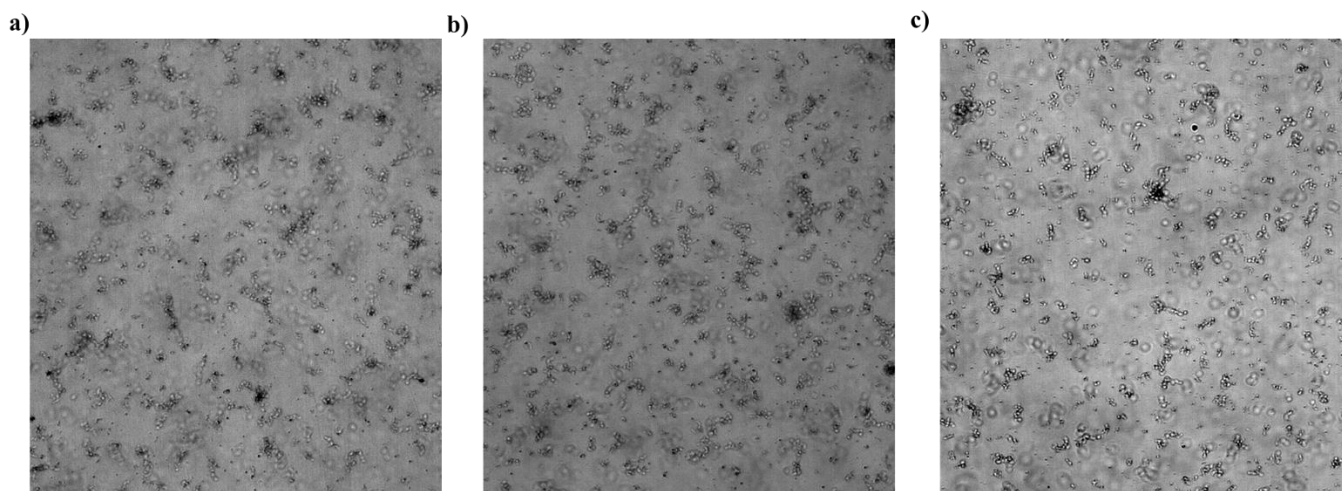


Figure 4.12-Observation au microscope optique des agrégats ATP/AzoDiGua pour différents rapports molaires de charge Q entre l'ATP et l'AzoDiGua **a)** [AzoDiGua]=1 mM, [ATP]=1 mM, $Q=2$ **b)** [AzoDiGua]= 1 mM, [ATP]=0.5 mM, $Q=1$ **c)** [AzoDiGua]=1 mM, [ATP]=0.25 mM, $Q=0.5$ ([Tris HCl]=50 mM, pH=7.4, Echelle : 20 μm)

d) Propriétés d'agrégation de l'AzoDiGua

Dans cette partie, nous avons étudié la possibilité de l'AzoDiGua de s'agréger avec lui-même, notamment par interaction π . Pour ce faire, les possibles propriétés d'agrégation de l'AzoDiGua ont été étudiées par spectroscopie UV-visible d'absorption et de fluorescence. L'AzoDiGua, portant une charge négative délocalisée sur chaque extrémité guanidinium, est soluble dans l'eau. Lorsque l'AzoDiGua est dissout dans l'éthanol, moins polaire que l'eau, le spectre de l'AzoDiGua se voit modifié (Figure 4.13.a). Tout d'abord, un effet hypsochrome de la transition π - π^* centrée à 360 nm est observé. Cette dernière est décalée de 5 nm et est observée à 355 nm dans l'éthanol. De plus, un petit épaulement de la bande d'absorption est observé vers 365 nm. De même, l'absorbance est plus faible dans la région 410-510 nm dans le solvant éthanol que dans l'eau solvant. Ce changement spectral met en évidence la tendance de l'AzoDiGua à s'agréger lorsqu'il est solubilisé en milieu moins polaire. Afin de mettre en évidence la possibilité de l'AzoDiGua de former des agrégats moléculaires en solution aqueuse (de type H ou J) (Figure 4.13.c)^{117,118}, une étude en concentration a été menée (Figure 4.13.b). Etant donné la répulsion électrostatique entre les guanidinium, la probabilité de former des H-agrégats comparé au J-agrégats est faible. De manière générale, lorsque des agrégats de cette nature se forment en solution, des effets bathochromes ou hypochromes sont observés lorsque la concentration du chromophore augmente. La bande d'absorption de la transition π - π^* reste inchangée lorsque la concentration en AzoDiGua augmente progressivement ce qui est probablement dû au fait que l'AzoDiGua ne s'agrége pas avec lui-même sous la forme de J ou H-agrégats, même à 1 mM (Figure 4.13.b).

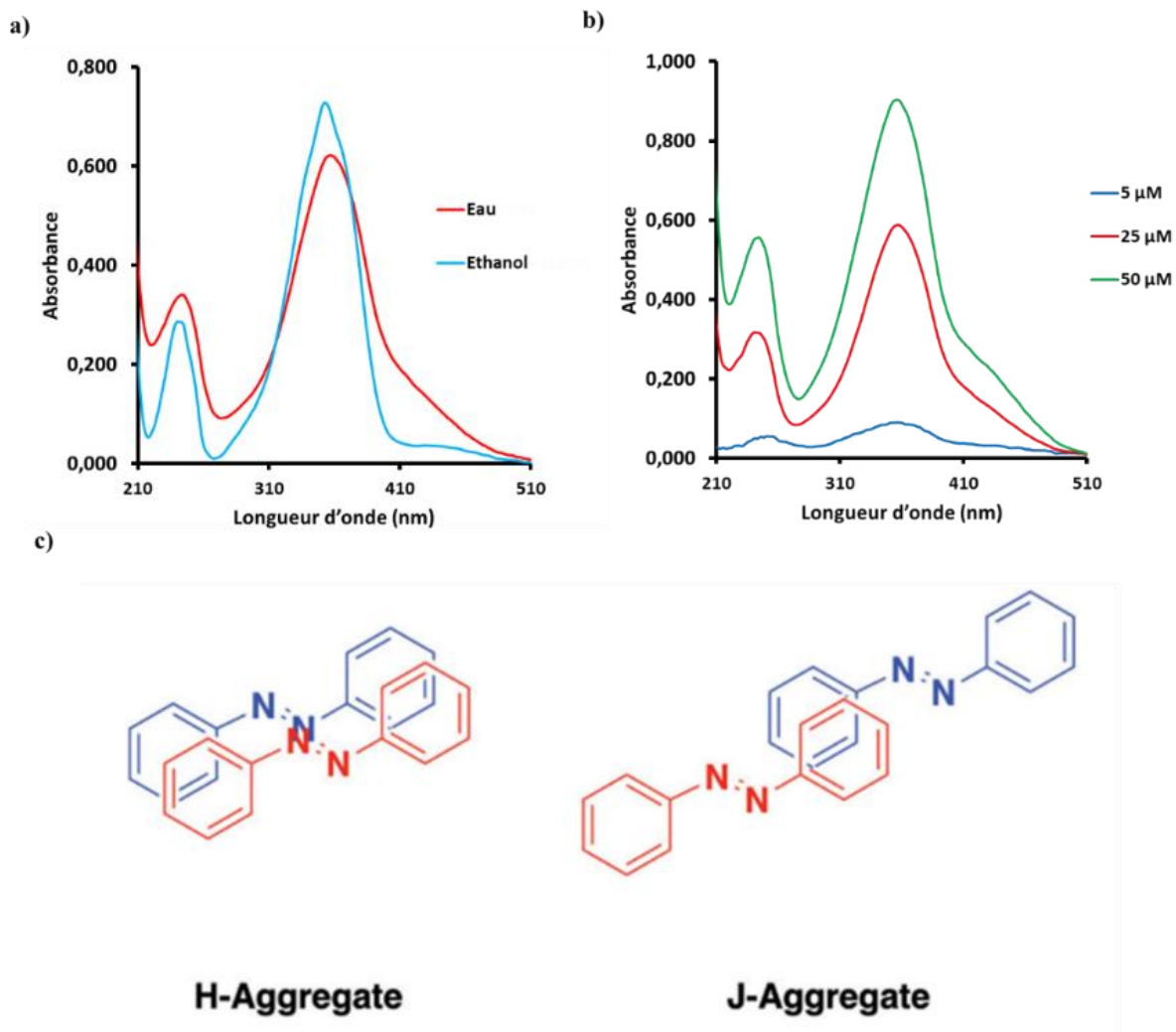


Figure 4.13-a) Spectre d'absorbance de l'AzoDiGua (25 μM) dans différents solvants non tamponnés de polarité différente (Eau et Ethanol) **b)** Spectre d'absorbance de l'AzoDiGua à différentes concentrations en milieu tamponné à pH = 7.4 ([Tris HCl] = 50 mM) **c)** Représentation schématique de H-agrégats ou J-agrégats d'azobenzènes¹¹⁷.

2) Fluorescence de l'assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua

L'AzoDiGua possède des propriétés de fluorescence induite par agrégation lorsqu'il s'autoassemble avec d'autres molécules organiques et se retrouve agrégé par interaction π au sein d'un assemblage. Cette étude sera menée ci-après pour l'assemblage ATP/AzoDiGua. L'AzoDiGua n'est pas fluorescent en solution en milieu dilué (Figure 4.14). Néanmoins, lorsque la concentration de ce dernier augmente, une faible bande d'émission de fluorescence vers 650 nm est mesurée lorsque cette molécule est excitée à 400 nm. Nous avons ainsi étudié ci-après si l'auto-assemblage ATP/AzoDiGua permettait d'exalter ce phénomène de fluorescence induite par agrégation.

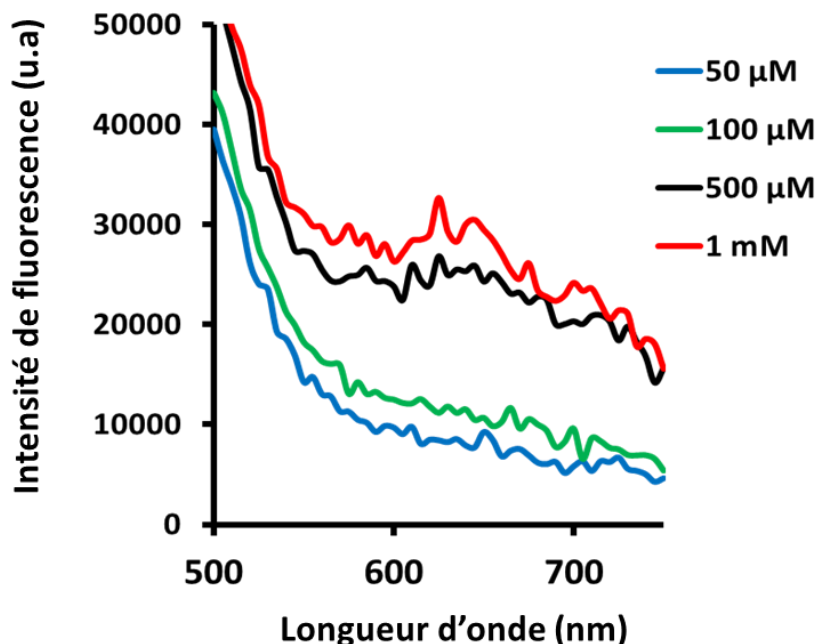


Figure 4.14 – Spectre d’émission de fluorescence de l’AzoDiGua à pH = 7.4 à différentes concentrations ([Tris HCl]=50 mM, Excitation : 400 nm)

a) Emission de fluorescence du co-assemblage ATP/AzoDiGua

Le mélange équimolaire de l’AzoDiGua et de l’ATP (1 mM) à pH physiologique (pH=7.4 [Tris HCl] = 50 mM) dans l’eau et à température ambiante a conduit à un co-assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua sous la forme d’agrégats micrométriques en suspension. Afin de caractériser les propriétés fluorescentes de ces agrégats, un spectre d’émission et d’excitation de fluorescence est acquis après 10 minutes d’assemblage en solution (Figure 4.15). Le spectre d’excitation de la suspension d’ATP/AzoDiGua a révélé une gamme d’excitation entre 400 et 500 nm pour une émission à 650 nm (Figure 4.15.b). Lorsque les agrégats d’ATP/AzoDiGua sont excités à 400 nm, la solution contenant les agrégats d’ATP/AzoDiGua présente une large émission de fluorescence de 500 à 750 nm avec un maximum d’émission à 650 nm (Figure 4.15.a). Ceci est d’autant plus remarquable que chaque brique de ces assemblages, l’ATP seul ou l’AzoDiGua seul, ne sont pas ou très peu fluorescents.

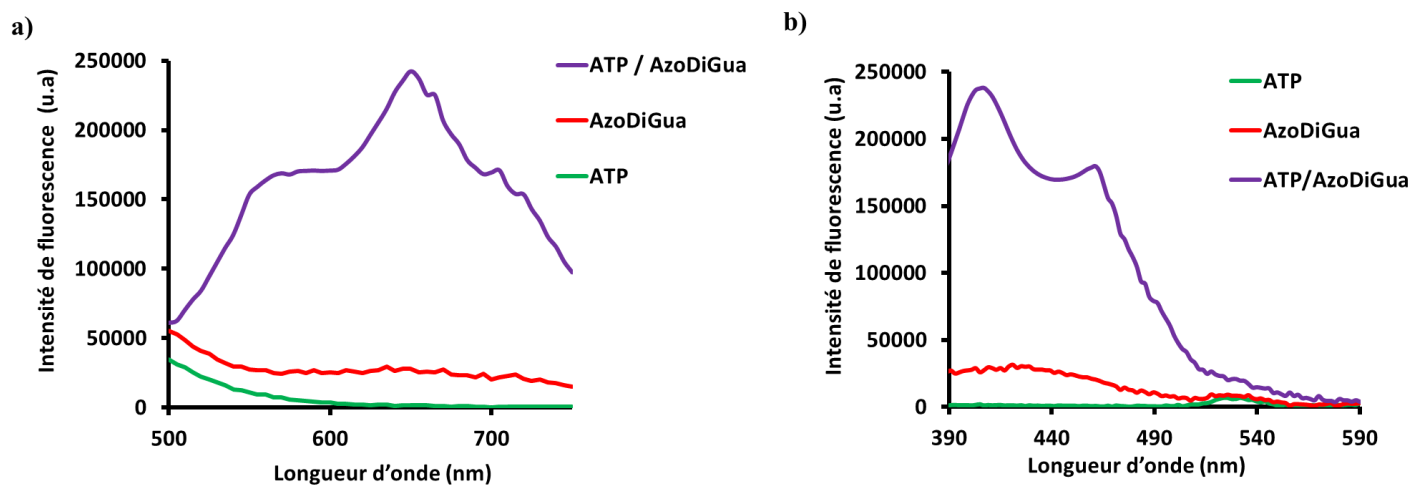


Figure 4.15- Spectres d'émission (a, excitation 400 nm) et d'excitation (b, émission 650 nm) de fluorescence de l'ATP seul (1 mM), de l'AzoDiGua seul (1 mM) et des agrégats ATP/AzoDiGua obtenus par auto-assemblage de l'ATP (1 mM) et de l'AzoDiGua (1 mM) pendant 10 min à température ambiante. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux [Tris-HCl] = 50 mM (pH = 7.4).

Hormis l'intensité, on remarque que les caractéristiques en absorption et émission sont très proches de celles de l'AzoDiGua seul alors que l'ATP, seul, n'a pratiquement aucune propriété fluorescence (Figure 4.16). La fluorescence du co-assemblage provient donc de la molécule d'AzoDiGua et son intensité est exaltée lorsque celle-ci s'auto-organise au sein des agrégats supramoléculaires ATP/AzoDiGua par interactions électrostatiques et π -stacking

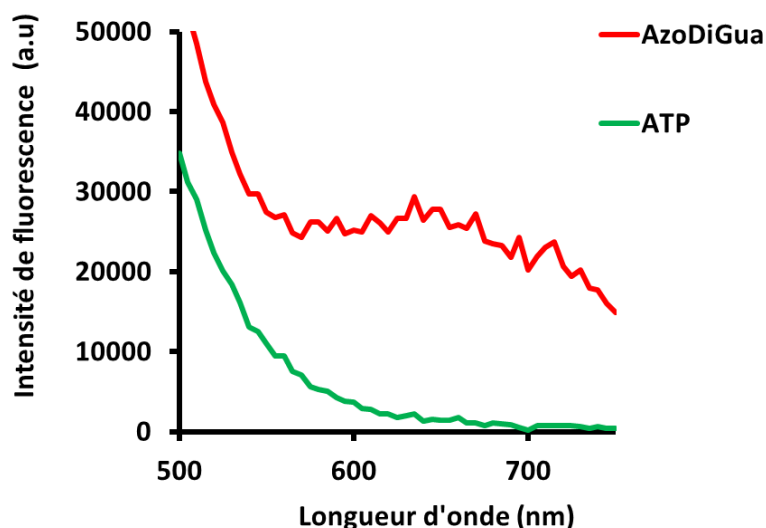


Figure 4.16- Zoom des spectres d'émission (excitation 400 nm) de l'AzoDiGua et de l'ATP montré en figure 4.15.

Les propriétés de fluorescence du co-assemblage ATP/AzoDiGua nous ont permis d'observer les agrégats supramoléculaires en suspension au microscope par fluorescence par excitation (Figure 4.17). L'intensité de fluorescence détectée est localisée sur les agrégats en suspension prouvant que cette dernière non seulement

émerge du co-assemblage ATP/AzoDiGua mais provient très majoritairement des agrégats micrométriques en suspension.

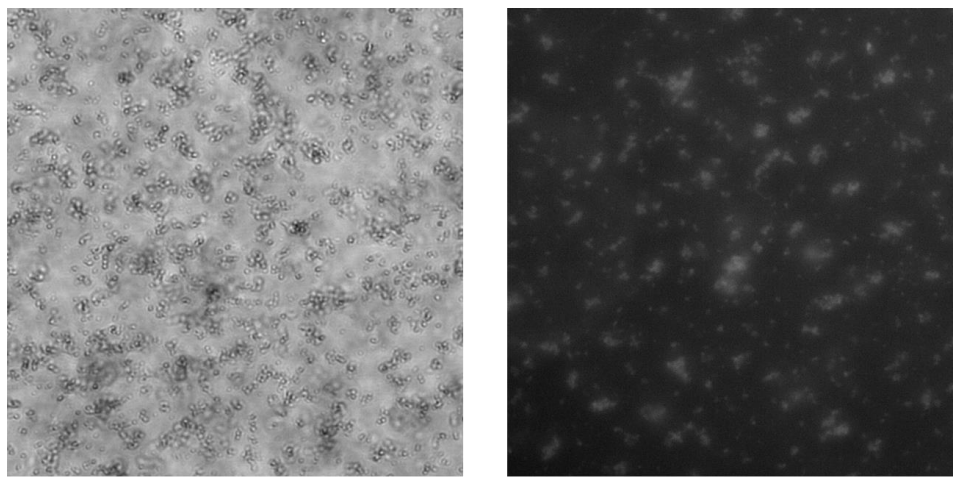


Figure 4.17- Images en microscopie à transmission (à gauche) et en fluorescence (à droite) (Excitation : 475/40 nm, Emission : 500-800 nm) des mêmes agrégats obtenus dans un mélange équimolaire ATP/AzoDiGua. Conditions : [ATP] = 1 mM ; [AzoDiGua] = 1 mM; 10 min de mélange à température ambiante. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux [Tris-HCl] = 50 mM (pH = 7.4). La barre d'échelle représente 20 μ m.

Une étude de la fluorescence en fonction du temps a été effectuée. Pour ce faire, l'émission de fluorescence à 650 nm d'une solution d'agrégats ATP/AzoDiGua excitée à 400 nm a été suivie en fonction du temps (Figure 4.18.a). Nous avons observé que la fluorescence du co-assemblage ATP/AzoDiGua diminue légèrement et progressivement dans le temps sur une échelle de 30 minutes. Ceci est probablement dû au fait que lorsque la solution est excitée à 400 nm, une partie des azobenzènes se photoisomérisent conduisant à un désassemblage des agrégats (l'étude du photocontrôle de la fluorescence et du désassemblage des agrégats ATP/AzoDiGua est étudiée en détail dans le chapitre suivant B.3). Ainsi, en excitant la solution à 450 nm, la fluorescence diminue également dans le temps mais plus faiblement qu'à 400 nm (Figure 4.18.b).

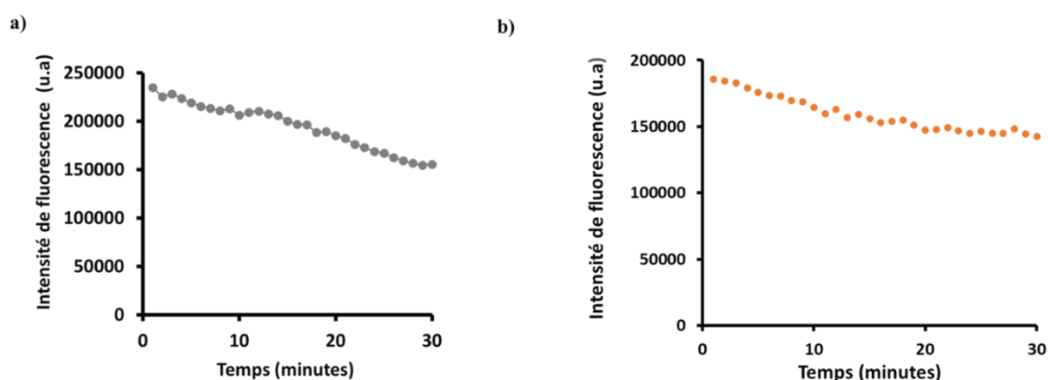


Figure 4.18- Evolution de l'intensité de fluorescence à 650 nm des agrégats ATP/AzoDiGua en fonctions du temps pour une excitation à a) 400 nm b) 450 nm. Conditions : [ATP] = 1 mM ; [AzoDiGua] = 1 mM; 10 min de mélange à température ambiante. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux [Tris-HCl] = 50 mM (pH = 7.4).

Afin de s'assurer que la fluorescence provient de la formation d'agrégats supramoléculaires en solution, une titration de l'AzoDiGua par l'ATP en milieu dilué et en l'absence de formation d'agrégats micrométriques a été effectuée (Figure 4.19) Lorsque le ratio $r = [\text{ATP}]/[\text{AzoDiGua}]$ augmente, la fluorescence de l'AzoDiGua reste inchangée et aucune exaltation de fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua n'est observée en présence d'une quantité croissante d'ATP. A ces concentrations, aucun agrégat micrométrique n'est détectable au microscope optique et aucune turbidité de la solution n'est observée. Cette mesure prouve que la fluorescence émerge bien de la présence des agrégats en solution d'ATP et d'AzoDiGua.

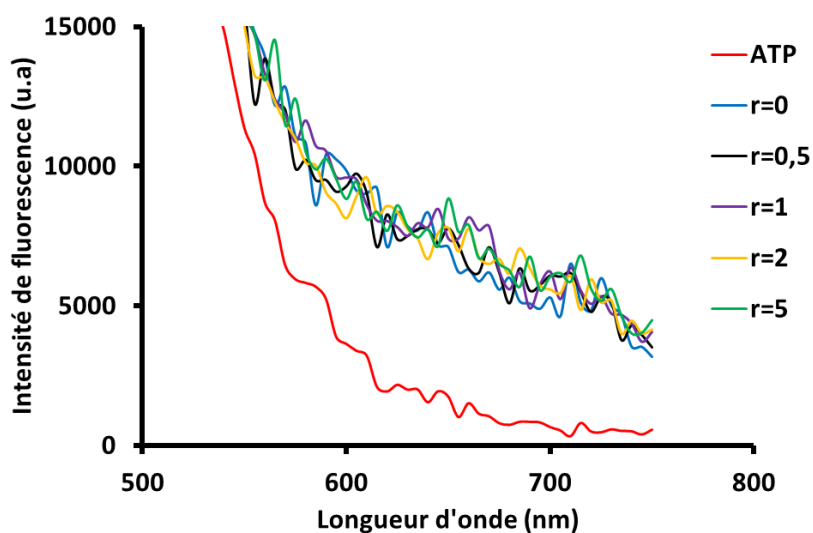


Figure 4.19- Spectre d'émission de fluorescence (excitation 400 nm) de l'AzoDiGua en présence d'un ratio $r = [\text{ATP}]/[\text{AzoDiGua}]$ croissant pour une concentration faible d'AzoDiGua (50 μM) pour laquelle on ne détecte pas d'agrégats micrométriques. Les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux $[\text{Tris-HCl}] = 50 \text{ mM}$ ($\text{pH} = 7.4$).

b) Sélectivité entre les dérivés de phosphate

L'AzoDiGua s'autoassemble avec l'ATP et ne possède pas les mêmes propriétés d'assemblage avec l'ADP et l'AMP comme étudié précédemment. Ainsi, l'émission de fluorescence de l'AzoDiGua a été étudiée en présence comparée d'ATP, ADP et AMP. Le mélange ATP/AzoDiGua est beaucoup plus fluorescent que le mélange ADP/AzoDiGua. Le mélange AMP/AzoDiGua ne présente pas de fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua. Ceci est cohérent avec les observations expérimentales au microscope optique (Figure 4.10). L'ATP, beaucoup plus chargée que ses homologues di et monophosphates, a tendance à davantage interagir avec l'AzoDiGua et former des agrégats supramoléculaires en solution. Cette reconnaissance moléculaire permet de sélectivement distinguer les dérivés tri, di et mono à des concentrations milli molaires.

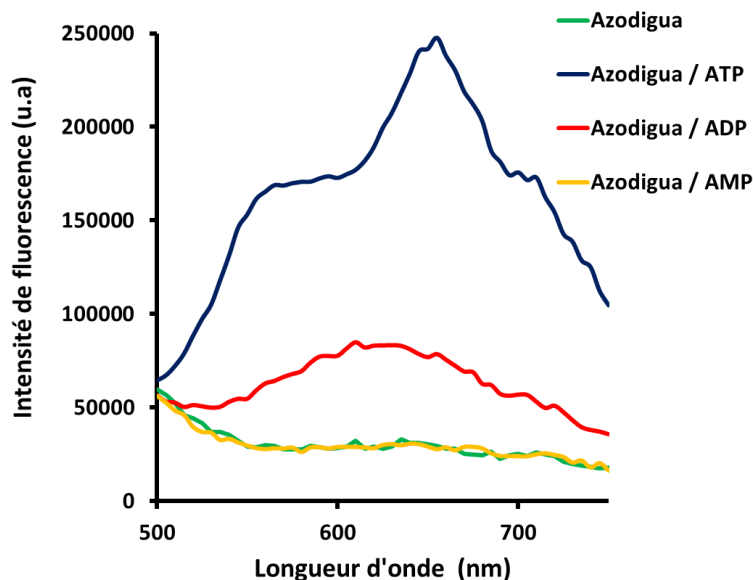


Figure 4.20- Spectre d'émission de fluorescence (excitation : 400 nm) de l'AzoDiGua seul ou en présence d'ATP, d'ADP ou d'AMP. Conditions : [ATP], [ADP] ou [AMP] = 1 mM ; [AzoDiGua] = 1 mM ; 10 min de mélange à température ambiante. Toutes les solutions sont réalisées dans un tampon aqueux [Tris-HCl] = 50 mM (pH = 7.4).

3) Conclusion

Dans ce premier chapitre, nous avons mis en évidence un nouveau type d'auto-assemblage combinant l'ATP, molécule d'importance biologique, et l'AzoDiGua, un intercalant d'ADN contenant un motif d'azobenzène et des groupements guanidinium. Nous avons ainsi montré que les molécules d'AzoDiGua et d'ATP ont la capacité de s'auto-assembler spontanément en solution, à pH physiologique, dans l'eau et à température ambiante par action concertée des interactions électrostatiques et π . L'auto-assemblage prend la forme d'agrégats supramoléculaires micrométriques se formant en quelques minutes seulement et soumis à une agitation moléculaire en solution. La formation de ces agrégats se traduit par un accroissement de la turbidité de la suspension.

Le co-assemblage ATP/AzoDiGua est fluorescent lorsqu'il est excité dans la zone d'absorbance de l'AzoDiGua (400 nm). L'assemblage présente une large fluorescence dans le visible avec un maximum vers 650 nm. Nous avons montré que cette fluorescence provient très probablement de l'effet de l'auto-organisation de l'AzoDiGua au sein du co-assemblage ATP/AzoDiGua via l'effet de fluorescence induite par l'agrégation des azobenzènes.

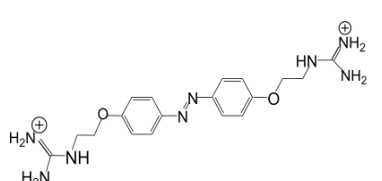
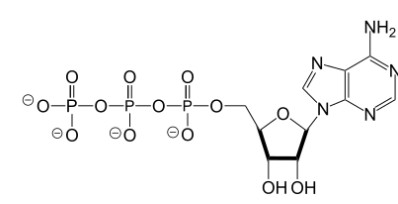
Dans le chapitre suivant, nous allons étudier le caractère dynamique de ces auto-assemblages, en exploitant les propriétés de l'AzoDiGua et de l'ATP, et en les soumettant à divers stimuli physique, chimique et biologique. Nous établirons comment contrôler de manière réversible l'auto-assemblage entre l'ATP et l'AzoDiGua (relargage d'ATP) et les propriétés (fluorescence, turbidité) dynamiques multi-stimulables qui peuvent en résulter.

CHAPITRE B.3- Assemblage supramoléculaire

ATP/AzoDiGua : un co-assemblage multi-stimulable et dynamique

Nous avons vu au chapitre précédent que l'association d'un intercalant d'ADN photosensible, l'AzoDiGua, à la molécule d'intérêt biologique l'ATP, conduisait à un auto-assemblage spontané dans l'eau et à pH neutre sous forme d'agrégats microscopiques fluorescents. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'étude du caractère dynamique de ces co-assemblages en tirant profit des différentes propriétés de l'AzoDiGua et de l'ATP. L'objectif est de pouvoir développer un système supramoléculaire stimulable dont les propriétés d'assemblage et de fluorescence peuvent être contrôlées de manière dynamique par différents stimuli. Pour ce faire, nous avons développé une stratégie visant à exploiter d'une part les propriétés de photoisomérisation et d'amphiphilie de l'AzoDiGua pour fabriquer un système photoswitchable et répondant à la présence de cavités hydrophobes. D'autre part, nous avons tiré profit du pouvoir chélatant de l'ATP et sa réponse à certaines enzymes pour développer un système répondant à la présence de métaux ou encore d'enzymes. L'objectif a été d'étudier le caractère dynamique de ce nouvel assemblage ATP/Azobenzène et sa réponse à différents stimuli tirant profit de la faiblesse des interactions électrostatiques et π entre l'ATP et l'AzoDiGua.

Pour ce faire, les assemblages supramoléculaires ont tout d'abord été formés dans des conditions fixes : mélange équimolaire d'ATP et d'AzoDiGua (1 mM) pendant 10 min dans une solution aqueuse avec un buffer ([Tris HCl]=50 mM) fixant le pH à 7.4. Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante. Les structures auto-assemblées ATP/AzoDiGua ont ensuite été exposées à différents stimuli et leurs réponses sont étudiées dans ce chapitre. Le tableau ci-dessous présente les stimuli qui ont été étudiés en tirant profit des propriétés spécifiques de chacune des briques ATP et AzoDiGua.

Molécule	Propriétés	Stimulus
<p>AzoDiGua</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Molécule photoisomérisable ○ Molécule amphiphile 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Lumière ○ Cavité hydrophobe
<p>ATP</p> 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Ligand chélatant ○ Substrat enzymatique 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Métaux ○ Enzyme

Plan :

1) Coassemblage ATP/AzoDiGua photoswitchable.....	103
a) L'AzoDiGua : une molécule photoisomérisable	103
b) Etude photodynamique du coassemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua	105
α) Photocontrôle de l'assemblage supramoléculaire entre l'ATP et l'AzoDiGua.....	105
β) Photocontrôle de la fluorescence de l'assemblage ATP/AzoDiGua	107
γ) Effet de l'irradiation bleue sur l'assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua	108
2) Coassemblage ATP/AzoDiGua répondant à la présence de métaux.....	109
a) Stratégie de désassemblage stimulé par des métaux.....	109
b) Etude dynamique du désassemblage ATP/AzoDiGua induit par le cuivre Cu ²⁺	110
α) Etude qualitative macroscopique et microscopique.....	110
β) Etude dynamique par résonance paramagnétique électronique RPE des agrégats ATP/AzoDiGua en présence des ions Cu ²⁺	111
γ) Modulation de la fluorescence du coassemblage ATP/AzoDiGua par les ions Cu ²⁺	114
3) Coassemblage ATP/AzoDiGua répondant à la présence d'une enzyme.....	117
a) Clivage enzymatique des agrégats ATP/AzoDiGua.....	117
b) Modulation de la fluorescence des agrégats ATP/AzoDiGua.....	118
4) Conclusions et introduction à la réponse à la complexation hôte-invité.....	120

1) Coassemblage ATP/AzoDiGua photoswitchable

a) L'AzoDiGua : une molécule photoisomérisable

L'AzoDiGua est un azobenzène capable de s'isomériser de sa conformation *trans* à sa conformation *cis* par irradiation dans l'UV. Il peut ensuite retourner à l'état *trans* par irradiation dans le bleu (Figure 5.1).

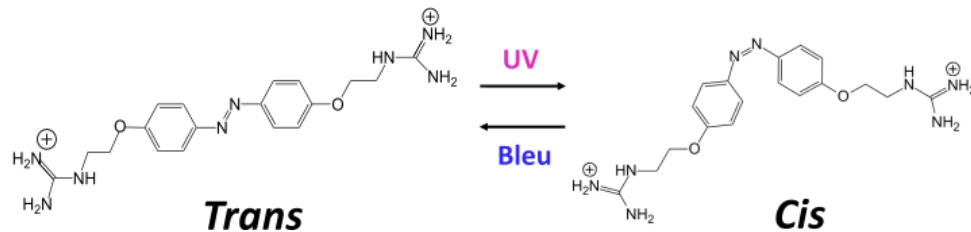


Figure 5.1- Représentation schématique de la photoisomérisation réversible de l'AzoDiGua

Une étude photophysique a été menée de manière à mieux comprendre la dynamique temporelle de photoisomérisation de l'AzoDiGua (Figure 5.2).

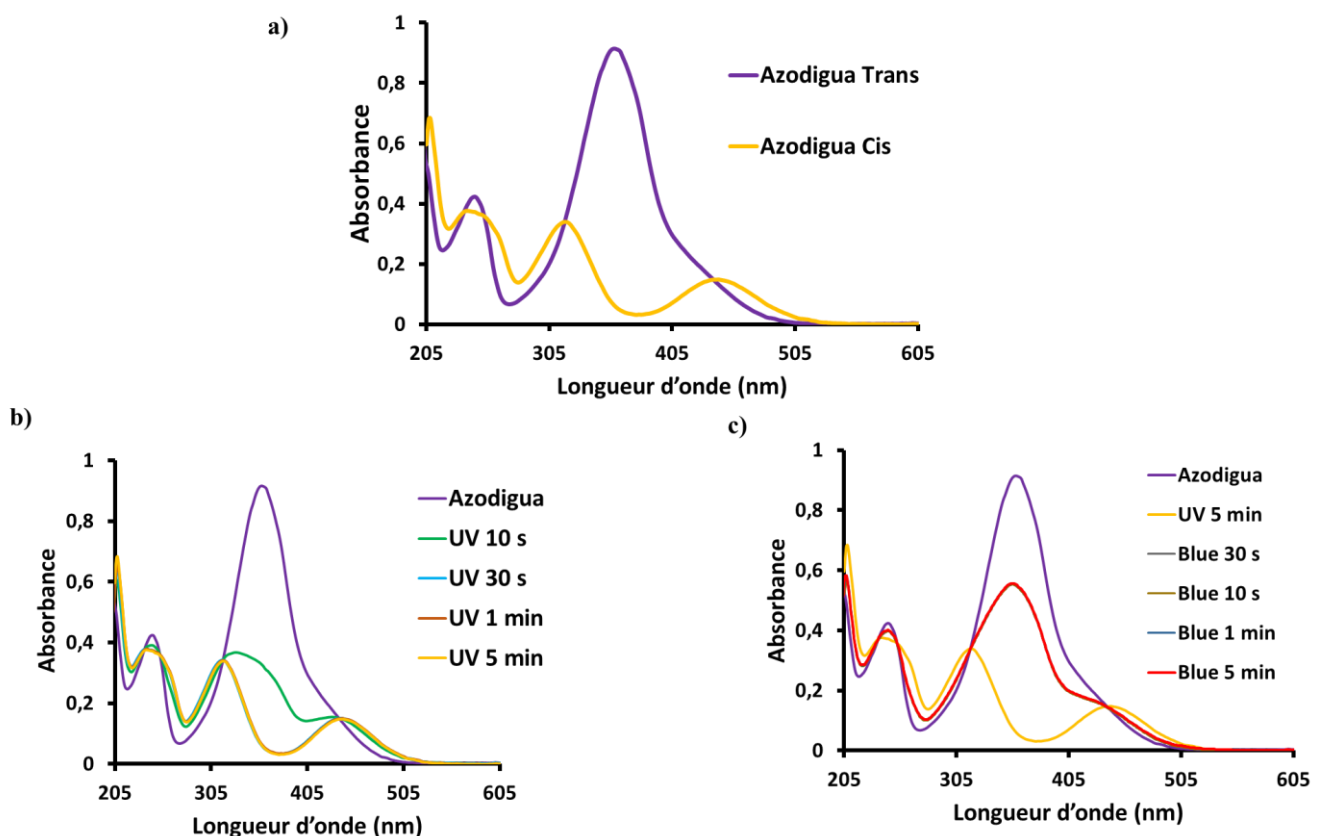


Figure 5.2-a) Spectre d'absorbance de l'AzoDiGua Trans et Cis **b)** Spectre d'absorbance de l'AzoDiGua trans avant (violet) et après différents temps d'irradiation UV (365 nm, 24 mW.cm⁻²) **c)** Spectre d'absorbance de l'AzoDiGua trans avant irradiation (violet) après irradiation UV (365 nm, 24 mW.cm⁻²) pendant 5 min (jaune) et suivie d'irradiations bleues (435 nm, 112 mW.cm⁻²) pendant différents temps d'exposition (rouge, vert, noir). Conditions : [AzoDiGua] = 50 μ M and [Tris HCl] = 50 mM (pH = 7.4)

L'AzoDiGua *trans* possède une bande d'absorption à 360 nm correspondant à une transition $\pi-\pi^*$. Lorsque la conformation *trans* est irradiée par de la lumière UV à 365 nm (24 mW.cm^{-2}) pendant une minute, l'AzoDiGua *trans* s'isomérise en AzoDiGua *cis* caractérisé par deux bandes d'absorption : une à 315 nm correspondant à une transition $\pi-\pi^*$ et une autre à 440 nm correspondant à une transition $n-\pi^*$ (Figure 5.2.a). Lorsque l'AzoDiGua *trans* est irradié par de la lumière UV (365 nm, 24 mW.cm^{-2}), la bande à 360 nm ($\pi-\pi^*$) voit son intensité diminuer pour donner naissance aux deux nouvelles bandes à 315 nm ($\pi-\pi^*$) et 440 nm ($n-\pi^*$) de l'AzoDiGua *cis* de plus faible intensité en moins d'une minute. L'état photostationnaire riche en *cis* est ainsi atteint après 30 secondes d'irradiation UV (Figure 5.2.b). Après irradiation dans le bleu à (435 nm, 112 mW.cm^{-2}), l'état photostationnaire est atteint très rapidement après 10 secondes (Figure 5.2.c). Cet état photostationnaire, riche en *trans*, ne correspond pas exactement au spectre de l'AzoDiGua *trans* et est constitué d'un mélange de *trans* et *cis*, riche en *cis*. En utilisant $\epsilon_{\text{AZD Trans}} = 2.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ déterminé préalablement, nous pouvons estimer que l'état photostationnaire atteint après l'irradiation bleue est composée d'environ 57% d'AzoDiGua *Trans* et 43% d'AzoDiGua *Cis*. Les compositions des états photostationnaires de l'AzoDiGua après irradiations UV et bleu sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Conditions	AzoDiGua Trans (%)	AzoDiGua Cis (%)
Solution d'AzoDiGua fraîchement préparée	100%	0%
Après irradiation UV	11%	89%
Après irradiation bleu	57%	43%

Tableau 1- Composition de l'état photostationnaire du mélange AzoDiGua Trans / AzoDiGua Cis dans différentes conditions (solution fraîche, après irradiation UV et après irradiation bleue).

La conversion de l'AzoDiGua *cis* en AzoDiGua *trans* peut également se produire par retour thermique. Cette conversion thermique est extrêmement lente et ne se produit pas après 2 heures en l'absence d'irradiation (Figure 5.3). Ainsi, l'AzoDiGua *cis* est stable à température ambiante en l'absence d'irradiation.

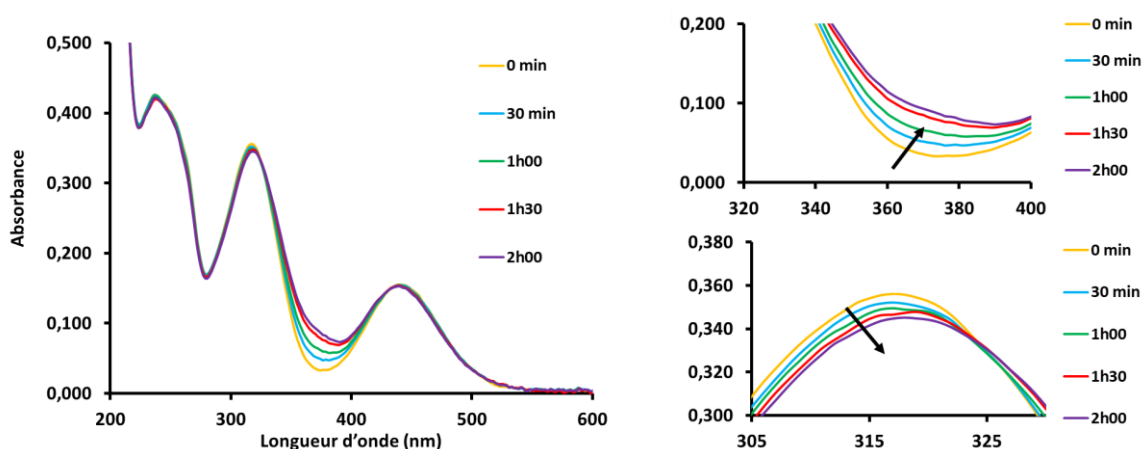


Figure 5.3- Spectre d'absorbance de l'AzoDiGua *cis* à différents temps à température ambiante et isolé de toute irradiation lumineuse ($[\text{AzoDiGua}] = 50 \mu \text{ M}$, $[\text{Tris HCl}] = 50 \text{ mM}$).

b) Etude photodynamique du coassemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua

Les propriétés de photoisomérisation de l'AzoDiGua ont permis de contrôler de manière réversible le coassemblage entre l'ATP et l'AzoDiGua en solution.

α) Photocontrôle de l'assemblage supramoléculaire entre l'ATP et l'AzoDiGua

L'irradiation par de la lumière UV (365 nm , 24 mW.cm^{-2}) du mélange trouble ATP/AzoDiGua pendant 3 minutes, caractéristique de la présence des agrégats supramoléculaires, conduit à une disparition de la turbidité de la solution (Figure 5.4.a). La solution devient jaune orangée et correspond à la couleur d'une solution d'AzoDiGua *cis* (Figure 5.4.b). Lorsque la solution est ensuite irradiée par de la lumière bleue (435 nm , 112 mW.cm^{-2}) pendant 3 minutes, la solution redevient turbide (Figure 5.4.a).



Figure 5.4-a) Photographies du mélange ATP/Trans AzoDiGua (AZD) (gauche), après 3 minutes d'irradiation UV (milieu) suivi de 3 minutes d'irradiation bleu (droite). **b)** Photographie d'une solution de Trans AZD (gauche) et de Cis AZD (droite) (Excitation UV : 365 nm (24 mW.cm^{-2}) Excitation bleue : 435 nm (112 mW.cm^{-2})).

Les suspensions soumises à différents stimuli lumineux ont ensuite été observées par microscopie optique à transmission (Figure 5.5). Lorsque les agrégats ATP/AzoDiGua sont irradiés avec de la lumière UV pendant 3 minutes ($395/25\text{ nm}$, 26 mW.cm^{-2}), correspondant à la région d'absorbance de l'AzoDiGua *trans*, le coassemblage ATP/AzoDiGua se dissocie, les agrégats diminuent en nombre et taille jusqu'à complètement disparaître (Video 2, annexe). Le désassemblage des agrégats ATP/AzoDiGua sous irradiation UV est très rapide et se produit en moins d'une minute d'irradiation. Lorsque cette solution est irradiée avec de la lumière bleue ($480/30\text{ nm}$, 40 mW.cm^{-2}), pendant 3 minutes, l'ATP et l'AzoDiGua se réassemblent en solution pour former des agrégats supramoléculaires (Video 3, annexe). Ces agrégats, obtenus après irradiation bleue, sont moins nombreux que dans l'état initial, ce qui peut s'expliquer par le fait que l'AzoDiGua atteint un état photostationnaire correspondant à un mélange de *trans* et *cis* lors de la photoconversion *cis* à *trans*, comme étudié lors de l'étude de spectroscopie UV-visible. Ceci explique également la couleur légèrement moins trouble de la solution ATP/AzoDiGua obtenue après irradiation dans le bleu (Figure 5.4.a). L'AzoDiGua *cis* ne s'assemble pas avec l'ATP ce qui est probablement dû à une contrainte géométrique et stérique des cycles

aromatiques ainsi qu'à un changement de polarité . En effet, la non planéité de la conformation *cis* limite le π -stacking et l'auto-organisation de type intercalation.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la réversibilité de l'assemblage photocontrôlé entre l'AzoDiGua et l'ATP. Pour ce faire, le mélange ATP/AzoDiGua a été successivement irradié pendant 3 minutes par de la lumière UV (395/25 nm, 26 mW.cm⁻²) et bleu (480/30 nm, 40 mW.cm⁻²). Un enchainement de 5 cycles d'irradiations consécutives UV et bleu a permis de mettre en évidence que le photocontrôle était réversible (Figure 5.5.c). En effet, les agrégats ATP/AzoDiGua se dissocient et se réassemblent sous l'action successive de la lumière UV et de la lumière bleue.

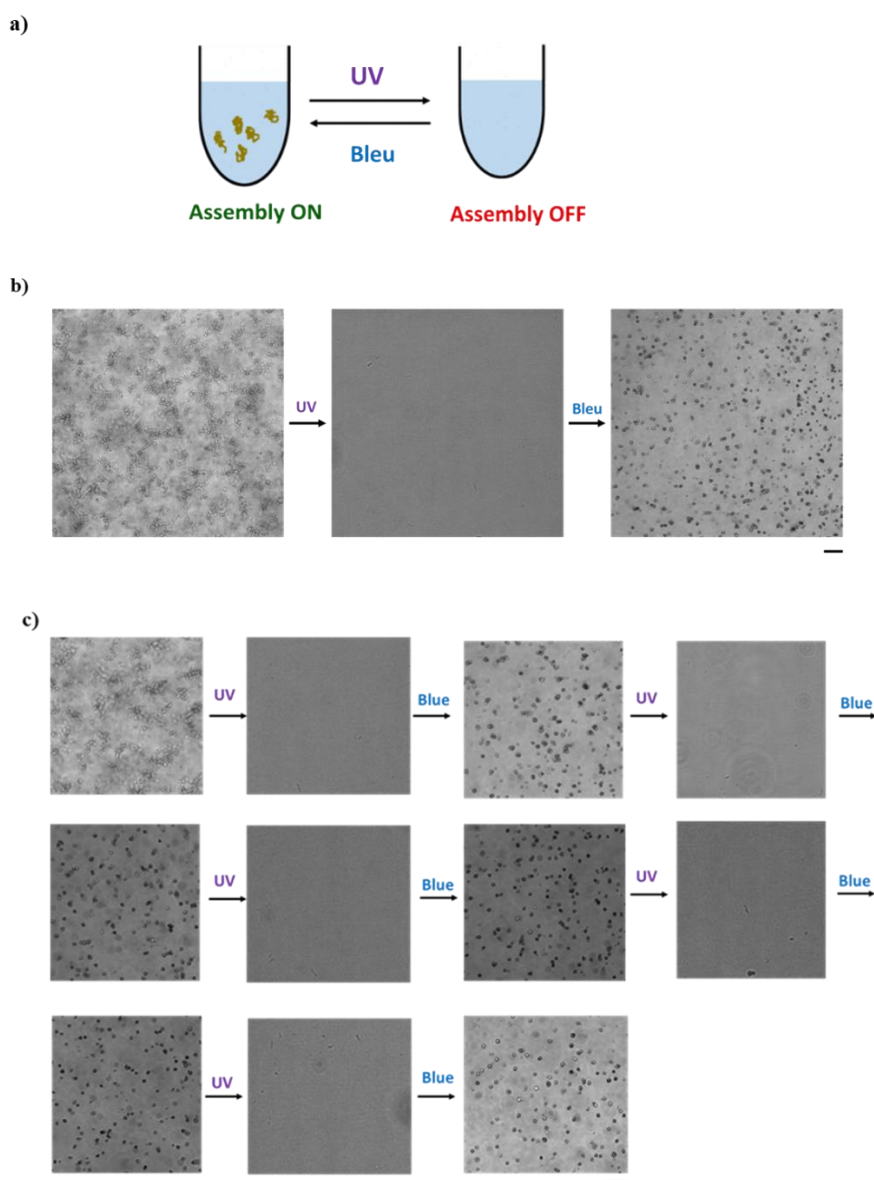


Figure 5.5- a) Stratégie de photocontrôle de l'assemblage entre l'ATP et l'AzoDiGua b) Observation au microscope optique à transmission du mélange ATP/AzoDiGua avant (à gauche) et après irradiation UV (au milieu) suivie d'une irradiation bleue (à droite) c) Enchainement de 5 cycles d'irradiation UV/bleu (Excitation UV : 395/25 nm , 26 mW.cm⁻², Excitation bleue : 480/30 nm, 40 mW.cm⁻², Temps d'irradiation : 3 minutes). La barre d'échelle représente 20 μ m.

Après photoisomérisation de l'AzoDiGua *cis* en *trans*, les agrégats se forment et continuent de s'agréger en solution après l'irradiation dans le bleu (Figure 5.6).

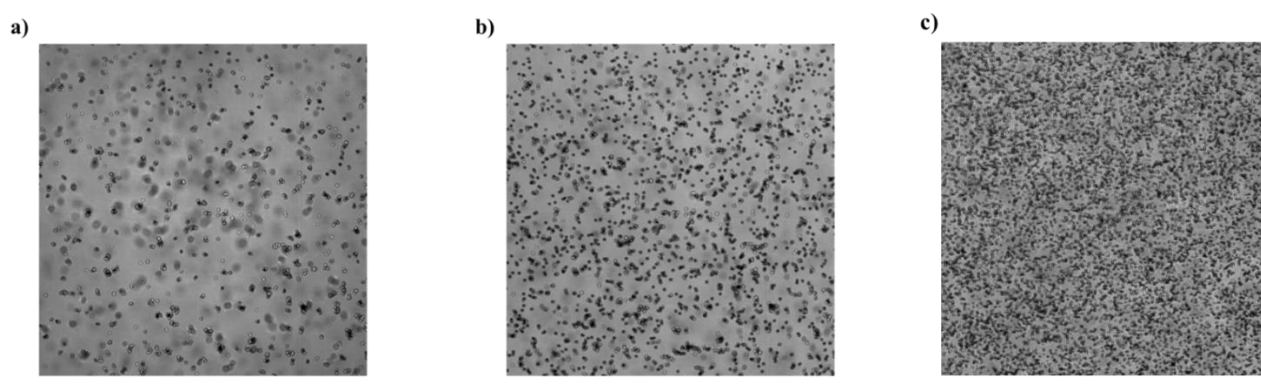


Figure 5.6- Observation au microscope optique des agrégats ATP/AzoDiGua après irradiation UV (395/25 nm , 26 mW.cm⁻²) pendant 3 min et irradiation bleu (480/30 nm, 40 mW.cm⁻²) pendant 3 min puis laissés incubés à température ambiante pendant **a)** 5 min, **b)** 10 min et **c)** 30 min. La barre d'échelle représente 20 μ m.

β) Photocontrôle de la fluorescence de l'assemblage ATP/AzoDiGua

Le coassemblage ATP/AzoDiGua étant fluorescent, nous nous sommes intéressés au photocontrôle réversible de la fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua *trans*. Par irradiation du mélange par de la lumière UV (395/25 nm , 26 mW.cm⁻²) pendant 5 minutes, la fluorescence des agrégats (Excitation : 400 nm, Emission : 650 nm) diminue progressivement. Lorsque le mélange ATP/AzoDiGua est irradié par de la lumière UV, l'AzoDiGua se photoisomérisé et n'est pas plus capable de s'assembler avec l'ATP. Ceci provoque la suppression du phénomène de fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua et le système voit ainsi sa fluorescence diminuer. Par irradiation du système avec de la lumière bleue (480/30 nm, 40 mW.cm⁻²) pendant 5 minutes, la fluorescence des agrégats (Excitation : 400 nm, Emission : 650 nm) augmente. L'AzoDiGua *cis* se photoisomérisé et les agrégats ATP/AzoDiGua se reforment progressivement expliquant l'augmentation de l'intensité de fluorescence. L'intensité de fluorescence après irradiation bleue est plus faible que l'intensité de fluorescence initiale dû à l'état photostationnaire atteint qui contient un mélange de *cis* et *trans*, riche en *trans* (Figure 5.7.a et Tableau 1). Ceci nous a permis de développer un switch de fluorescence grâce à l'assemblage réversible de l'AzoDiGua et l'ATP en solution et à température ambiante par irradiation successive UV et bleue (Figure 5.7.b). Il constitue l'un des rares exemples où le phénomène de fluorescence induite par agrégation permet de conserver le caractère photoswitchable de l'azobenzène. A noter que l'AzoDiGua *trans* a une intensité de fluorescence plus élevée à 650 nm que l'AzoDiGua *cis*. En effet, cette différence peut s'interpréter par une différence d'agrégation en solution. L'AzoDiGua *trans* est moins polaire que l'AzoDiGua *cis* et donc plus hydrophobe. Sa capacité d'agrégation en solution aqueuse est donc plus importante que celle de l'AzoDiGua *cis*. Ceci est donc à corrélérer avec le fait que l'agrégation en solution des molécules d'AzoDiGua *trans* ne s'opère pas de la même manière pour les molécules d'AzoDiGua *cis* expliquant la différence d'émission de fluorescence entre les deux conformères (Figure 5.7.c).

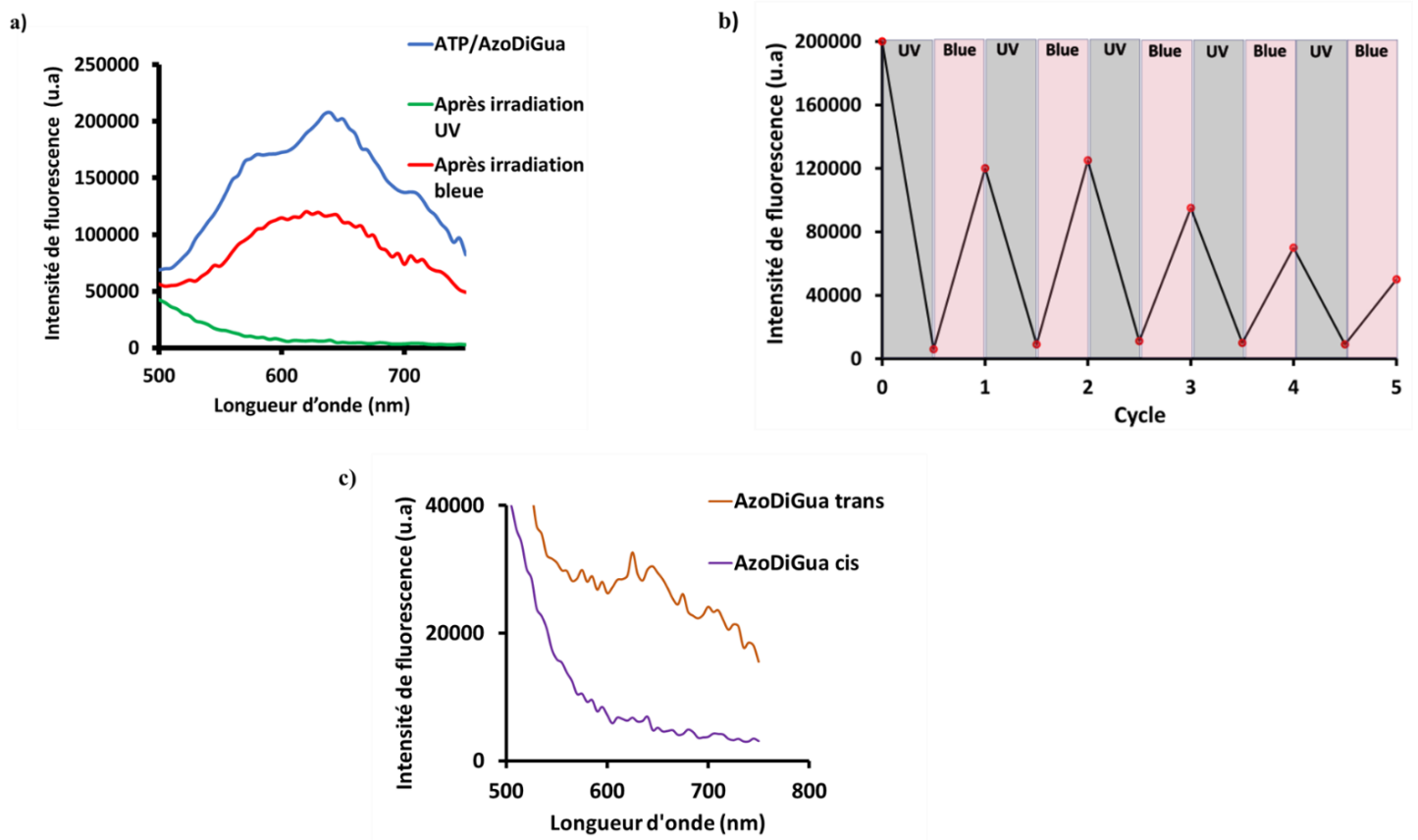


Figure 5.7-a) Spectre d'émission de fluorescence du co-assemblage ATP/AzoDiGua avant et après irradiation UV ($395/25 \text{ nm}$, 26 mW.cm^{-2}) pendant 5 minutes suivi d'une irradiation bleue ($480/30 \text{ nm}$, 40 mW.cm^{-2}) pendant 5 minutes. **b)** Intensité de fluorescence à 650 nm selon des cycles successifs alternant irradiation UV ($395/25 \text{ nm}$, 26 mW.cm^{-2}) et bleue ($480/30 \text{ nm}$, 40 mW.cm^{-2}) pendant 5 minutes. **c)** Spectre d'émission de fluorescence de l'AzoDiGua *trans* (avant irradiation UV pendant 5 minutes) et AzoDiGua *cis* (obtenu après irradiation UV pendant 5 minutes de l'AzoDiGua *trans*) (1 mM , UV : 365 nm , 24 mW.cm^{-2} , Bleu : 435 nm , 112 mW.cm^{-2}). L'excitation de fluorescence est à 400 nm pour tous les spectres.

γ) Effet photomécanique par irradiation bleue de l'assemblage ATP/AzoDiGua

Un effet photomécanique a été observé lorsque les agrégats d'ATP/AzoDiGua sont irradiés par de la lumière bleue sans irradiation UV préalable. Les agrégats tendent à se compacter entre eux lorsque le milieu est irradié par de la lumière bleue (Figure 5.8). Cette photocompaction tend à réduire l'étendue spatiale des agrégats ATP/AzoDiGua et se produit dès les premières secondes d'irradiation (Figure 5.8 et Vidéo 4 en annexe).

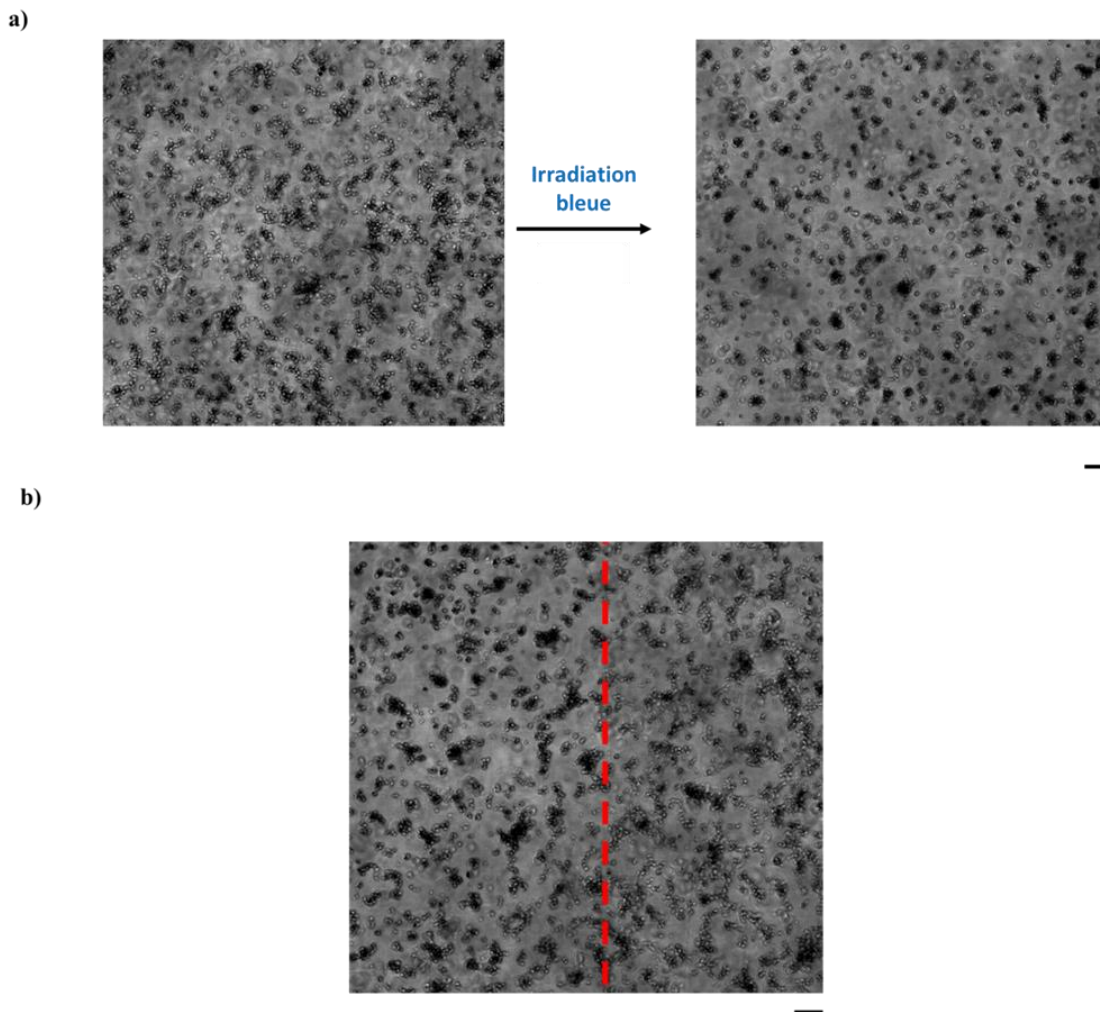


Figure 5.8-a) Observation au microscope optique de la suspension ATP/AzoDiGua en solution avant (gauche) et après (droite) irradiation bleue (480/30 nm, 40 mW.cm⁻²) pendant 1 minute **b)** Observation au microscope optique de la frontière (représentée en pointillés rouges) entre une zone irradiée (à gauche) et une zone non irradiée (à droite) par de la lumière bleue. La barre d'échelle représente 20 µm.

2) Co-assemblage ATP/AzoDiGua répondant à la présence de métaux

a) Stratégie de désassemblage stimulé par des métaux

L'ATP est un ligand organique multidenté capable de chélater divers ions métalliques, et notamment les cations divalents (magnésium II, calcium II, cuivre II,..)^{117,118}. Pour ce faire, nous avons tenté d'exploiter l'affinité de l'ATP pour les ions métalliques afin de développer des systèmes dynamiques en présence de métaux capables de moduler la fluorescence de l'assemblage ATP/AzoDiGua (Figure 5.9).

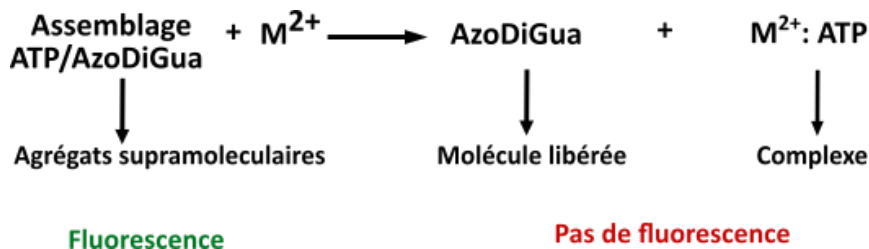


Figure 5.9- Stratégie de modulation de la fluorescence de l'assemblage ATP/AzoDiGua par complexation de l'ATP par un ion métallique M^{2+} qui induit le désassemblage et la perte de fluorescence.

b) Etude dynamique du désassemblage ATP/AzoDiGua induit par le cuivre Cu^{2+}

α) Etude qualitative macroscopique et microscopique

Une série de métaux monovalents et divalents a été ajoutée à une solution d'agrégats supramoléculaires ATP/AzoDiGua en suspension afin d'explorer leur éventuelle capacité à induire un désassemblage par complexation de l'ATP. Les métaux divalents (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+}) induisent un changement d'aspect optique instantané de la solution d'ATP/AzoDiGua lorsqu'ils sont ajoutés en excès et que la solution est bien homogénéisée. Celle-ci passe d'une couleur trouble à la couleur caractéristique de l'AzoDiGua *trans* montrant que les agrégats sont désassemblés en solution. Les métaux monovalents, quant à eux, n'induisent pas de changement d'aspect optique montrant que les agrégats restent en solution et ne sont pas désassemblés (Figure 5.10). Cette observation de sélectivité par la valence des ions est expliquée par la faible constante d'association de l'ATP avec les ions Na^+ et K^+ comparativement aux ions Mg^{2+} , Ca^{2+} et Cu^{2+} ¹¹⁹.

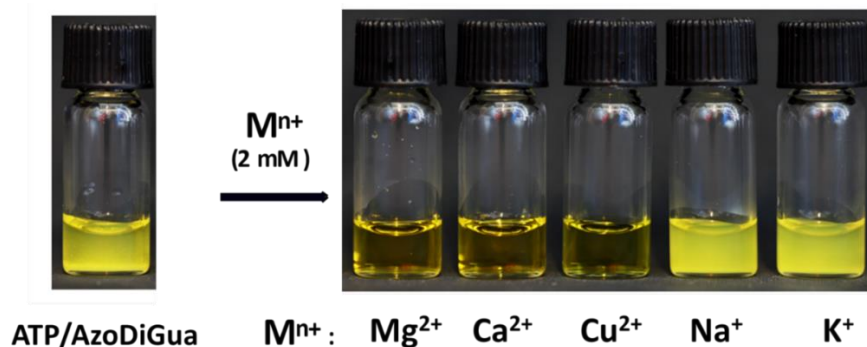


Figure 5.10- Photographie d'une solution d'ATP/AzoDiGua avant (gauche) et après (droite) ajout de différents métaux (MgSO_4 , CaCl_2 , $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, NaCl , KCl) à une concentration de 2 mM ($[\text{AzoDiGua}] = [\text{ATP}] = 1 \text{ mM}$, $[\text{Tris HCl}] = 50 \text{ mM}$)

L'étude a été poursuivie plus spécifiquement avec les ions Cu^{2+} car ces derniers sont paramagnétiques et une étude par résonance paramagnétique électronique (RPE) a pu être menée par la suite pour mieux comprendre la dynamique de réponse des agrégats d'ATP/AzoDiGua en présence d'un centre métallique. L'observation au microscope optique des agrégats ATP/AzoDiGua avant et après ajout de Cu^{2+} (2 mM) a permis de confirmer l'observation macroscopique. Après ajout des ions Cu^{2+} à une solution d'ATP/AzoDiGua et homogénéisation de la solution, les agrégats d'ATP/AzoDiGua sont instantanément dissociés une minute après ajout des ions Cu^{2+} et ne sont plus observables au microscope optique. La solution perd alors instantanément son aspect

trouble signifiant que l'ATP et l'AzoDiGua ne sont donc plus associés en solution. Les ions Cu^{2+} induisent donc un désassemblage du coassemblage ATP/AzoDiGua. Afin de mieux comprendre, le mécanisme à l'échelle moléculaire, une étude par RPE a été menée sur ce système.

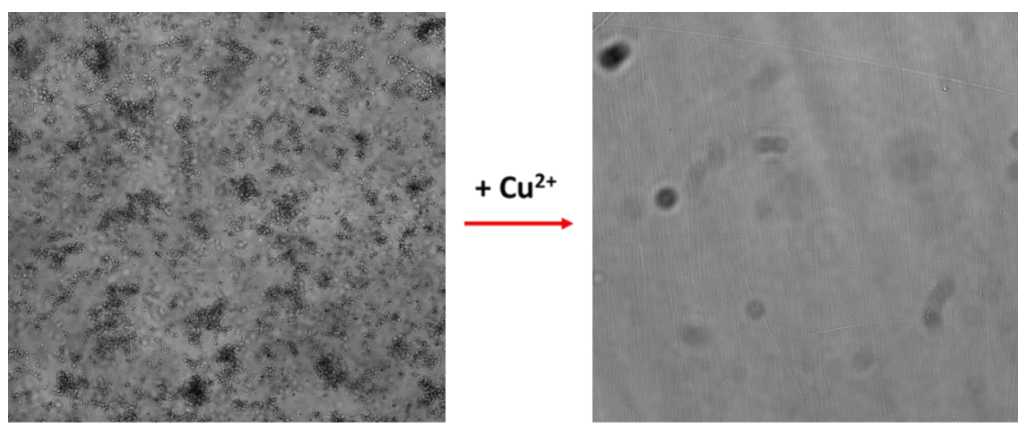


Figure 5.11-Observation au microscope optique des agrégats ATP/AzoDiGua avant (gauche) et 1 minute après (droite) ajout d'ions Cu^{2+} ($[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2] = 2 \text{ mM}$) au sein du mélange ATP/AzoDiGua. La barre d'échelle représente 20 μm .

β) Etude dynamique par résonance paramagnétique électronique RPE des agrégats ATP/AzoDiGua en présence des ions Cu^{2+}

Une étude par RPE a permis de mieux explorer la réponse des agrégats d'ATP/AzoDiGua en présence d'ions Cu^{2+} . Pour ce faire, des spectres RPE à 110K ont été acquis dans les conditions expérimentales de désassemblage des agrégats d'ATP/AzoDiGua.

L'AzoDiGua et l'ATP ne présentent pas de signal RPE n'ayant pas de paramagnétisme. Les spectres RPE de Cu^{2+} et du mélange Cu^{2+} /AzoDiGua sont similaires et présentent les mêmes pics. Ceci prouve que l'ion Cu^{2+} et l'AzoDiGua n'interagissent pas en solution. A l'inverse, les spectres RPE de Cu^{2+} et du mélange Cu^{2+} /ATP ne présentent pas les mêmes caractéristiques. Un épaulement du spectre RPE de Cu^{2+} vers 3100 G ainsi qu'un shift de 3310 G à 3280 G est observé en présence d'ATP. De plus, la structure hyperfine des ions Cu^{2+} entre 2400 et 3000 G est également modifiée en présence d'ATP (Figure 5.12). Ces modifications du spectre RPE de Cu^{2+} en présence d'ATP prouvent que les ions Cu^{2+} interagissent avec l'ATP en solution par complexation modifiant la sphère de coordination des ions cuivre. Il est à noter que la structure hyperfine des centres paramagnétiques est mal identifiée due à la forte concentration des solutions conduisant à un élargissement des spectres par interaction magnétique entre les complexes de cuivre ¹²⁰.

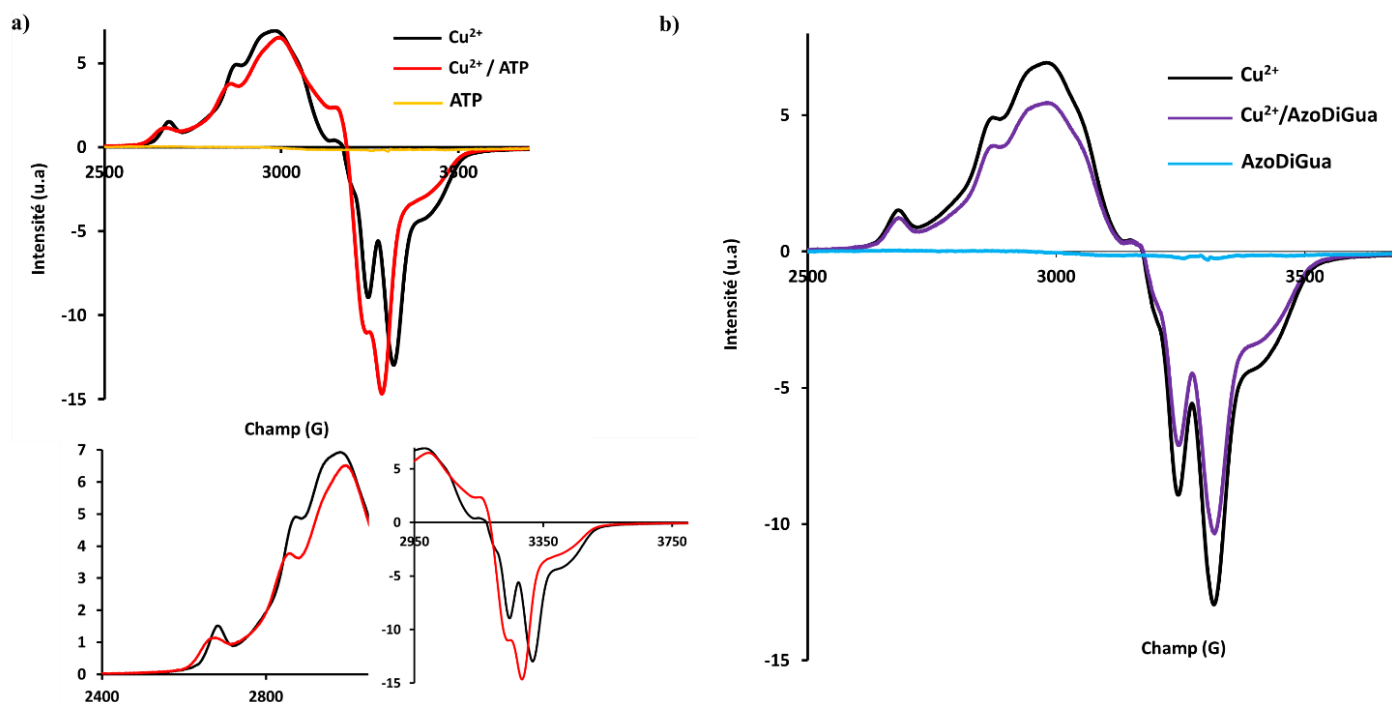


Figure 5.12-a) Spectres RPE des ions cuivre Cu^{2+} seuls, de l'ATP seul, et du mélange $\text{Cu}^{2+}/\text{ATP}$. **b)** Spectres RPE des ions cuivre Cu^{2+} seuls, de l'AzoDiGua seul, et du mélange $\text{Cu}^{2+}/\text{AzoDiGua}$. Conditions : $[\text{ATP}] = 1 \text{ mM}$; $[\text{AzoDiGua}] = 1 \text{ mM}$; $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2] = 2 \text{ mM}$. Toutes les solutions sont réalisées dans le buffer $[\text{Tris HCl}] = 50 \text{ mM}$ ($\text{pH} = 7.4$).

Mesures réalisées à $T = 110 \text{ K}$

Nous nous sommes ensuite intéressés à étudier la dynamique de complexation de l'ATP par les ions Cu^{2+} en présence des agrégats ATP/AzoDiGua. Pour ce faire, un spectre RPE des agrégats ATP/AzoDiGua a été enregistré avant et après ajout des ions Cu^{2+} . Le mélange ATP/AzoDiGua ne présente pas de signal RPE n'étant pas paramagnétique. Lorsque les ions Cu^{2+} sont ajoutés au mélange, un signal paramagnétique est détecté présentant les mêmes traits caractéristiques que le spectre RPE du mélange $\text{Cu}^{2+}/\text{ATP}$. Ceci prouve que lorsque les ions Cu^{2+} sont ajoutés à la solution contenant le co-assemblage ATP/AzoDiGua, ils se complexent à l'ATP et provoquent le désassemblage des structures ATP/AzoDiGua (Figure 5.13.a). De même, le spectre RPE du mélange ATP/AzoDiGua après ajout de Cu^{2+} et ATP/Cu après ajout d'AzoDiGua présentent les mêmes caractéristiques prouvant que le cuivre se complexe avec l'ATP en présence d'AzoDiGua et empêche ainsi le coassemblage entre l'ATP et l'AzoDiGua en solution (Figure 5.13.b). Les calculs menés par nos collaborateurs ont mené à un facteur de Landé $g = 2,08$ pour le complexe $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{ATP}$ en absence et en présence d'AzoDiGua.

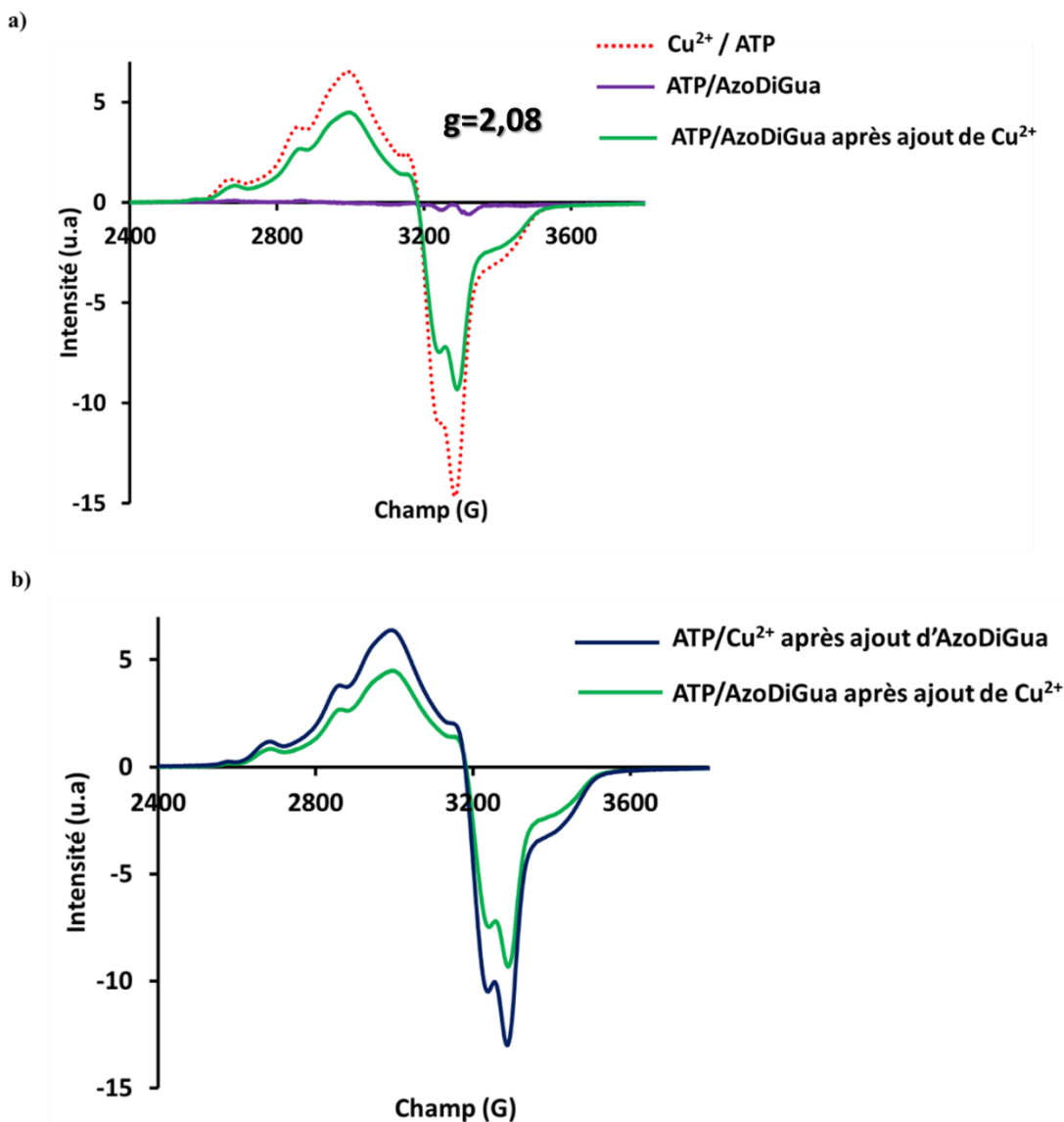


Figure 5.13-a) Spectre RPE du mélange ATP/Cu²⁺, du mélange ATP/AzoDiGua avant et après ajout des ions Cu²⁺ **b)** Spectre RPE du mélange ATP/Cu²⁺ après ajout d'AzoDiGua. Conditions : [ATP] = 1 mM ; [AzoDiGua] = 1 mM ; [Cu(NO₃)] = 2 mM. Toutes les solutions sont réalisées dans le buffer [Tris HCl] = 50 mM (pH = 7.4).

Lorsque les ions Cu²⁺ interagissent avec le ligand ATP lié à l'AzoDiGua, un nouveau pic apparaît à 2500 G (Figure 5.14), marqué d'une *. Ce pic n'est pas présent sur le spectre du complexe Cu²⁺/ATP en l'absence d'AzoDiGua. Ce nouveau pic correspond très probablement à une nouvelle espèce de cuivre présent en solution (complexe bimétallique ou à un degré d'oxydation différent de II) en présence d'AzoDiGua modifiant la structure géométrique voire électronique du cuivre¹²¹. Ainsi, en ajoutant les ions Cu²⁺ aux agrégats ATP/AzoDiGua, l'ATP se complexent aux ions Cu²⁺. Cette complexation brise l'interaction entre l'AzoDiGua et l'ATP entraînant une dissociation des agrégats. La complexation de l'ATP avec les ions Cu²⁺ en présence de l'AzoDiGua conduit à une nouvelle espèce de cuivre caractérisé par la naissance d'un nouveau pic sur le signal RPE (Figure 5.14).

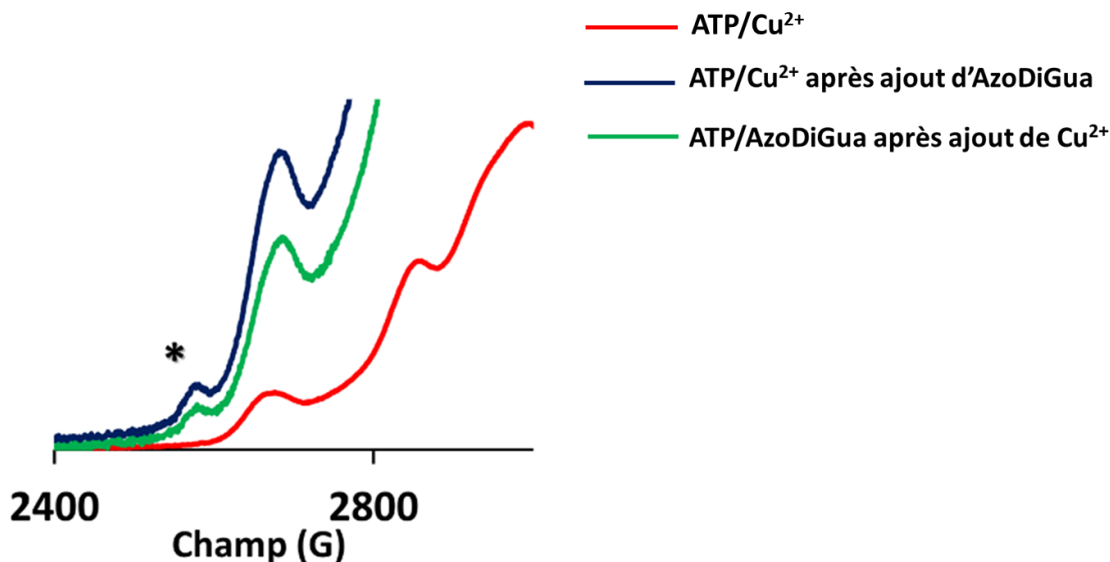


Figure 5.14- Zoom des spectres RPE normalisés $\text{Cu}^{2+}/\text{ATP}$, $\text{ATP}/\text{Cu}^{2+}$ après ajout d'AzoDiGua et $\text{ATP}/\text{AzoDiGua}$ après ajout de Cu^{2+} . L'étoile * représente le nouveau pic apparaissant. Conditions : $[\text{ATP}] = 1 \text{ mM}$; $[\text{AzoDiGua}] = 1 \text{ mM}$; $[\text{Cu}(\text{NO}_3)_2] = 2 \text{ mM}$. Toutes les solutions sont réalisées dans le buffer $[\text{Tris HCl}] = 50 \text{ mM}$ ($\text{pH} = 7.4$). Mesures réalisées à $T = 110 \text{ K}$

γ) Modulation de la fluorescence du co-assemblage $\text{ATP}/\text{AzoDiGua}$ par les ions Cu^{2+}

Le contrôle de l'assemblage entre l'ATP et l'AzoDiGua par le Cu^{2+} a permis de moduler la fluorescence du coassemblage $\text{ATP}/\text{AzoDiGua}$. Par ajout croissant d'ions Cu^{2+} au sein du mélange $\text{ATP}/\text{AzoDiGua}$, la fluorescence des agrégats $\text{ATP}/\text{AzoDiGua}$ au maximum d'émission (650 nm) diminue progressivement. Ceci s'explique par la complexation progressive de l'ATP par les ions Cu^{2+} (Figure 5.15.a). Lorsque la concentration en Cu^{2+} est deux fois supérieure à celle de l'ATP, la fluorescence diminue grandement instantanément jusqu'à atteindre au bout de 10 minutes la fluorescence de l'AzoDiGua libre (Figure 5.15.b). Ceci prouve qu'une grande partie de l'ATP assemblée avec l'AzoDiGua est complexée après ajout des ions Cu^{2+} et empêche ainsi le phénomène de fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua.

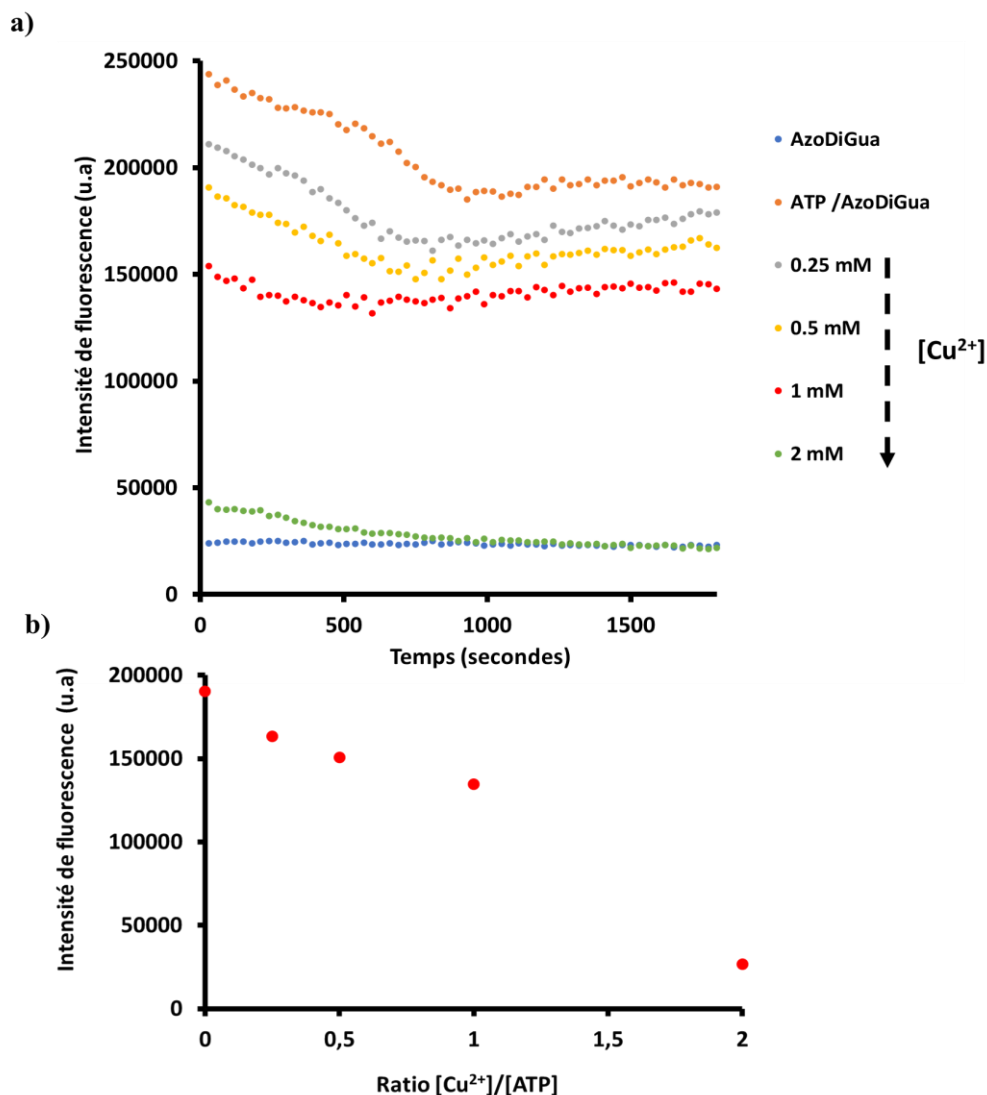


Figure 5.15-a) Variation temporelle de l'intensité de fluorescence à 650 nm (excitation 400 nm) du mélange ATP/AzoDiGua après l'ajout d'une quantité croissante de Cu²⁺. **b)** Intensité de fluorescence à 650 nm (excitation 400 nm) du mélange ATP/AzoDiGua en fonction du ratio [Cu²⁺]/[ATP] 10 minutes après l'ajout de Cu²⁺ ([ATP]=1 mM, [Tris HCl]=50 mM, pH=7.4).

Une observation au microscope optique de la solution avant et après ajout d'ions Cu²⁺ pour différents ratios [Cu²⁺]/[ATP] a permis de corréler les observations faites en fluorescence. Une observation au microscope optique a été faite 1 minute après ajout d'ions Cu²⁺ pour différentes quantités (Figure 5.16.a-d). Plus la quantité d'ions Cu²⁺ est élevée, plus les agrégats sont dissociés jusqu'à être complètement désassemblés lorsque la concentration en Cu²⁺ est deux fois supérieure à celle de l'ATP pour laquelle aucun coassemblage n'est observable au microscope optique. Une observation a également été faite 30 minutes après ajout d'ions Cu²⁺ pour différentes quantités. Les agrégats restant en solution et pour lesquels l'ATP n'a pas été complexé par les ions Cu²⁺ tendent à s'agréger entre eux dans le temps (Figure e-g). A l'inverse, aucun agrégat d'ATP/AzoDiGua n'est observé après 30 minutes lorsque la concentration en ions Cu²⁺ est deux fois supérieure à celle de l'ATP. Ceci prouve que les interactions ATP/AzoDiGua ont été totalement brisées par complexation

de l'ATP avec les ions Cu^{2+} et qu'aucun agrégat n'est présent en solution lorsque la concentration en ions Cu^{2+} est deux fois supérieure à celle de l'ATP.

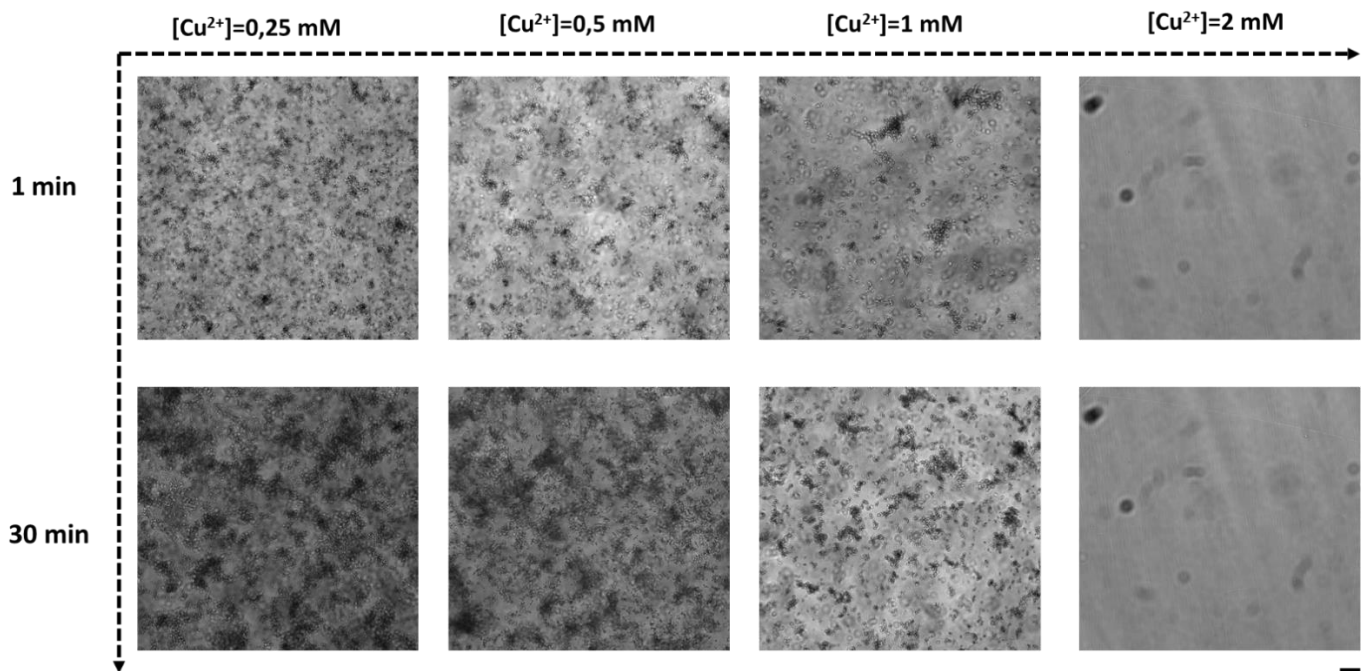


Figure 5.16- Observation au microscope optique à transmission du mélange ATP/AzoDiGua 1 minute (haut) et 30 minutes (bas) après l'ajout de différentes concentrations de Cu^{2+} . La barre d'échelle représente 20 μm .

Il est également possible de reformer les agrégats ATP/AzoDiGua par ajout supplémentaire d'un excès d'ATP. Ainsi, les molécules d'AzoDiGua libres en solution interagissent avec l'ATP pour reformer les agrégats en solution. La solution devient alors trouble, caractéristique de la formation du coassemblage ATP/AzoDiGua (Figure 5.17).

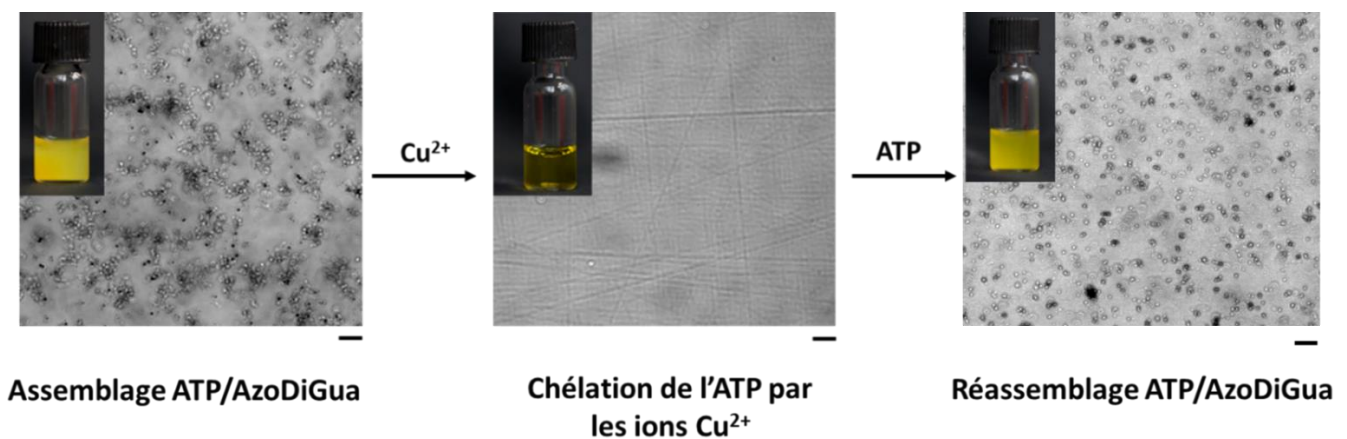


Figure 5.17- Observation au microscope optique des agrégats ATP/AzoDiGua avant (gauche) et après l'ajout successif de 2 mM Cu^{2+} (milieu) et de 3 mM d'ATP (droite). La barre d'échelle représente 20 μm .

3) Coassemblage ATP/AzoDiGua répondant à la présence d'une enzyme

a) Clivage enzymatique des agrégats ATP/AzoDiGua

L'ATP est un substrat enzymatique capable de s'hydrolyser en présence d'enzymes spécifiques telles que l'alkaline phosphatase (ALP)⁹³. Cette enzyme est capable de cliver l'ATP en adénosine et trois groupements phosphate. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la réponse des agrégats supramoléculaires ATP/AzoDiGua en présence de l'ALP (Figure 5.18.a). Lorsque l'enzyme est ajoutée à un mélange ATP/AzoDiGua, ce dernier perd sa turbidité après une dizaine de minutes pour atteindre la couleur caractéristique de l'AzoDiGua (Figure 5.18.b).

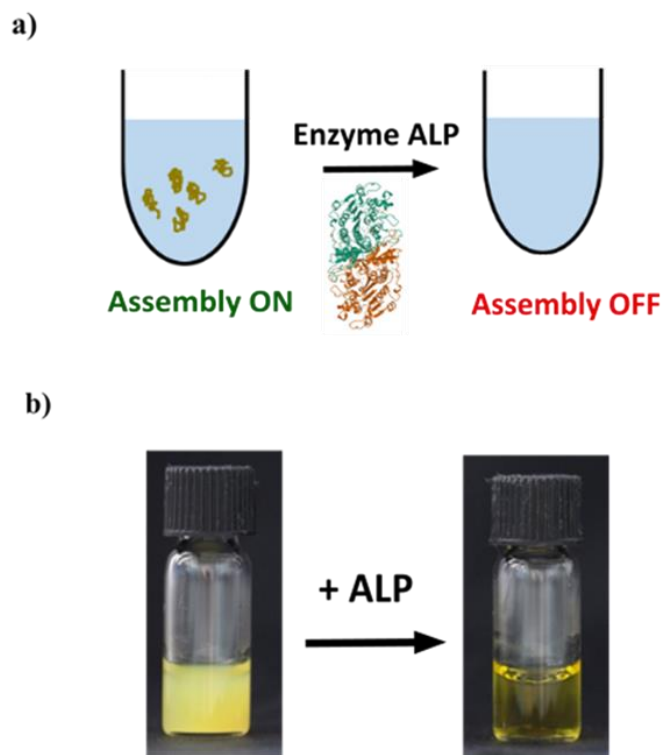


Figure 5.18-a) Stratégie de désassemblage des agrégats ATP/AzoDiGua par l'enzyme alcaline phosphatase (ALP). **b)** Photographies d'une solution du mélange ATP/AzoDiGua avant (gauche) et 10 minutes après (droite) avoir ajouté 10 U/ μ L d'enzyme ALP (5 μ L d'ALP).

Une solution d'agrégats ATP/AzoDiGua avant et après ajout de l'enzyme est observée au microscope optique (Figure 5.19). Une dizaine de minutes après ajout de l'enzyme ALP à une solution contenant les agrégats d'ATP/AzoDiGua, ces derniers ne sont plus observables au microscope optique et sont totalement dissociés. Ceci prouve que l'enzyme hydrolyse l'ATP qui n'est ainsi plus capable de s'assembler avec l'AzoDiGua sous forme d'agrégats supramoléculaires.

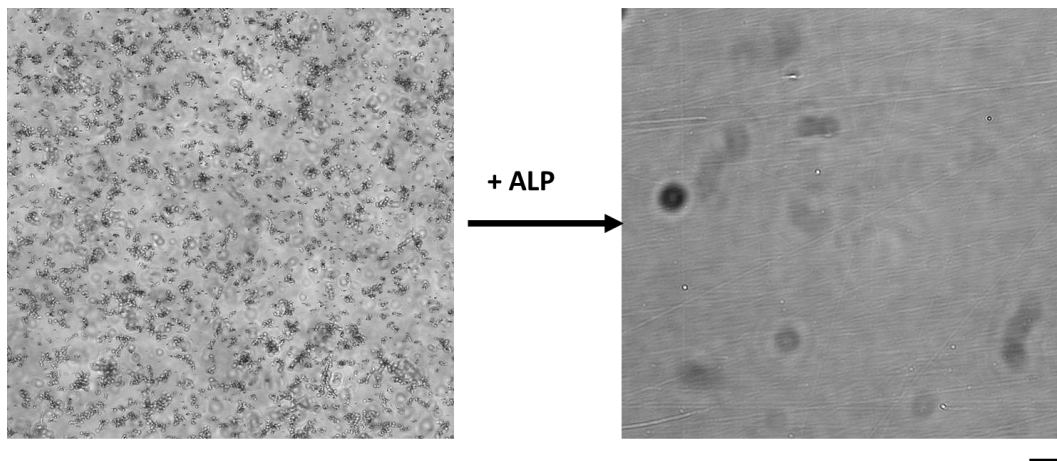


Figure 5.19- Observation au microscope optique du mélange ATP/AzoDiGua avant (gauche) et 10 min après (droite) ajout de 10 U/ μ L d'enzyme ALP (5 μ L d'ALP). La barre d'échelle représente 20 μ m.

Lorsque l'ALP, préalablement chauffée à 90°C et dénaturée, est ajoutée au mélange ATP/AzoDiGua, les agrégats ne se désassemblent pas. Ceci prouve que le désassemblage est bien dû à l'activité enzymatique de l'ALP qui hydrolyse l'ATP en adénosine et groupements phosphate et permet de détruire l'interaction entre l'ATP et l'AzoDiGua (Figure 5.20).

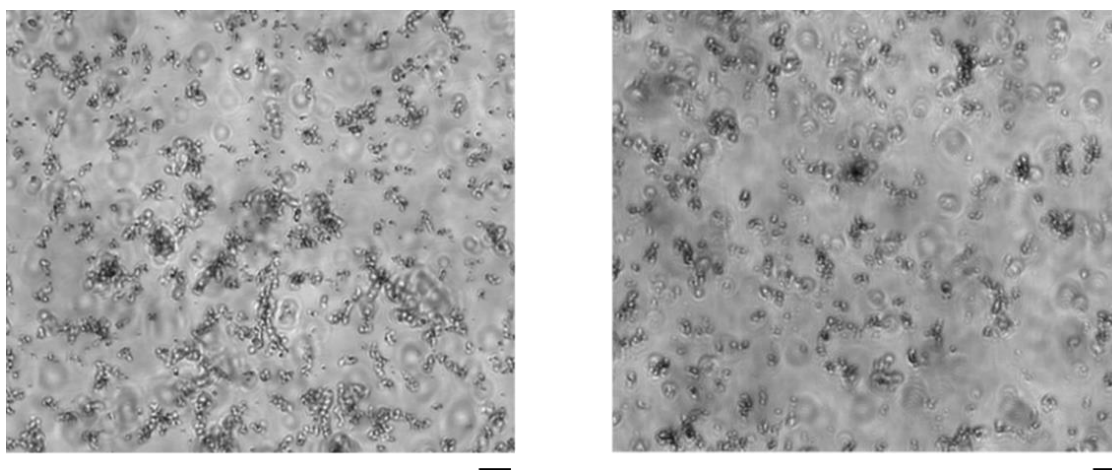


Figure 5.20- Observation au microscope optique des agrégats ATP/AzoDiGua avant (gauche) et après (droite) avoir ajouté 10 U/ μ L de l'enzyme ALP préalablement dénaturée à 90°C (5 μ L d'ALP) .

b) Modulation de la fluorescence des agrégats ATP/AzoDiGua

L'effet de l'ALP sur la fluorescence du coassemblage ATP/AzoDiGua a été étudié. Lorsque l'ALP est ajoutée au mélange ATP/AzoDiGua, la fluorescence des agrégats diminue progressivement. Après une dizaine de minutes, la fluorescence du coassemblage ATP/AzoDiGua atteint la même valeur de fluorescence que l'AzoDiGua libre. Ceci prouve que l'AzoDiGua est libre en solution et n'est plus assemblé avec l'ATP, à l'origine de la fluorescence induite par agrégation (Figure 5.21). Ainsi, l'ALP est capable, en une dizaine de minutes, de désassembler les agrégats d'ATP et d'AzoDiGua en solution à température ambiante et par conséquent contrôler la fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua.

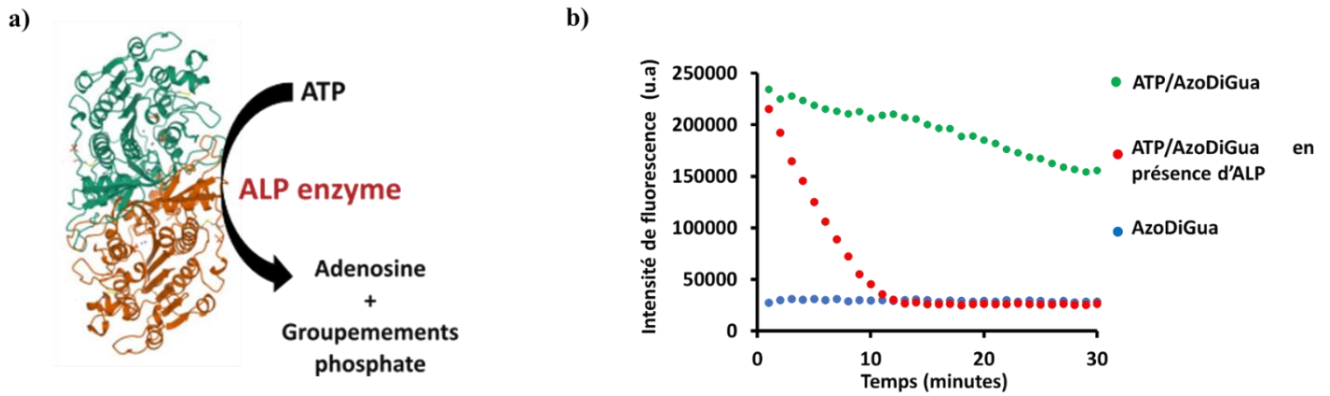


Figure 5.21- a) Représentation schématique de l'hydrolyse de l'ATP en présence de l'enzyme ALP. b) Evolution de l'intensité de fluorescence à 650 nm (excitation 400 nm) de l'AzoDiGua seul, du coassemblage ATP/AzoDiGua en absence ou en présence de 10 U/ μ L d'ALP (5 μ L d'ALP).

Afin de comparer cette cinétique de dégradation enzymatique à d'autres systèmes modèles, l'hydrolyse enzymatique du DDAO phosphate (9H-(1,3-Dichloro-9,9-diméthylacridin-2-one-7-yl) phosphate) par l'ALP a été étudiée. L'hydrolyse du DDAO phosphate (Figure 5.22.a) clive la liaison O-P pour former la molécule de DDAO (7-hydroxy-9H-(1,3-dichloro-9,9-diméthylacridin-2-one) (Figure 5.22.b) qui est fluorescente. Ainsi, nous avons utilisé la molécule de DDAO phosphate pour mimer le clivage des groupements phosphate de l'ATP et comparer sa cinétique d'hydrolyse à celle de l'ATP assemblée avec l'AzoDiGua. Après ajout d'ALP, la fluorescence augmente jusqu'à devenir stable au bout de 6 minutes (Figure 5.22.b). Cette fluorescence correspond à celle de la molécule de DDAO obtenue après hydrolyse totale du groupement phosphate. La cinétique de dégradation enzymatique des agrégats ATP/AzoDiGua est ainsi comparable à la dégradation d'une molécule seule non assemblée avec une autre molécule.

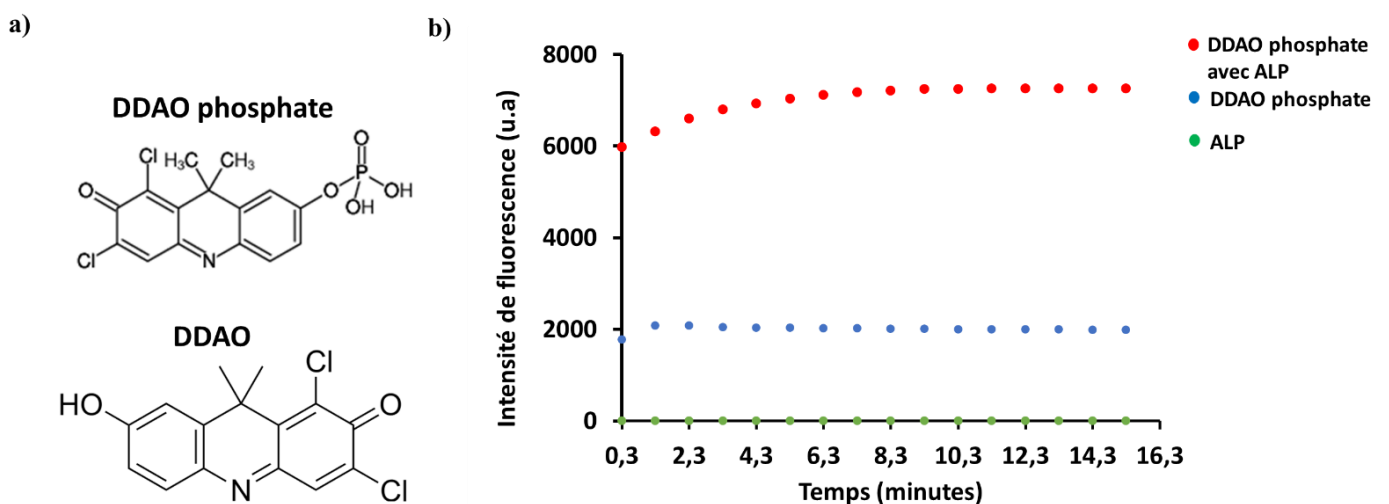


Figure 5.22-a) Structure moléculaire des molécules de DDAO et DDAO phosphate b) Intensité de fluorescence en fonction du temps du DDAO phosphate en présence d'ALP (5 μ L, 10 U/ μ L) dans le DMF ([DDAO]=50 μ M, (Excitation : 590 nm, Emission : 690 nm).

4) Conclusions et introduction à la réponse à la complexation hôte-invité

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet de différents stimuli, chimique, physique et biologique, sur l'assemblage supra-moléculaire en solution entre l'ATP et l'AzoDiGua afin de développer un co-assemblage multi-stimuli répondant.

Nous avons tout d'abord montré que la lumière était capable de contrôler réversiblement l'auto-assemblage supramoléculaire entre l'ATP et l'AzoDiGua par photoisomérisation de l'azobenzène. Lorsque l'AzoDiGua *trans* s'isomérisé sous l'action de la lumière UV en AzoDiGua *cis*, les interactions entre le dérivé d'azobenzène et l'ATP ne sont plus favorables (changement de géométrie, perte de planéité et augmentation de la polarité de l'AzoDiGua) et les agrégats ATP/AzoDiGua se désassemblent. Lorsque le milieu est réirradié avec de la lumière bleue, l'AzoDiGua *cis* se photoisomérisé en AzoDiGua *trans* et les agrégats se reforment. Cet auto-assemblage supramoléculaire réversible en solution de l'ATP et l'AzoDiGua nous a permis de contrôler réversiblement la fluorescence par la lumière. A notre connaissance, il s'agit du premier auto-assemblage supramoléculaire photostimulable et réversible impliquant des molécules d'ATP non modifiées de manière covalente. Puis, nous avons exploité les propriétés chélatantes de l'ATP afin de contrôler le désassemblage dynamique des structures supramoléculaires ATP/AzoDiGua par l'ajout d'ions métalliques. De manière très intéressante, ce système est sélectif vis-à-vis de la valence, les cations divalents provoquant le désassemblage et les monovalents restant sans effet. Nous avons vu que lorsque des ions cuivre en excès sont ajoutés au milieu réactionnel, les agrégats se dissocient et la fluorescence induite par agrégation est rompue. Des études par résonance paramagnétique électronique nous ont permis de montrer que c'est bien la complexation du cuivre avec les molécules d'ATP qui provoque le désassemblage des structures AzoDiGua/ATP et la diminution de fluorescence. Par ajout d'un excès d'ATP, les agrégats ATP/AzoDiGua peuvent ensuite se reformer. Les structures supramoléculaires AzoDiGua/ATP apparaissent donc non seulement comme très dynamiques et pouvant être contrôlées par l'ajout d'ions métalliques mais aussi, grâce à leurs propriétés de fluorescence dans l'état assemblé seulement, permettent de concevoir un principe intéressant de détection d'ions métalliques par fluorescence qui est également sensible à la valence. Enfin, nous avons utilisé l'ATP comme un substrat enzymatique pour désassembler les agrégats ATP/AzoDiGua par une enzyme phosphatase qui se traduit également par un contrôle enzymatique de la fluorescence. Ainsi, les assemblages ATP/AzoDiGua constituent un système nouveau dynamique et multi-stimuli-répondants dont la fluorescence induite par agrégation a pu être contrôlée par la lumière, la chélation ou encore une enzyme. Tous ces résultats montrent non seulement la variété des propriétés dynamiques obtenues avec ce système particulier, mais mettent également en lumière l'intérêt d'utiliser un intercalant photosensible comme brique de co-assemblage de molécules biologiques d'intérêt, ici l'ATP, pour contrôler dynamiquement ces dernières (notamment par la lumière) sans avoir besoin de les modifier de manière covalente.

Un dernier stimulus a été étudié et a consisté à exploiter les propriétés de complexation hôte-invité de l'AzoDiGua. Pour ce faire, nous avons développé un système host-guest combinant l'AzoDiGua et une cavité organique, appelée cyclodextrine. Nous avons utilisé ce complexe d'inclusion pour piloter les propriétés d'intercalation de l'AzoDiGua mais également ses propriétés d'assemblage avec l'ATP. Ces résultats sont présentés dans la partie C de ce manuscrit.

Conclusion de la partie B

Au cours de ce travail, nous avons exploité un tout nouveau concept initié par notre équipe visant à combiner des intercalants d'ADN avec des dérivés d'ADN afin de développer des assemblages dynamiques et stimulables. Nous nous sommes intéressés d'une part à un intercalant d'ADN photosensible, l'AzoDiGua, possédant des propriétés de photo-isomérisation réversible et de fluorescence induite par agrégation et d'autre part, à un nucléotide, l'ATP, possédant un rôle crucial dans de nombreux procédés biologiques.

Nous avons montré que l'ATP et l'AzoDiGua étaient capables de s'autoassembler en solution sous la forme d'agrégats supramoléculaires micrométriques. Ces agrégats sont en suspension en solution, s'agrègent progressivement à l'échelle de la minute et provoquent une turbidité instantanée de la solution. Cette reconnaissance spontanée provient des interactions électrostatiques attractives entre les groupements guanidinium de l'AzoDiGua et les groupements phosphate de l'ATP ainsi que les interactions π entre la partie aromatique de l'AzoDiGua et de l'ATP. Les agrégats ATP/AzoDiGua présentent une large émission de fluorescence entre 500 et 800 nm, alors que leurs briques individuelles (ATP seul et AzoDiGua seul) ne sont pas fluorescentes. Cette propriété provient de la fluorescence induite par l'agrégation de l'AzoDiGua au sein du co-assemblage. Ainsi, ce système présente la caractéristique d'être fluorescent uniquement dans son état auto-assemblé.

Nous avons ensuite caractérisé la réponse de ce co-assemblage à différents stimuli en solution tirant profit des propriétés physico-chimiques intrinsèques de l'ATP et de l'AzoDiGua. Grâce aux propriétés de photo-isomérisation réversible de l'AzoDiGua, nous avons été capable de contrôler réversiblement par la lumière l'assemblage en solution entre l'ATP et l'AzoDiGua ainsi que la fluorescence des agrégats ATP/AzoDiGua. Puis, en exploitant les propriétés de chélation de l'ATP, nous avons pu mettre en évidence la capacité des ions Cu^{2+} à induire un désassemblage des agrégats ATP/AzoDiGua et ainsi de contrôler par le ratio $[\text{Cu}^{2+}] : [\text{ATP}]$ la fluorescence du co-assemblage ATP/AzoDiGua en solution. Enfin, nous avons exploré la capacité d'utiliser une enzyme comme un stimulus. L'alkaline phosphatase s'est ainsi avérée capable d'induire un désassemblage des agrégats ATP/AzoDiGua par hydrolyse de l'ATP et de contrôler la fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua à l'origine des propriétés de fluorescence du co-assemblage ATP/AzoDiGua. Ce système constitue un des rares systèmes auto-assemblés à base d'ATP fluorescents et multi-stimulables. Cette stratégie pourrait être étendue à d'autres types de nucléotides ou d'intercalants d'ADN photosensibles.

Article en préparation : “ATP/Azobenzene-guanidinium self-assembly into fluorescent and multi stimuli-responsive supramolecular aggregates”, O.Abodja, N.Touati, M.Morel, S.Rudiuk, D.Baigl*

PARTIE C

Intercalant d'ADN photosensible/cyclodextrine : des pseudo-rotaxanes photodynamiques au contrôle de propriétés variées d'intercalants d'ADN

Dans la partie précédente, nous avons vu comment un intercalant photosensible de l'ADN, appelé AzoDiGua, en présence d'un nouveau partenaire d'intérêt biologique, l'ATP, permettait de construire des structures auto-assemblées dynamiques, répondant à de nombreux stimuli, notamment la lumière. Dans cette partie, nous souhaitons explorer un nouveau principe d'actuation de l'AzoDiGua afin d'augmenter les possibilités de contrôle dynamique de cette molécule intéressante pour contrôler aussi bien l'hybridation de l'ADN (intercalation photosensible) que la construction d'auto-assemblages supramoléculaires comme vus dans la partie précédente. Notre stratégie a consisté à se baser sur les principes de la chimie hôte-invité, en mettant en interaction l'AzoDiGua avec une α -cyclodextrine. Nous montrons que ceci conduit à la formation d'un nouveau pseudo-rotaxane photodynamique constitué de l'AzoDiGua inclus dans la cavité de l' α -cyclodextrine. Ce complexe d'inclusion a été utilisé pour contrôler à l'échelle supramoléculaire les propriétés d'intercalation dans l'ADN et les propriétés de fusion et d'hybridation de l'ADN ainsi que la fluorescence et le contrôle du coassemblage avec l'ATP. Tous ces résultats montrent l'obtention de nouvelles propriétés dynamiques stimulés par l'inclusion de l'AzoDiGua dans une cyclodextrine.

Plan :

Chapitre C.1 : Complexe d'inclusion Azobenzène/Cyclodextrine photosensibles et en interaction avec l'ADN.....125

Chapitre C.2 : Complexe d'inclusion de type pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -Cyclodextrine photosensible : Synthèse et caractérisation.....137

Chapitre C.3 Complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -Cyclodextrine : vers des propriétés dynamiques d'assemblage et melting d'ADN.....155

CHAPITRE C.1- Complexes d'inclusion Azobenzène/Cyclodextrine photosensibles et en interaction avec l'ADN

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques ayant la forme d'une petite cavité hydrophobe à la surface hydrophile. Ainsi, ces molécules amphiphiles ont été largement utilisées pour développer des complexes hôte-invité à reconnaissance moléculaire spécifique. Les systèmes à base de pseudo-rotaxanes formés entre une cyclodextrine et un dérivé d'azobenzène ont été étudiés afin de développer des systèmes fonctionnels photostimulables. Après avoir présenté la chimie des cyclodextrines, nous nous intéresserons aux travaux effectués sur des systèmes supramoléculaires photosensibles à base de cyclodextrines encapsulant un azobenzène. Enfin, nous exposerons les travaux effectués pour contrôler certaines propriétés de l'ADN par des systèmes formés de cyclodextrines et exposerons la stratégie et les objectifs du travail de thèse.

Plan :

1) Systèmes supramoléculaires à base de cyclodextrines.....	127
a) Présentation.....	127
b) Systèmes hôte-invité.....	127
α) Propriétés structurales des cyclodextrines.....	127
β) Complexes d'inclusion cyclodextrine/molécule hydrophobe.....	127
2) Systèmes host-guest photosensibles à base de cyclodextrines.....	129
a) Systèmes hôte-invité Azobenzène/Cyclodextrine.....	129
b) Machines moléculaires Azobenzène/Cyclodextrine photosensibles.....	130
α) Propriétés mécaniques.....	130
β) Propriétés biologiques.....	131
γ) Propriétés optiques.....	132
3) Cyclodextrines et ADN.....	133
a) Compaction d'ADN.....	133
b) Positionnement du travail de thèse : vers l'intercalation et l'assemblage d'ADN contrôlés par des cyclodextrines.....	134
α) Stratégie.....	134
β) Objectif.....	135

1) Systèmes supramoléculaires à base de cyclodextrines

a) Présentation

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques et chiraux. Il s'agit de polymères cycliques dont l'unité de base est le D-glucopyranose (glucose) chacune liée par une liaison glycosidique α -1,4. Ces polymères sont des substances synthétiques qui ont été découvertes par le chimiste Antoine Villiers et qui peuvent être synthétisées par dégradation enzymatique de l'amidon. Elles ont vu leurs premières applications dans les années 1980 dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire. Les CD sont classées en trois grandes catégories différant par le nombre de cycles de glucose dont elles sont constituées et le diamètre du macrocycle : les α -CD (6 unités), les β -CD (7 unités) et les γ -CD (8 unités) (Figure 6.1) ^{122,123}.

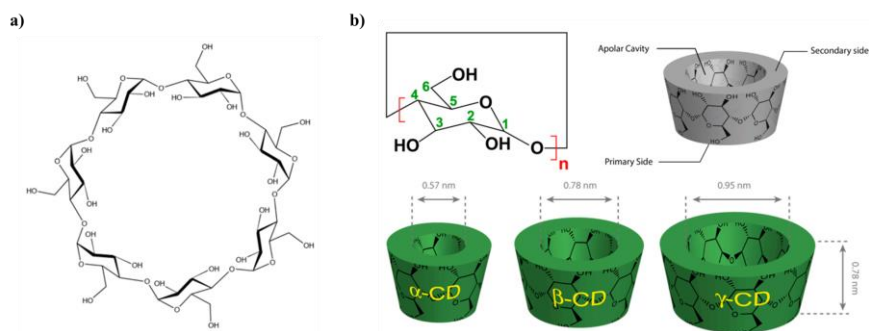


Figure 6.1-a) Structure moléculaire d'une cyclodextrine β ¹²³. **b)** Classes et taille des catégories de cyclodextrines α, β, γ ¹²².

b) Systèmes hôte-invité

α) Propriétés structurales des cyclodextrines

Les cyclodextrines, de par leur structure spécifique, ont été largement utilisées comme molécules hôtes afin de développer des systèmes *host-guest* ayant des applications dans des domaines allant de la biologie aux matériaux. La structure macrocyclique des cyclodextrines est stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires entre les groupements hydroxyle en position C2 et C3 d'unités de glucose adjacentes. Ces molécules sont chirales, de par la présence de 5 carbones asymétriques sur le D-glucopyranose permettant de faire de la reconnaissance moléculaire chirale¹²⁴. De même, les cyclodextrines sont des molécules amphiphiles. En effet, elles sont constituées d'une cavité hydrophobe, essentiellement organique, et d'une surface hydrophile formée par les groupements hydroxyle du glucose. Ce caractère amphiphile a permis aux chimistes d'utiliser cette cavité comme une molécule hôte pour former des complexes d'inclusion hôte-invité avec une large gamme de molécules hydrophobes ¹²⁵.

β) Complexes d'inclusion cyclodextrine/molécule hydrophobe

La formation d'un complexe d'inclusion entre une molécule invitée hydrophobe D et la cyclodextrine hôte CD résulte d'un équilibre d'association et de dissociation caractérisée par une constante d'équilibre thermodynamique K qui sera d'autant plus élevée que l'inclusion est favorable thermodynamiquement et une

stœchiométrie CD : D bien précise La stœchiométrie 1 : 1 est la configuration la plus fréquente mais d'autres, telles que 2 : 1, 2 : 2 ou 1 : 2 peuvent être mises en évidence (Figure 6.2.a).



$$K_{1:1} = \frac{[CD \cdot D]}{[CD][D]}$$

A l'échelle microscopique, la première force motrice de la formation du complexe est d'origine entropique et provient de l'effet hydrophobe. Lorsque le complexe n'est pas formé, l'invité hydrophobe est très mal solvate par les molécules d'eau et l'interaction entre la cavité de la cyclodextrine et l'eau solvant est très peu favorable. Ainsi, lorsque la molécule invitée rentre dans la cyclodextrine, les molécules d'eau présentes au sein de la cavité hydrophobe sont expulsées de cette dernière afin de permettre la complexation de la molécule apolaire (Figure 6.2.c). Le réseau de liaisons hydrogène autour de la molécule invitée est rompu et les molécules adoptent une configuration maximisant leur entropie finale. Ainsi, d'un point de vue énergétique, la différence d'énergie $\Delta E = E_{CD:D} - (E_{CD} + E_D)$ est négative ce qui est énergétiquement favorable¹²⁵. La deuxième force motrice de la formation du complexe est les interactions de Van der Waals. En effet, la cyclodextrine a un moment dipolaire orienté du disque secondaire au disque primaire. Lorsque la molécule invitée hydrophobe entre dans la cavité, elle s'oriente de façon à ce que son moment dipolaire soit de direction opposée à celui de la cyclodextrine (Figure 6.2.b)¹²⁶. Une large gamme de molécules invitées ont été explorées (hydrocarbures, alcools, aromatiques, azobenzènes, ..) dont les constantes d'association varient de 10^2 à 10^6 et dépendent du milieu réactionnel¹²⁷.

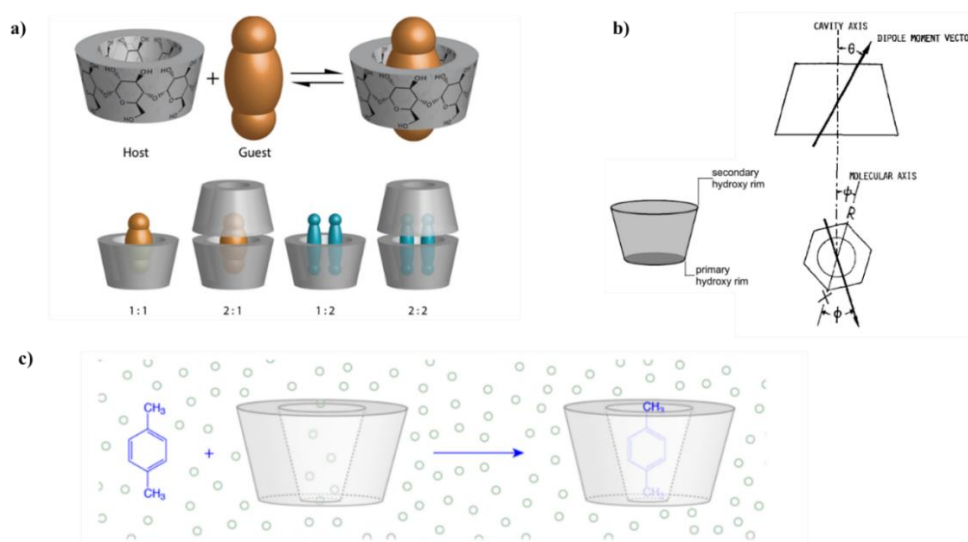


Figure 6.2-a) Représentation schématique d'un complexe hôte-invité avec différentes stœchiométries¹²². **b)** Moment dipolaire de la cyclodextrine CD et d'une molécule invitée^{128,126}. **c)** Représentation schématique de l'effet hydrophobe lors de la complexation du p-xylène avec une cyclodextrine (les ronds bleus représentent les molécules d'eau solvant)^{122,125}.

Les complexes d'inclusion formés par les cyclodextrines trouvent leurs applications dans le domaine de la chimie pharmaceutique ou encore en chimie analytique. Les cyclodextrines peuvent être utilisées pour séparer des constituants d'un mélange lors d'une séparation par chromatographie. La colonne est enrichie en cyclodextrines ayant une affinité pour un des constituants du mélange ce qui permet de les séparer lors de l'éluion par complexation sélective (Figure 6.3.a) ¹²³. De même, les cyclodextrines sont également très utilisées dans le transport de substances actives hydrophobes. La cavité hydrophobe complexe ainsi la molécule et la transporte en milieu aqueux pour la libérer dans les cellules adéquates (Figure 6.3.b) ^{129,130,131}.

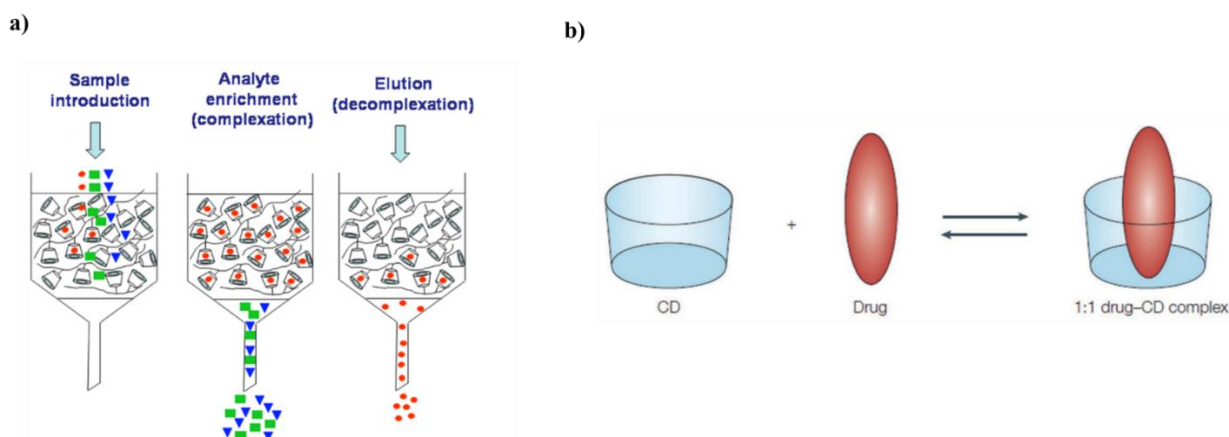


Figure 6.3-a) Séparation de constituants d'un mélange par chromatographie sur colonne composée de cyclodextrines¹²³

b.) Encapsulation de substances biologiques hydrophobes par des cyclodextrines pour le transport en milieu cellulaire¹³¹.

2) Systèmes host-guest photosensibles

Les cyclodextrines constituent d'excellentes plateformes pour fabriquer des systèmes photosensibles dont les propriétés (optiques, mécaniques, biologiques) peuvent être dynamiquement contrôlées par la lumière.

a) Système hôte-invité Azobenzène/Cyclodextrine

Les azobenzènes ont été largement explorés pour leur capacité à former des complexes d'inclusion avec des cyclodextrines^{132,133,134,135,136}. Leur capacité à s'isomériser rapidement sous l'action d'un rayonnement a permis de développer des systèmes host-guest photocontrôlés. L'azobenzène *trans*, apolaire et moins contraint stériquement, a une constante thermodynamique d'association avec l' α -CD K_a beaucoup plus élevée ($K_a=2000 \text{ M}^{-1}$) que l'azobenzène de conformation *cis*, davantage polaire et plus contraint stériquement ($K_a=35 \text{ M}^{-1}$). Ainsi, l'équilibre d'inclusion est davantage favorisé pour l'azobenzène *trans* que le *cis* ce qui a permis aux scientifiques de développer des systèmes intelligents permettant de réguler leurs fonctions grâce à la lumière.

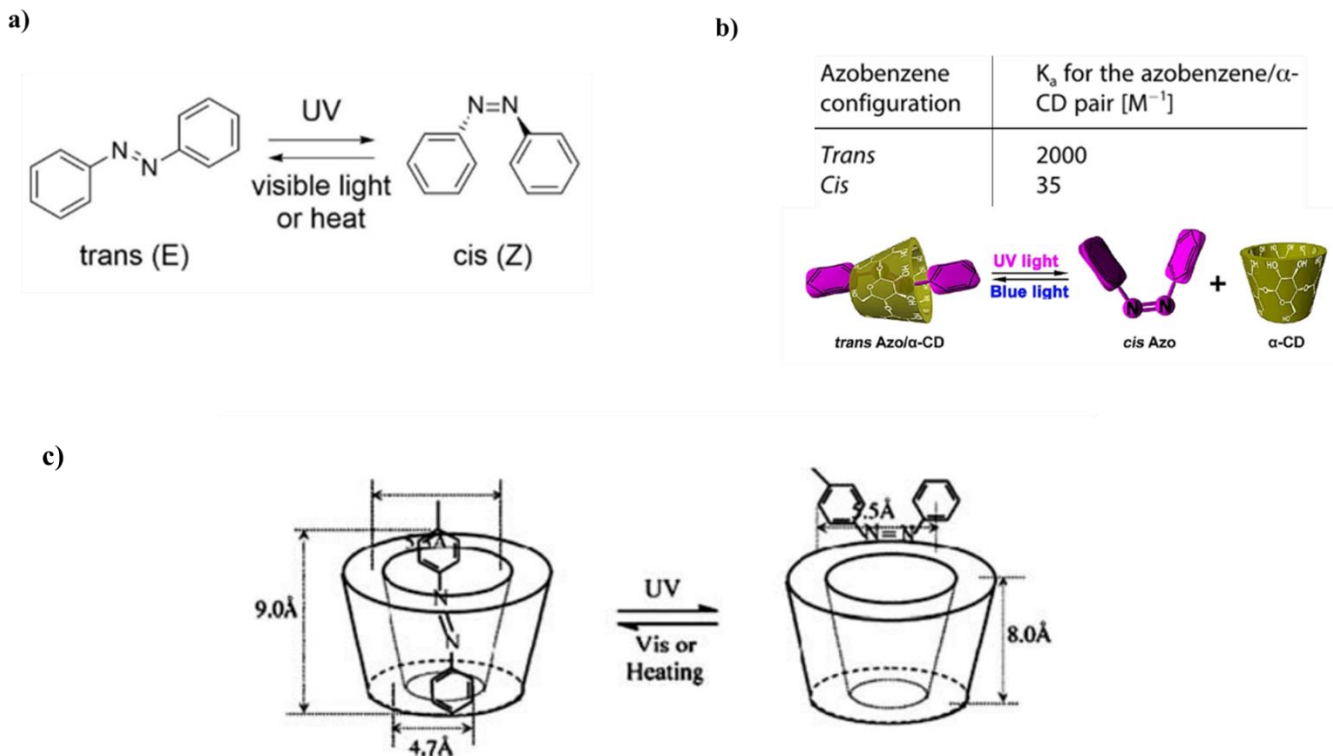


Figure 6.4-a) Principe de photoisomérisation de l'azobenzène¹³³. **b)** Schéma de l'inclusion photocontrôlée de l'azobenzène dans une α -cyclodextrine^{133,137}. **c)** Dimensions moléculaires d'un dérivé d'azobenzène comparées à celles d'une α -cyclodextrine¹³⁸.

b) Machines moléculaires Azobenzène/Cyclodextrine photosensibles

Une série de machines moléculaires photostimulables combinant des azobenzènes et des cyclodextrines a ainsi été développée pour contrôler certaines propriétés telles que le mouvement mécanique, le relargage de molécules biologiques ou encore l'émission de lumière par fluorescence.

α) Propriétés mécaniques

Le photocontrôle de la conformation des azobenzènes a permis aux chimistes de développer des machines moléculaires capables d'effectuer un mouvement mécanique sous l'action de la lumière. Le mouvement de contraction et décontraction des filaments de myosine et d'actine a inspiré de nombreux travaux de recherche cherchant à mimer leur mouvement mécanique afin de fabriquer des muscles artificiels capables d'agir réversiblement sous l'action de la lumière¹³⁹. Pour ce faire, certains chimistes ont développé des rotaxanes de type [c2]-daisy chain capable de bouger sous l'action de différents stimuli (pH, lumière, oxydoréduction, etc) d'une forme contractée à une forme étendue (Figure 6.5.a). Par exemple, en 2017, l'équipe de Giuseppone développe une [c2]-daisy chain polymérique dont le mouvement mécanique est contrôlé par le pH (Figure 6.5.b)¹³⁹. Les scientifiques ont été aussi intéressés par le développement de rotaxanes [c2]-daisy chain mécaniquement contrôlés par la lumière¹³⁴. Ainsi l'équipe d'Harada développe un rotaxane de type [c2]-daisy chain à base d' α -cyclodextrines et de dérivés d'azobenzène (Figure 6.5.c et d)¹⁴⁰. Dans ce travail, les auteurs

ont pu contrôler l'arrangement supramoléculaire de l'azobenzène et de la cyclodextrine le long de l'axe du rotaxane par photoisomérisation de l'azobenzène mimant le mouvement d'un muscle. Lorsque l'azobenzène *trans* se photoisomérisé en *cis*, ce dernier ne se complexe plus à la cyclodextrine provoquant un déplacement de la cavité de l' α -CD le long de l'axe moléculaire et la contraction de la structure. Le rotaxane retrouve son état étiré lors de la photoisomérisation l'azobenzène *cis* en *trans*.

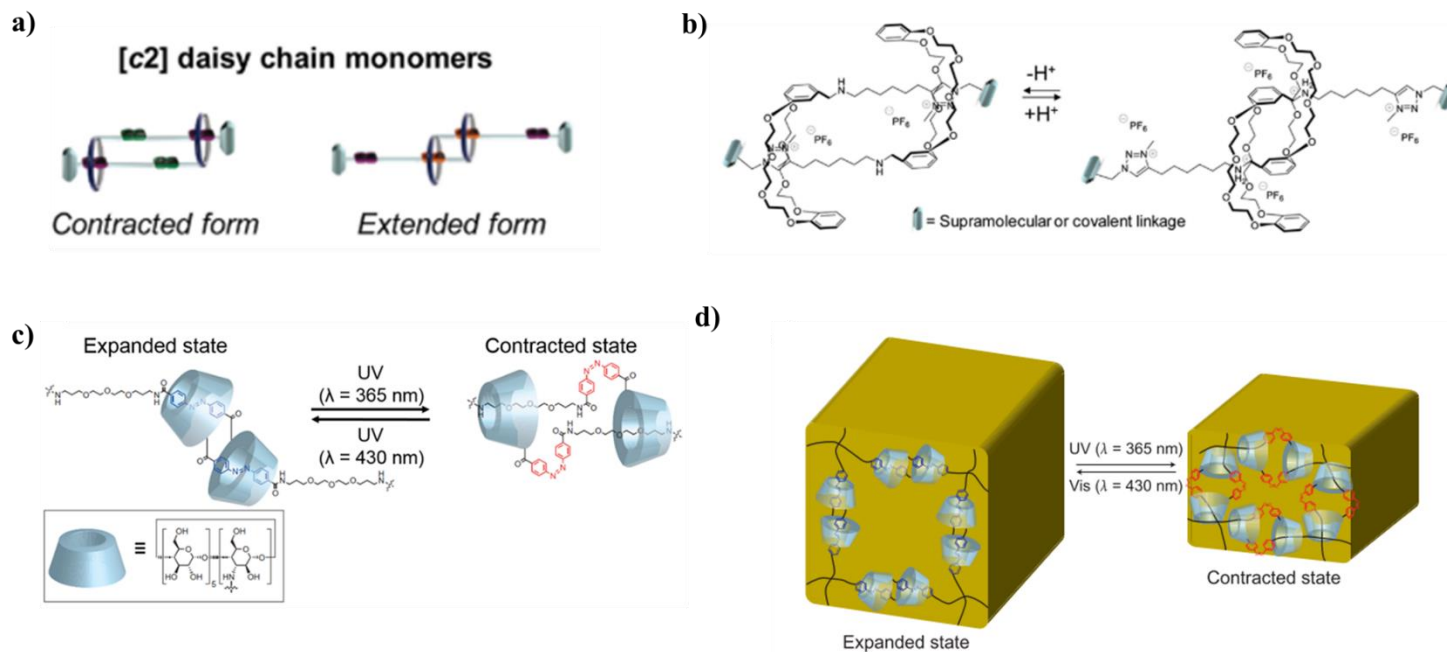


Figure 6.5-a) Représentation schématique de la forme contractée et étendue de monomères de [c2] daisy chain ¹³⁹ .**b)** Exemple de [c2] daisy chain dont le mouvement est contrôlé par le pH ¹³⁹ . **c)** Structure supramoléculaire et photoisomérisation d'une [c2] daisy chain à base d' α -CD et d'un dérivé d'azobenzène ¹⁴⁰ .**d)** Contraction et étirement photochimique d'un hydrogel d'une [c2] daisy chain à base d' α -CD et d'un dérivé d'azobenzène¹⁴⁰.

β) Propriétés biologiques

Certains travaux scientifiques se sont intéressés à la synthèse de polyrotaxanes hydrogels photosensibles pour le relargage contrôlé de molécules biologiques. Une diversité de systèmes photocontrôlés de cette nature formés par inclusion de polymères d'azobenzène dans la cavité hydrophobe de cyclodextrines a été étudiée ^{141,142}. En 2015, l'équipe de Wu développe un polyrotaxane hydrogels capable de s'assembler en présence d'un dérivé polymérique d'azobenzène *trans* s'incluant au sein de β -cyclodextrines¹⁴³. Les auteurs ont été capables d'effectuer une transition réversible sol-gel en photoisomérisant le dérivé d'azobenzène *trans* en *cis*. Le dérivé *cis* et la β -CD, ne se complexant pas, ne forment pas de gel et restent en solution sous forme libres (Figure 6.6.a). Cet hydrogel photosensible a été utilisé pour le relargage de l'albumine, protéine principale du plasma sanguin. Pour ce faire, l'hydrogel a été chargé en protéines d'albumine qui s'incluent entre les chaînes de polymères. Lorsque l'azobenzène *trans* se photoisomérisé en *cis*, l'hydrogel se dissocie libérant instantanément la protéine (Figure 6.6.b).

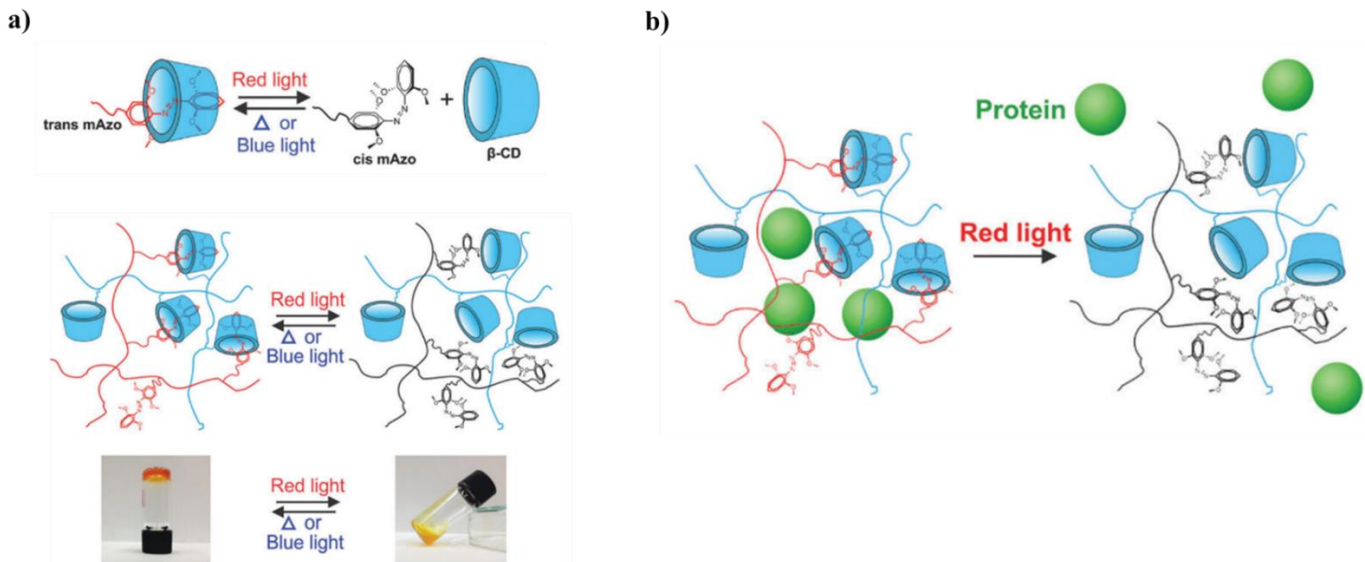


Figure 6.6-a) Représentation schématique de la transition photoréversible sol-gel d'un hydrogel polyrotaxane formé par un polymère de dérivé d'azobenzène et d'une β -cyclodextrine fonctionnalisée¹⁴⁴. **b)** Relargage photocontrôlé de la protéine albumine par photoisomérisation du dérivé d'azobenzène au sein de l'hydrogel¹⁴³.

γ) Propriétés optiques

Les cyclodextrines ont également été utilisées comme des cavités capables de contrôler réversiblement la phosphorescence ou fluorescence de certains composés chimiques par irradiation lumineuse afin de développer des petits interrupteurs moléculaires de lumière¹⁴⁴. La première stratégie a été de s'appuyer sur la reconnaissance moléculaire compétitive d'une cyclodextrine entre deux molécules invitées. Ainsi, en 2011, l'équipe de Tian réussit à contrôler de manière réversible la phosphorescence à température ambiante d'un dérivé bromé de naphthalène¹⁴⁵. Pour ce faire, les auteurs forment un complexe d'inclusion entre un dérivé d'azobenzène *trans* et une β -cyclodextrine dont la constante d'association est bien plus grande que celle entre le dérivé bromé de naphthalène et la β -cyclodextrine (Figure 6.7.a). Ainsi, par irradiation UV, l'azobenzène *cis* se forme permettant au dérivé de naphthalène de se complexer avec la β -cyclodextrine, la forme *cis* ayant peu d'affinité avec la cavité hydrophobe. En irradiant par de la lumière bleue, l'effet inverse se produit. Ainsi, les auteurs ont été capables de contrôler la phosphorescence induite par la complexation entre le dérivé de naphthalène et la cyclodextrine grâce à l'irradiation lumineuse (Figure 6.7.a). La formation du pseudo-rotaxane entre le dérivé bromé de naphthalène et la β -cyclodextrine provoque une phosphorescence à température ambiante que les auteurs ont été capables de contrôler réversiblement par la photoisomérisation du dérivé d'azobenzène. Les cyclodextrines ont de même été utilisées comme briques de construction d'édifices supramoléculaires dont la fluorescence a pu être contrôlée photochimiquement. En 2020, l'équipe de Zhang développe un hydrogel formé par un polymère de cyclodextrine fonctionnalisé par une unité tétraphényléthylène et un polymère d'azobenzène également fonctionnalisé par la même unité¹⁴⁶. Lorsque l'hydrogel se forme par inclusion de l'azobenzène dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine, les unités de tétraphényléthylène s'agrègent par interaction π provoquant une émission de fluorescence induite par

agrégation. Ainsi lorsque l'azobenzène se photoisomérise, le pseudo-rotaxane se dissocie privant le tétraphényléthène de s'agréger et de fluorescer (Figure 6.7.b). Ainsi, les auteurs ont ainsi été capables de fabriquer un petit interrupteur moléculaire formé par un hydrogel fluorescent photostimulable.

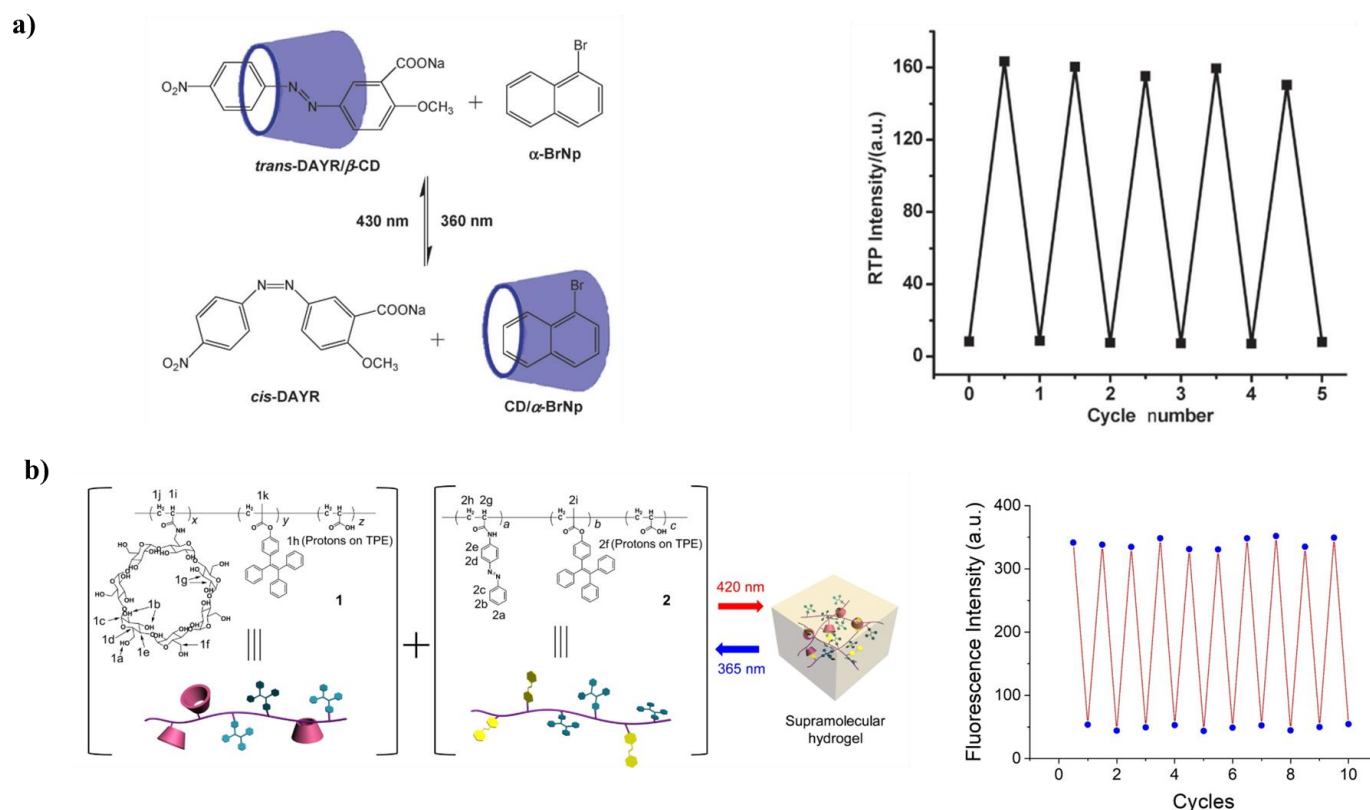


Figure 6.7-a) Photocontrôle de la phosphorescence à température ambiante d'un dérivé de naphthalène par formation sélective d'un pseudo-rotaxane ¹⁴⁵. **b)** Fluorescence photocontrôlée d'un hydrogel de cyclodextrine/azobenzène par agrégation photoinduite d'un dérivé de tétraphényléthène ¹⁴⁶.

3) Cyclodextrines et ADN

a) Compaction d'ADN

L'interaction entre des cyclodextrines fonctionnalisées par des groupements cationiques et l'ADN a été largement étudiée pour contrôler des propriétés de compaction de l'ADN ou encore d'autoassemblage supramoléculaire ^{147,148,149,150,151,152,153,154}. La compaction et décompaction de l'ADN a largement été étudiée avec des surfactants polycationiques ¹⁵⁵. Ainsi, certains auteurs ont utilisé la propriété de complexation des cyclodextrines pour contrôler l'état de compaction de l'ADN ^{156,157}. L'agent de compaction doit avoir une concentration micellaire critique bien supérieure à la concentration critique d'association avec l'ADN. Par exemple, en 2008, l'équipe de Lindmann compacte l'ADN avec un tensioactif cationique CTAB (Figure 6.8.a) ¹⁴⁸. En ajoutant une β-cyclodextrine, un complexe d'inclusion se forme entre le surfactant et la cavité hydrophobe permettant de décompacter l'ADN. Certains auteurs se sont également intéressés à la propriété de compaction de l'ADN par des assemblages de cyclodextrines. En 2018, l'équipe de Sollogoub et Bouteiller, en collaboration avec notre équipe, fonctionnalise une β-cyclodextrine avec de l'adamantane et des

ammoniums empêchant la dimérisation des cyclodextrines mais permettant une polymérisation supramoléculaire (Figure 6.8.b)¹⁵⁸. Les auteurs ont ainsi montré que ce polymère supramoléculaire cationique de cyclodextrines était capable de compacter l'ADN.

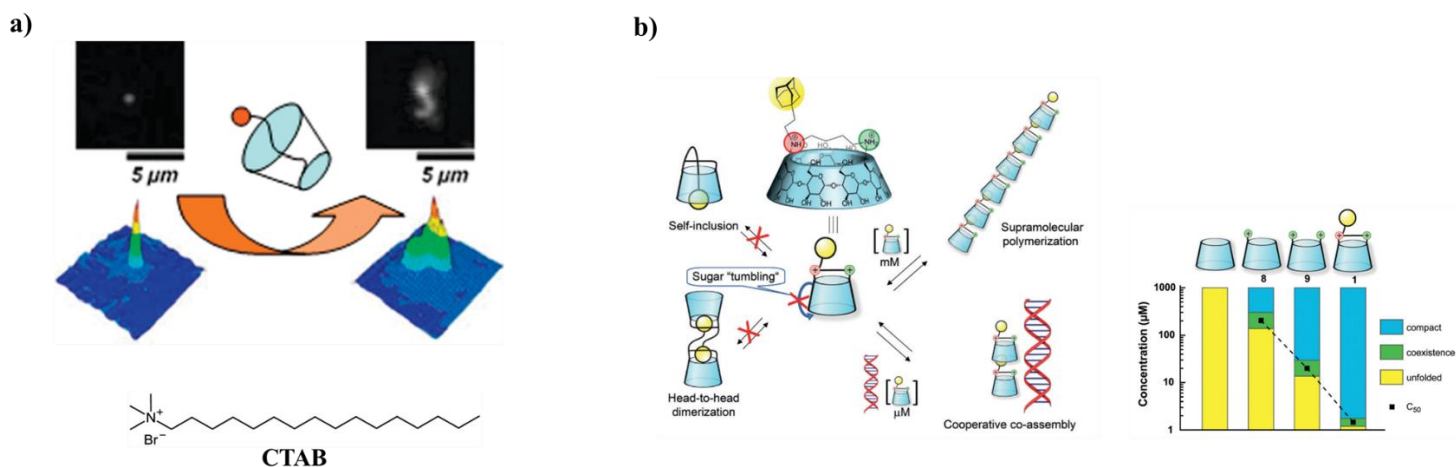


Figure 6.8- a) Décompaction contrôlée par complexation du surfactant CTAB par une β -cyclodextrine. Adapté de la référence¹⁴⁸. b) Compaction de l'ADN par un polymère de cyclodextrines fonctionnalisées¹⁵⁸.

b) Positionnement du travail de thèse : vers l'intercalation et l'assemblage d'ADN contrôlés par des cyclodextrines

Si la compaction ou décompaction d'ADN assistée par des cyclodextrines a été étudiée, à notre connaissance, les propriétés d'assemblage d'ADN ou dérivés d'ADN basées sur l'intercalation et dynamiquement contrôlées par des cyclodextrines, n'ont pas été explorées.

α) Stratégie

Les pseudo-rotaxanes formés de cyclodextrines et de molécules amphiphiles bolaformes fonctionnalisées par deux pseudo-stoppers ont été explorés dans certains travaux scientifiques¹⁵⁹. Récemment en 2021, l'équipe de recherche de Sollogoub a développé un pseudo-rotaxane contrôlable par le pH formé d'une α -cyclodextrine fonctionnalisée par des groupements amine et d'une chaîne carbonée linéaire possédant à chaque extrémité un groupe ammonium chargé positivement (Figure 6.10)¹⁶⁰. A pH basique, les groupements amine à la surface de l' α -cyclodextrine sont neutres. Ainsi, la molécule linéaire peut s'inclure dans la cavité de l' α -cyclodextrine pour former un pseudo-rotaxane. Lorsque le pH du milieu devient acide, les groupements amine à la surface de l' α -cyclodextrine sont chargés positivement. Ainsi, par répulsion électrostatique entre les ammoniums de l' α -cyclodextrine et ceux de la molécule invitée, cette dernière n'est plus capable de s'inclure dans la cavité de l' α -cyclodextrine et le pseudo-rotaxane se dissocie.

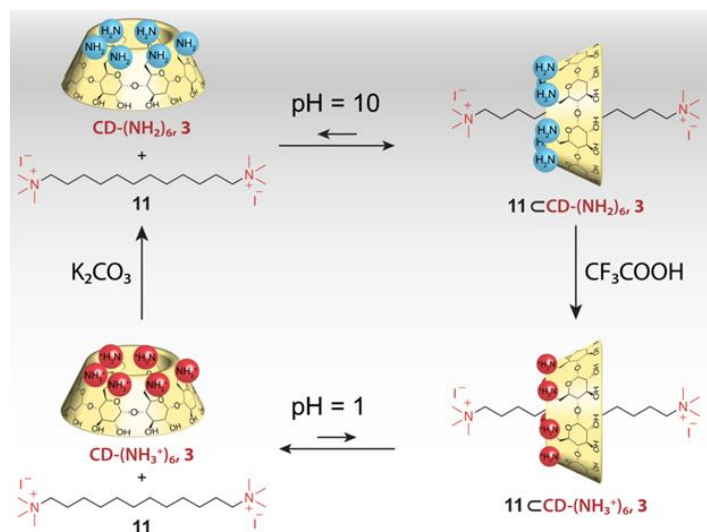


Figure 6.9- Formation et dissociation d'un pseudo-rotaxane contrôlable par le pH¹⁶⁰.

Dans cette partie du travail de thèse, nous nous sommes ainsi intéressés à la caractérisation d'un nouveau type de pseudo-rotaxane formé par l'AzoDiGua, intercalant d'ADN photosensible et bolaforme présenté dans la partie précédente, et une α -cyclodextrine. Nous avons pu ainsi mettre en évidence sa structure, ses propriétés physico-chimiques et sa photoswitchabilité.

β) Objectifs

Ce nouveau pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -CD a été utilisé pour contrôler dynamiquement les propriétés d'assemblage d'ADN et de dérivés d'ADN basées sur l'intercalation. L'objectif est ainsi d'utiliser la cyclodextrine comme un stimulus moléculaire d'assemblage d'ADN ou dérivés d'ADN.

Dans un premier temps, l'objectif de l'étude a été d'utiliser ce pseudo-rotaxane pour contrôler les propriétés d'hybridation/fusion de l'ADN double-brin à température constante en tirant profit des propriétés d'intercalation de l'AzoDiGua. Cet objectif a été préalablement atteint par photocontrôle réversible de la température de fusion de l'ADN en tirant profit des propriétés de photoisomérisation de l'AzoDiGua⁶³. Dans ce travail, nous exploitons les propriétés d'amphiphilie de l'AzoDiGua par formation d'un complexe host-guest avec l' α -cyclodextrine. Ceci constitue une étape-clé et une stratégie utile pour stimuler des procédés biologiques et nanotechnologiques basées sur l'assemblage ou désassemblage de l'ADN double-brin de manière isotherme¹⁶¹. Dans un second temps, nous avons utilisé la cyclodextrine comme un stimulus externe permettant de contrôler les systèmes auto-assemblés AzoDiGua/ATP étudiés dans la partie B de ce manuscrit.

Ces assemblages d'ADN ou dérivés d'ADN dynamiquement contrôlés par une cyclodextrine, agissant comme un stimulus externe, constituent, à notre connaissance, un nouveau concept d'actuation et est détaillé dans les chapitres qui suivent.

CHAPITRE C.2 - Complexe d'inclusion de type pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -Cyclodextrine photosensible : Synthèse et caractérisation

Dans ce chapitre, nous allons décrire la caractérisation d'un nouveau complexe d'inclusion, de type pseudo-rotaxane, formé par l'AzoDiGua, intercalant d'ADN photosensible, et une α -cyclodextrine. Différentes caractérisations structurales et thermodynamiques ont permis de montrer que l'AzoDiGua *trans* s'inclut dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine tandis que la forme *cis* est exclue de la cavité. Le complexe d'inclusion s'est également avéré être fluorescent dû au blocage de la conformation de l'AzoDiGua au sein de la cavité. De même, le pseudo-rotaxane présente une chiralité dû au transfert de chiralité de la cyclodextrine vers l'AzoDiGua. Ainsi, certaines propriétés du pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -cyclodextrine, telles que le transfert de chiralité et la fluorescence, ont pu être photocontrôlées par photoisomérisation de l'AzoDiGua permettant de former et dissocier réversiblement le complexe d'inclusion.

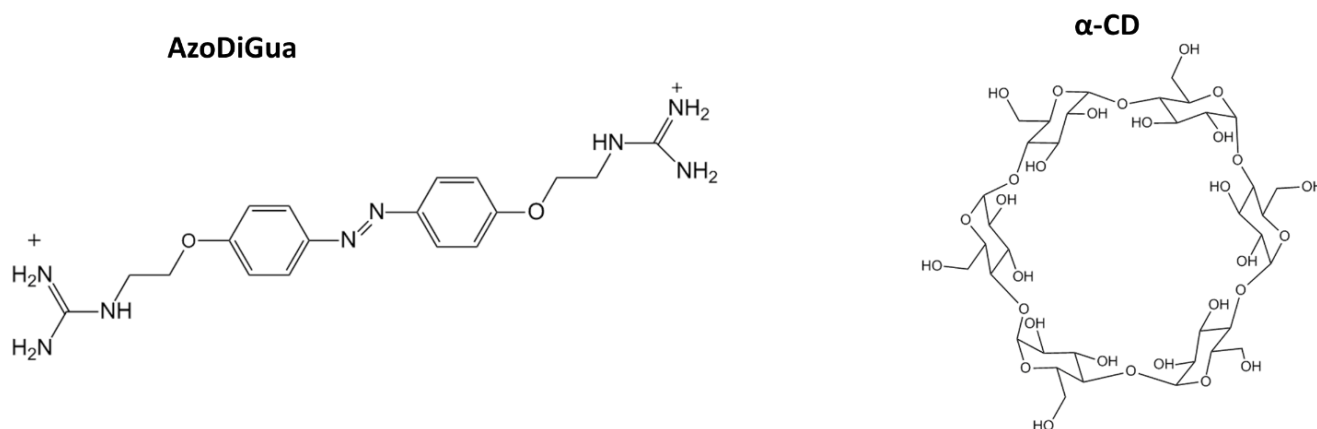
Plan :

1) Etude de l'interaction entre l'AzoDiGua et l'α-cyclodextrine.....	139
a) Caractérisation thermodynamique par ITC.....	139
b) Caractérisation spectroscopique par spectroscopie d'absorption UV-visible.....	140
c) Caractérisation structurale par RMN.....	142
α) Analyse par RMN ^1H 1D.....	142
β) Analyse par RMN ^1H ROESY et DOSY 2D.....	143
2) Etude photodynamique du complexe d'inclusion AzoDiGua/α-CD.....	145
a) Caractérisation par dichroïsme circulaire et spectroscopie UV-visible: transfert de chiralité photocontrôlée.....	145
b) Caractérisation par spectroscopie de fluorescence : fluorescence photocontrôlée.....	150
3) Conclusions.....	152

1) Etude de l'interaction entre l'AzoDiGua et l' α -cyclodextrine

a) Caractérisation thermodynamique par ITC

Afin de sonder une éventuelle interaction entre l'AzoDiGua et l' α -cyclodextrine (α -CD), une étude calorimétrique par ITC (Isothermal titration calorimetry) a été menée dans le but de déterminer la stoechiométrie, la constante de dissociation ainsi que l'enthalpie de liaison entre les deux molécules^{162,163,164,165}. Pour ce faire, l'AzoDiGua a été titré par l' α -CD et la chaleur dégagée a été mesurée au cours du temps (Figure 7.1.a). Le thermogramme est ensuite traité afin de tracer l'aire de chaque pic de chaleur en fonction du ratio molaire [CD] : [AzoDiGua] (Figure 7.1.b). Ce graphique permet ensuite d'avoir accès à l'enthalpie de liaison ΔH , la stoechiométrie n et la constante de dissociation K_d pour le complexe d'inclusion α -CD/AzoDiGua que nous avons comparées au complexe β -CD/AzoDiGua (Figure 7.1.c et d). Ces valeurs sont regroupées dans le Tableau 2 ci-dessous



	K_d (M)	n	ΔH (kJ.mol ⁻¹)
α -CD/AzoDiGua	$5,682.10^{-5}$	0,930	-25,09
β -CD/AzoDiGua	$1,424.10^{-4}$	0,826	-8,004

Tableau 2- Calcul des constantes de dissociation K_d , de la stoechiométrie n et de l'enthalpie de liaison ΔH des complexes α -CD/AzoDiGua et β -CD/AzoDiGua

L'interaction entre l' α -CD et l'AzoDiGua est plus favorable que celle entre la β -CD et l'AzoDiGua. En effet, les chaleurs de dilution sont davantage importantes et plus élevées pour l' α -CD (de l'ordre de $-2500 \mu\text{J}$ pour l' α -CD et $-750 \mu\text{J}$ pour la β -CD, Figure 7.1.a et c). Cette observation est confirmée par l'enthalpie de liaison qui est trois fois plus élevée pour l' α -CD que pour la β -CD. L'affinité de l'AzoDiGua plus prononcée pour l' α -CD que pour la β -CD peut ainsi être expliquée par des effets enthalpiques. Les réseaux de liaisons hydrogène des molécules d'eau à l'intérieur de la cavité de la β -CD sont plus nombreux que pour l' α -CD, la cavité de cette dernière étant plus petite. Ainsi, le coût enthalpique pour briser ce réseau de liaisons hydrogène afin d'exclure les molécules d'eau de la cavité, lorsque l'AzoDiGua s'inclut, sera plus élevée pour la β -CD que pour l' α -CD, expliquant ainsi une meilleure interaction avec cette dernière. La constante de dissociation K_d du complexe α -CD/AzoDiGua est de l'ordre de 5.10^{-5} M, soit une constante d'association $K_a=2.5.10^4 \text{ M}^{-1}$ qui est

l'ordre de grandeur des constantes d'association usuelles des azobenzènes¹³⁷. La constante de dissociation K_d du complexe β -CD/AzoDiGua est de l'ordre de 1.10^{-4} soit une constante d'association de 10^4 M et est légèrement inférieure à celle de l' α -CD. La stœchiométrie du complexe CD-AzoDiGua est de 1 : 1 signifiant qu'une cyclodextrine encapsule une molécule d'AzoDiGua.

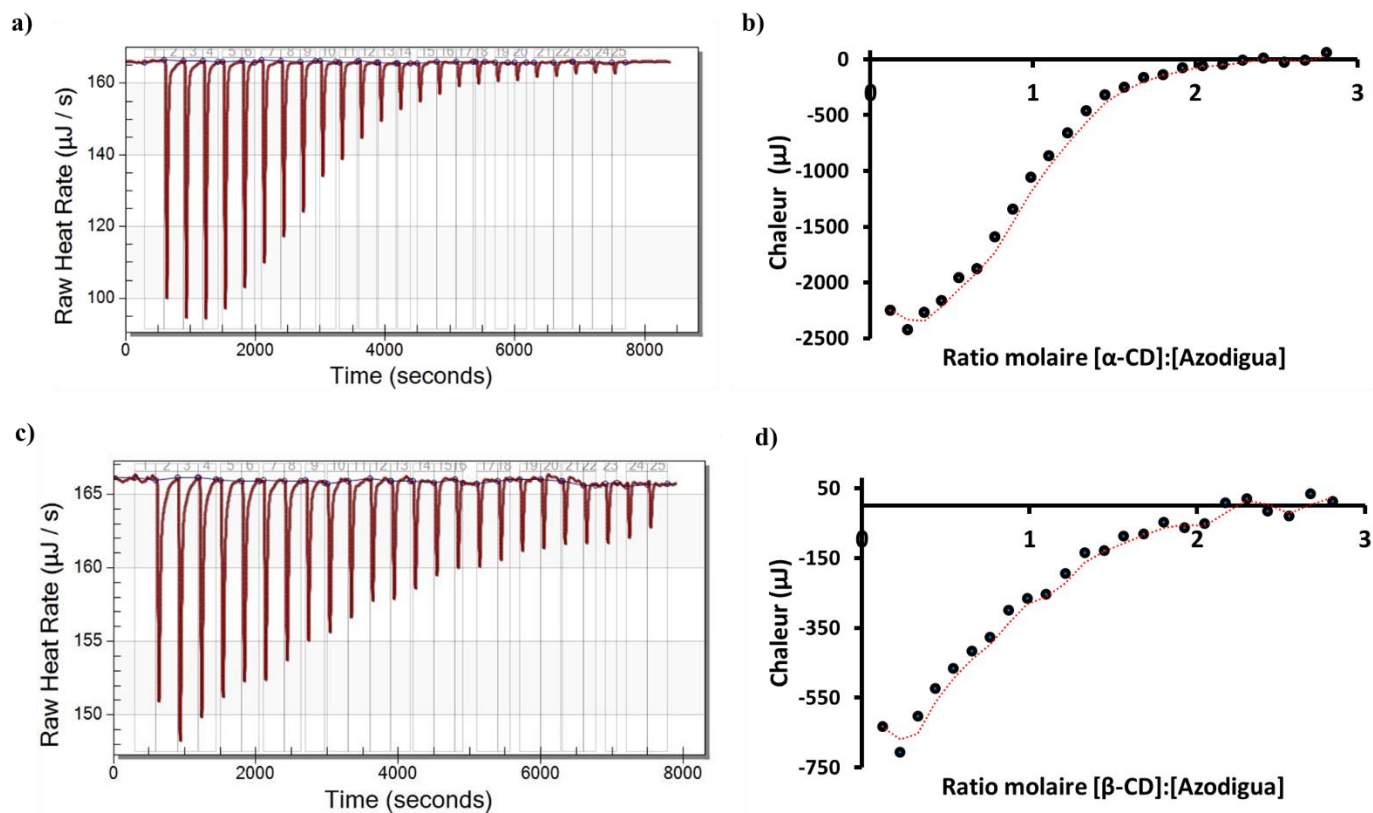


Figure 7.1-a) Thermogramme de la titration de l'AzoDiGua par l' α -CD. **b)** Aire des pics de chaleur en fonction du rapport molaire $[\alpha\text{-CD}] : [\text{AzoDiGua}]$. **c)** Thermogramme de la titration de l'AzoDiGua par la β -CD. **d)** Aire des pics de chaleur en fonction du rapport molaire $[\beta\text{-CD}] : [\text{AzoDiGua}]$. Conditions : $[\text{AzoDiGua}] = 1 \text{ mM}$; $[\text{CD}] = 10 \text{ mM}$.

Solutions réalisées dans le buffer [Tris HCl] = 50 mM (pH = 7.4).

Etant donné l'affinité plus affirmée pour l' α -CD que la β -CD, les études de ce chapitre et du chapitre suivant ont été réalisées sur le complexe d'inclusion α -CD/AzoDiGua.

b) Caractérisation spectroscopique par spectroscopie d'absorption UV-visible

L'interaction entre l' α -CD et l'AzoDiGua a été étudiée par spectroscopie d'absorption UV-visible (Figure 7.2.a). Pour ce faire, l'AzoDiGua a été titrée par l' α -CD en augmentant progressivement le rapport $r = [\alpha\text{-CD}] : [\text{AzoDiGua}]$. Lorsque r augmente, un effet bathochrome est observé sur la transition $\pi\text{-}\pi^*$ à 360 nm de l'AzoDiGua. Cet effet bathochrome peut être interprété par le changement d'environnement de l'AzoDiGua par ajout progressif d' α -CD en solution¹⁶⁶. En effet, la polarité du milieu environnant l'AzoDiGua diminue progressivement car les molécules d'AzoDiGua s'incluent graduellement dans la cavité hydrophobe qui est

moins polaire que l'eau solvant. Ce changement de polarité est ainsi à l'origine de l'effet bathochrome observé pour la transition $\pi-\pi^*$ de l'AzoDiGua. Un point isobestique est également observé à 400 nm correspondant à la coexistence de plusieurs espèces en solution (cyclodextrines libres, molécules d'AzoDiGua libres et complexes d'inclusion α -CD/AzoDiGua). L'épaule de la bande de l'AzoDiGua libre baisse graduellement en intensité au fur et à mesure que le rapport r augmente. La titration par spectroscopie UV-visible d'absorption a permis d'estimer la constante d'association K_a entre l'AzoDiGua et l' α -CD grâce à l'équation de Benesi-Hildebrand ci-après ¹⁶⁶ :

$$\frac{1}{\lambda - \lambda_0} = \frac{1}{K_a \times (\lambda_\infty - \lambda_0)} \times \frac{1}{[\alpha CD]} + \frac{1}{\lambda_\infty - \lambda_0}$$

Dans cette titration, la transition $\pi-\pi^*$ de l'AzoDiGua à 360 nm est suivie :

- λ_0 = longueur d'onde initiale du maximum d'absorbance de l'AzoDiGua
- λ_∞ = longueur d'onde finale du maximum d'absorbance de l'AzoDiGua
- λ = longueur d'onde du spectre d'absorbance de l'AzoDiGua pour la concentration $[\alpha\text{-CD}]$ correspondante
- $[\alpha\text{-CD}]$ = concentration de l' α -CD
- K_a = constante d'association du complexe AzoDiGua/ α -CD

Ainsi, en notant $\Delta\lambda = \lambda - \lambda_0$, le tracé de la courbe $1/\Delta\lambda$ en fonction de $1/[\alpha\text{-CD}]$ permet d'accéder à la constante d'association K_a du complexe d'inclusion (Figure 7.2.b). La régression linéaire a permis d'estimer $K_a = 4,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. De manière intéressante, cette valeur est du même ordre de grandeur que celle mesurée par calorimétrie (Figure 7.1) qui est estimée à $K_a = 2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

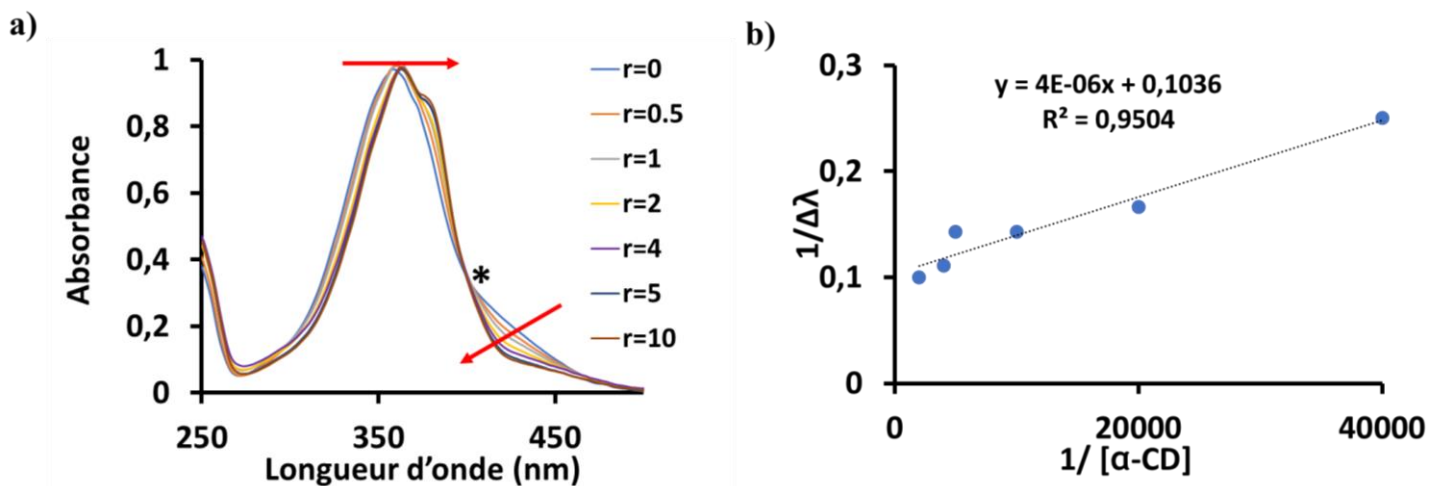


Figure 7.2-a) Spectre d'absorbance de l'AzoDiGua pour différents ratios $r = [\alpha\text{-CD}]/[\text{AzoDiGua}]$. **b)** Tracé de $1/\Delta\lambda$ en fonction de $1/[\alpha\text{-CD}]$ et détermination de la constante d'association K grâce à l'équation Benesi-Hildebrand. Le point isobestique est marqué d'un astérisque *. Conditions : $[\text{AzoDiGua}] = 50 \mu\text{M}$; Solutions réalisées dans le buffer $[\text{Tris HCl}] = 50 \text{ mM}$ ($\text{pH} = 7.4$).

c) Caractérisation structurale par RMN

Afin de caractériser la structure du complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD, la résonance magnétique nucléaire RMN ^1H 1D et 2D nous a permis d'obtenir des informations sur l'inclusion de l'AzoDiGua au sein de la cavité de l' α -CD. La numérotation suivante pour les protons aromatiques est adoptée. Le détail complet de l'assignation des signaux pour chaque proton est donné en annexes.

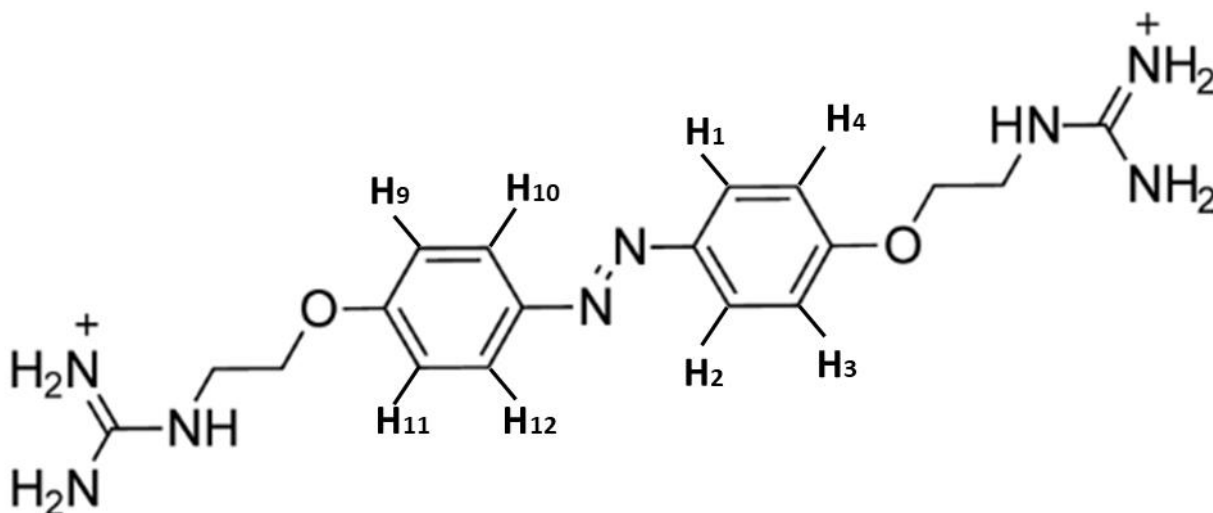


Schéma 7.1- Numérotation des protons des cycles aromatiques de l'AzoDiGua

α) Analyse par RMN ¹H 1D

Le détail de l'assignement des spectres est donné en annexes 1,2 et 3. Les concentrations sont de 5 mM pour l'AzoDiGua et pour l' α -CD de manière à totalement déplacer l'équilibre dans le sens de formation du complexe. Ainsi, à cette concentration, le complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD est formé en solution.

Le spectre RMN ¹H de l'AzoDiGua présente deux doublets à 7,73 et 7,05 ppm correspondant respectivement aux protons aromatiques en ortho H₃ et H₄ et meta H₁ et H₂ de l'oxygène de chaque cycle aromatique équivalent dû à la symétrie de la molécule (Spectre en annexe 1). Lorsque l'AzoDiGua est en présence d' α -CD, deux doublets dans la région des aromatiques apparaissent à 8,23 et 7,63 ppm. Ils correspondent tous les deux à un shift de 0,5 ppm par rapport aux signaux des aromatiques de l'AzoDiGua libre. Ainsi, ces deux doublets correspondent aux protons du cycle aromatique en ortho et méta et ont le même environnement de perturbation. Ceci prouve qu'ils sont inclus dans la cyclodextrine et se voient déblindés dû à un environnement moins électro négatif dans la cavité hydrophobe. Deux doublets sont également présents à 7,24 et 7,17 ppm qui correspondent très probablement aux protons aromatiques du deuxième cycle aromatique H₉, H₁₀, H₁₁ et H₁₂ (Spectre en annexe 3). Ainsi, lorsque l'AzoDiGua interagit avec la cyclodextrine, la symétrie de l'azobenzène est brisée et les deux cycles aromatiques ne sont plus équivalents. Selon ces observations expérimentales, nous pouvons proposer qu'un des cycles aromatiques s'inclue totalement dans la cavité de la cyclodextrine tandis que l'autre ne s'inclut pas totalement expliquant l'apparition de nouveaux signaux dû à une perte de symétrie. Afin de gagner plus en détails sur l'inclusion de l'AzoDiGua dans l' α -CD, nous avons effectué de la RMN 2D.

β) Analyse par RMN ¹H ROESY et DOSY 2D

β.1) Analyse par RMN ¹H ROESY 2D

La RMN ¹H ROESY 2D nous a permis de sonder une éventuelle corrélation entre les protons de l' α -CD et l'AzoDiGua. La corrélation est basée sur l'effet Overhauser nucléaire entre deux spins qui interagissent spatialement (à travers des interactions intermoléculaires) et non scalairement (à travers des liaisons covalentes). Les protons aromatiques H₃ et H₄ à 8,23 ppm et H₁ et H₂ à 7,63 ppm corrélient avec la région des protons de la cyclodextrine (Figure 7.2). Une corrélation avec les protons H3 et H5 de l' α -CD à 3,53 ppm et 3,90 ppm peut être détectée (En Annexe 2 est représentée la numérotation des protons de l' α -CD). Néanmoins, seuls les protons aromatiques du doublet à 7,24 ppm corrélient avec les protons de la cyclodextrine. Les protons aromatiques du doublet à 7,17 ppm ne corrélient pas avec ceux de la cyclodextrine. Ceci signifie probablement que seule la moitié du deuxième cycle aromatique est inclus dans la cavité de la cyclodextrine. Ainsi, les protons H₁₀ et H₁₂ sont inclus et corrélient avec ceux de la cyclodextrine (7,24 ppm) et les protons H₉ et H₁₁ sont très probablement hors de la cavité de la cyclodextrine et ne corrélient pas totalement avec les protons de l' α -CD. Ainsi, ces observations RMN permettent de conclure que l'AzoDiGua s'inclue de façon non

symétrique dans la cavité de la cyclodextrine. En Figure 3 est représentée la structure suggérée du complexe d'inclusion au sein de laquelle un des cycles aromatiques de l'AzoDiGua est entièrement inclus dans la cavité de l' α -cyclodextrine tandis que l'autre est probablement inclus à moitié.

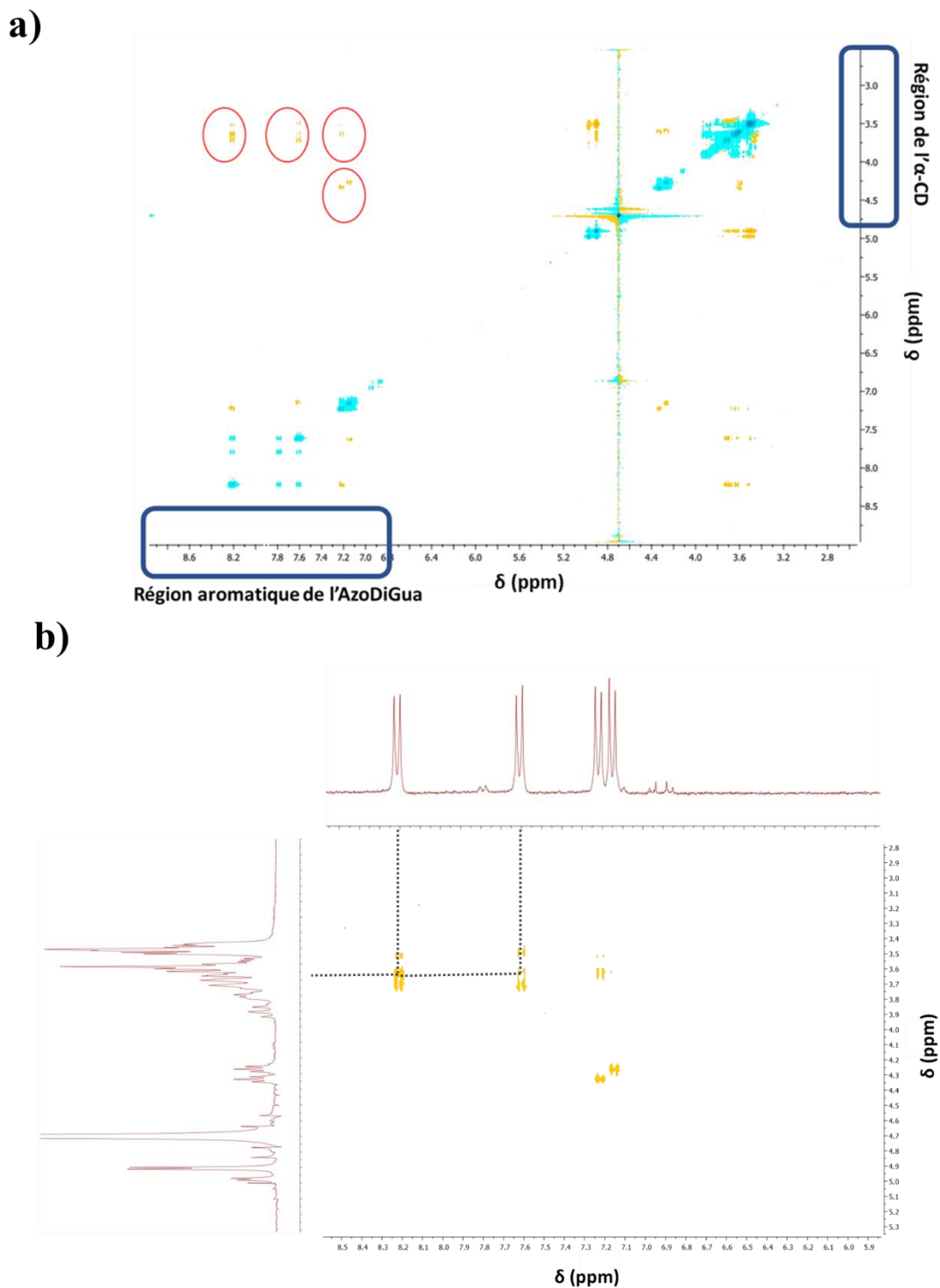


Figure 7.2-a) Spectre ^1H RMN 2D ROESY (D_2O , 300 MHz) du mélange AzoDiGua/ α -CD ($[\text{AzoDiGua}] = 5 \text{ mM}$, $[\alpha\text{-CD}] = 5 \text{ mM}$) **b)** Zoom des signaux entourés en rouge sur le spectre de la figure 7.3.a montrant la corrélation entre les protons de l'AzoDiGua et l' α -CD (les lignes noires indiquent les corrélations internucléaires).

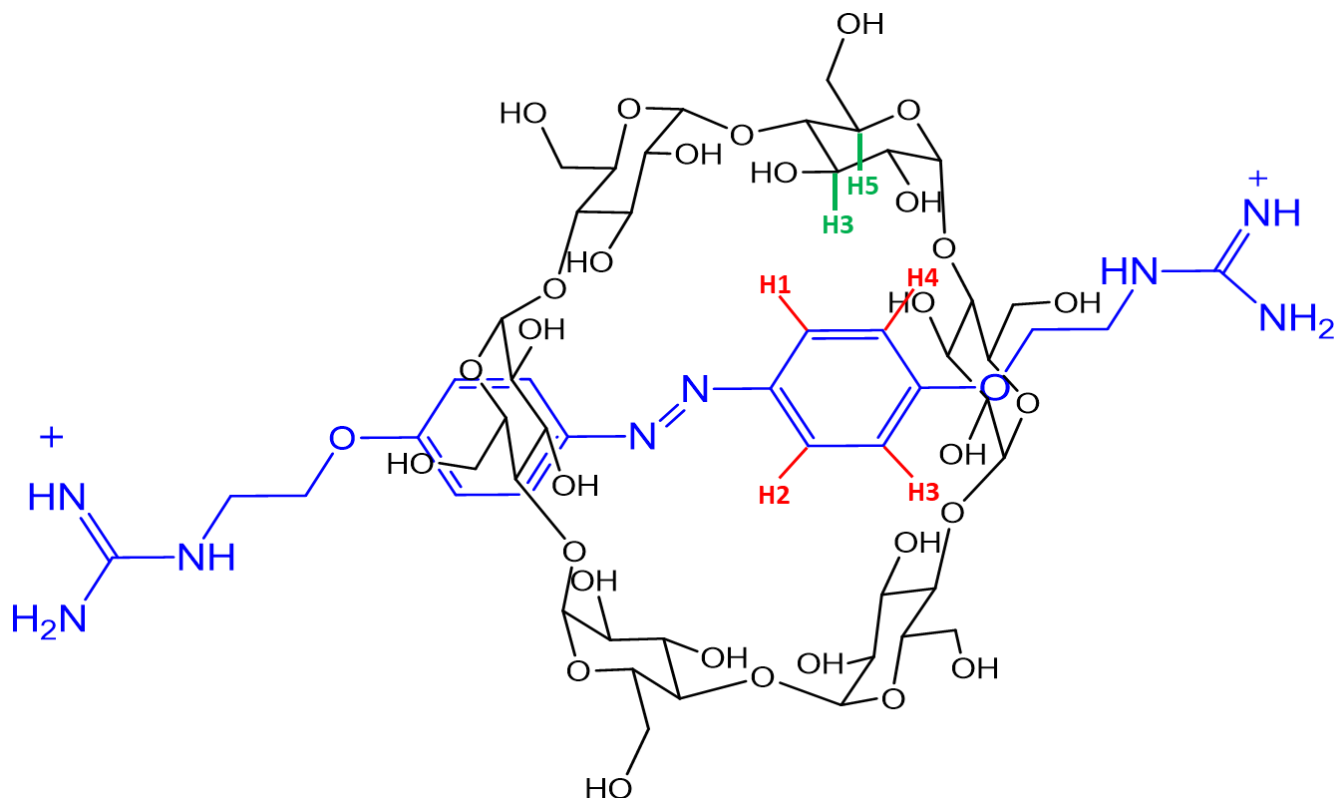


Schéma 7.3- Structure proposée pour le complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD et représentation des corrélations internucléaires entre les protons H3 et H5 de l' α -CD et les protons aromatiques H1,H2,H3 et H4 de l'AzoDiGua

β .2) Analyse par RMN ^1H DOSY 2D

Afin de confirmer l'inclusion de l'AzoDiGua au sein de la cavité de l' α -CD, une étude par diffusion par RMN ^1H 2D DOSY a été effectuée afin de comparer les coefficients de diffusion de l'AzoDiGua et de l'AzoDiGua en présence d' α -CD. Sur l'annexe 4 et 5 sont représentés les spectres DOSY de l'AzoDiGua pur et d'un mélange équimolaire AzoDiGua/ α -CD. Les protons aromatiques de l'AzoDiGua en présence d' α -CD ont un coefficient de diffusion inférieur à celui de l'AzoDiGua libre. En effet, les protons aromatiques de l'AzoDiGua pur à δ 7,05 et 7,73 ppm ont un coefficient de diffusion supérieur ($D_{\text{AZD}}=2.10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$) aux protons aromatiques à 7,63 et 8,23 ppm de l'AzoDiGua en présence d' α -CD ($D_{\text{AZD}/\alpha\text{-CD}}=0.9.10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$). Cette comparaison des coefficients de diffusion par la RMN 2D DOSY ^1H prouve que l'AzoDiGua est inclus dans la cavité. En effet, lorsque l'AzoDiGua forme un pseudo-rotaxane avec l' α -CD, ses mouvements moléculaires sont plus contraints que lorsqu'il est libre. Ainsi, le coefficient de diffusion mesuré pour l'AzoDiGua en présence de l' α -CD est plus faible que l'AzoDiGua libre prouvant que ce dernier s'inclut dans l' α -CD ^{167,168}.

2) Etude photodynamique du complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD

Dans cette partie, une étude de la dynamique photochimique du pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -CD a été menée. L'objectif est de caractériser le photocontrôle du complexe d'inclusion qui se base sur la photoisomérisation

de l'AzoDiGua *trans* en *cis*. Ainsi, le premier objectif a été de montrer que l'AzoDiGua *cis* ne s'inclue pas dans la cavité hydrophobe de l' α -CD pour ensuite pouvoir contrôler réversiblement certaines propriétés du complexe d'inclusion (chiralité et fluorescence).

a) **Caractérisation par dichroïsme circulaire et spectroscopie UV-visible : transfert de chiralité photocontrôlé**

L' α -CD est chirale mais n'est pas active en dichroïsme circulaire. Lorsqu'une molécule achirale entre dans la cavité de l' α -CD, celle-ci est perturbée par un environnement chiral et un transfert de chiralité de l'hôte vers l'invité peut se produire par des interactions dipôle-dipôle si le complexe d'inclusion a une constante d'association assez forte. Cette interaction permet ainsi d'avoir un dichroïsme circulaire induit (ICD) dû à un transfert de chiralité de l' α -CD vers la molécule invitée. Néanmoins, pour que l'ICD se produise, il est nécessaire que la molécule invitée soit un chromophore. C'est à la longueur d'onde de la transition électronique d'absorption du chromophore qu'aura lieu le transfert de chiralité lorsque la molécule invitée entre dans la cavité chirale de l' α -CD. Le signal de dichroïsme circulaire induit dans la région d'absorbance du chromophore est le signe de la complexation hôte-invité^{169,170,171,172,173,174}. L'AzoDiGua *trans* est un chromophore achiral possédant une transition π - π^* à 360 nm. Ainsi, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à sonder un possible transfert de chiralité de l' α -CD vers l'AzoDiGua. Puis, dans un deuxième temps, nous avons étudié le photocontrôle du complexe d'inclusion α -CD/AzoDiGua.

Etant donné que la constante de dissociation du complexe AzoDiGua/ α -CD est de $5 \cdot 10^{-5}$ M d'après les données de calorimétrie et de spectroscopie UV-visible, nous nous sommes placés au-delà de la limite de dissociation, à 500 μ M, de manière à bien former le complexe d'inclusion en solution. Lorsque l'AzoDiGua est en présence de l' α -CD, un signal de dichroïsme circulaire induit apparaît dans la zone d'absorbance de l'AzoDiGua correspondant à la transition π - π^* à 360 nm. Un premier effet Cotton négatif (vers 445 nm) puis un second effet Cotton positif (vers 360 nm) sont identifiés. L'intensité du signal de dichroïsme circulaire induit positif est beaucoup plus intense que celle du signal de dichroïsme circulaire induit négatif car il se situe dans la zone d'absorbance de l'AzoDiGua (Figure 7.4).

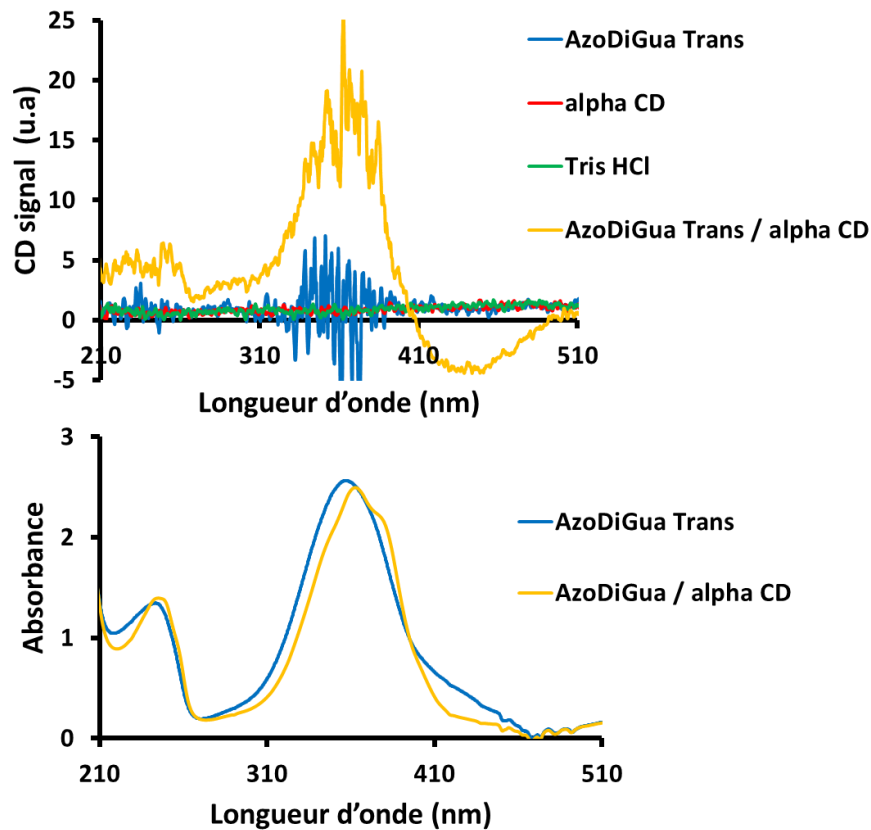


Figure 7.4- En haut : Spectre de dichroïsme circulaire de l’AzoDiGua *Trans*, de l’alpha CD, du Tris-HCl et du mélange AzoDiGua *Trans*/alpha CD dans le buffer Tris-HCl. En bas : Spectre d’absorbance de l’AzoDiGua *Trans* et du mélange AzoDiGua *Trans* / alpha CD. Conditions : [AzoDiGua]=500 μ M ; [alpha CD]=500 μ M ; Solutions réalisées dans le buffer [Tris-HCl] = 50 mM (pH = 7.4).

Après irradiation du complexe d’inclusion AzoDiGua/ α -CD avec de la lumière UV, le signal de dichroïsme circulaire induit à 360 et 445 nm disparaît pour donner un signal silencieux. Le signal obtenu après irradiation UV correspond exactement au signal de dichroïsme circulaire de l’AzoDiGua *cis* qui n’est pas actif en dichroïsme circulaire. Ainsi, en irradiant le complexe d’inclusion AzoDiGua/ α -CD avec de la lumière UV, l’AzoDiGua *trans* se photoisomérisé en AzoDiGua *cis*. Le mélange AzoDiGua *cis* / α -CD résultant n’est pas actif en dichroïsme circulaire ce qui prouve qu’aucun transfert de chiralité de l’ α -CD vers l’AzoDiGua *cis* ne se produit. Ainsi, l’AzoDiGua *cis* ne s’inclue pas dans la cavité hydrophobe de l’ α -CD. Lorsque le mélange obtenu AzoDiGua *cis* / α -CD est irradié par de la lumière bleue, le signal de dichroïsme circulaire positif à 360 nm et négatif à 445 nm est détecté. L’AzoDiGua *cis* se photoisomérisé en AzoDiGua *trans* et ce dernier s’inclue de nouveau dans la cavité hydrophobe de l’ α -CD permettant de recouvrer un transfert chiralité de l’ α -CD vers l’AzoDiGua. Le spectre d’absorbance de l’AzoDiGua *cis* ainsi que celui du complexe d’inclusion AzoDiGua *trans*/ α -CD après irradiation UV se superposent. Ceci prouve que l’AzoDiGua *cis* est sous forme libre en présence d’ α -CD et ne s’inclue pas dans la cavité de cette dernière. Lorsque le mélange AzoDiGua *cis*/ α -CD est irradié par de la lumière bleue, la photoisomérisation de l’AzoDiGua *cis* en AzoDiGua *trans* provoque la

formation du complexe d'inclusion. Le spectre d'absorbance obtenu correspond au spectre initial du mélange AzoDiGua *trans*/ α -CD prouvant que le complexe d'inclusion se reforme. Ce système permet d'avoir un photocontrôle réversible de la chiralité du pseudo-rotaxane en exploitant le transfert de chiralité de l' α -CD vers l'AzoDiGua *trans* (Figure 7.5). Les spectres d'absorbance en milieu dilué du pseudo-rotaxane α -CD/AzoDiGua avant et après irradiation sont présentés en annexe 6.

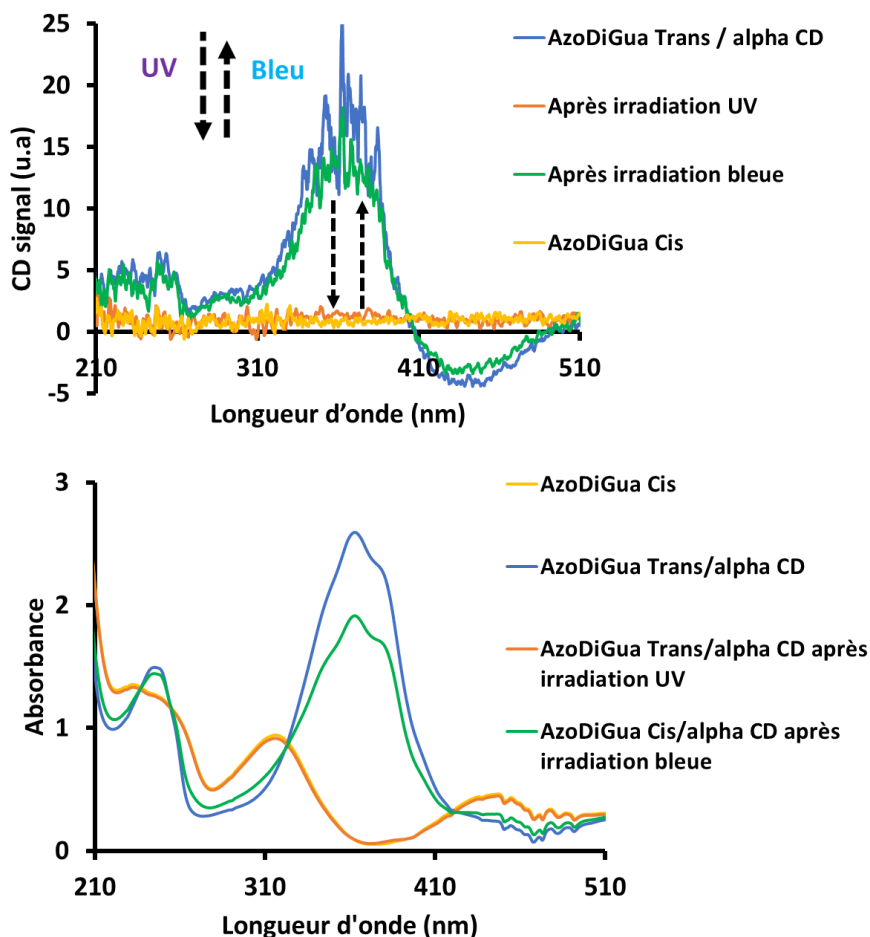


Figure 7.5- Spectre de dichroïsme circulaire (haut) et d'absorbance (bas) de l'AzoDiGua *cis* seul, et du mélange AzoDiGua *Trans*/alpha CD après irradiations successives UV (365 nm, power) pendant 5 min et bleue (435 nm) pendant 5 min. Conditions : [AzoDiGua] = 500 μ M ; [alpha CD] = 500 μ M ; Solutions réalisées dans le buffer [Tris-HCl] = 50 mM (pH = 7.4).

Le signal de dichroïsme circulaire de l'AzoDiGua *trans* à 500 μ M présente un signal bruité dans sa zone d'absorbance à 360 nm. Lorsque la concentration de l'AzoDiGua *trans* est réduite à 100 μ M, ce signal bruité n'est plus détectable. L'AzoDiGua *cis* ne présente, quant à lui, aucun signal bruité dans sa zone d'absorbance à 500 μ M. L'apparition de ce signal bruité pour l'AzoDiGua *trans* à haute concentration est très probablement lié à sa capacité d'agrégation en solution aqueuse par interaction π entre les cycles aromatiques comparé à l'AzoDiGua *cis* qui n'a pas cette propriété en solution (Figure 7.6).

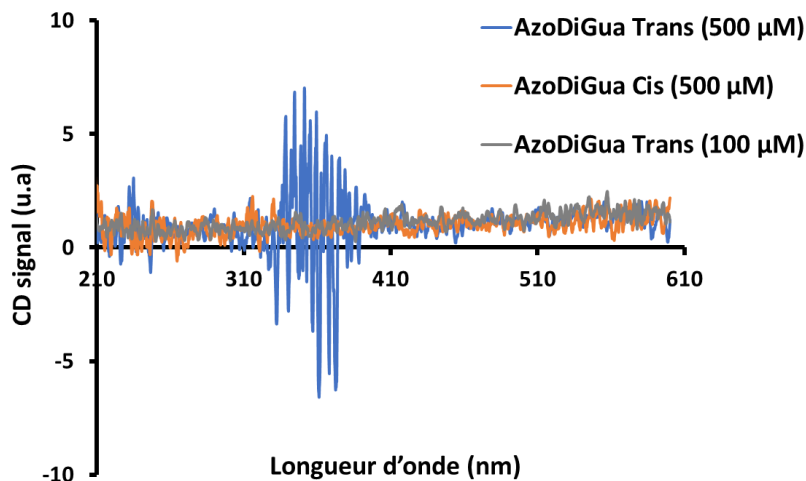


Figure 7.6- Spectre de dichroïsme circulaire de l'AzoDiGua *Trans* à deux concentrations différentes (100 μM , 500 μM) et de l'AzoDiGua *Cis* (500 μM) ([Tris HCl]=50 mM)

Pour un mélange équimolaire AzoDiGua/ α CD, plus la concentration de l'hôte et de l'invité augmente, plus le transfert de chiralité de l' α CD vers l'AzoDiGua est détecté par dichroïsme circulaire (Figure 7.7.a). Ceci s'explique par un fort déplacement d'équilibre dans le sens de formation du complexe d'inclusion. De même, lorsque une quantité croissante d' α CD est ajoutée progressivement dans une solution d'AzoDiGua, l'intensité du signal de dichroïsme circulaire à 445 nm (premier effet cotton négatif) et à 360 nm (second effet cotton positif) augmente progressivement (Figure 7.7.b). Ceci s'explique par le fait que l'AzoDiGua se complexe progressivement avec l' α CD permettant un transfert de chiralité de l'hôte vers l'invité et prouve que le dichroïsme circulaire induit émerge de la présence de l' α CD complexant l'AzoDiGua.

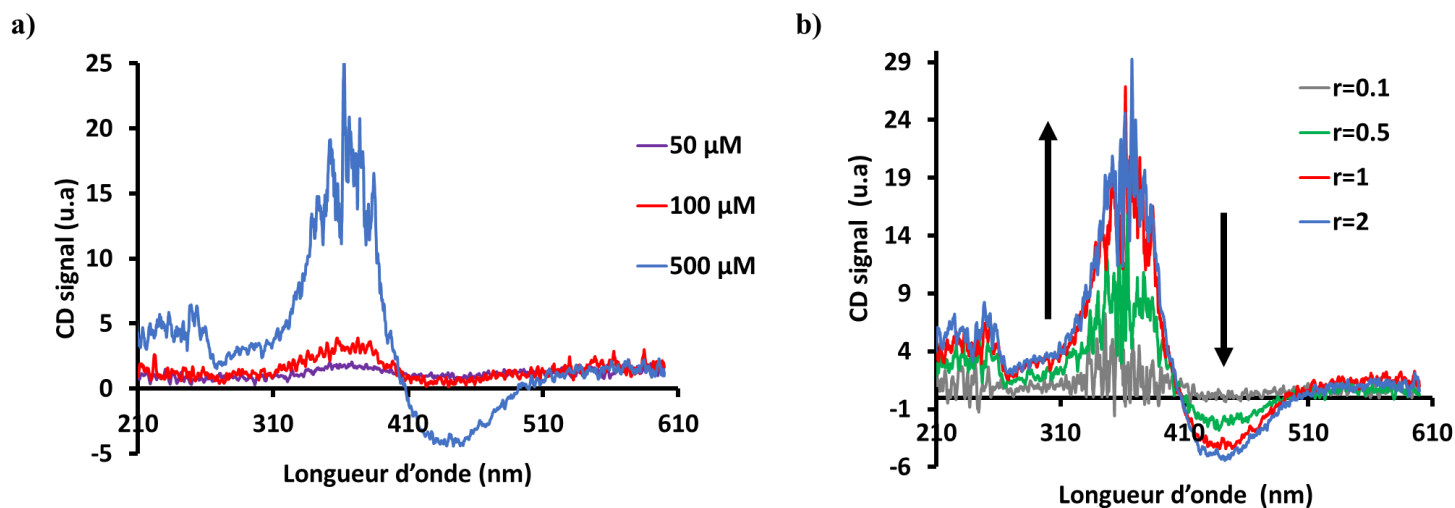


Figure 7.7- a) Spectre de dichroïsme circulaire d'un mélange équimolaire AzoDiGua/ α CD de différentes concentrations (50 μM , 100 μM , 500 μM). **b)** Spectre de dichroïsme circulaire d'un mélange AzoDiGua/ α CD pour différents rapports $r = [\alpha \text{ CD}]/[\text{AzoDiGua}]$ ([AzoDiGua]=500 μM). Solutions réalisées dans le buffer [Tris HCl] = 50 mM (pH = 7.4).

b) Caractérisation par spectroscopie de fluorescence : fluorescence photocontrôlée

Les propriétés de fluorescence du pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α CD ont également été investiguées. L' α -CD n'est pas fluorescente tandis que l'AzoDiGua présente une légère intensité de fluorescence à 650 nm (Figure 7.8.a). Lorsque l' α CD et l'AzoDiGua sont mélangés en quantités équimolaires à 500 μ M, un complexe d'inclusion type pseudo-rotaxane se forme comme étudié par dichroïsme circulaire. Le complexe d'inclusion formé entre l' α -CD et l'AzoDiGua présente une émission de fluorescence à 650 nm supérieure à celle de l'AzoDiGua (Figure 7.8.a). Cette exaltation d'émission de fluorescence émerge des propriétés de l'AzoDiGua qui s'inclue dans la cavité hydrophobe. En effet, lorsque l'AzoDiGua rentre dans la cavité de l' α -CD, sa conformation est bloquée (rotation et vibration) et ce blocage est à l'origine de l'intensité de fluorescence détectée lorsque le complexe hôte-invité AzoDiGua/ α -CD se forme en solution. Ainsi, en excitant la molécule d'AzoDiGua dans sa zone d'absorbance à 400 nm, il est capable de fluorescer lorsqu'il est inclus dans la cavité de l' α -CD (Figure 7.8.a).

En exploitant le fait que l'AzoDiGua *cis* ne s'inclue pas dans la cavité de l' α -CD, la fluorescence du complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD a pu être contrôlée de manière réversible par la photoisomérisation de l'AzoDiGua *trans* en AzoDiGua *cis* (Figure 7.8.b et c). Ainsi, lorsque le complexe d'inclusion fluorescent AzoDiGua *trans*/ α -CD est irradié par de la lumière UV pendant 5 minutes, l'AzoDiGua *trans* se photoisomérisse en AzoDiGua *cis*. Ce dernier, ne s'incluant pas dans la cavité hydrophobe de la cyclodextrine, provoque une baisse de l'intensité de fluorescence due à la dissociation du complexe d'inclusion. L'intensité de fluorescence du mélange AzoDiGua *cis*/ α -CD, obtenu par irradiation UV du complexe d'inclusion AzoDiGua *trans*/ α -CD, n'est pas exactement similaire à celle de l'AzoDiGua *cis* en solution aqueuse et est légèrement supérieure (Figure 7.8.b et d). Ceci s'explique probablement par le fait que l'AzoDiGua *cis* se trouve dans un milieu riche en α -cyclodextrines. En effet, ces dernières modifient légèrement la polarité du milieu environnant et par conséquent l'intensité de fluorescence de l'AzoDiGua *cis*. Ce photocontrôle du complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD nous a permis de contrôler réversiblement la fluorescence du pseudo-rotaxane par irradiation successive UV et bleue permettant de fabriquer un switch moléculaire ON/OFF (Figure 7.8.c). Lorsque le complexe d'inclusion est irradié par de la lumière UV, l'AzoDiGua *trans* se photoisomérisse en AzoDiGua *cis* provoquant une dissociation du complexe d'inclusion et une baisse de l'intensité de fluorescence. Lorsque le mélange obtenu est réirradié par de la lumière bleue, l'AzoDiGua *cis* se photoisomérisse en AzoDiGua *trans* provoquant une reformation du complexe d'inclusion et une augmentation de l'intensité de fluorescence. Il est à noter que l'intensité de fluorescence après irradiation bleue est plus faible que l'intensité de fluorescence initiale. Ceci est dû à l'état photostationnaire atteint qui contient un mélange de *cis* et *trans*, riche en *trans* qui n'est pas de même composition que le mélange initial (Tableau 1, Chapitre B.3).

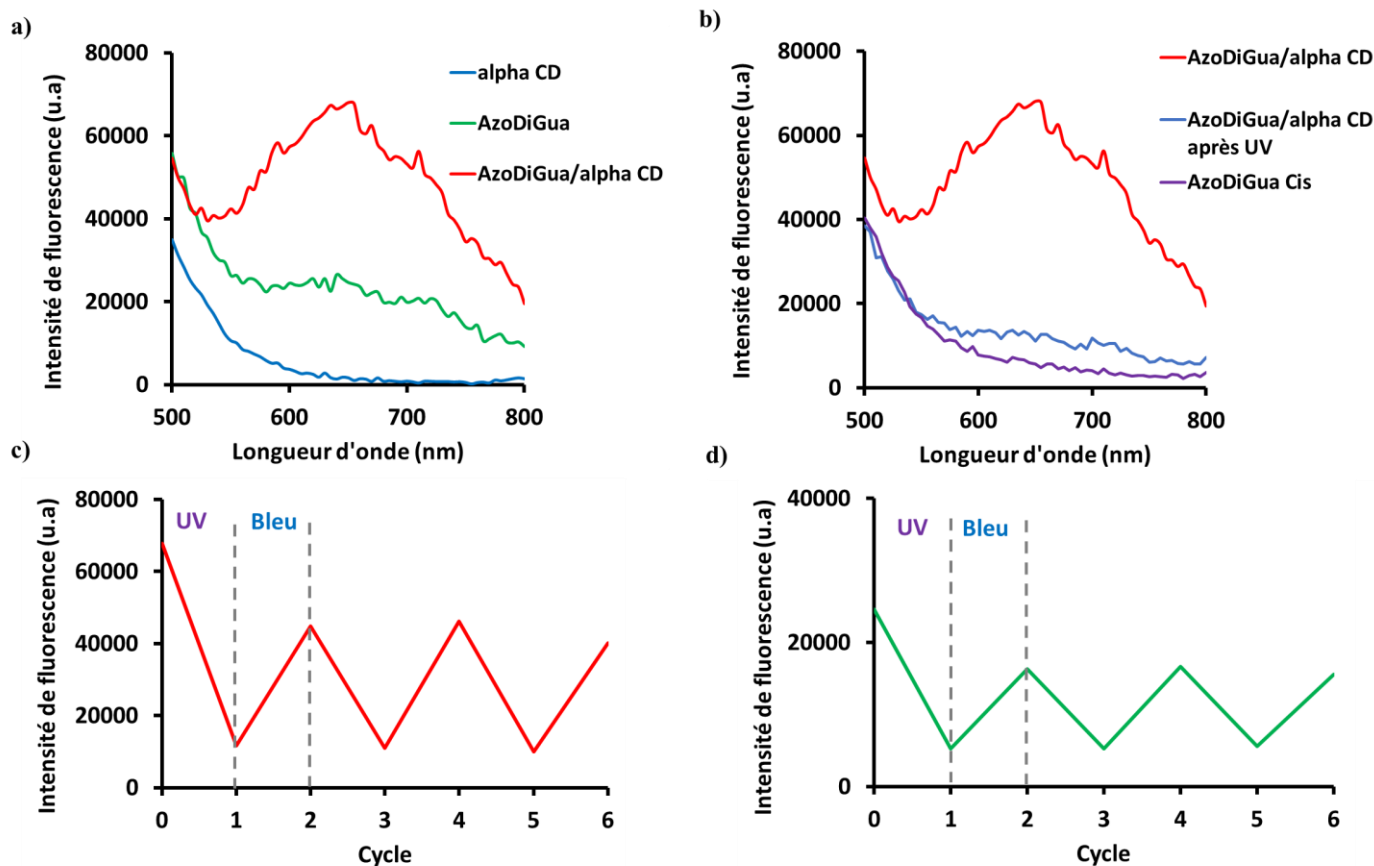


Figure 7.8- **a)** Spectre d'émission de fluorescence de l'AzoDiGua, de l'alpha CD et du complexe alpha CD/AzoDiGua **b)** Spectre d'émission de fluorescence du complexe alpha CD/AzoDiGua après irradiation UV (365 nm, 24 mW.cm⁻²). **c)** Variation de l'intensité de fluorescence du complexe d'inclusion alpha CD/AzoDiGua à 650 nm après des cycles successifs d'irradiation UV (365 nm, 24 mW.cm⁻²) et bleue (435 nm, 112 mW.cm⁻²) pendant 5 minutes. **d)** Variation de l'intensité de fluorescence de l'AzoDiGua à 650 nm après des cycles successifs d'irradiation UV (365 nm, 24 mW.cm⁻²) et bleue (435 nm, 112 mW.cm⁻²) pendant 5 minutes. Toutes les solutions sont réalisées dans le buffer [Tris HCl] = 50 mM (pH = 7.4) ([AzoDiGua]=[alpha CD]=500 µM) et toutes les excitations de fluorescence sont effectuées à 400 nm.

Pour un mélange équimolaire AzoDiGua/α-CD, plus la concentration augmente, plus l'intensité de fluorescence du pseudo-rotaxane est élevée (Figure 7.9). Cette évolution croissante de l'intensité de fluorescence avec la concentration du complexe d'inclusion prouve que le pseudo-rotaxane AzoDiGua/α-CD est bien fluorescent.

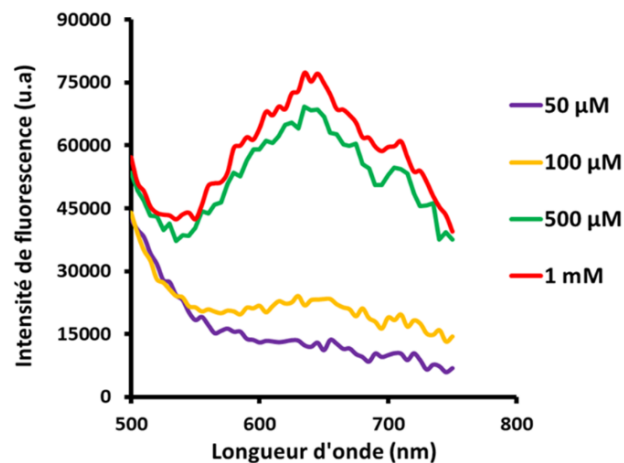


Figure 7.9-Spectre d'émission de fluorescence (Excitation : 400 nm) du complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD en pour un mélange équimolaire AzoDiGua/ α -CD à différentes concentrations. Solutions réalisées réalisées dans le buffer [Tris HCl] = 50 mM (pH = 7.4)

De même, en ajoutant des quantités croissantes d'alpha cyclodextrine en présence d'AzoDiGua (500 μ M), l'intensité de fluorescence de l'AzoDiGua augmente progressivement (Figure 7.10). Cette exaltation de fluorescence de l'AzoDiGua émerge de la complexation progressive de l'azobenzène au sein de la cavité de l' α -CD.

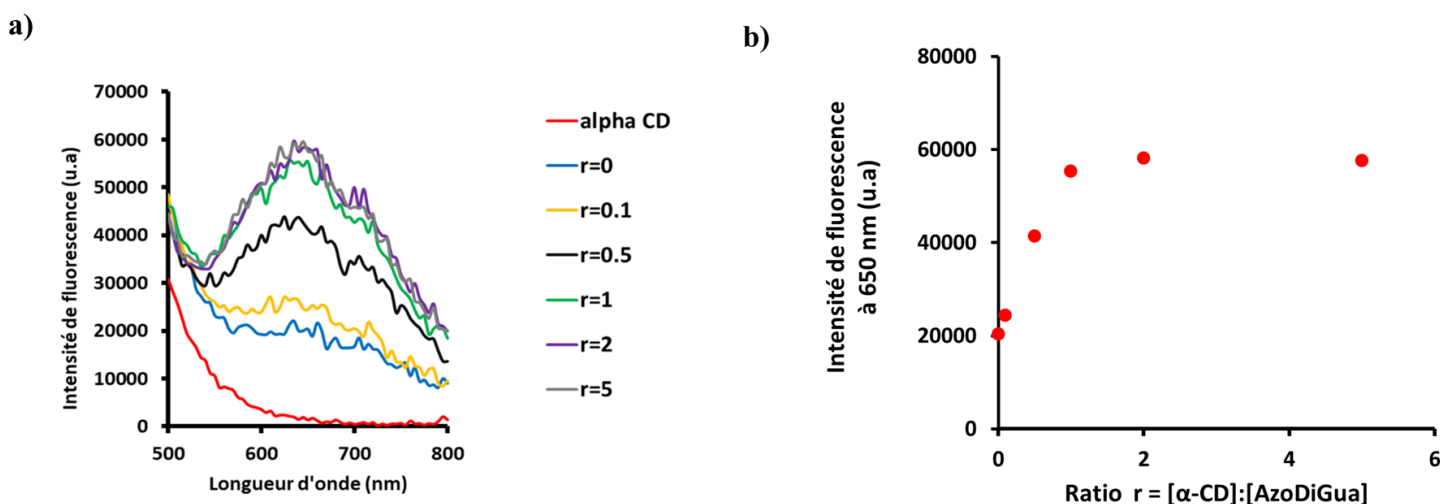


Figure 7.10- a) Spectre d'émission de fluorescence de l'AzoDiGua (500 μ M) en présence d'un ratio croissant $r=[\alpha\text{-CD}]:[\text{AzoDiGua}]$ dans le buffer [Tris HCl]=50 mM. Le spectre de fluorescence de l'alpha CD a été réalisé pour une concentration de 500 μ M. **b)** Variation de l'intensité de fluorescence de l'AzoDiGua à 650 nm en fonction du ratio $r=[\alpha\text{-CD}]:[\text{AzoDiGua}]$. Les spectres ont été réalisés avec une excitation de 400 nm.

3) Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé un nouveau complexe d'inclusion, de type pseudo-rotaxane, combinant l'AzoDiGua, intercalant d'ADN photosensible, et une α -Cyclodextrine.

Ce complexe d'inclusion possède une constante de dissociation de 5.10^{-5} M et une stœchiométrie 1 :1. Des études par RMN 2D ont montré que l'AzoDiGua s'incluait de façon non symétrique au sein de la cavité de l' α -Cyclodextrine. Des études par dichroïsme circulaire et spectroscopie UV-visible ont permis de mettre en évidence que la forme *cis* de l'AzoDiGua ne s'inclue pas dans la cavité et que le complexe d'inclusion était chiral par transfert de chiralité de la cyclodextrine vers le dérivé d'azobenzène. Enfin, la formation du complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -Cyclodextrine a conduit à une augmentation de l'intensité de fluorescence de l'AzoDiGua nous ayant permis de conclure que le pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -Cyclodextrine était fluorescent.

De manière très intéressante, nous avons enfin montré que ce complexe d'inclusion était photosensible et que ses propriétés de chiralité et de fluorescence pouvaient être réversiblement photocontrôlées via la photoisomérisation de l'AzoDiGua. Ceci nous a ainsi permis de développer un switch supramoléculaire ON/OFF photocontrôlé combinant l'AzoDiGua et l' α -Cyclodextrine et conduisant à un contrôle de propriétés notables, comme la fluorescence ou la chiralité (Figure 7.11).

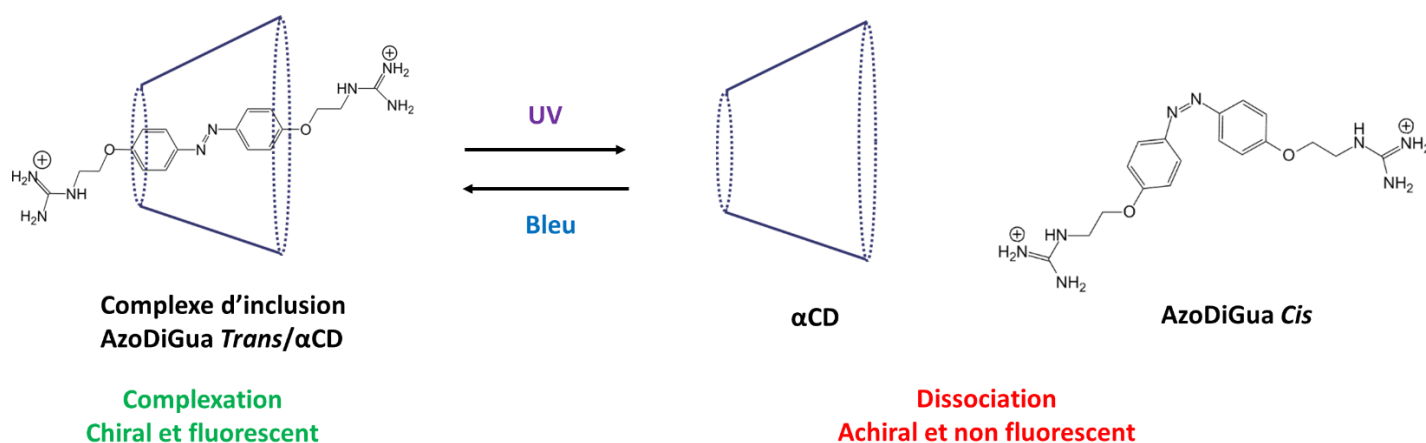


Figure 7.11- Photocontrôle du complexe d'inclusion type pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -Cyclodextrine et des propriétés associées (fluorescence, chiralité induite) par photoisomérisation *trans-cis* réversible de l'AzoDiGua, démontré dans ce chapitre.

Ce complexe d'inclusion photosensible a ensuite été utilisé pour deux applications différentes. La première consiste à contrôler de manière isotherme l'assemblage de brins d'ADN en exploitant la propriété d'intercalation de l'AzoDiGua. La deuxième a pour but de contrôler l'assemblage supramoléculaire entre l'ATP et l'AzoDiGua, décrit aux chapitres B.2 et B.3, et d'utiliser l' α -Cyclodextrine comme un stimulus hôte-invité pour désassembler dynamiquement les agrégats supramoléculaires et briser l'émission de fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua. Le contrôle dynamique de ces propriétés est décrit dans le chapitre suivant.

CHAPITRE C.3- Complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -Cyclodextrine : vers des propriétés dynamiques d'assemblage et fusion de l'ADN

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'intercalant ADN photosensible, l'AzoDiGua, formait un complexe d'inclusion dynamique avec l' α -Cyclodextrine. Dans ce chapitre, nous allons exploiter ce phénomène pour contrôler de manière dynamique les propriétés d'interaction de l'AzoDiGua avec l'ADN (intercalation) ou l'ATP (auto-assemblages vus aux chapitres B2 et B3). La première propriété ciblée a donc été sa propriété d'intercalation. Nous avons ainsi été capable de contrôler l'assemblage par appariement des bases de brins d'ADN ainsi que sa température de fusion T_m par formation du pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -Cyclodextrine. La deuxième propriété ciblée est la capacité de l'AzoDiGua de former des assemblages supramoléculaires fluorescents avec l'ATP, détaillées dans les chapitres B2 et B3. Nous avons ainsi été capables de contrôler les propriétés d'assemblage des agrégats supramoléculaires ATP/AzoDiGua dont la fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua répond à la complexation hôte-invité de l' α -cyclodextrine.

Plan :

1) Intercalation dynamique de l'AzoDiGua au sein de l'ADN contrôlée par la complexation AzoDiGua/α-Cyclodextrine.....	157
a) Stratégie générale.....	157
b) Présentation du système ADN <i>Hairpin</i> étudié.....	158
c) Etude de l'effet de la complexation AzoDiGua/ α -Cyclodextrine sur le melting d'ADN.....	159
α) Intercalation de l'ADN par l'AzoDiGua.....	159
β) Effet de l' α -Cyclodextrine sur le melting d'ADN.....	161
2) Etude de l'autoassemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua dynamique en présence d'interactions host-guest.....	163
a) Stratégie générale.....	163
b) Effet de l' α -Cyclodextrine sur l'assemblage ATP/AzoDiGua.....	164
α) Assemblage ATP/AzoDiGua et effet de l'ajout d'une α -cyclodextrine.....	164
β) Etude de la dynamique de désassemblage par dichroïsme circulaire.....	167
γ) Effet sur la fluorescence des agrégats ATP/AzoDiGua.....	169
3) Conclusions et perspectives.....	170

1) Intercalation dynamique de l'AzoDiGua au sein de l'ADN contrôlée par la complexation AzoDiGua/ α -Cyclodextrine

a) Stratégie générale

L'AzoDiGua est un intercalant d'ADN. Il est donc capable de s'inclure entre les bases de l'ADN par interaction π et électrostatiques. Ceci se traduit par une stabilisation du double-brin d'ADN en augmentant sa température de fusion (ou « melting » en anglais), qu'on notera ici T_m . Ainsi, dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la possibilité de désintercaler l'AzoDiGua en présence d'une α -cyclodextrine afin de contrôler l'hybridation des bases d'ADN par l'interaction hôte-invité à température constante (Figure 8.1). La stratégie consiste à manipuler deux équilibres chimiques distincts :



Ainsi, nous nous sommes intéressés à la possibilité de déplacer l'équilibre (2) dans le sens de formation du complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD et ainsi rompre l'équilibre (1) d'intercalation de l'AzoDiGua dans l'ADN (Figure 8.1.b)

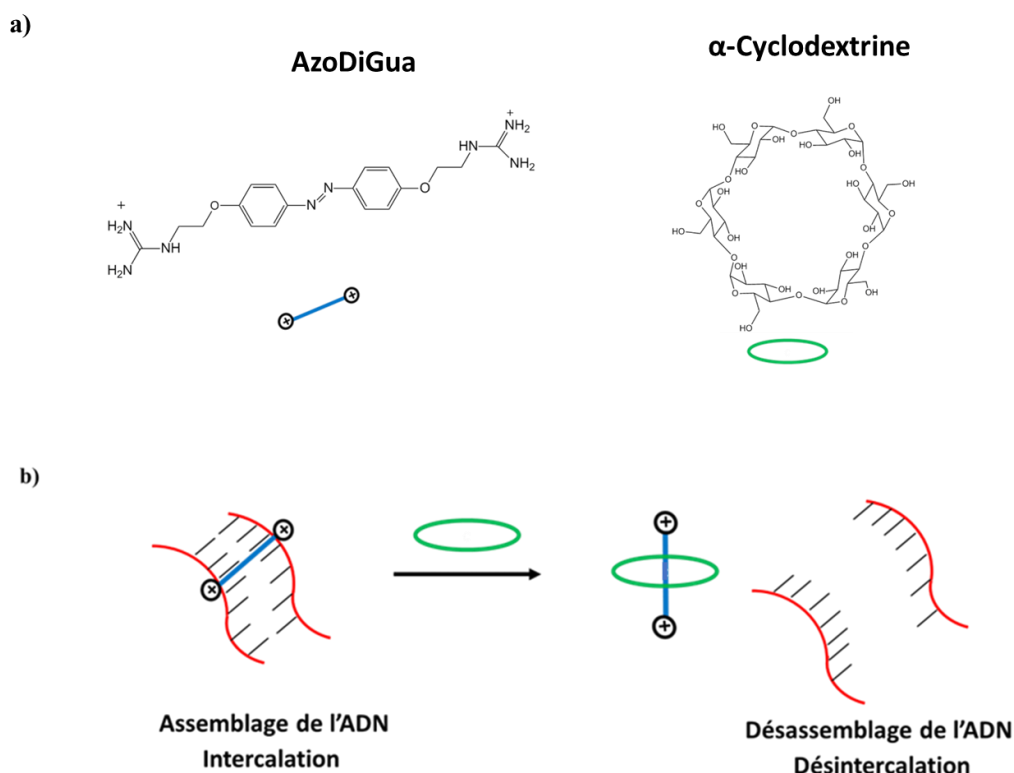


Figure 8.1-a) Structure moléculaire et schématique de l'intercalant d'ADN AzoDiGua et l' α -Cyclodextrine. **b)** Représentation schématique de la stratégie de désassemblage de l'ADN par la complexation hôte-invité AzoDiGua/ α -Cyclodextrine à température constante.

b) Présentation du système ADN *Hairpin* étudié

L'étude a été réalisée sur un système ADN que l'on appellera *Hairpin*. Le système ADN *Hairpin* a été préalablement développé par notre laboratoire. Il est constitué d'un brin d'ADN primaire composé :

- d'une chaîne de thymines flexibles non appariées
- d'un double brin possédant 5 paires de base appariées et dont le pourcentage en bases GC (Guanine et Cytosine) peut être contrôlé
- De deux bras de séquences de bases non appariées

Deux oligonucléotides, respectivement fonctionnalisés par un groupement A accepteur (Cyanine 3c) et un groupement B donneur (Cyanine 5c) et complémentaires des deux bras de l'ADN primaire, viennent s'hybrider par appariement des bases sur chaque bras de la plateforme (Figure 8.2.a). Ceci constitue le système ADN *Hairpin* qui est étudié dans ce chapitre.

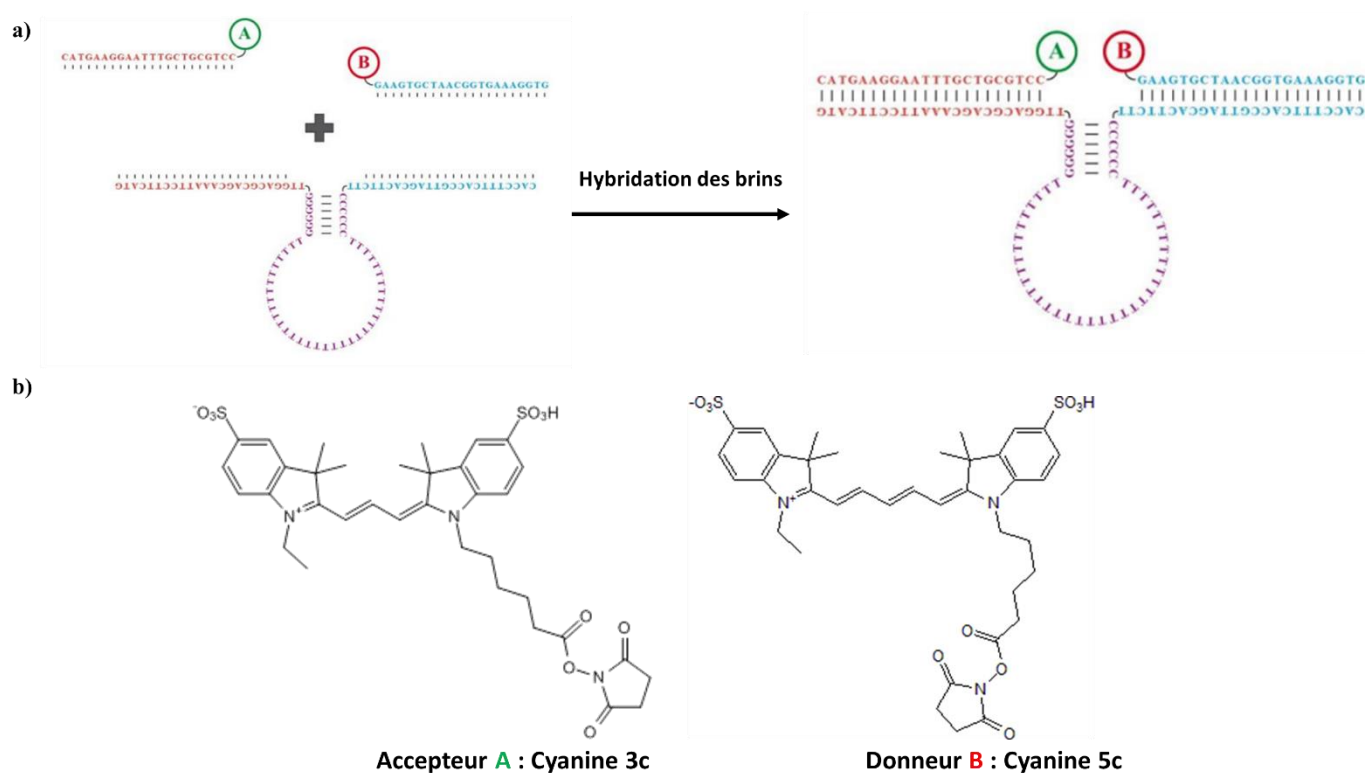


Figure 8.2-a) Construction de la plateforme du système ADN *Hairpin* par hybridation. **b)** Structure moléculaire des accepteur A et donneur B.

La détermination de la température de fusion T_m de l'ADN est effectuée grâce à une mesure FRET (Förster Resonance Energy Transfer). Lorsque les groupements A et B sont proches l'un de l'autre et bien positionnés dans l'espace, un transfert d'énergie FRET du donneur vers l'accepteur est possible (Figure 8.3.a). Ainsi, lorsque le donneur est excité à sa longueur d'onde d'excitation, ce dernier transfère son énergie à l'état excité à l'accepteur qui est capable d'émettre de la lumière par fluorescence à sa longueur d'onde d'émission. Lorsque la température du milieu augmente et atteint la température T_m du double-brin de la tige du *hairpin*,

l'appariement des 5 paires de bases est brisé ce qui éloigne les molécules A et B et rend le transfert d'énergie FRET beaucoup moins efficace (Figure 8.3.a). Nous avons donc utilisé cette stratégie pour mesurer la température de fusion T_m dans différentes conditions. Pour ce faire, l'efficacité FRET E_{FRET} est mesurée en fonction de la température du milieu T . L'efficacité du transfert d'énergie FRET est calculée par la grandeur suivante E_{FRET} :

$$E_{\text{FRET}} = \frac{I_A}{I_A + I_B}$$

Avec :

- I_A : intensité de fluorescence de l'accepteur A à sa longueur d'onde d'émission
- I_B : intensité de fluorescence du donneur B à sa longueur d'onde d'émission

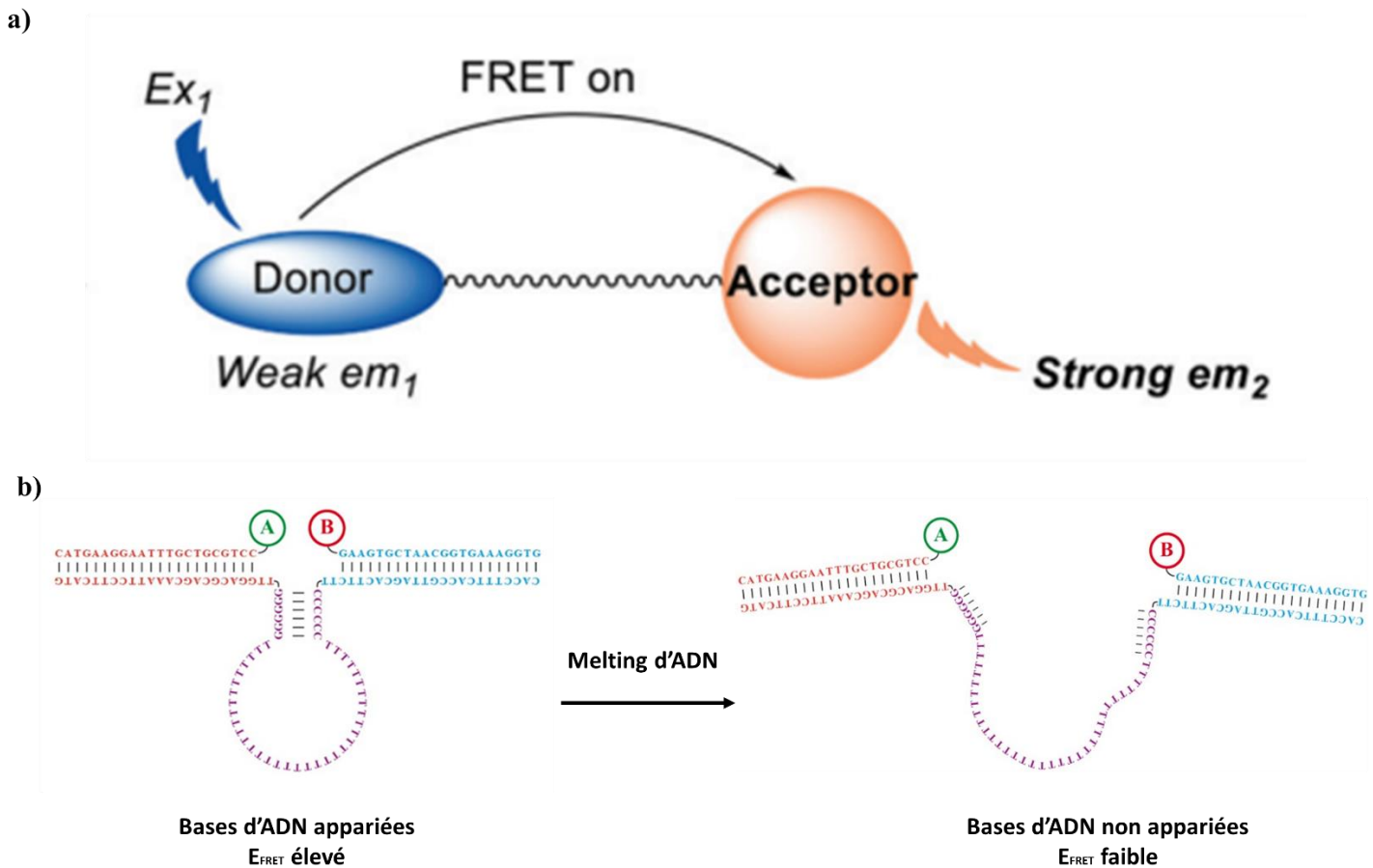


Figure 8.3-a) Représentation schématique d'un transfert d'énergie FRET (Forster Resonance Energy Transfer) entre un donneur et un accepteur¹⁷⁴. **b)** Représentation schématique du melting d'ADN et du contrôle de l'efficacité FRET E_{FRET} par appariement des bases du système ADN *Hairpin* étudié.

c) Etude de l'effet de la complexation AzoDiGua/ α -Cyclodextrine sur le melting d'ADN

α) Intercalation de l'ADN par l'AzoDiGua

L'AzoDiGua est capable de stabiliser le double brin d'ADN étant capable de s'intercaler entre les bases d'ADN⁶⁴. Les parties aromatiques de l'AzoDiGua se positionnent entre les bases G-C par interaction π tandis que les extrémités guanidinium se placent à l'extérieur de la double hélice par interaction électrostatiques avec les phosphates. Une étude systématique sur cet ADN *Hairpin* a été préalablement réalisée par notre laboratoire pour élucider les effets de concentration en AzoDiGua, les effets de force ionique et les effets de séquences des brins d'ADN appariés sur la différence ΔT_m correspondant à la différence de température de fusion ΔT_m de l'ADN après et avant intercalation de l'AzoDiGua. Les conditions choisies pour l'étude de l'effet de la formation du complexe AzoDiGua/ α -Cyclodextrine sur la fusion d'ADN ont été choisies telles que l'intercalation de l'AzoDiGua stabilise grandement l'ADN et conduit à un ΔT_m élevé afin de pouvoir étudier l'effet de la présence de l' α -cyclodextrine sur le désassemblage de l'ADN sur une grande gamme de température.

Dans les conditions choisies, l'ADN *Hairpin* a une température de fusion $T_m = 16$ °C. Lorsque l'AzoDiGua s'intercale dans l'ADN, la température de fusion T_m augmente et atteint $T_m = 45$ °C conduisant à un $\Delta T_m = 29$ °C (Figure 8.4).

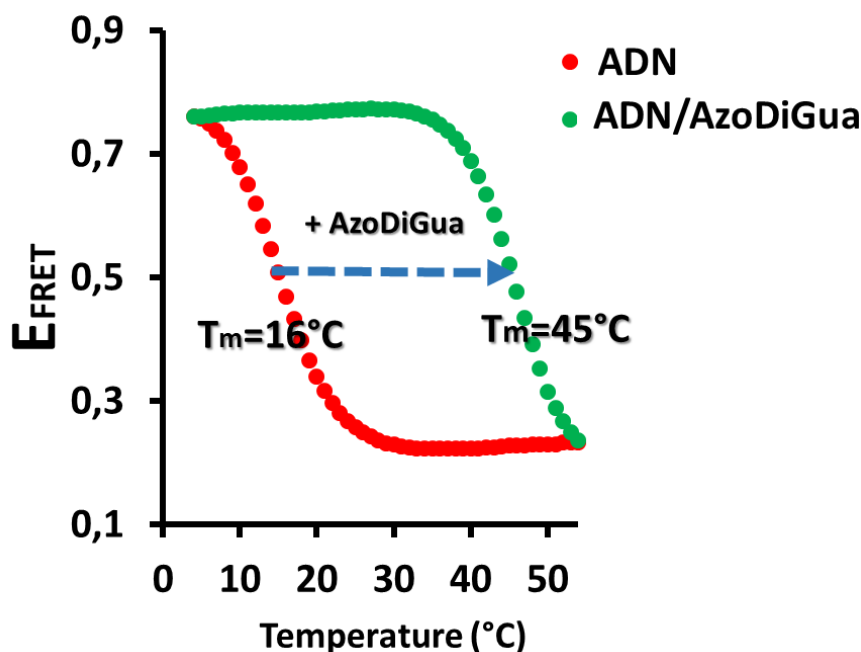


Figure 8.4- Efficacité FRET E_{FRET} en fonction de la température. Le système est excité à la longueur d'onde $\lambda_{exc} = 520$ nm et les intensités de fluorescence sont mesurées aux longueurs d'onde d'émission $\lambda_{em}^A = 550$ nm et $\lambda_{em}^B = 682$ nm. Le chauffage se fait avec une rampe de 1 °C / 5 s. Conditions : [Plateforme d'ADN *hairpin*] = 1 μ M ; [AzoDiGua] = 50 μ M ; [NaCl] = 75 mM, 5 paires de base contenant 100% GC). Toutes les solutions sont réalisées dans le buffer [Tris-HCl] = 10 mM et [NaCl] = 75 mM.

β) Effet de l'α-Cyclodextrine sur le melting d'ADN

Afin d'étudier l'effet de la présence d'une α-Cyclodextrine sur l'intercalation de l'AzoDiGua, nous avons d'abord étudié l'effet de l'α-Cyclodextrine sur la fusion de l'ADN seul. Pour ce faire, la température de fusion T_m de l'ADN *hairpin* a été mesurée en présence de concentrations croissantes d'α-CD (Figure 8.5.a). L'α-CD n'a pas d'influence significative sur la fusion de l'ADN. En effet, la température de fusion T_m de l'ADN varie très peu en présence de l'α-Cyclodextrine (Figure 8.5.b). Une légère stabilisation de 2°C est observée pour une concentration en α-CD de 50 et 1250 μM mais aucune tendance monotone ne peut être dégagée. L'effet de l'α-CD sur le melting de l'ADN *hairpin* peut donc être négligée par rapport à l'effet de l'AzoDiGua.

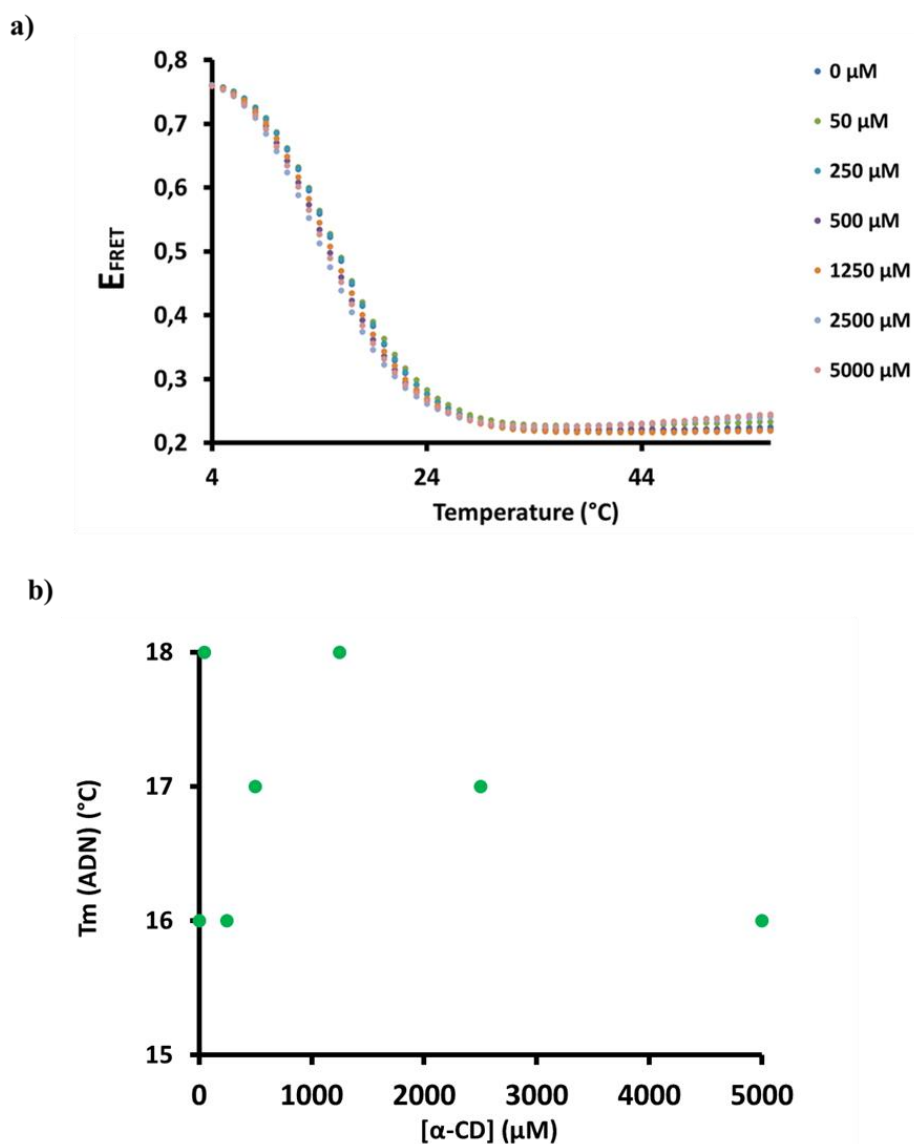


Figure 8.5-a) Courbes de fusion de l'ADN *hairpin* en présence de concentrations croissantes en α-CD ([α-CD]=0 ; 50 ; 250 ; 500 ; 1250 ; 2500 ; 5000 μM.) **b)** Evolution de la température de melting T_m de l'ADN *hairpin* en fonction de la concentration en α-CD. Conditions : [Plateforme d'ADN *hairpin*]= 1 μM. Toutes les solutions sont réalisées dans le buffer [Tris-HCl] = 10 mM et [NaCl] = 75 mM.

Nous avons ensuite étudié l'éventuelle capacité de l' α -CD d'interagir avec l'AzoDiGua intercalée dans l'ADN pour contrôler la température de fusion de l'ADN *Hairpin* et ainsi son hybridation. L'ajout progressif d' α -CD au sein de l'ADN *hairpin* intercalée par l'AzoDiGua conduit à une diminution graduelle de la température de fusion T_m de l'ADN. La Figure 8.c représente la différence $\Delta T_{m(CD)} = T_m(\text{ADN/AzoDiGua}/\alpha\text{-CD})_r - T_m(\text{ADN/AzoDiGua})_{r=0}$ en fonction du rapport $r = [\alpha\text{-CD}]/[\text{AzoDiGua}]$ pour une concentration constante en AzoDiGua. La différence $\Delta T_{m(CD)}$ correspond à la différence entre la température de fusion de l'ADN pour le rapport $r = [\alpha\text{-CD}]/[\text{AzoDiGua}]$ et la température de fusion de l'ADN lorsque ce rapport $r = 0$, c'est-à-dire qu'en présence d'AzoDiGua. En augmentant la concentration en α -CD, $\Delta T_{m(CD)}$ augmente progressivement jusqu'à atteindre une valeur limite de 25 °C (Figure 8.6.c). Ainsi, la température de fusion T_m de l'ADN peut être régulée sur un intervalle de 25°C par ajout progressif d'une α -CD. A notre connaissance, un tel contrôle de T_m par simple ajout de cyclodextrine n'avait jamais été décrit. Ceci permet ainsi de contrôler l'assemblage de l'ADN de manière isotherme en présence d'une α -CD qui provoque la désintercalation de l'AzoDiGua de l'ADN par formation du pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -CD caractérisée au chapitre C.2 (Figure 8.6.b). L'AzoDiGua complexé n'est donc plus capable de s'intercaler dans l'ADN et conduit à une baisse de sa température de fusion et à son désassemblage à température constante.

Cette étude constitue une approche jamais explorée dans la littérature visant à contrôler l'assemblage de l'ADN par compétition entre l'intercalation et la complexation d'un intercalant d'ADN bolaforme. Une approche photochimique a été publiée par notre laboratoire exploitant la différence de température de fusion entre le *trans* et le *cis* AzoDiGua. Dans ce chapitre, nous avons mis au point une nouvelle stratégie visant à exploiter les propriétés amphiphiles de l'AzoDiGua pour contrôler la fusion et l'hybridation d'ADN à température constante et ce, par simple ajout contrôlé d' α -Cyclodextrine.

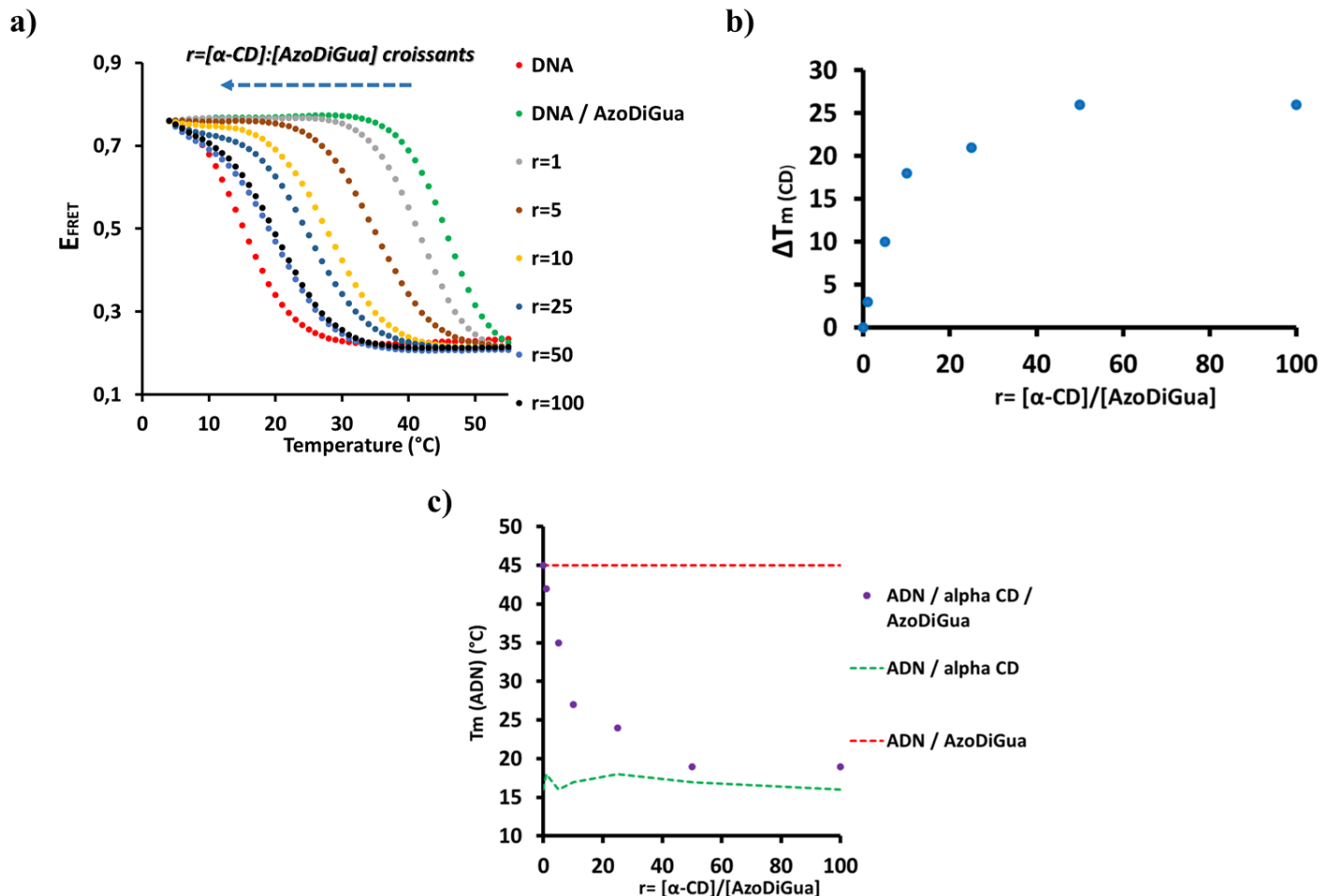


Figure 8.6 – a) Courbes de melting de l’ADN *hairpin* en fonction du rapport $r = [\alpha\text{-CD}]/[\text{AzoDiGua}]$. b) Variation de $\Delta T_{m(\text{CD})}$ en fonction du rapport r où $\Delta T_{m(\text{CD})} = T_{m(\text{ADN}/\text{AzoDiGua}/\alpha\text{-CD})_r} - T_{m(\text{ADN}/\text{AzoDiGua})}$ représente la différence entre la température de fusion de l’ADN pour le rapport r et la température de melting de l’ADN lorsque $r = 0$, c’est-à-dire en présence uniquement d’AzoDiGua. c) Variation de la température de melting de l’ADN *hairpin* $T_m(\text{ADN})$ en fonction du rapport r . Conditions : [Plateforme d’ADN *hairpin*] = 1 μM ; [AzoDiGua] = 50 μM . Toutes les solutions sont réalisées dans le buffer [Tris-HCl] = 10 mM et [NaCl] = 75 mM.

2) Etude de l’autoassemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua dynamique en présence d’interactions host-guest

a) Stratégie générale

Comme étudié dans les chapitres B.2 et B.3, l’AzoDiGua est capable de former des agrégats fluorescents et stimulables avec l’ATP. Dans cette partie, nous allons nous intéresser à l’utilisation d’une α -cyclodextrine comme un stimulus de désassemblage des agrégats ATP/AzoDiGua. Dans le même esprit que les propriétés d’intercalation de l’AzoDiGua, nous avons étudié la capacité de l’ α -cyclodextrine à rompre l’interaction ATP/AzoDiGua et ainsi induire le désassemblage des agrégats supramoléculaires ATP/AzoDiGua en exploitant le fait que ce dernier forme un complexe d’inclusion avec l’ α -CD (Figure 8.7). Cette stratégie

permettrait ainsi de moduler les propriétés d'assemblages et de fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua. Pour cette étude, les assemblages ATP/AzoDiGua ont été préparées dans les conditions habituelles ($[ATP] = 1 \text{ mM}$; $[AzoDiGua] = 1 \text{ mM}$; solutions dans le buffer $[Tris-HCl] = 50 \text{ mM}$; incubation pendant 10 min à température ambiante).

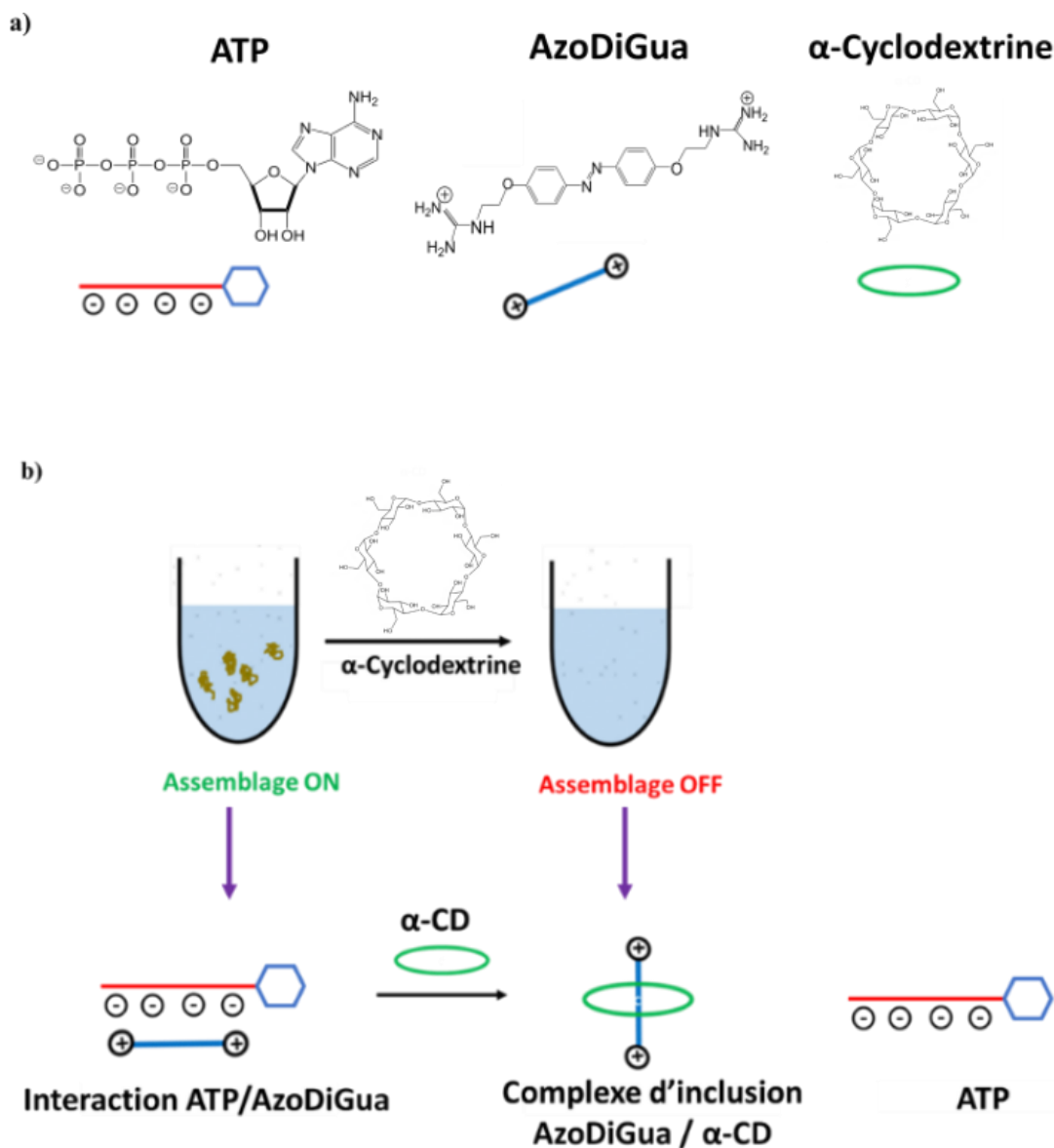


Figure 8.7- a) Structures moléculaire et schématique de l'ATP, AzoDiGua et α -Cyclodextrine. b) Représentation schématique du désassemblage des agrégats d'ATP/AzoDiGua par complexation hôte-invité de l'AzoDiGua par l' α -CD provoquant la rupture d'interaction de l'ATP avec l'AzoDiGua.

b) Effet de l' α -Cyclodextrine sur l'assemblage ATP/AzoDiGua

α) Assemblage ATP/AzoDiGua et effet de l'ajout d'une α -cyclodextrine

Lorsqu'une α -Cyclodextrine est ajoutée dans une solution contenant les agrégats supramoléculaires en suspension, la solution perd sa turbidité (Figure 8.8). Cette disparition de turbidité, caractéristique du co-assemblage ATP/AzoDiGua, signifie que les agrégats sont dissociés après l'ajout de l' α -Cyclodextrine. Ainsi,

lorsque l' α -Cyclodextrine est ajoutée au mélange ATP/AzoDiGua, cette dernière forme un complexe d'inclusion avec l'AzoDiGua. Ainsi, l'ATP n'est plus capable d'interagir avec l'AzoDiGua par interaction électrostatique et π pour former les agrégats conduisant à une perte de turbidité de la solution. Ces hypothèses ont été confirmées par microscopie optique, dichroïsme circulaire et spectroscopie de fluorescence.



Figure 8.8- Photographies d'une solution contenant un mélange ATP/AzoDiGua avant (gauche) et après ajout d'une solution de 2 mM d' α -cyclodextrine (droite).

Une observation au microscope optique à transmission a permis de mettre en évidence l'effet de l' α -CD sur l'assemblage supramoléculaire ATP/AzoDiGua. Lorsqu'une solution d' α -CD est ajoutée à une solution d'agrégats ATP/AzoDiGua en suspension, de façon à avoir un rapport $[\alpha\text{-CD}]/[\text{AzoDiGua}] = 2$, plus aucun agrégat n'est observé au microscope optique en moins d'une minute après homogénéisation de la solution (Figure 8.9.b). Lorsque l' α -CD est ajoutée à la solution contenant les agrégats ATP/AzoDiGua de façon à avoir un rapport $[\alpha\text{-CD}]/[\text{AzoDiGua}] = 1$, certaines zones sont encore riches en agrégats et ces derniers ne sont pas totalement dissociés (Figure 8.9.c). Il est donc important d'avoir un léger excès d' α -CD pour déplacer l'équilibre dans le sens de formation du complexe d'inclusion afin de rompre l'interaction ATP/AzoDiGua.

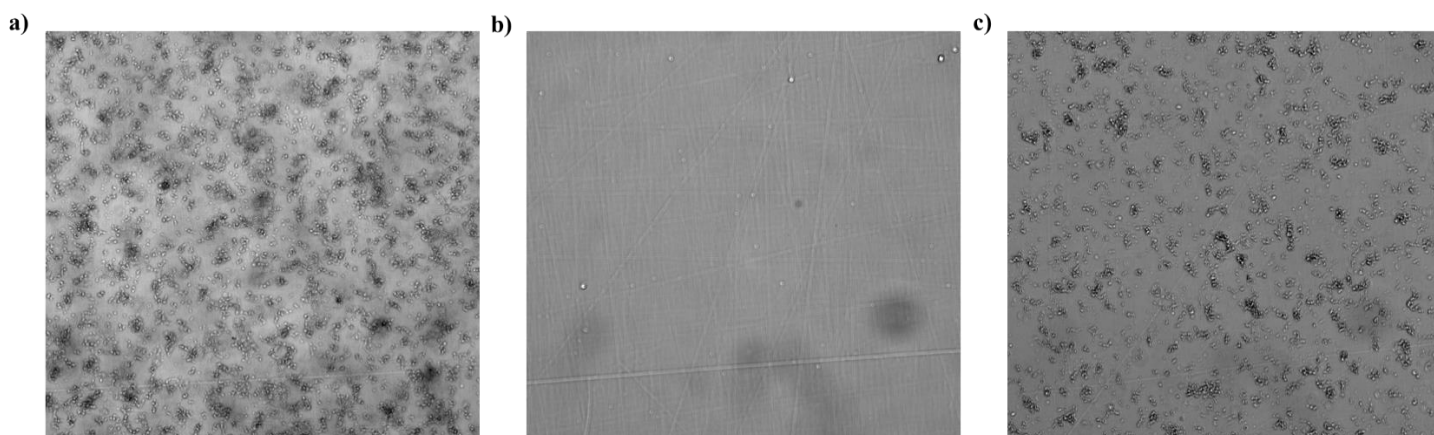


Figure 8.9- Observation au microscope optique des agrégats ATP/AzoDiGua **a)** avant et 1 min après l'addition d' α -cyclodextrine à un ratio $r = [\alpha\text{-CD}]/[\text{AzoDiGua}]$ **b)** $r = 2$ ou **c)** $r = 1$. La barre d'échelle représente 20 μm .

Ainsi, lorsqu'une solution d'alpha CD est ajoutée à une solution d'agrégats ATP/AzoDiGua, de manière à avoir un rapport $[\alpha \text{ CD}] : [\text{AzoDiGua}]$ égal à 1, le co-assemblage ATP/AzoDiGua n'est pas totalement dissocié (Figure 8.10.b). Lorsqu'un excès d'alpha CD est réajoutée à cette même solution de manière à atteindre un rapport $[\alpha \text{ CD}]/[\text{AzoDiGua}]$ égal à 2, les agrégats résiduels (Figure 8.10.b) sont totalement désassemblés (Figure 8.10.c).

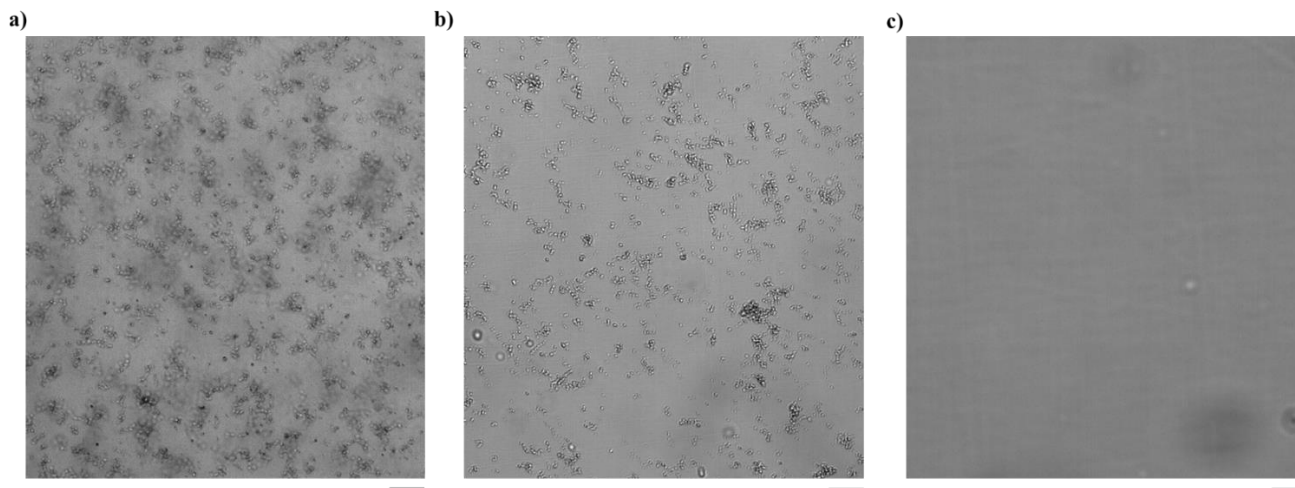


Figure 8.10- Observation au microscope optique d'une solution d'agrégats ATP/AzoDiGua **a)** avant puis 10 secondes après ajout ; au sein de la même solution d'agrégats ATP/AzoDiGua ; d'une solution d'alpha CD avec un ratio $r = [\alpha \text{ CD}]/[\text{AzoDiGua}]$ **b)** $r = 1$ **c)** $r = 2$ La barre d'échelle représente 20 μm .

Nous nous sommes intéressés à l'effet de la dilution par ajout de la solution d' α -cyclodextrine. Lorsqu'une solution purement aqueuse de même volume que celui de la solution d' α -CD, est ajoutée à la solution d'agrégats ATP/AzoDiGua, aucun désassemblage n'est observé (Figure 8.11.b). Cette observation met en évidence que la dilution de 1/10 de la solution contenant l'ATP et l'AzoDiGua n'affecte pas les agrégats ATP/AzoDiGua et que le désassemblage est bien dû à l'activité de l' α -CD. 5 minutes après l'ajout du volume de contrôle d'eau, les agrégats d'ATP/AzoDiGua continuent de s'agréger en solution ce qui montre que la légère dilution n'affecte pas le co-assemblage supramoléculaire entre l'ATP et l'AzoDiGua (Figure 8.11.c).

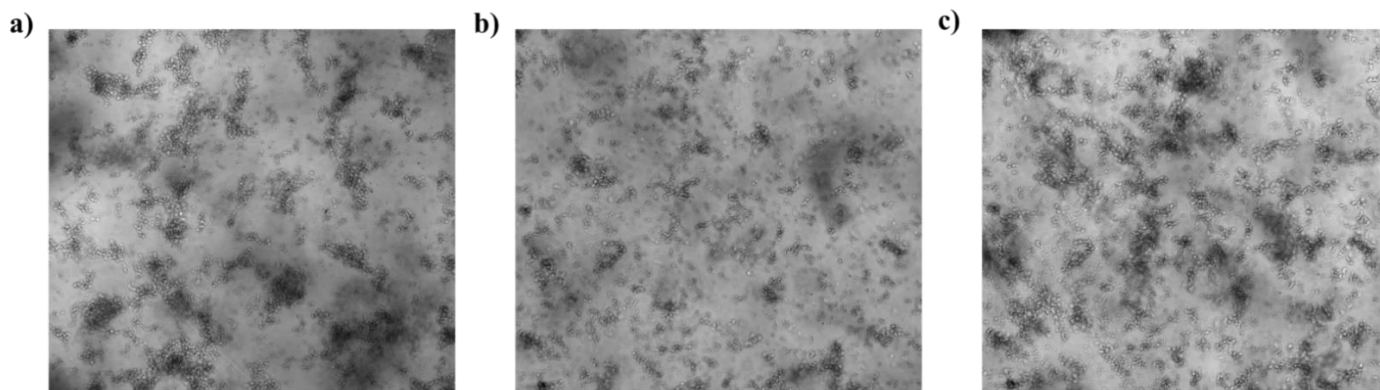


Figure 8.11- Observation au microscope optique des agrégats ATP/AzoDiGua **a)** avant **b)** 5 secondes **c)** 5 minutes ; après ajout de 10 μL d'eau. La barre d'échelle représente 20 μm .

β) Etude de la dynamique de désassemblage par dichroïsme circulaire

Afin de mieux comprendre l'influence de l'ajout de l' α -CD sur le co-assemblage ATP/AzoDiGua, une analyse par dichroïsme circulaire a été opérée étant donné que le complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD est chiral (cf chapitre C.1).

Le mélange ATP/AzoDiGua contenant les agrégats supramoléculaires conduit à un signal de dichroïsme circulaire et possède un effet Cotton à 310 et 410 nm dans la zone d'absorbance de l'AzoDiGua (Figure 8.12.a). Le signal est de très grande intensité et sature à 200 u.a. Lorsque la concentration en ATP et AzoDiGua est divisée par 10, aucun signal de dichroïsme circulaire n'est détecté. Ceci prouve que le signal de dichroïsme circulaire est bien dû à la présence des agrégats supramoléculaires ATP/AzoDiGua. Deux explications peuvent rendre compte du signal de dichroïsme circulaire des agrégats ATP/AzoDiGua : la diffusion et la chiralité. Premièrement, ce signal peut être expliqué par la diffusion de la lumière. En effet, la lumière traversant la solution peut être diffusée par les agrégats d'ATP/AzoDiGua micrométriques en suspension présents sur le trajet de la lumière. Cette diffusion pourrait rendre compte du signal de dichroïsme circulaire de grande intensité. Dans un second temps, le signal de dichroïsme circulaire des agrégats ATP/AzoDiGua peut être expliqué par l'environnement chiral autour de l'AzoDiGua. En effet, la molécule d'ATP est chirale et lorsqu'elle se co-assemble avec l'AzoDiGua, l'environnement de ce dernier devient chiral. Ainsi, un signal de dichroïsme circulaire dans la zone d'absorbance de l'AzoDiGua est détecté avec un effet Cotton positif et négatif respectivement à 310 et 410 nm. Le signal saturé n'est pas présent lorsque le mélange équimolaire AzoDiGua/ATP est dans des conditions diluées pour lesquels les agrégats ne se forment pas (Figure 8.12.c). Ceci prouve que le signal est bien dû à la présence des agrégats moléculaires en suspension.

Lorsque l' α CD est ajoutée au mélange ATP/AzoDiGua contenant les agrégats, le signal dû au co-assemblage ATP/AzoDiGua disparaît et un nouveau signal de dichroïsme circulaire est détecté correspondant au transfert de chiralité de l' α CD vers l'AzoDiGua s'incluant dans la cavité (Figure 8.12.b). Afin de prouver que l'AzoDiGua se complexe à l' α CD, nous avons comparé ce nouveau signal à différents signaux de référence.

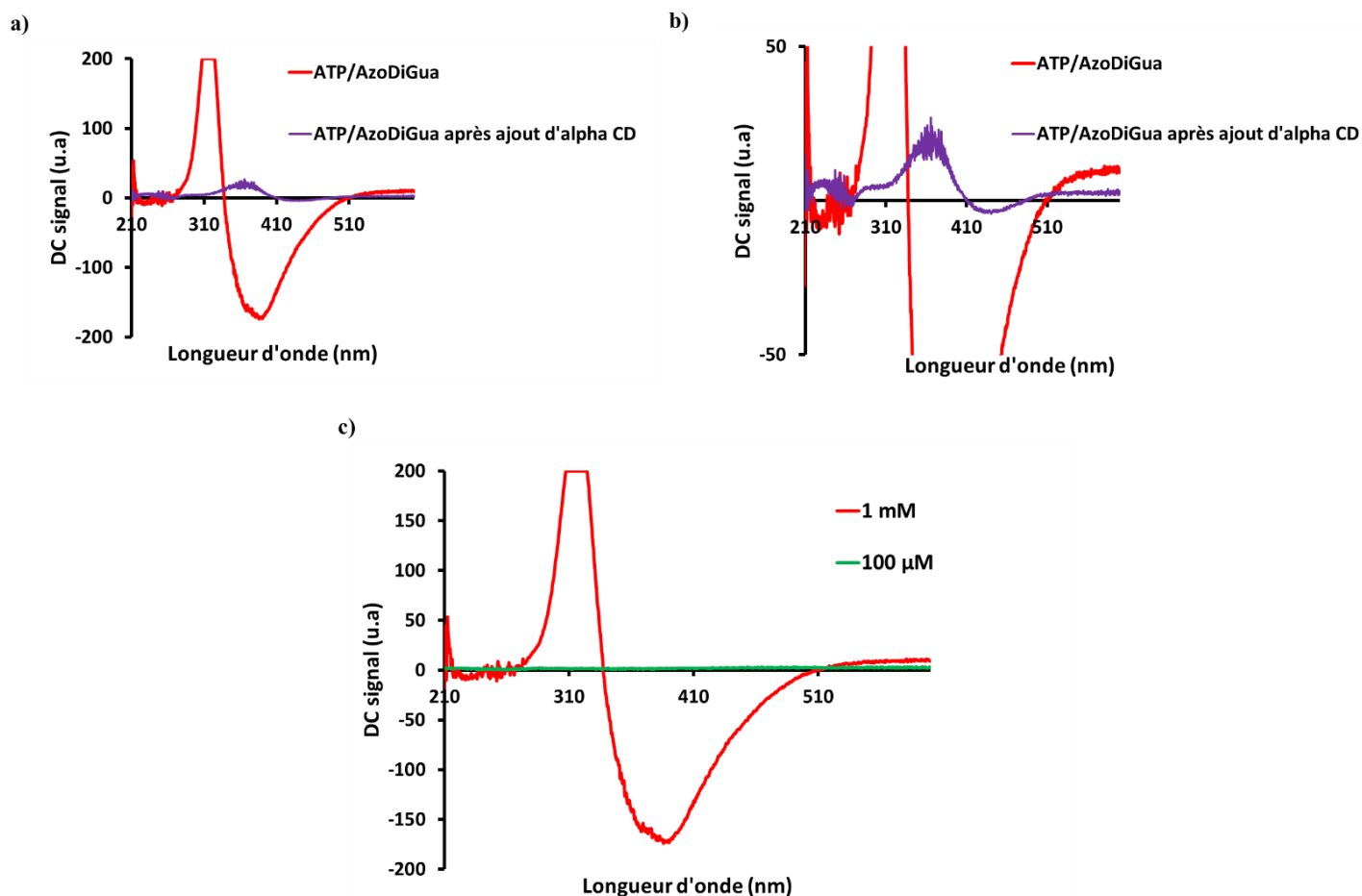


Figure 8.12- a) Spectre de dichroïsme circulaire du mélange ATP/AzoDiGua avant ajout et après ajout d'alpha CD. b) Zoom du spectre de dichroïsme circulaire du mélange ATP/AzoDiGua avant et après ajout d'alpha CD. c) Spectre de dichroïsme circulaire d'un mélange équimolaire ATP/AzoDiGua de 100 μ M et 1 mM. (Pour les spectres a et b, [AzoDiGua] = 1 mM, [ATP] = 1 mM, [Tris HCl] = 50 mM, [alpha CD] = 2 mM)

Le signal du mélange ATP/AzoDiGua après ajout de l'alpha CD correspond exactement au signal AzoDiGua/alpha CD dans la région 300-500 nm correspondant à la zone d'absorbance de l'AzoDiGua (Figure 8.13). Ainsi, lorsque l'alpha CD est ajoutée au mélange ATP/AzoDiGua contenant les agrégats, un transfert de chiralité s'opère de l'alpha CD vers l'AzoDiGua prouvant que le complexe AzoDiGua/alpha CD se forme. La région 215-300 nm correspond, quant à elle, à la zone d'absorbance de l'ATP. Le signal correspondant au mélange ATP/alpha CD n'est pas présent dans celui du mélange ATP/AzoDiGua après ajout de l'alpha CD tandis que le signal de l'ATP libre y est partiellement retrouvé. Ces observations prouvent que l'ATP est probablement libre en solution lorsque l'alpha CD est ajoutée dans la solution d'agrégats tandis que l'AzoDiGua se complexifie avec l'alpha CD brisant son interaction avec l'ATP. Ainsi, cette étude par dichroïsme circulaire a permis de confirmer que lorsque l'alpha CD est ajoutée à une solution contenant les agrégats ATP/AzoDiGua, un complexe AzoDiGua/alpha CD est formé conduisant à la rupture d'interaction entre l'ATP et l'AzoDiGua et ainsi à une dissociation des agrégats.

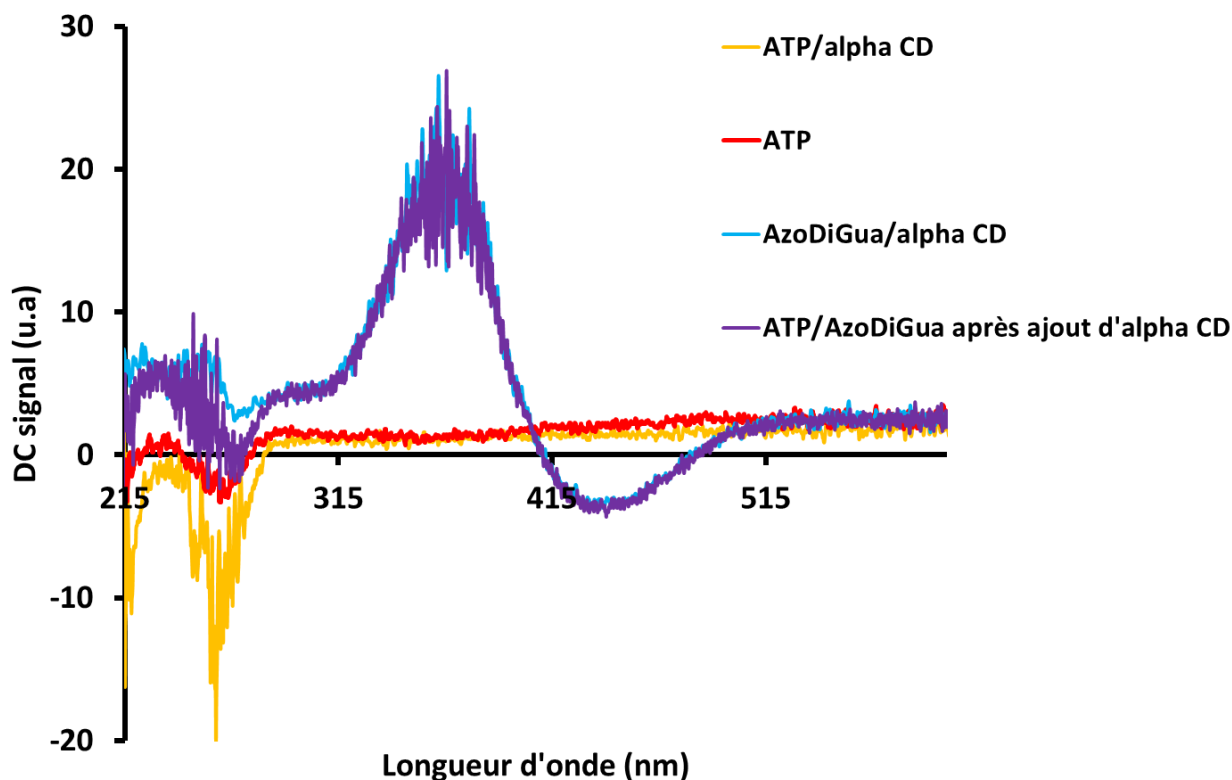


Figure 8.13- Spectre de dichroïsme circulaire de l'ATP, du mélange ATP/alpha CD, du mélange AzoDiGua/alpha CD, du co-assemblage ATP/AzoDiGua après ajout de l'alpha CD ([AzoDiGua] = 1 mM, [ATP] = 1 mM, [Tris HCl] = 50 mM, [alpha CD] = 2 mM)

γ) Effet sur la fluorescence des agrégats ATP/AzoDiGua

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de l' α -CD sur la fluorescence des agrégats ATP/AzoDiGua. En ajoutant l' α -CD à la solution d'agrégats, l'AzoDiGua s'inclut dans la cavité de l' α -CD et n'interagit plus avec l'ATP. Cette rupture d'interaction conduit à une baisse significative de l'émission de fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua (Figure 8.14). Comme étudié au chapitre précédent, le complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD est également fluorescent à haute concentration. Néanmoins, la fluorescence du complexe d'inclusion est beaucoup plus faible que celles des agrégats ATP/AzoDiGua. Ainsi, en utilisant l' α -CD comme un stimulus de désassemblage des agrégats ATP/AzoDiGua, nous avons été capables de contrôler la fluorescence du milieu réactionnel. Cette différence de fluorescence provient probablement de la nature différente de l'interaction entre d'une part l'AzoDiGua et l'ATP et d'autre part l'AzoDiGua et l' α -CD. Dans le cas de l'assemblage ATP/AzoDiGua, la fluorescence provient de l'agrégation de l'AzoDiGua au sein de l'assemblage avec l'ATP. Dans le cas du complexe hôte-invité AzoDiGua/ α -CD, la fluorescence provient probablement du blocage de conformation de l'AzoDiGua au sein de la cavité.

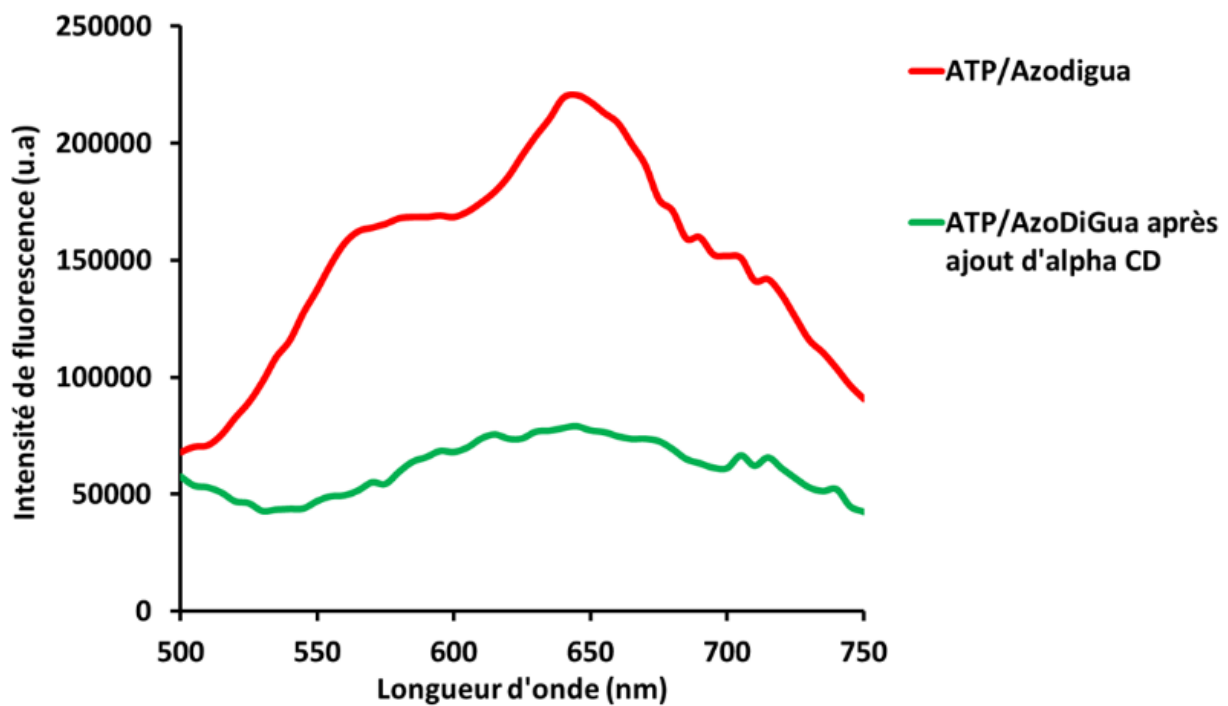


Figure 8.14- Spectre d'émission de fluorescence des agrégats ATP/AzoDiGua avant et 30 secondes après ajout d'une solution d'alpha CD (Excitation : 400 nm, [ATP] = 1 mM, [AzoDiGua] = 1 mM, [Tris HCl] = 50 mM, [alpha CD] = 2 mM)

3) Conclusion et perspectives

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'utilisation du complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD pour contrôler de manière dynamique des propriétés spécifiques de l'AzoDiGua, d'une part sa capacité d'intercalation dans l'ADN et de modulation de la température de fusion, d'autre part sa propriété à former des auto-assemblages supramoléculaires dynamiques en présence de la molécule d'intérêt biologique ATP.

La première stratégie a été d'exploiter les propriétés d'intercalation de l'AzoDiGua. L'AzoDiGua est capable de s'intercaler dans des brins d'ADN appariés et ainsi stabiliser le double brin en augmentant la température de fusion T_m de ce dernier. En ajoutant une α -CD, une compétition entre la complexation hôte-invité et l'intercalation opère. L'AzoDiGua s'inclut dans la cavité de l' α -CD et se désintercale de l'ADN. Ceci entraîne la diminution de la température de fusion T_m et permet ainsi de contrôler de manière isotherme l'assemblage de l'ADN par la complexation intercalant/ α -CD. Cette stratégie novatrice pourrait avoir des applications dans la libération contrôlée de molécules biologiques encapsulées dans la double hélice d'ADN, ou bien de contrôler des édifices élaborés basés sur l'appariement spécifique de l'ADN, comme les origamis d'ADN par exemple. Les perspectives de ce travail seraient d'étudier l'aspect « séquence-dépendant » de la désintercalation de l'AzoDiGua par l' α -CD en changeant le pourcentage de bases GC ou bien la longueur du double brin d'ADN.

La deuxième approche a été d'exploiter les propriétés d'assemblage de l'AzoDiGua. L'AzoDiGua est capable de former des assemblages supramoléculaires fluorescents avec l'ATP. En ajoutant une α -CD au système, l'interaction ATP/AzoDiGua se brise et l'AzoDiGua s'inclut dans la cavité hydrophobe de l' α -CD. Ceci conduit à un désassemblage des agrégats supramoléculaires ATP/AzoDiGua et à une perte de l'émission de fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua.

Ces stratégies consistent en un concept nouveau d'assemblages supramoléculaires dynamiques utilisant des cyclodextrines comme stimuli de complexation hôte-invité d'intercalants d'ADN bolaformes amphiphiles.

Conclusion de la partie C

Au cours de ce travail de thèse, nous avons caractérisé un nouveau complexe hôte-invité de type pseudo-rotaxane formé entre une α -cyclodextrine et un intercalant d'ADN photosensible, l'AzoDiGua. Des études structurales et thermodynamiques par spectroscopie UV-visible, RMN, dichroïsme circulaire et ITC ont permis de montrer que l'AzoDiGua s'incluait dans la cavité hydrophobe de l' α -cyclodextrine pour former un pseudo-rotaxane présentant des propriétés de chiralité. Des études par spectroscopie de fluorescence ont permis de mettre en évidence que le pseudo-rotaxane était fluorescent de par la conformation particulière de l'AzoDiGua au sein de la cavité. Enfin, une étude photodynamique par spectroscopie UV-visible, de fluorescence et dichroïsme circulaire a permis de confirmer que la conformation *cis* de l'AzoDiGua ne s'incluait pas dans l' α -cyclodextrine contrairement à la conformation *trans* permettant un photocontrôle original de la fluorescence et de la chiralité du pseudo-rotaxane.

Nous avons ensuite utilisé ce pseudo-rotaxane pour contrôler les propriétés d'intercalation de l'AzoDiGua et ainsi ses propriétés d'assemblage avec l'ADN double-brin ou des dérivés d'ADN. Dans un premier temps, nous avons exploité la complexation hôte-invité de l'AzoDiGua avec l' α -cyclodextrine pour contrôler dynamiquement et de manière isotherme l'hybridation d'un double brin d'ADN. Ce concept inédit a permis de montrer que l' α -cyclodextrine agissait comme un stimulus capable de modifier la température de fusion de l'ADN en désintercalant l'AzoDiGua de la double-hélice et ainsi de désapparer l'ADN à température constante. Cette stratégie pourrait avoir des applications en ingénierie moléculaire de l'ADN où le contrôle de l'hybridation d'ADN par différents stimuli est d'un grand intérêt pour piloter des processus biologiques ou supramoléculaires basés sur l'assemblage et le désassemblage de l'ADN, notamment dans le domaine des nanotechnologies structurales à ADN (origamis d'ADN, par exemple).

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à utiliser l' α -cyclodextrine comme un stimulus de désassemblage des agrégats ATP/AzoDiGua supramoléculaires étudiés dans la partie B. Nous avons pu montrer, par microscopie optique, spectroscopie de fluorescence et de dichroïsme circulaire, que l' α -cyclodextrine était capable d'induire une brisure d'interaction entre l'ATP et l'AzoDiGua par formation du pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -cyclodextrine en solution. Cette complexation a conduit à la dissociation des agrégats d'ATP/AzoDiGua en solution, une perte de la turbidité de la solution contenant les agrégats et également une baisse de la fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua. Cette stratégie pourrait avoir des applications biologiques en relargage d'ATP engagé dans des complexes supramoléculaires avec d'autres molécules capables de former des complexes d'inclusion avec des α -cyclodextrines biocompatibles.

Article en préparation : “Photoswitchable DNA intercalator/ α -cyclodextrin pseudo-rotaxane for dynamic DNA assembly at constant temperature”, O.Abodja, A.Walrant, S.Rudiuk, M.Morel, D.Baigl*

PARTIE D

Influence des interactions intermoléculaires de l'AzoDiGua sur les propriétés photochimiques de la proflavine

Dans cette partie, constituée d'un seul chapitre, nous allons nous intéresser à l'utilisation des deux assemblages supramoléculaires développés dans cette thèse (agrégats ATP/AzoDiGua et complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD pour) pour tenter de contrôler les propriétés photochimiques d'un fluorophore intercalant d'ADN : la proflavine. Dans une première partie, nous étudierons les propriétés de quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua. Dans une seconde partie, nous explorerons la capacité des propriétés d'auto-assemblage de l'AzoDiGua avec l'ATP ou de complexation hôte-invité avec une α -cyclodextrine à contrôler de manière dynamique la fluorescence de la proflavine.

Plan :

1) Photochimie supramoléculaire et présentation du projet.....	175
a) Les interactions intermoléculaires au service des propriétés photochimiques.....	175
b) Présentation de la stratégie du travail.....	176
α) La proflavine : un intercalant d'ADN fluorescent.....	176
β) Objectif et stratégie du travail	177
2) Quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua.....	178
a) La proflavine : une molécule fluorophore.....	178
b) L'AzoDiGua : une molécule quencher.....	179
α) Quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua.....	180
β) Mécanisme de quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua.....	181
β.1) Relation de Stern-Volmer.....	181
β.2) Application au quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua.....	182
γ) Photocontrôle du quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua.....	182
3) Contrôle des propriétés de quenching de l'AzoDiGua par les interactions intermoléculaires....	184
a) Par le coassemblage AzoDiGua/ATP.....	184
b) Par la complexation hôte-invité AzoDiGua/α-cyclodextrine.....	186

1) Photochimie supramoléculaire et présentation du projet

a) Les interactions intermoléculaires au service des propriétés photochimiques

Certains travaux de recherche s'intéressent à l'utilisation des interactions intermoléculaires pour moduler les propriétés photochimiques de fluorophores ¹⁷⁶. La propriété que de nombreux travaux ont explorée est la fluorescence. Une stratégie récemment développée consiste à exploiter la complexation hôte-invité (Figure 9.1.a). Lorsqu'un fluorophore est complexé au sein d'une cavité, ses propriétés de fluorescence ne sont pas les mêmes que lorsqu'il est libre. Ainsi en ajoutant une molécule analyte capable de se complexer avec la cavité, le fluorophore est libéré permettant d'avoir de nouvelles propriétés de fluorescence. Cette modulation de fluorescence par les interactions intermoléculaires hôte-invité a également été étendue aux assemblages supramoléculaires (Figure 9.1.b). Certains fluorophores peuvent en effet s'assembler en solution, par exemple sous forme de dimères. Ainsi, en ajoutant un analyte ayant une interaction avec le fluorophore, l'assemblage est brisé permettant de moduler l'émission de fluorescence du fluorophore.

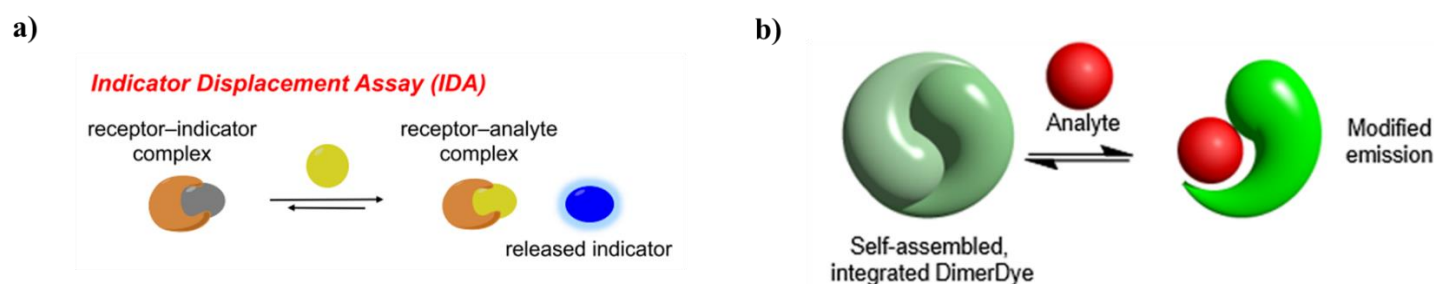


Figure 9.1-a) Modulation de fluorescence d'un chromophore par la complexation hôte-invité dynamique en présence d'un analyte ²⁷ **b)** Modulation de fluorescence d'un chromophore par l'autoassemblage supramoléculaire dynamique en présence d'un analyte ¹⁷⁷

Ces deux stratégies, basée d'une part sur la complexation hôte-invité et d'autre part sur l'autoassemblage, ont été appliquées à de nombreux systèmes moléculaires. En 2014, l'équipe de Peng développe un système de détection fluorescente du paraquat (Figure 9.2.a)¹⁷⁸. Pour ce faire, les auteurs ont utilisé un cucurbit[8]uril au sein duquel s'encapsulent deux molécules de bleu de méthylène. Cette inclusion quenche la fluorescence du bleu de méthylène. En présence de la molécule de paraquat, le bleu de méthylène est libéré de la cavité du cucurbit[8]uril afin que le paraquat s'inclue dans cette dernière. Le bleu de méthylène libre est donc capable d'émettre de la lumière par fluorescence constituant un moyen de détection de la molécule de paraquat. En 2018, l'équipe de Hof utilise la même stratégie pour suivre une réaction de méthylation d'un substrat catalysée par une enzyme (Figure 9.2.b)¹⁷⁷. Pour ce faire, les auteurs ont développé un calixarène capable de se dimériser en solution sous la forme d'un assemblage dimérique non fluorescent. Lorsque le substrat se méthyle en présence de l'enzyme, le produit issu de cette réaction s'inclue au sein du calixarène. Cette inclusion brise le dimère et permet au calixarène de fluorescer.

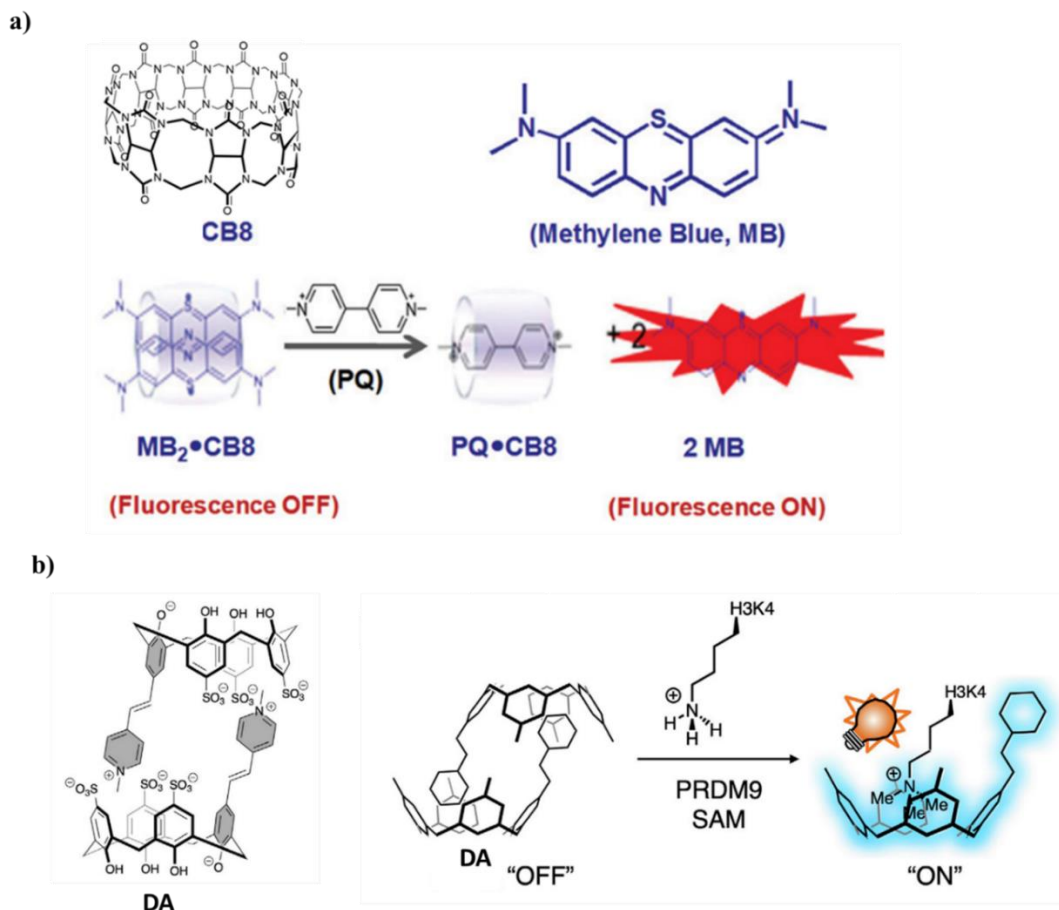


Figure 9.2- Stratégie de contrôle des propriétés photochimiques d'un chromophore **a)** par la complexation hôte-invité ¹⁷⁸ **b)** par l'assemblage supramoléculaire ¹⁷⁷.

b) Objectif du travail

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à contrôler les propriétés photochimiques d'un intercalant d'ADN fluorescent : la proflavine.

α) La proflavine : un intercalant d'ADN fluorescent

La proflavine est un dérivé d'acridine ayant des applications en chimiothérapie, photobiologie ou conversion de l'énergie solaire ¹⁷⁹. Il s'agit d'une molécule capable d'interagir avec d'autres molécules par interactions π , électrostatique et hydrogène de par sa structure moléculaire en solution aqueuse (Figure 9.3).

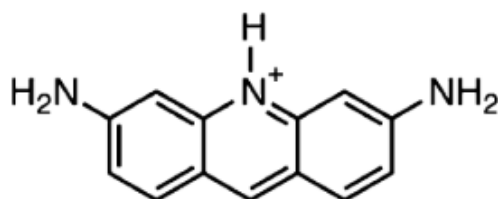


Figure 9.3- Structure moléculaire de la proflavine à pH=7 ¹⁸⁰

La proflavine est un intercalant d'ADN fluorescent. Ce dérivé d'acridine a la capacité de s'intercaler entre les bases de la double hélice de l'ADN voire également de G-quadruplexes^{181,182,183,184} et son émission de fluorescence est quenchée par intercalation (Figure 9.4)¹⁷⁹.

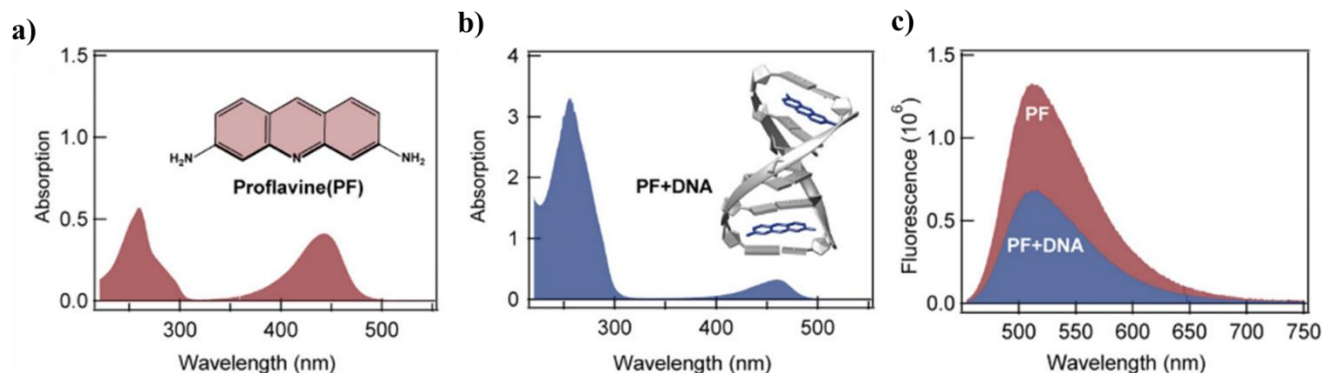


Figure 9.4-a) Spectre d'absorbance de la proflavine **b)** Spectre d'absorbance et représentation schématique de la proflavine s'intercalant dans l'ADN **c)** Spectre d'émission de fluorescence de la proflavine en présence d'ADN.

Adaptée de la référence¹⁷⁹.

β) Objectif et stratégie du travail

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé l'AzoDiGua comme une molécule quencher de la fluorescence de la proflavine. Nous nous sommes ensuite intéressés à contrôler dynamiquement les propriétés de quenching de l'AzoDiGua par les interactions intermoléculaires qu'il peut établir avec deux molécules, étudiées dans cette thèse : l'ATP et l' α -Cyclodextrine. En effet, l'AzoDiGua est capable de s'auto-assembler sous forme d'agrégats supramoléculaires avec la molécule d'ATP en solution (Cf chapitres B.2 et B.3). Ainsi, en faisant interagir l'ATP avec le complexe AzoDiGua/Proflavine, nous avons tenté d'étudier la possibilité d'inhiber le quenching de fluorescence de la proflavine par assemblage avec l'ATP afin de contrôler dynamiquement les propriétés photochimiques de la proflavine. La même stratégie a été étudiée avec l' α -Cyclodextrine. En effet, l'AzoDiGua est capable de former un complexe hôte-invité type pseudo-rotaxane avec l' α -Cyclodextrine comme montré dans la partie C. Ainsi, en ajoutant ce sucre au complexe AzoDiGua/Proflavine, nous avons également tenté d'étudier la possibilité d'inhiber le quenching de fluorescence de la proflavine par complexation hôte-invité afin de contrôler dynamiquement les propriétés photochimiques de la proflavine (Figure 9.5).

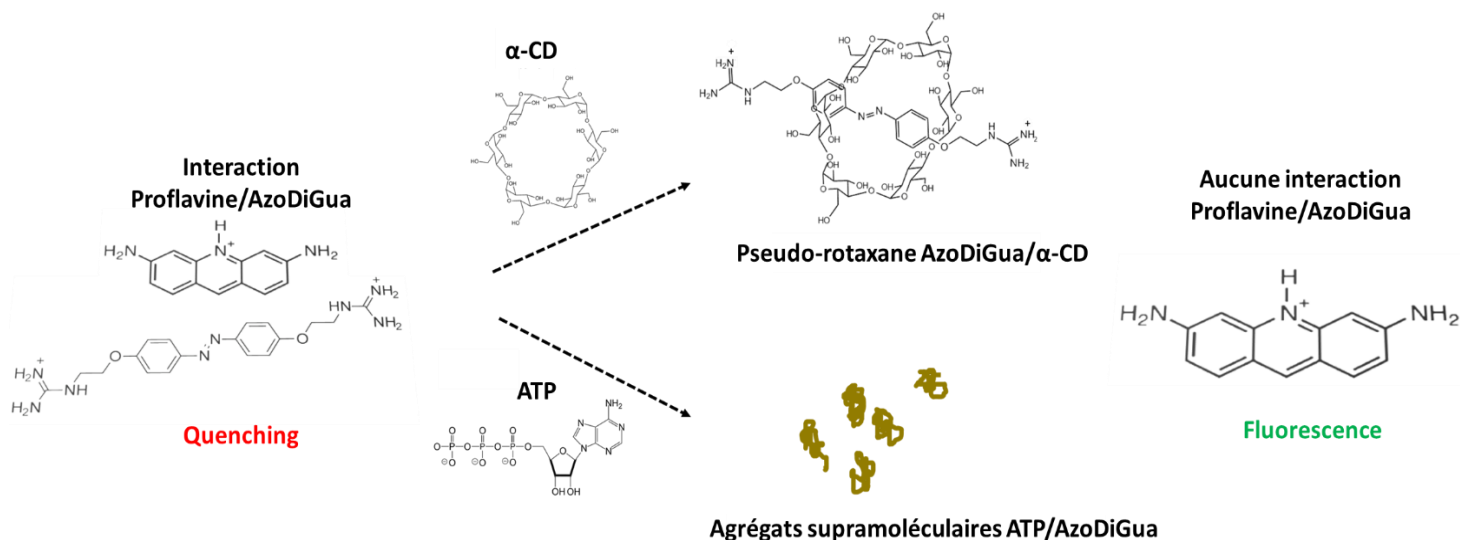


Figure 9.5- Stratégie générale de contrôle du quenching de fluorescence de la proflavine par les interactions intermoléculaires de l'AzoDiGua par formation d'un pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -CD (Stratégie n°1) ou d'agréats supramoléculaires ATP/AzoDiGua (Stratégie n°2).

2) Quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua

a) La proflavine : une molécule fluorophore

La proflavine possède deux bandes d'absorption. La première est située à 250 nm correspondant à une transition π - π^* et la deuxième est située à 445 nm correspondant à une transition n - π^* . Lorsque la molécule est excitée dans sa zone d'absorbance correspondant à la transition n - π^* , une émission de fluorescence est détectée avec un maximum d'émission vers 520 nm (Figure 9.6).

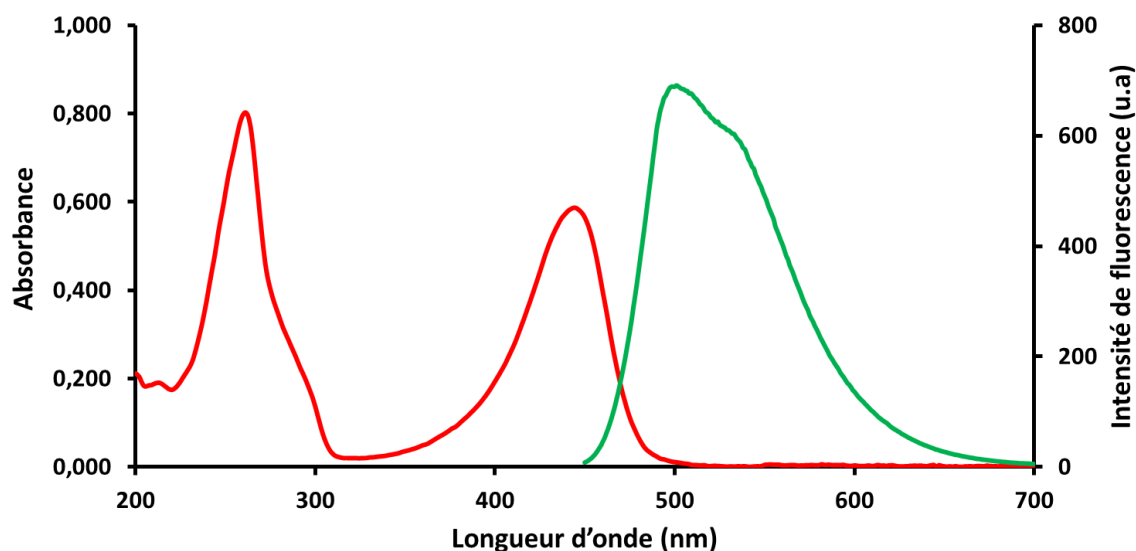


Figure 9.6- Spectre d'absorbance (rouge) et d'émission (excitation 420 nm) de fluorescence (vert) de la proflavine ([Proflavine] = 5 μ M and [Tris HCl] = 50 mM, pH = 7.4)

b) L'AzoDiGua : une molécule quencher

α) Quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua

L'AzoDiGua *Trans* est capable de quencher la fluorescence de la proflavine à haute concentration (Figure 9.7). Pour une concentration constante en proflavine (fluorophore), plus la concentration en AzoDiGua (quencher) augmente, plus l'intensité de fluorescence de la proflavine diminue. Le quenching de fluorescence est marqué pour des rapports $r = [\text{AzoDiGua}]/[\text{Proflavine}]$ élevé. En effet, l'intensité de fluorescence de la proflavine est divisée par deux en présence d'AzoDiGua lorsque $r=20$ et est quasi-nulle par rapport à l'intensité initiale lorsque $r = 100$.

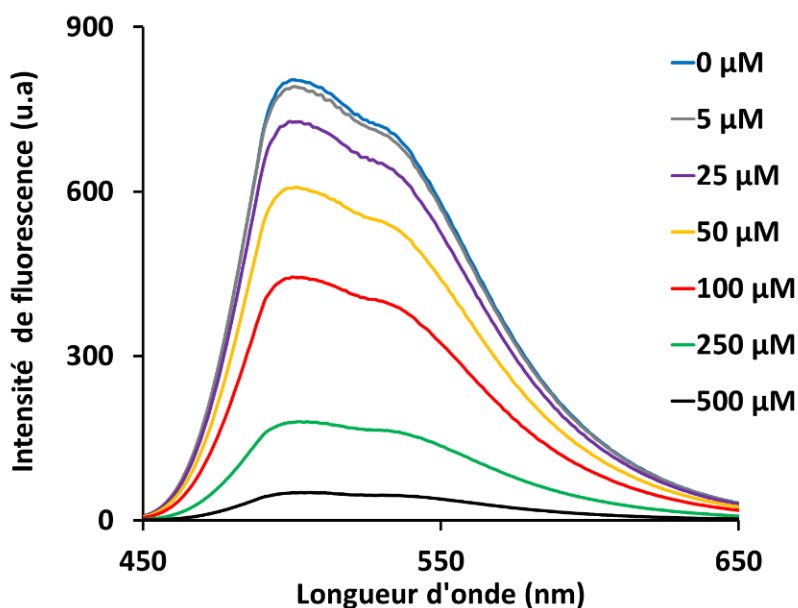


Figure 9.7- Spectre d'émission de fluorescence de la proflavine (5 µM) en présence de concentrations croissantes d'AzoDiGua (0, 5, 25, 50, 100, 250, 500 µM) (Excitation : 420 nm, [Tris HCl]=50 mM, pH=7.4)

β) Mécanisme de quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua

β.1) Relation de Stern-Volmer

Afin de mieux comprendre les propriétés de quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua, l'équation de Stern-Volmer, ci-après, a été utilisée :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + K_Q\tau_0[Q] \quad : \text{Relation de Stern-Volmer}$$

Avec F_0 l'intensité de fluorescence du fluorophore sans quencher, F l'intensité de fluorophore en présence d'une concentration $[Q]$ de quencher, $[Q]$ la concentration du quencher, K_{sv} la constante de Stern-Volmer, K_Q , la constante de quenching et τ_0 le temps de vie du fluorophore à l'état excité sans quencher.

Il existe principalement deux types de mécanisme de quenching : le quenching dynamique et le quenching statique¹⁸⁵. Le quenching statique correspond à la formation d'un complexe non fluorescent entre le

fluorophore et le quencher à l'état fondamental. Le quenching dynamique correspond, quant à lui, à l'interaction entre le quencher et le fluorophore à l'état excité. Le quenching dynamique dépend essentiellement de la diffusion moléculaire. Ainsi, en augmentant la température, le coefficient de diffusion et la constante de quenching dynamique augmentent. A l'inverse, la constante de quenching statique diminue avec la température car le complexe quencher-fluorophore devient instable à haute température.

β.2) Application au quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua

La linéarité de la relation de Stern-Volmer n'est pas vérifiée dans le cas du quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua (Figure 9.8.a). L'évolution du rapport des intensités de fluorescence en fonction de la concentration du quencher Q varie de manière exponentielle. Cette évolution signifie que le mécanisme de quenching est une combinaison entre un mécanisme statique et dynamique^{186,187}. Deux régimes mécanistiques peuvent être ainsi mis en évidence.

Tout d'abord, pour des faibles concentrations en AzoDiGua, la variation du rapport d'intensité de fluorescence F_0/F varie linéairement avec la concentration $[Q]$ de quencher (Figure 9.8.b). La relation de Stern Volmer a permis, pour ce régime linéaire, de déterminer la constante de Stern-Volmer $K_{SV}=8,14.10^3 M^{-1}$ et la constante de quenching $K_Q=8,14.10^{11} M^{-1}.s^{-1}$ en prenant $\tau_0=1.10^{-8} s$ ¹⁸⁸. L'ordre de grandeur de la constante de quenching K_Q correspond bien à un mécanisme de quenching statique ($>10^{10} M^{-1}.s^{-1}$)^{185,179} au cours duquel la proflavine et l'AzoDiGua forment un complexe non fluorescent à l'état fondamental qui après excitation retourne à son état fondamental sans émission de lumière. Puis, pour des plus hautes concentrations en AzoDiGua, le régime n'est plus linéaire et la loi de Stern-Volmer converge vers une loi exponentielle. Ce second régime correspond probablement à un mécanisme de quenching dynamique¹⁸⁹.

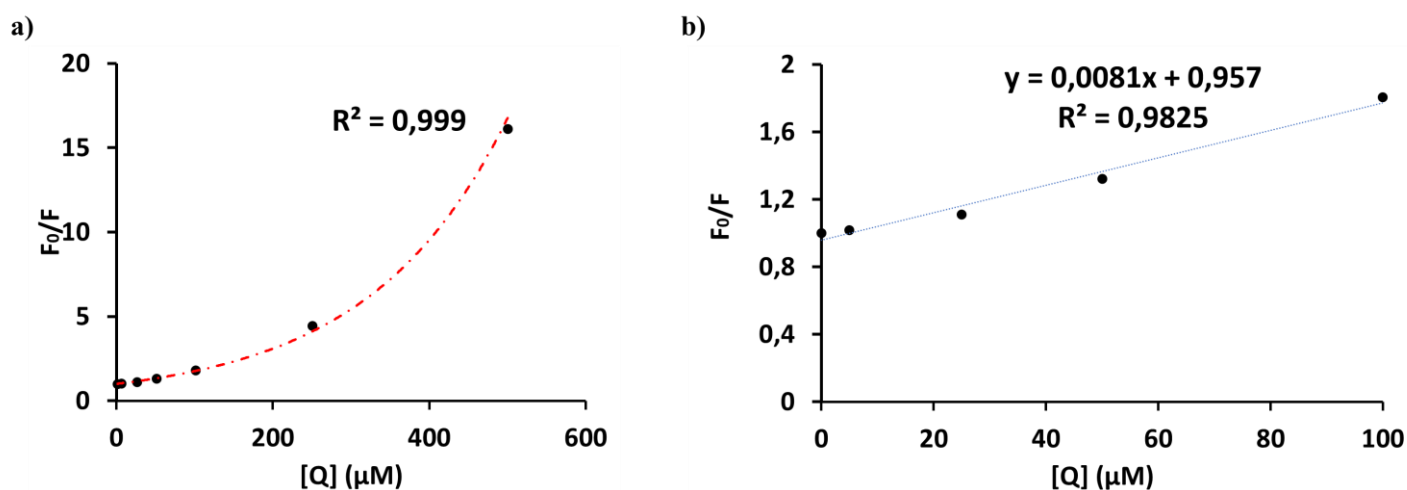


Figure 9.8-a) Evolution du rapport d'intensité de fluorescence de la proflavine F_0/F en fonction de la concentration en AzoDiGua quencher $[Q]$. **b)** Evolution linéaire de la relation de Stern-Volmer pour $[Q]$ comprise entre 0 et 100 μM . ([Proflavine] = 5 μM dans le tampon [Tris-HCl] = 50 mM, T = 25 °C).

y) Photocontrôle du quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua

Le photocontrôle du quenching de la proflavine par la photoisomérisation de l'AzoDiGua a été étudiée. Pour ce faire, nous avons d'abord étudié la possibilité de l'AzoDiGua *Trans* de se photoisomériser en AzoDiGua *Cis* en présence de proflavine (Figure 9.9). Lorsqu'un mélange équimolaire proflavine-AzoDiGua est irradié par de la lumière UV pendant 5 minutes, la bande d'absorption large à 360 nm du mélange Proflavine-AzoDiGua, correspondant à la transition $\pi-\pi^*$ de l'AzoDiGua *Trans*, disparaît au profit d'une nouvelle bande d'absorption à 315 nm correspondant à la transition $\pi-\pi^*$ de l'AzoDiGua *Cis*. Cette caractéristique spectroscopique prouve que, sous irradiation UV, l'AzoDiGua *Trans* est capable de se photoisomériser en AzoDiGua *Cis* en présence de la molécule de proflavine.

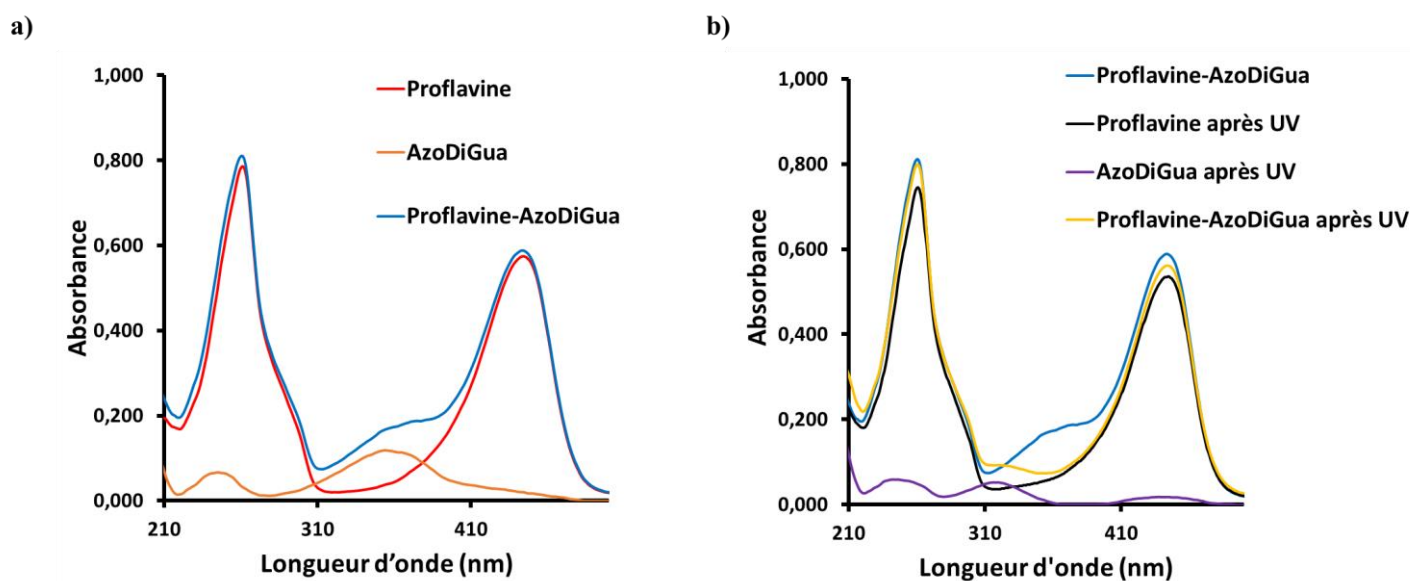


Figure 9.9- a) Spectre d'absorbance de la proflavine, de l'AzoDiGua et du mélange équimolaire proflavine-AzoDiGua.

b) Spectre d'absorbance de la proflavine, de l'AzoDiGua et du mélange proflavine-AzoDiGua après irradiation UV ([Proflavine] = 5 μM ; [AzoDiGua] = 5 μM ; solutions réalisées dans le tampon [Tris HCl] = 50 mM, Excitation UV : 365 nm, 24 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)

L'AzoDiGua *Trans* (500 μM) est capable de quencher la fluorescence de la proflavine (5 μM) (Figure 9.10.a) comme étudié ci-avant. Lorsque le mélange AzoDiGua *Trans*-proflavine est irradié par de la lumière UV pendant une dizaine de minutes, l'AzoDiGua *Trans* se photoisomériser en AzoDiGua *Cis*. Après irradiation UV, la fluorescence de la proflavine augmente légèrement mais reste toujours quenchée (Figure 9.10.b). Ceci prouve que l'AzoDiGua *Cis* est également capable de quencher la fluorescence de la proflavine. Ainsi, aucun photocontrôle de la fluorescence du dérivé d'acridine n'est possible car les deux conformations *Trans* et *Cis* sont capables de quencher la fluorescence de la proflavine. Néanmoins, il est à noter que l'AzoDiGua *Trans* quenche davantage que son conformère *Cis* la fluorescence de la proflavine.

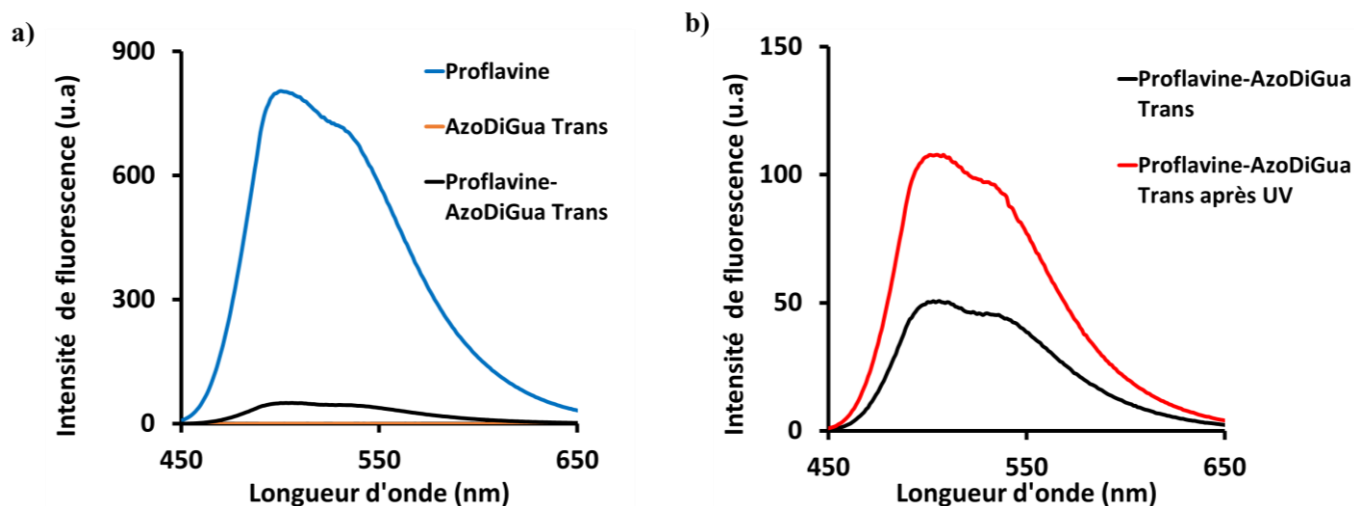


Figure 9.10-a) Spectre d'émission de fluorescence (Excitation : 420 nm) de la proflavine, de l'AzoDiGua *Trans*, du mélange proflavine-AzoDiGua *Trans*. **b)** Spectre d'émission de fluorescence (Excitation : 420 nm) du mélange proflavine-AzoDiGua *Trans* avant et après irradiation UV ([AzoDiGua] = 500 μ M ; [Proflavine] = 5 μ M ; solutions réalisées dans [Tris HCl] = 50 mM ; Excitation UV : 365 nm, 24 mW.cm⁻²)

3) Contrôle des propriétés de quenching de l'AzoDiGua par les interactions intermoléculaires

Afin de contrôler les propriétés photochimiques de la proflavine, nous avons tenté d'exploiter les propriétés d'assemblage de l'AzoDiGua. Ce dérivé d'azobenzène est capable de former un assemblage supramoléculaire avec l'ATP et un complexe d'inclusion, type pseudo-rotaxane, avec l' α -CD. Ainsi, grâce à la formation de ces édifices, nous avons tenté de contrôler dynamiquement les propriétés de quenching de la proflavine par l'AzoDiGua.

a) Par le coassemblage AzoDiGua/ATP

Afin de contrôler la fluorescence de la proflavine par l'assemblage ATP/AzoDiGua, nous nous sommes dans un premier temps assuré que les agrégats supramoléculaires d'ATP/AzoDiGua se forment en présence de proflavine. La proflavine n'impacte pas la capacité de co-assemblage entre l'ATP et l'AzoDiGua en solution (Figure 9.11). En effet, l'observation au microscope optique du mélange ATP/AzoDiGua en présence de proflavine a permis de mettre en évidence la formation des agrégats micrométriques ATP/AzoDiGua en une dizaine de minutes. Ainsi, la proflavine n'impacte pas les capacités d'assemblage de l'AzoDiGua avec l'ATP.

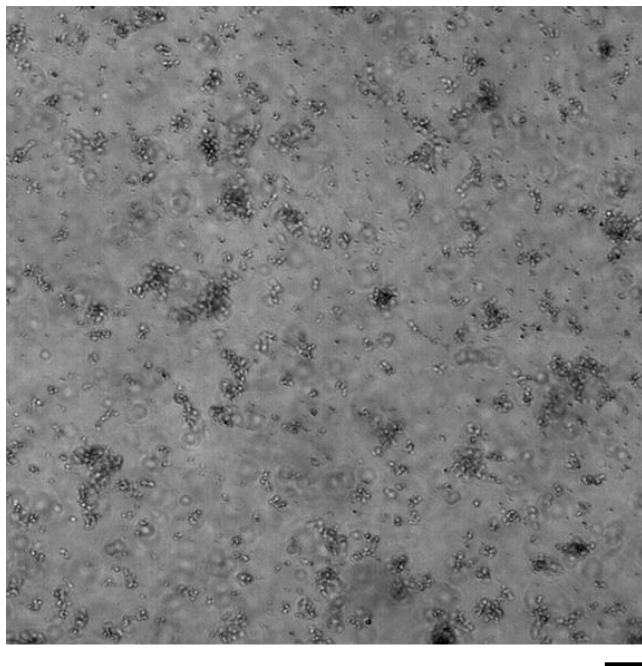


Figure 9.11- Observation au microscope optique du mélange ATP/AzoDiGua en présence de proflavine après 10 minutes ($[AzoDiGua] = 1 \text{ mM}$; $[ATP] = 1 \text{ mM}$; $[Proflavine] = 10 \text{ }\mu\text{M}$; solutions réalisées dans $[Tris \text{ HCl}] = 50 \text{ mM}$; la barre d'échelle représente $20 \text{ }\mu\text{m}$)

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la capacité de contrôler le quenching de fluorescence de la proflavine par l'AzoDiGua par assemblage avec l'ATP. Pour ce faire, la fluorescence de la proflavine a été suivie au cours du temps en présence du mélange ATP/AzoDiGua (Figure 9.12). En présence de l'excès d'ATP, la fluorescence de la proflavine diminue légèrement tandis qu'en présence de l'excès d'AzoDiGua, la fluorescence de la proflavine est totalement quenchée comme étudiée ci-avant. Le quenching de fluorescence de la proflavine par l'ATP et par l'AzoDiGua est stable au cours du temps. En présence des agrégats ATP/AzoDiGua, la fluorescence de la proflavine est toujours quenchée et est stable au cours du temps. De manière intéressante, l'intensité de fluorescence mesurée est inférieure à celle du mélange AzoDiGua/Proflavine. Elle provient ainsi à la fois du quenching par l'ATP et par l'AzoDiGua, majoritairement, qui s'assemblent en solution. Ainsi, le coassemblage ATP/AzoDiGua ne permet pas d'empêcher l'interaction AzoDiGua/proflavine car l'AzoDiGua est toujours capable de quencher la fluorescence de la proflavine tout en s'assemblant avec l'ATP en solution sous forme d'agrégats supramoléculaires. De plus, il en résulte un effet coopératif entre l'ATP et l'AzoDiGua qui agissent collectivement et synergiquement pour quencher la fluorescence de la proflavine par formation des agrégats ATP/AzoDiGua.

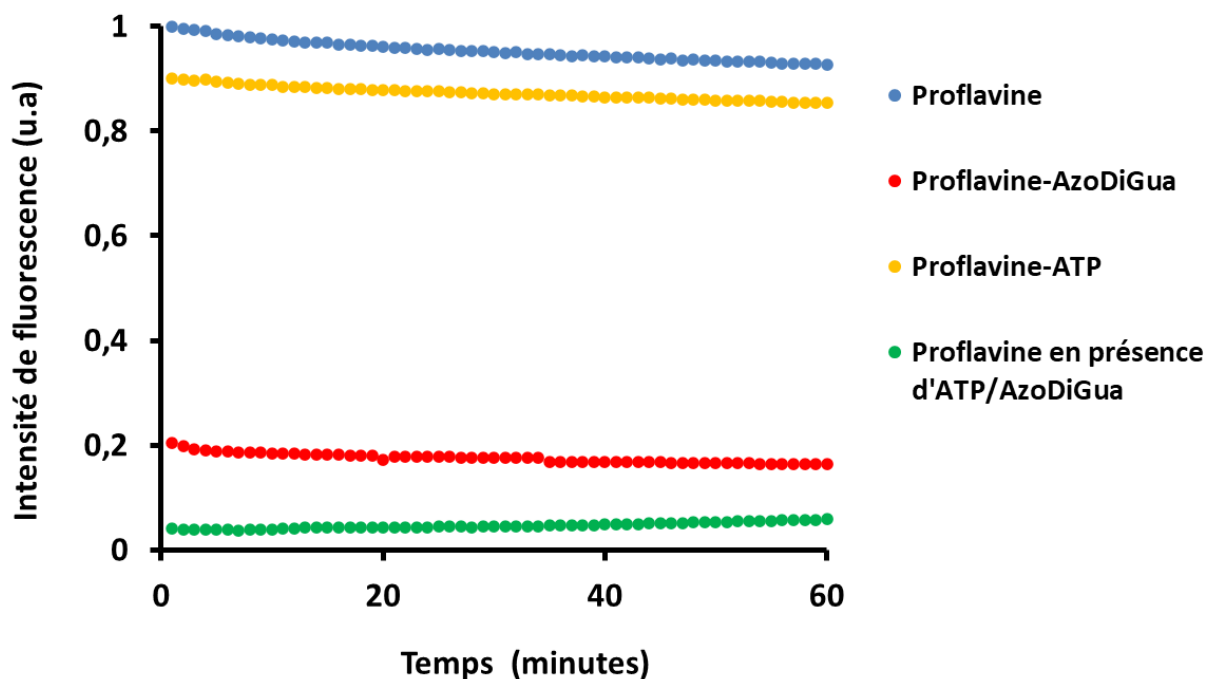


Figure 9.12- Evolution au cours du temps de l'intensité de fluorescence à 520 nm (Excitation 470 nm) normalisée de la proflavine, du mélange proflavine/AzoDiGua, proflavine/ATP et proflavine/ATP/AzoDiGua ([Proflavine] = 10 μ M ; [AzoDiGua] = 1 mM ; [ATP] = 1 mM ; solutions réalisées dans [Tris HCl] = 50 mM (pH=7.4).

b) Par la complexation hôte-invité AzoDiGua/ α -Cyclodextrine

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à une autre stratégie de contrôle des propriétés de quenching de la proflavine par l'AzoDiGua autre que l'autoassemblage en solution étudiée ci-avant. Cette stratégie consiste à exploiter la capacité de l'AzoDiGua à former un pseudo-rotaxane avec une α -CD. Ainsi, en ajoutant une α -CD au complexe Proflavine-AzoDiGua, nous avons tenté de contrôler le quenching de fluorescence de la Proflavine par complexation hôte-invité.

L'acridine existe sous deux formes : la forme protonée (AcH^+) et la forme basique (Ac). La proflavine a un pKa de 8,2. Ainsi, à pH=7,4, la proflavine est sous forme protonée (Figure 9.13). En 2015, l'équipe de Pal s'intéresse à la complexation de l'acridine au sein de la cavité d'une cyclodextrine et à l'intercalation de ce dernier dans un double brin d'ADN¹⁹⁰. Les auteurs ont montré, en contrôlant le pH et par conséquent la structure moléculaire du fluorophore, que l'acridine sous sa forme protonée AcH^+ s'intercale dans l'ADN et ne se complexe pas avec la cyclodextrine tandis que la forme basique Ac se complexe avec la cyclodextrine mais ne s'intercale pas dans l'ADN. Ceci s'explique par des arguments purement électrostatiques. En effet, lorsque le pH diminue (4.5), l'acridine se protone et préfère s'intercaler dans l'ADN par attraction électrostatique. A l'inverse, lorsque le pH augmente (8.0), l'acridine n'est pas protonée et préfère se complexer à la cyclodextrine par effet hydrophobe.

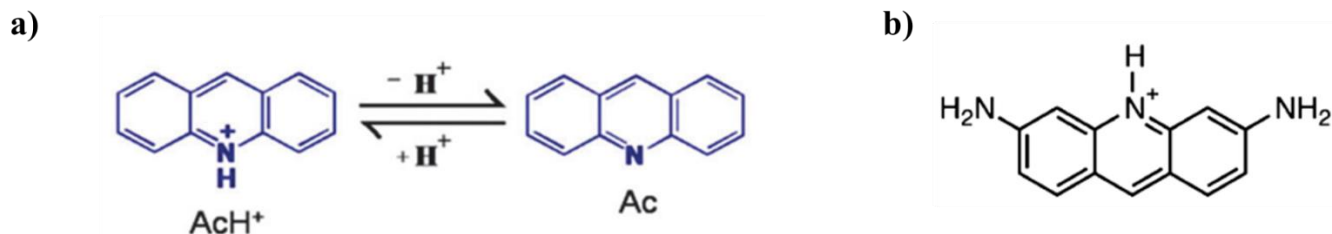


Figure 9.13-a) Structure moléculaire protonée et basique de l'acridine en solution aqueuse¹⁹⁰ **b)** Structure moléculaire de la proflavine à pH=7.4 en solution aqueuse¹⁸¹

Les molécules d'AzoDiGua et de proflavine sont toutes les deux chargées positivement. Néanmoins, la charge positive est délocalisée sur le cycle aromatique pour la proflavine et sur les extrémités guanidinium pour l'AzoDiGua. Ainsi, en ajoutant une α -CD au complexe AzoDiGua-Proflavine, nous avons étudié la possibilité de détruire ce complexe par formation du pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -CD et ainsi empêcher l'AzoDiGua de quencher la fluorescence de la proflavine.

La fluorescence de la proflavine diminue très légèrement en présence d'un excès d' α -CD ce qui prouve que cette dernière n'a pas d'influence sur le quenching de fluorescence de la proflavine (Figure 9.14.a). Lorsque la proflavine est en présence d'un mélange équimolaire en excès d'AzoDiGua et d' α -CD, l'intensité de fluorescence du dérivé d'acridine est deux fois plus intense que celle du mélange AzoDiGua-Proflavine mais n'atteint pas l'intensité de fluorescence initiale de la Proflavine (Figure 9.14.b). Cette observation reflète une baisse de l'efficacité de quenching de l'AzoDiGua en présence d' α -CD. A 500 μ M, le complexe d'inclusion AzoDiGua/ α -CD est formé en solution, comme étudié par dichroïsme circulaire (Figure 7.4, Chapitre C.1). Ainsi, en ajoutant l' α -CD au complexe Proflavine-AzoDiGua, l'AzoDiGua se complexe à l' α -CD pour former un pseudo-rotaxane. Cette complexation permet d'isoler l'AzoDiGua de la proflavine et ainsi de probablement détruire le complexe Proflavine-AzoDiGua à l'origine du quenching de fluorescence de la proflavine. Cette brisure d'interaction Proflavine-AzoDiGua permet à cette dernière de fluorescer d'où l'augmentation de l'intensité de fluorescence. Néanmoins, l'intégralité de la fluorescence de la proflavine n'est pas retrouvée. Ceci peut s'expliquer par deux arguments hypothétiques. Tout d'abord, il est probable qu'une faible fraction du complexe AzoDiGua-Proflavine se dissocie par ajout de l' α -CD et qu'ainsi une faible proportion de molécules d'AzoDiGua se retrouve complexée à l'alpha CD. Deuxièmement, il est également probable que l'AzoDiGua complexé à l' α -CD soit toujours capable de quencher la fluorescence de la proflavine de par la disposition de la molécule d'AzoDiGua au sein de la cavité étudiée par RMN au chapitre C.1. Il est à noter que la proflavine peut également se complexer à l' α -CD et qu'une compétition de complexation entre l'AzoDiGua et la proflavine s'effectue en solution. Néanmoins, l' α -CD ne quenche pas la fluorescence de la proflavine (Figure 9.14). Ainsi, en tirant profit de cette propriété, même si la proflavine se complexe à l' α -CD à la place de l'AzoDiGua, l'interaction Proflavine-AzoDiGua sera également brisée permettant à la proflavine de fluorescer.

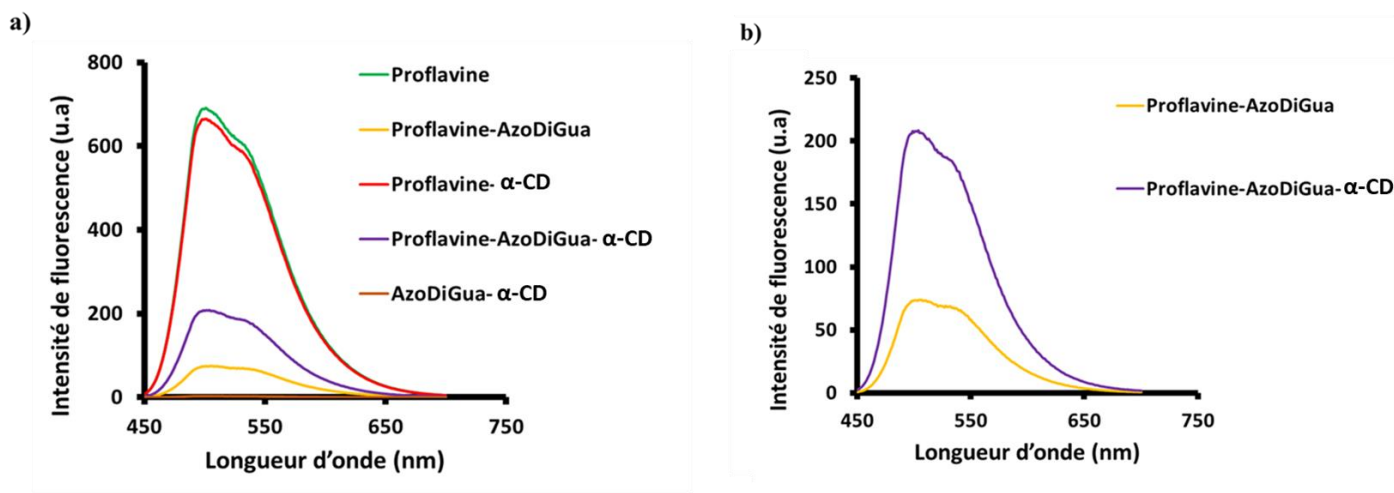


Figure 9.14-a) Spectre d'émission de fluorescence de la Proflavine, du mélange Proflavine/AzoDiGua, Proflavine/ α -CD, Proflavine/AzoDiGua/ α -CD et AzoDiGua/ α -CD. **b)** Zoom sur les spectres d'émission de fluorescence du mélange Proflavine-AzoDiGua et Proflavine-AzoDiGua- α -CD. ([Proflavine] = 5 μ M ; [AzoDiGua] = 500 μ M ; [α CD] = 500 μ M ; solutions réalisées dans [Tris-HCl] = 50 mM, Excitation : 420 nm)

Conclusion de la partie D

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés aux propriétés de quenching de fluorescence de l'AzoDiGua. L'AzoDiGua *Trans* est capable de quencher la fluorescence de la proflavine selon un mécanisme à la fois statique et dynamique selon la régression Stern-Volmer. Une étude photochimique a permis de mettre en évidence que l'AzoDiGua *Cis* est également capable de quencher la fluorescence de la proflavine mais de manière moins efficace que l'AzoDiGua *Trans*, ce qui empêche d'avoir un photocontrôle de la fluorescence de la proflavine. Nous nous sommes ensuite intéressés à la capacité de contrôler dynamiquement les propriétés de quenching de l'AzoDiGua par les interactions intermoléculaires. Dans un premier temps, nous avons tenté d'exploiter la capacité de l'AzoDiGua à former des agrégats en solution en présence d'ATP. Ainsi, nous avons pu montrer que la formation du co-assemblage ATP/AzoDiGua en solution ne permet pas de briser l'interaction AzoDiGua-Proflavine mais qu'elle quench la fluorescence de la proflavine par synergie de l'action de l'ATP et de l'AzoDiGua. Dans un second temps, nous avons étudié l'influence de la formation du pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -cyclodextrine sur les propriétés de quenching de l'AzoDiGua. Nous avons montré que l'ajout d' α -cyclodextrine au complexe Proflavine-AzoDiGua vient en partie en compétition avec les interactions AzoDiGua-Proflavine conduisant à une légère augmentation de l'intensité de fluorescence de la proflavine reflétant une baisse de l'efficacité de quenching de l'AzoDiGua.

Afin de compléter cette étude, une étude thermodynamique et structurale (constante d'association, inclusion du dérivé d'acridine au sein de la cavité) de l'interaction possible entre la proflavine et l' α -cyclodextrine doit être menée et doit être comparée à celle qui a été menée avec l'AzoDiGua. Cette stratégie de contrôle de la fluorescence par les interactions intermoléculaires (auto-assemblage et complexe hôte-invité) pourrait également être étendue à d'autres types de fluorophores pour fabriquer des systèmes stimulables ayant de potentielles applications en détection.

Conclusion générale de la thèse

Cette thèse s'est articulée autour de trois projets.

Nous avons tout d'abord étendu un concept initié par notre laboratoire visant à combiner des intercalants d'ADN avec des dérivés d'ADN au-delà de la double hélice afin de développer des co-assemblages fonctionnels et stimulables. Nous avons ainsi pu montrer que l'AzoDiGua, intercalant d'ADN photosensible, et l'ATP, nucléotide d'importance énergétique, sont capables de s'assembler spontanément en solution dans des conditions biocompatibles sous la forme d'agrégats supramoléculaires micrométriques. Ces co-assemblages se sont avérés être fluorescents induit par l'agrégation de l'AzoDiGua. Nous avons ensuite caractérisé leur réponse dynamique à différents stimuli tirant profit des propriétés chimiques et physiques de l'AzoDiGua et l'ATP. Ces agrégats se sont ainsi avérés être sensibles à la lumière (photo-isomérisation de l'AzoDiGua), à l'ajout d'ions métalliques (chélation de l'ATP), l'activité enzymatique (hydrolyse enzymatique de l'ATP) et à des cyclodextrines (complexe hôte-invité AzoDiGua/cyclodextrine). Au-delà des propriétés obtenues avec ces nouveaux assemblages dynamiques particuliers, nous montrons avec cette partie l'intérêt plus général, et le potentiel, d'associer un intercalant d'ADN photosensible avec une brique de co-assemblage d'intérêt biologique. L'intérêt de cette approche est de pouvoir obtenir des assemblages dynamiques impliquant la brique biologique-cible sans avoir besoin de modifier celle-ci de manière covalente.

Dans une seconde partie, nous avons exploité les propriétés d'intercalation de l'AzoDiGua et cherché un nouveau principe de contrôle dynamique de ce phénomène afin de contrôler de manière originale l'hybridation et la fusion d'ADN. Pour ce faire, nous avons caractérisé la structure et les propriétés physico-chimiques (fluorescence, chiralité, photoswitchabilité) d'un pseudo-rotaxane formé de l'AzoDiGua et d'une α -cyclodextrine. Ce pseudo-rotaxane a ensuite été utilisé pour contrôler l'assemblage de l'ADN à température constante. Cette stratégie d'assemblage par hybridation/melting d'ADN utilisant une cyclodextrine comme stimulus est un concept inédit exploitant les propriétés de complexation hôte-invité d'intercalant d'ADN bolaformes amphiphiles. Nous pensons que cette stratégie pourrait être appliquée au relargage de biomolécules ou encore au design de structures d'ADN complexes dynamiques.

Dans une dernière partie, nous avons mis en évidence la capacité de l'AzoDiGua *Trans* et *Cis* à quencher la fluorescence de la proflavine. Nous avons ensuite tenté de contrôler dynamiquement les propriétés photochimiques de la proflavine par les propriétés d'assemblage de l'AzoDiGua sous la forme d'agrégats ATP/AzoDiGua et d'un complexe hôte-invité AzoDiGua/ α -cyclodextrine.

Publications et conférences

Ce travail de thèse a conduit à deux publications en préparation et deux présentations de mes travaux de thèse en conférence.

2 articles en préparation :

- “*Photoswitchable DNA intercalator/ α -cyclodextrin pseudo-rotaxane for dynamic DNA assembly at constant temperature*”, O.Abodja, N.Touati, M.Morel, S.Rudiuk, D.Baigl*
- “*ATP/Azobenzene-guanidinium self-assembly into fluorescent and multi stimuli- responsive supramolecular aggregates*”, O.Abodja, A.Walrant, S.Rudiuk, M.Morel, D.Baigl*

2 présentations en conférence :

- Conférence internationale ICNI 2022 (International Conference on Non-covalent Interactions)- Université de Strasbourg, Strasbourg, 18-22 juillet 2022
Poster et communication orale flash : “ATP/AzoDiGua self-assembly into fluorescent stimuli-responsive supramolecular aggregates”
- Workshop PSL Soft and Living Matter days 2023 - Université PSL, Paris, 3-6 juillet 2023
Poster: “Photoswitchable DNA intercalator/ α -cyclodextrin pseudo-rotaxane for dynamic DNA assembly at constant temperature”

PARTIE EXPERIMENTALE

MATERIELS

Produits chimiques utilisés

L'AzoDiGua a été synthétisée selon une procédure publiée par notre laboratoire ⁶⁴. Les différents autres produits utilisés ont été achetés sur Sigma Aldrich. De la Milli-Q water (Millipore, 18.2 MΩ.cm) a été utilisée pour toutes les expériences.

Instruments utilisés

Microscope optique à transmission et de fluorescence

Les observations au microscope optique à transmission et par fluorescence ont été réalisées sur un Axio Observer Z1, Zeiss équipé d'une caméra EMCCD (Evolve 512, Photometrics) et de différents filtres optiques dont les détails sont donnés dans la méthode.

Spectrophotomètre d'absorption UV-visible et de fluorescence

Les mesures d'absorbance ont été réalisées sur un spectromètre de laboratoire Eppendorf BioSpectrometer dans une cuve de 10 mm d'épaisseur. Les spectres de fluorescence d'excitation et d'émission des chapitres B.2, B.3, C.2, C.3 et D.2 ont été acquis sur un lecteur de plaques Tecan Spark fluorimeter. Les spectres de d'émission de fluorescence du chapitre D ont été acquis sur un spectromètre JASCO FP8550.

Photocontrôle

Les mesures d'irradiation ont été réalisées grâce à une cool LED équipée d'une fibre optique (precisExcite) possédant une excitation UV (365 nm, Puissance : 24 mW.cm⁻²) et bleue (435 nm, 112 mW.cm⁻²).

Spectromètre RMN

Les spectres RMN 1D et 2D ¹H ont été réalisés dans l'oxyde de deutérium D₂O grâce à un spectromètre RMN bruker de 300 MHz acquis sur le logiciel Topsin. Les spectres RMN 1D et 2D obtenus ont été traités sur le logiciel Mestrenova.

Spectromètre RPE

Les spectres RPE ont été réalisés à basse température T=110K dans l'azote liquide. Les détails d'acquisition pour chaque spectre sont donnés ci-dessous :

Component	Frequence (GHz)	Puissance (mW)	Modulation d'amplitude (G)	Nombre de scans
ATP (1 mM)	9,2611	10	6	3
AzoDiGua (1 mM)	9,2687	10	6	3
Cu(NO ₃) ₂ (2 mM)	9,2641	10	6	3
AzoDiGua (1 mM)/ ATP (1 mM)	9,2687	10	6	2
Cu(NO ₃) ₂ (2 mM)/ATP (1 mM)	9,2613	10	6	2
Cu(NO ₃) ₂ (2 mM)/AzoDiGua (1 mM)	9,2682	10	6	2
ATP (1 mM)/AzoDiGua (1 mM)/Cu(NO ₃) ₂ (2 mM)	9,2641	10	6	3

Spectromètre de dichroïsme circulaire

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été réalisés sur un spectromètre JASCO J815 à température ambiante T=25°C avec une vitesse de balayage de 200 nm/min dans une cuvette en quartz d'épaisseur 1 mm contenant la solution étudiée.

Titration calorimétrique isotherme

Les thermogrammes ont été effectués à température ambiante T=25°C grâce à un calorimètre Ta instruments NanoITC. Les traitements post-mesures ont été réalisés sur le logiciel NanoAnalyze.

Machine QPCR (quantitative polymerase chain reaction)

Les courbes de melting de l'ADN ont été réalisées sur une qPCR QuantStudio5.

METHODES ET PROTOCOLES

CHAPITRE B.2

○ Préparation et observation au microscope optique et de fluorescence d'une solution d'agrégats ATP/AzoDiGua

Une solution aqueuse fraîche d'ATP (50 mM), d'AzoDiGua (5 mM) et de Tris HCl (100 mM) ont été préparées. 2 μ L de solution d'ATP (1 mM), 20 μ L de la solution d'AzoDiGua (1 mM) et 50 μ L de la solution de Tris HCl (50 mM) ont été dilués dans 28 μ L d'eau à température ambiante $T=25^{\circ}\text{C}$ pour atteindre un volume total de 100 μ L. La solution est ensuite immédiatement observée au microscope optique de transmission et de fluorescence grâce à une plaque de puits en plastique. Les observations par microscopie de fluorescence ont été réalisées en utilisant un filtre optique d'excitation et d'émission bien précises (Exc : 475/40 nm, Emission : 500-800 nm). Les agrégats s'agrègent progressivement à l'échelle de la minute et les différentes mesures et caractérisation ont été faites une dizaine de minutes après le mélange de l'AzoDiGua et l'ATP pour des concentrations fixées (1 mM pour chaque molécule) et un pH fixe ([Tris HCl]=50 mM, pH=7.4).

○ Acquisition des spectres de fluorescence d'excitation et d'émission des agrégats ATP/AzoDiGua

Les spectres d'excitation (Emission : 650 nm) et d'émission (Excitation : 400 nm) ont été réalisés sur 100 μ L d'une solution fraîchement préparée d'ATP et AzoDiGua et acquis une dizaine de minutes après le mélange entre l'ATP et l'AzoDiGua. Pour ce faire, une solution fraîche d'ATP/AzoDiGua a été préparée. Après une dizaine de minutes, l'ensemble de la solution est versé dans un puits d'une microplaque de mesure et les spectres de fluorescence sont immédiatement acquis.

CHAPITRE B.3

○ Photocontrôle de l'assemblage et du désassemblage de l'ATP et de l'AzoDiGua

La photoréponse des agrégats ATP/AzoDiGua a été étudiée et observée au microscope optique à transmission. Pour ce faire, une solution fraîche d'agrégats ATP/AzoDiGua a été préparée et versée dans un puits d'une microplaque. Après une dizaine de minutes, la solution est irradiée par de la lumière UV grâce un filtre optique du microscope (Filtre Sirius EBFP2, Longueur d'onde : 395/25 nm , Puissance : 26 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) pendant 3

minutes. La même solution est ensuite réirradiée par de la lumière bleue grâce à un filtre optique du microscope (Filtre GFP Chroma 39002, Longueur d'onde : 480/30 nm , Puissance : 40 mW.cm⁻²) pendant 3 minutes. Un spectre de fluorescence de chaque solution est ensuite directement acquis selon la procédure ci-dessus.

○ **Photocontrôle**

La photoréponse (turbidité des solutions) des agrégats ATP/AzoDiGua a été étudiée avec une cool LED équipée d'une fibre optique (precisExcite). Pour ce faire, les agrégats d'ATP/AzoDiGua ont été fraîchement préparés. Après une dizaine de minutes d'assemblage en solution, la solution contenant le mélange ATP/AzoDiGua est irradiée alternativement par de la lumière UV (Excitation : 365 nm, Puissance : 24 mW.cm⁻²) et bleue (Excitation : 435 nm, Puissance : 112 mW.cm⁻²) pendant 3 minutes en focalisant le faisceau de la fibre optique sur la surface de la solution. Les photographies des différents tubes de turbidité différentes ont été effectuées aussitôt l'irradiation terminée. La photoréponse de l'AzoDiGua (spectre UV-visible d'absorption et d'émission de fluorescence de l'AzoDiGua *cis* et *trans*) a été étudiée de la même manière avec des solutions d'AzoDiGua fraîchement préparées.

○ **Etude de la chélation de l'ATP par les ions Cu²⁺ par microscopie optique, spectroscopie de fluorescence et spectroscopie RPE**

Une solution d'agrégats d'ATP/AzoDiGua de 100 µL est fraîchement préparée selon la procédure décrite ci-avant. 4 µL d'une solution aqueuse de nitrate de cuivre Cu(NO₃)₂, fraîchement préparée (50 mM) et passée sous ultrasonication pendant 10 minutes, est ajoutée au mélange ATP/AzoDiGua de manière à avoir un rapport [Cu²⁺]/[ATP]=2 (en négligeant l'effet de la faible dilution). Le mélange est homogénéisé en pipetant successivement la solution 3 fois. Les mesures de fluorescence, les spectres RPE ainsi que les observations au microscope optique ont été effectuées aussitôt l'ajout de cuivre réalisé avec les mêmes solutions.

○ **Etude de l'hydrolyse enzymatique des agrégats ATP/AzoDiGua**

L'enzyme Alkaline phosphatase (10 U/µL) a été utilisée sans modification. 100 µL d'une solution d'agrégats ATP/AzoDiGua a été fraîchement préparée. Après une dizaine de minutes, 5 µL de la solution d'enzyme livrée ont été prélevés et ajouté à 100 µL de la solution d'agrégats ATP/AzoDiGua. Les mesures de fluorescence ainsi que les observations au microscope optique ont été effectuées aussitôt l'ajout de l'enzyme réalisé.

CHAPITRE C.2

○ **Synthèse du complexe d'inclusion type pseudo-rotaxane AzoDiGua/ α -CD**

Le complexe d'inclusion est formé dans l'eau tamponnée au Tris HCl (50 mM) à température ambiante $T=25^{\circ}\text{C}$. Pour ce faire, une solution fraîche d'AzoDiGua et d'alpha cyclodextrine sont préparées. Les différentes solutions de concentration désirée ont été préparées par dilution de ces deux solutions mères.

○ **Tracé des thermogrammes par titration calorimétrique isotherme (ITC)**

L'étude thermodynamique et calorimétrique du complexe d'inclusion a été réalisée par titration isotherme calorimétrique (ITC). La mesure a été effectuée à température ambiante $T=25^{\circ}\text{C}$. La cellule de mesure a été préalablement lavée à l'eau et au tampon Tris HCl puis remplie par une solution d'AzoDiGua (1 mM) pour un volume $V=1\text{ mL}$. La seringue d'injection est remplie par une solution d'alpha (ou beta) cyclodextrine (10 mM) pour un volume $V=250\ \mu\text{L}$. Les deux solutions sont tamponnées au Tris HCl (50 mM). Après équilibration thermique du calorimètre, des injections de $10\ \mu\text{L}$ sont effectuées avec un intervalle de mesure de 5 minutes pour un total de 25 injections sous agitation mécanique (400 rpm).

○ **Transfert de chiralité photocontrôlé par dichroïsme circulaire et fluorescence photocontrôlée**

Un mélange d'AzoDiGua ($500\ \mu\text{M}$) et d'alpha-cyclodextrine ($500\ \mu\text{M}$) dans un tampon Tris HCl (50 mM) est fraîchement préparé et versé dans une cuvette en quartz de 1 mm d'épaisseur. Cette dernière est irradiée par de la lumière UV (Exc : 365 nm) puis par de la lumière bleue (Exc : 435 nm) grâce à la fibre optique de la cool LED pendant 5 minutes. La cuve est immédiatement placée dans le spectromètre de dichroïsme circulaire afin d'acquérir un spectre après irradiation UV et bleue.

La fluorescence photocontrôlée a été étudiée de la même manière. Un mélange d'AzoDiGua ($500\ \mu\text{M}$) et d'alpha-cyclodextrine ($500\ \mu\text{M}$) dans un tampon Tris HCl (50 mM) est fraîchement préparé pour un volume total de $100\ \mu\text{L}$ et est versé dans un puits d'une microplaque de mesure. Après irradiation UV et bleue pendant 5 minutes (Cool LED, Excitation UV : 365 nm, Excitation bleu : 435 nm), la microplaque est insérée rapidement dans le lecteur de plaques et un spectre d'émission de fluorescence est acquis. Cette mesure est répétée pour trois cycles.

CHAPITRE C.3

○ **Etude du désassemblage des agrégats ATP/AzoDiGua par l'alpha-cyclodextrine**

Une solution d'agrégats ATP/AzoDiGua de 100 μL a été fraîchement préparée selon la procédure décrite ci-avant. 10 μL d'une solution aqueuse d'alpha cyclodextrine fraîchement préparée (20 mM) et passée sous ultrasonication pendant 5 minutes, est ajoutée au mélange ATP/AzoDiGua de manière à avoir un rapport [alpha-cyclodextrine]/[AzoDiGua]=2 (en négligeant l'effet de la faible dilution). Le mélange est homogénéisé en pipetant successivement la solution 3 fois. Les spectres de fluorescence, de dichroïsme circulaire ainsi que les observations au microscope optique ont été effectuées aussitôt l'ajout d'alpha-cyclodextrine dans la solution d'ATP/AzoDiGua réalisé.

○ **Tracé des courbes de melting de l'ADN par FRET**

Les courbes de melting de l'ADN ont été réalisées par mesure FRET. L'intensité de fluorescence de l'accepteur et du donneur est mesurée respectivement à 550 et 682 nm pour une longueur d'onde d'excitation de 520 nm. Les solutions ci-après sont fraîchement préparées dans un bain de glace. Un volume de 20 μL de solution est préparé avec la composition suivante : [Tris HCl]=10 mM, [AzoDiGua]=50 μM , [NaCl]=75 mM, [Plateforme d'ADN]=1 μM , [alpha CD]= 0 ; 50 ; 250 ; 500 ; 1250 ; 2500 ; 5000 μM . Les intensités de fluorescence sont mesurées à chaque température de 4 à 97°C avec un chauffage de 1°C/5 s. La séquence hairpin (présentée au chapitre B.3) contient 5 paires de base de 100% de paires Guanine-Cytosine.

CHAPITRE D

○ **Spectres de fluorescence de la proflavine**

Les spectres de fluorescence de la proflavine en présence d'AzoDiGua ou d' α -Cyclodextrine ont été réalisés à température ambiante et dans l'eau tamponnée au Tris HCl (50 mM, pH=7.4). L'excitation de fluorescence est de 420 nm et les largeurs d'émission et d'excitation du spectromètre sont de 2,5 nm.

ANNEXES

Chapitre annexe.....	201
Annexe 1.....	205
Annexe 2.....	206
Annexe 3.....	207
Annexe 4.....	208
Annexe 5.....	209
Annexe 6.....	210
Annexe 7.....	211

Chapitre annexe : Interaction C-di-nucléotides/ Intercalant d'ADN

Dans ce chapitre, nous avons exploré l'interaction entre l'AzoDiGua, intercalant d'ADN et des di-nucléotides cycliques (C-di-nucléotides) pour former des assemblages supramoléculaires complexes. Après un bref état de l'art sur les C-di-nucléotides comme briques de construction d'édifices complexes, nous présenterons les quelques résultats obtenus.

1) Des C-di-nucléotides aux assemblages supramoléculaires

a) Les C-di-nucléotides

Les C-di-nucléotides sont une classe de molécules signaux permettant de réguler la formation de biofilms bactériens à l'origine d'infections sévères^{191,192,193,194}. Ils sont constitués de deux nucléotides monophosphates liés par une liaison phosphodiester pour former un composé cyclique. Ces molécules sont au nombre de quatre : 2,3'-CGAMP, CGAMP, C-di-GMP et C-di-AMP (avec A=adénosine, G= Guanosine, C= Cyclique).

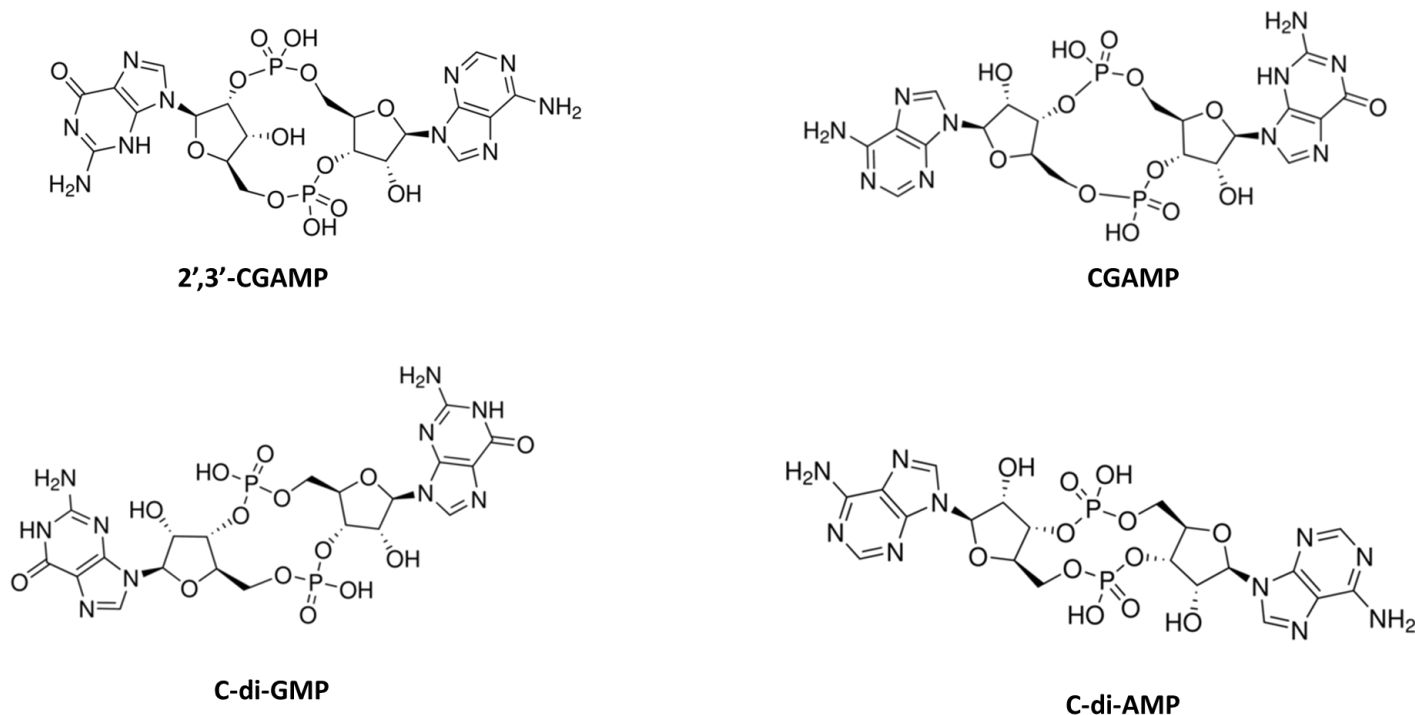


Figure 10.1- Structures moléculaires des 4 molécules C-di-nucléotides

b) Assemblages à base de C-di-nucléotides et objectif du travail

La capacité des C-di-nucléotides à former des assemblages supramoléculaires étendus a été très peu explorée dans la littérature. Les C-di-GMP, riches en guanine, ont été étudiés pour leur capacité à induire la formation de G-quadruplexes en présence de certaines molécules planes et aromatiques^{195,196,197,198,199}. En 2011, l'équipe de Sintim montre que l'interaction entre la C-di-GMP et le thiazole orange aromatique induit la formation d'un G-quadruplexe¹⁹⁵. Le dérivé aromatique devient fluorescent lorsqu'il s'assemble avec la C-di-GMP constituant

un système de détection par fluorescence de la molécule de thiazole orange (Figure 10.2.a). Les C-di-AMP ont, quant à eux, été très peu explorés. En 2014, l'équipe de Sintim développe un complexe supramoléculaire combinant la C-di-AMP et la coralyne²⁰⁰. La C-di-AMP est ainsi capable d'isoler la coralyne des ions halogénures, par complexation, qui sont capables de quencher la fluorescence de la coralyne permettant la détection de C-di-AMP (Figure 10.2.b)

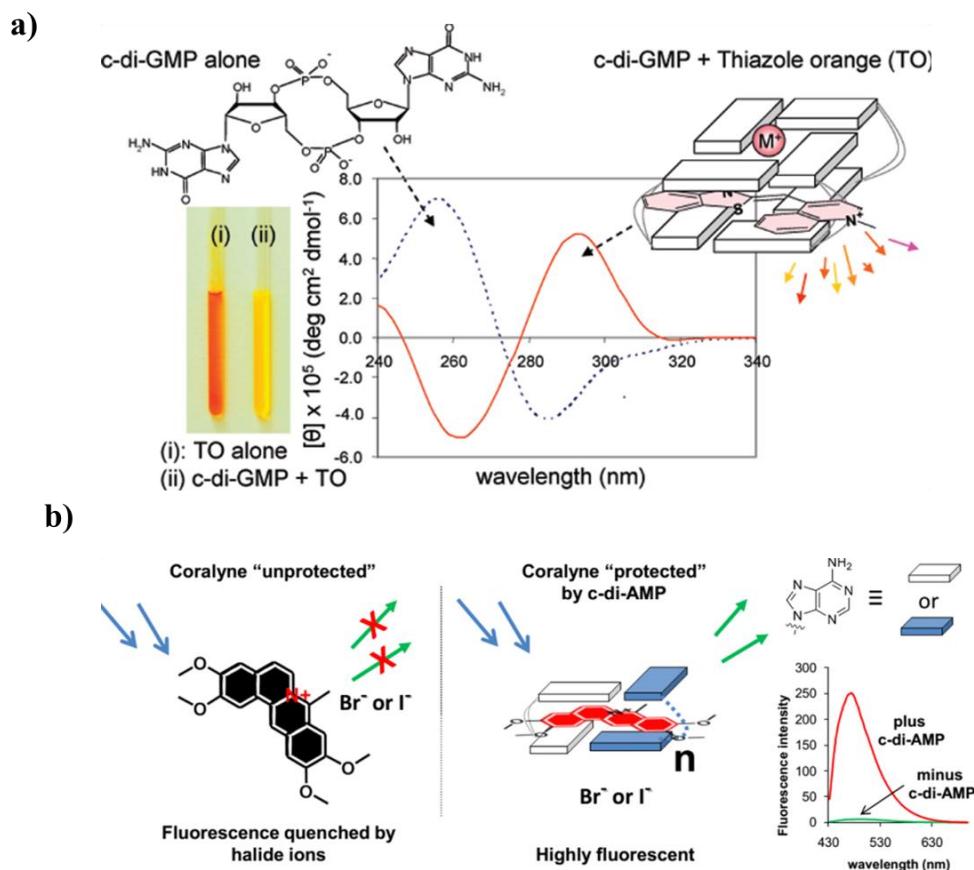


Figure 10.2- a) Formation de G-quadruplexes en présence de C-di-GMP et de thiazole orange¹⁹⁵ b) Formation d'un complexe supramoléculaire en présence de C-di-AMP et de coralyne²⁰⁰

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la possible formation d'assemblages entre l'AzoDiGua, intercalant d'ADN et des C-di-nucléotides.

2) Résultats et discussion

L'AzoDiGua est capable de s'autoassembler en solution avec la C-di-AMP, la C-di-GMP et la CGAMP. Les objets formés sont de taille micrométrique et se forment instantanément et spontanément à température ambiante et pH physiologique. Tout comme les agrégats ATP/AzoDiGua, l'assemblage s'agrège progressivement à l'échelle de la minute. De manière assez surprenante, la 2'-3'-CGAMP ne s'assemble pas avec l'AzoDiGua contrairement à son homologue CGAMP. Ainsi, la position du phosphate formant le cycle entre les deux nucléobases ainsi que la symétrie de la molécule semblent jouer un rôle (Figure 10.3).

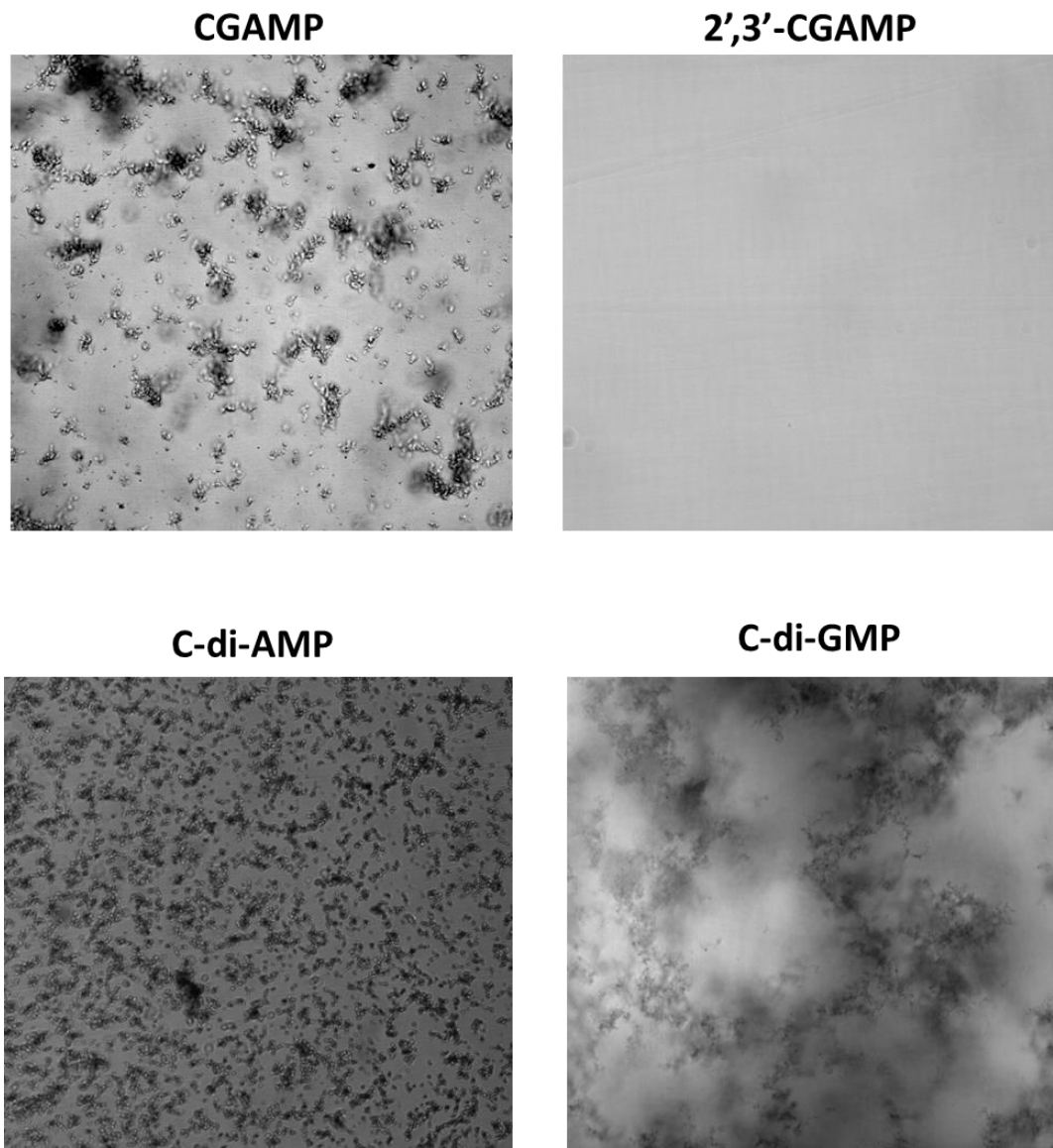


Figure 10.3- Observation au microscope optique du mélange AzoDiGua/C-di-nucléotide au bout de 10 minutes de mélange ($[AzoDiGua]=1\text{ mM}$, $[C\text{-di-nucléotide}]=1\text{ mM}$, $[Tris\ HCl]=50\text{ mM}$, Echelle : $20\ \mu\text{m}$).

Les assemblages formés avec la C-di-AMP, C-di-GMP et CGAMP sont fluorescents (Figure 10.4). L'assemblage AzoDiGua/CGAMP est beaucoup moins fluorescent que celui formé par les C-di-GMP et C-di-AMP. Le mélange AzoDiGua/2'-3'-CGAMP ne donne quant à lui aucun signal de fluorescence. La fluorescence émerge probablement de l'agrégation de l'AzoDiGua au sein de l'assemblage avec les C-di-nucléotides. La symétrie des C-di-nucléotides semble également jouer un rôle dans la fluorescence induite par agrégation de l'AzoDiGua. En effet, la C-di-GMP et C-di-AMP, symétriques, induisent une fluorescence de l'AzoDiGua de plus grande intensité que celle de la CGAMP.

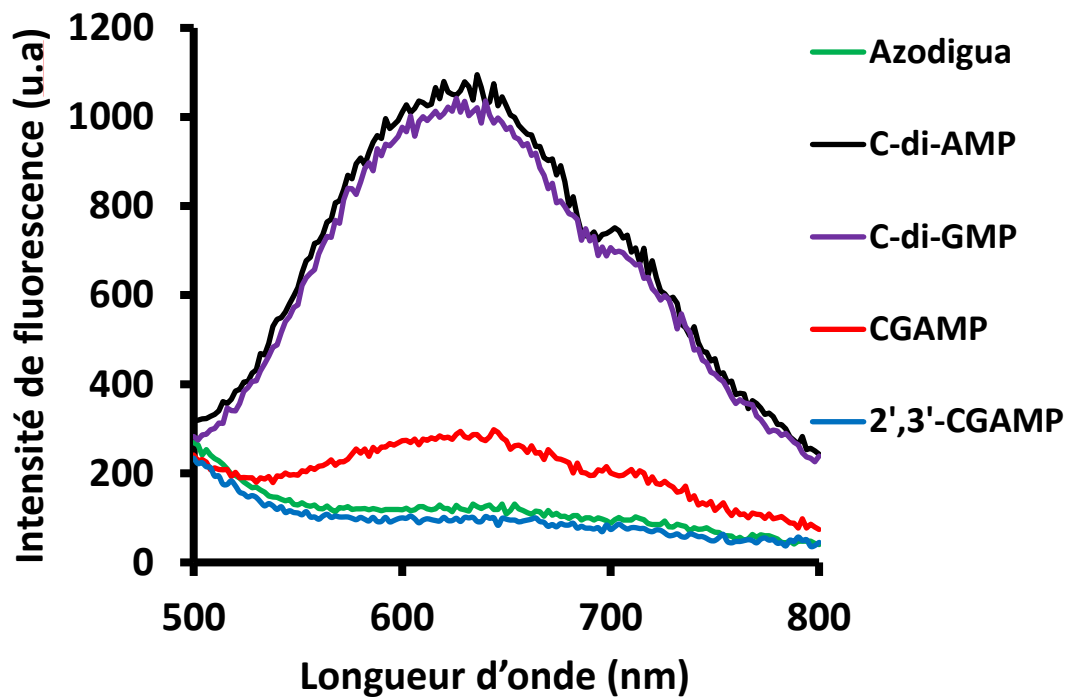
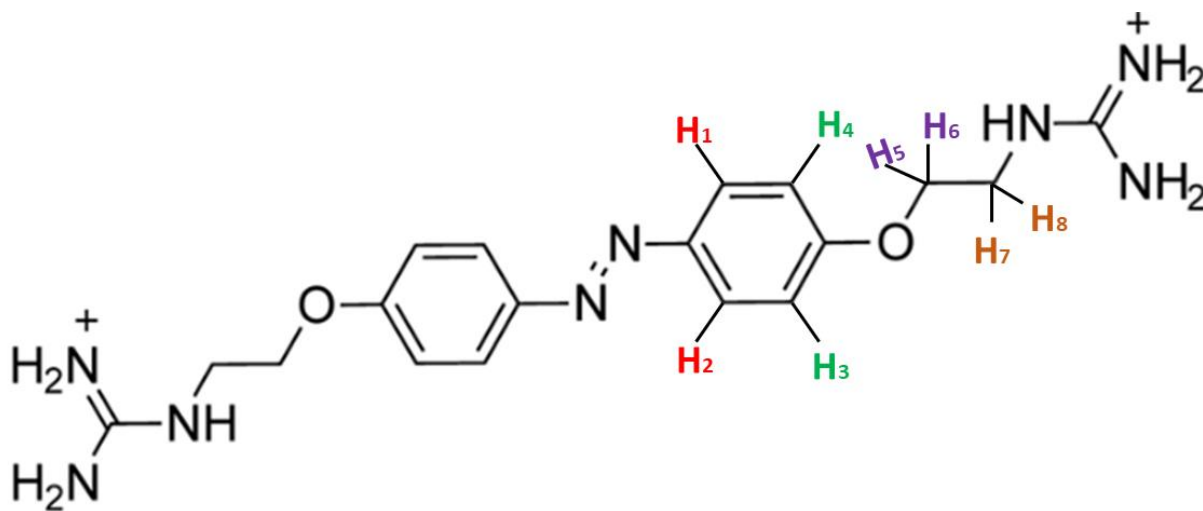
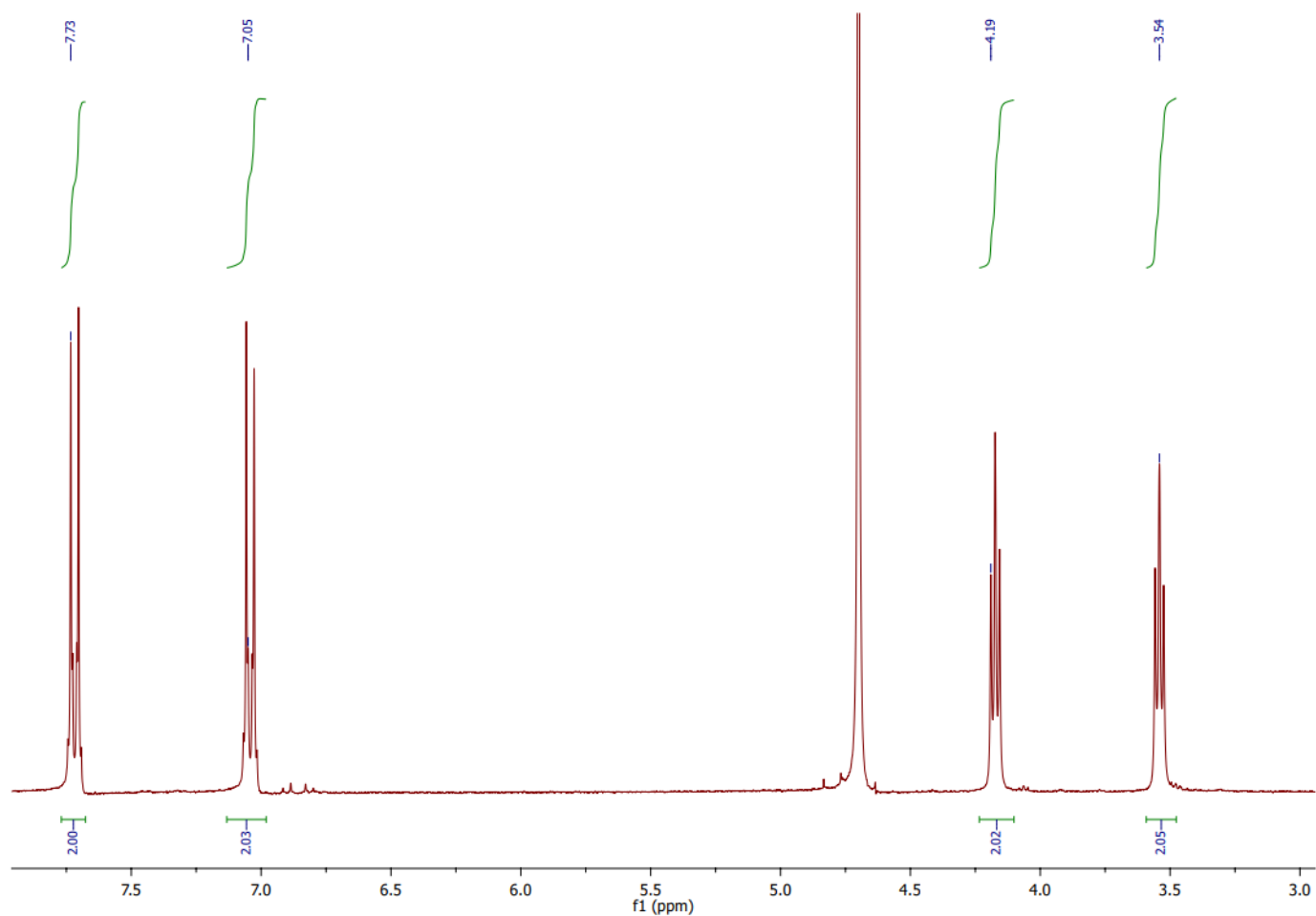


Figure 10.4- Spectre d'émission de fluorescence du mélange AzoDiGua/C-di-nucléotide (Excitation : 400 nm, [AzoDiGua]=1 mM, [C-di-nucléotide]=1 mM, [Tris HCl]=50 mM)

Annexe 1 : Spectre RMN ^1H 1D de l'AzoDiGua ($[\text{AzoDiGua}] = 5 \text{ mM}$, D_2O , 300 MHz)



^1H RMN (300 MHz, D_2O) : 4,81 (D_2O), 7,73 (doublet, 2H, H₃-H₄) , 7,05 (doublet, 2H, H₁-H₂) , 4,19 (triplet, 2H, H₅-H₆), 3,54 (triplet, 2H, H₇-H₈)

Annexe 2 : Spectre RMN ^1H 1D de l' α -CD ($[\alpha\text{-CD}] = 5 \text{ mM}$, D_2O , 300 MHz)

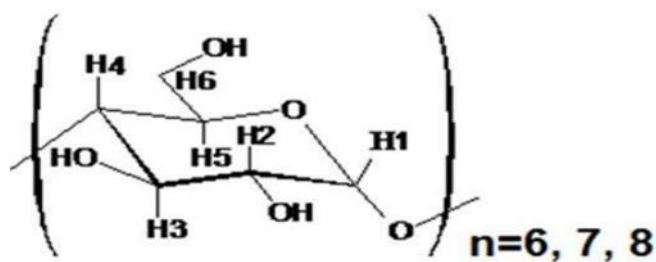
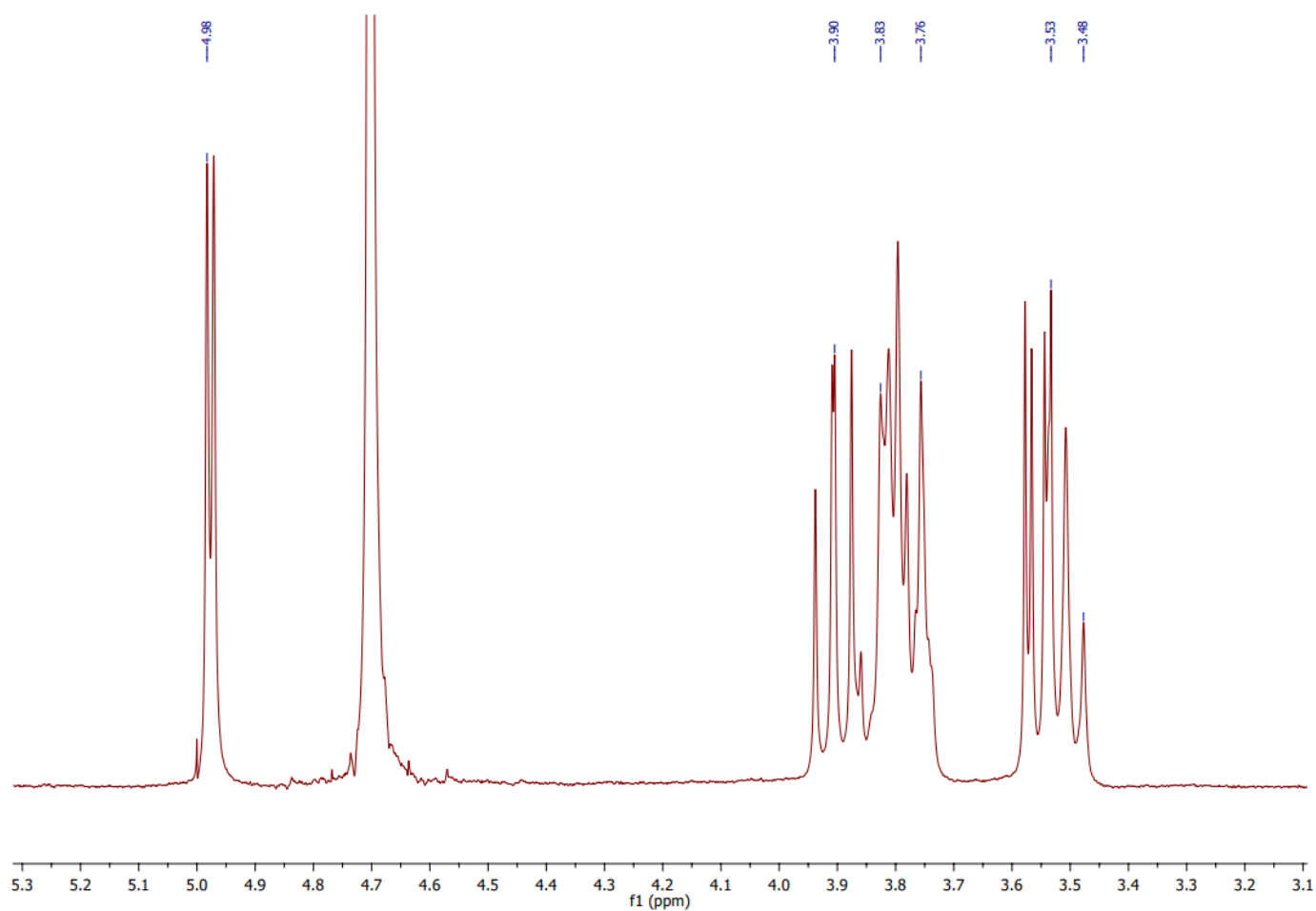
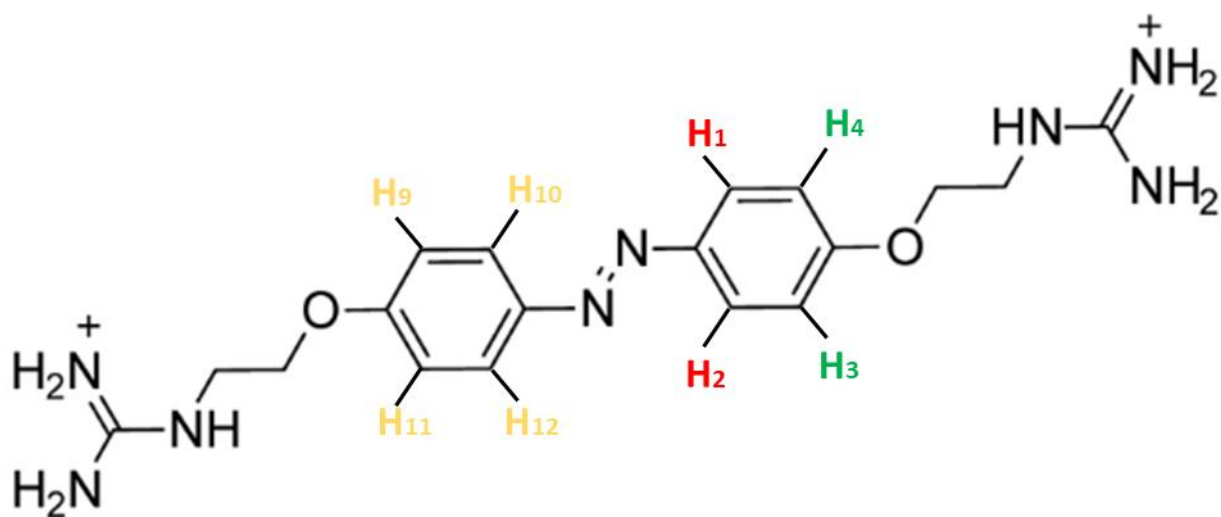
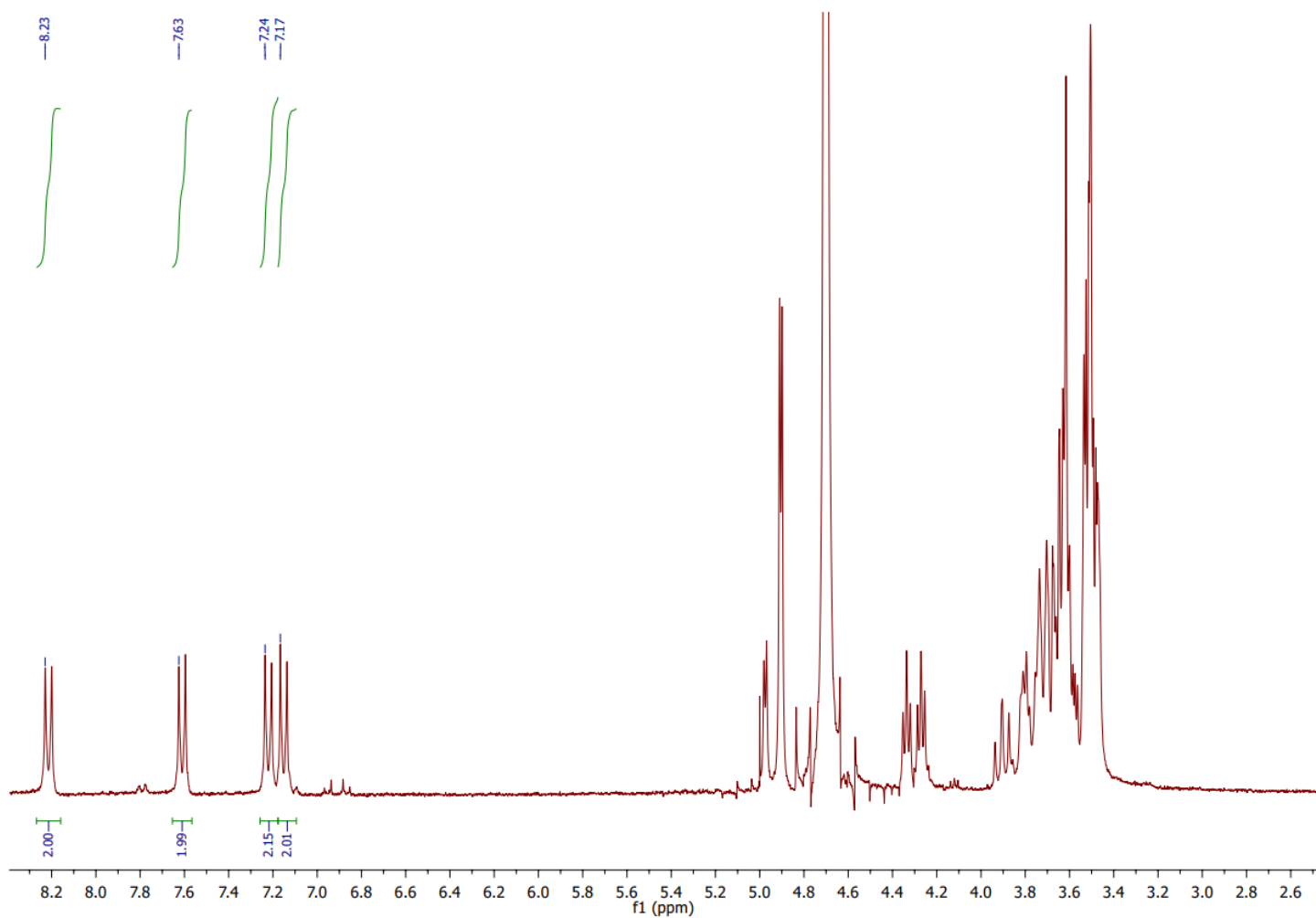


Figure S1-Représentation des protons de l' α -CD

L'assignement des pics de l' α -CD a été effectué grâce à la littérature²⁰¹.

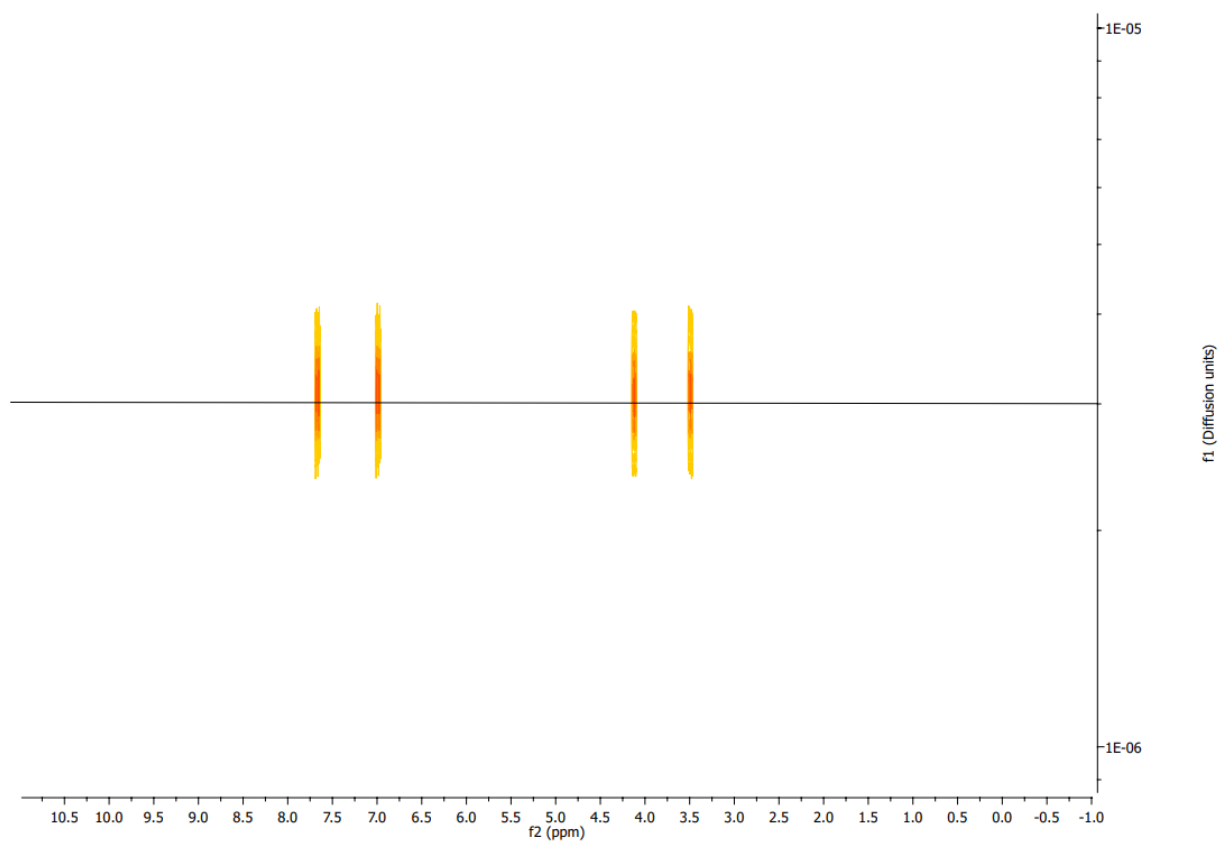
^1H RMN (300 MHz, D_2O) : 4,98 (H1) 3,90 (H3) 3,83 (H5) 3,76 (H6) 3,53 (H2) 3,48 (H4)

Annexe 3 : Spectre RMN ^1H 1D du mélange AzoDiGua/ α -CD ([AzoDiGua]=5 mM, [α -CD]=5 mM, D_2O , 300 MHz)

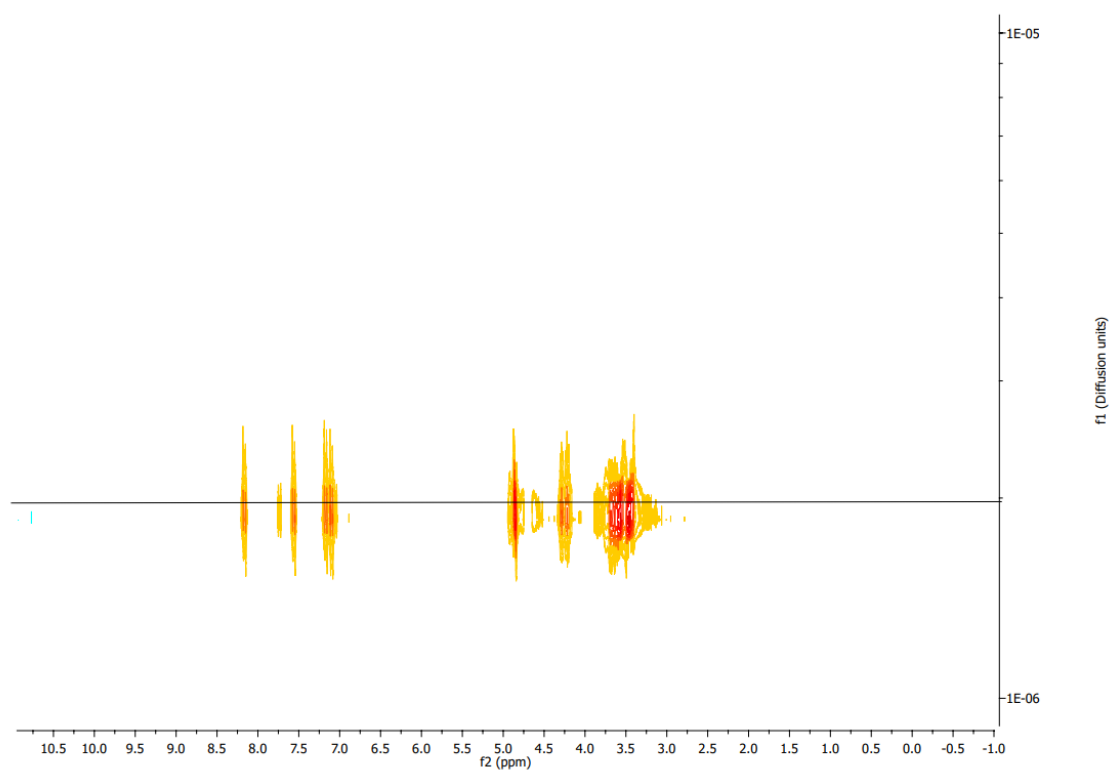


^1H RMN (300 MHz, D_2O) : 8,23 (doublet, 2H, H_3 - H_4) , 7,63 (doublet, 2H, H_1 - H_2) , 7,24-7,17 (deux doublets, 2H et 2H, H_9 - H_{12})

Annexe 4 : Spectre DOSY 2D ^1H de l'AzoDiGua ($[\text{AzoDiGua}] = 5 \text{ mM}$, D_2O , 300 MHz)



Annexe 5 : Spectre DOSY 2D ^1H du mélange équimolaire AzoDiGua/ α -CD
(($[\text{AzoDiGua}] = 5 \text{ mM}$, $[\alpha\text{-CD}] = 5 \text{ mM}$, D_2O , 300 MHz)



Annexe 6 : Photocontrôle du complexe AzoDiGua/ α -CD par spectroscopie UV-visible d'absorption

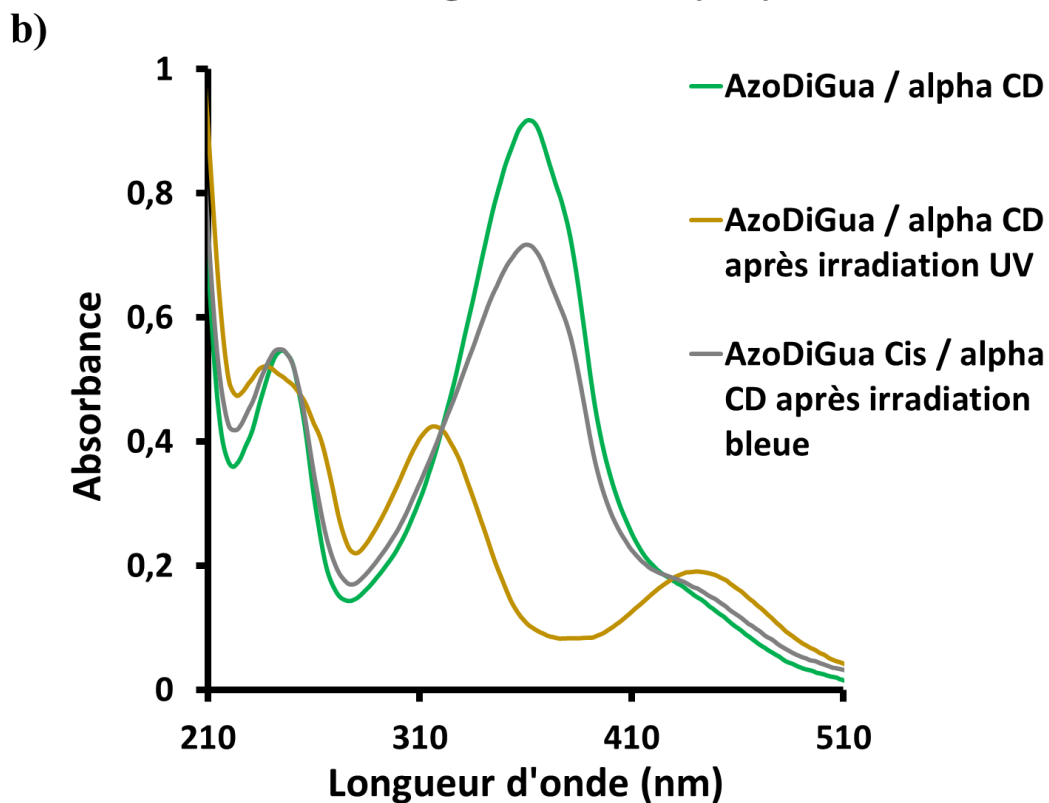
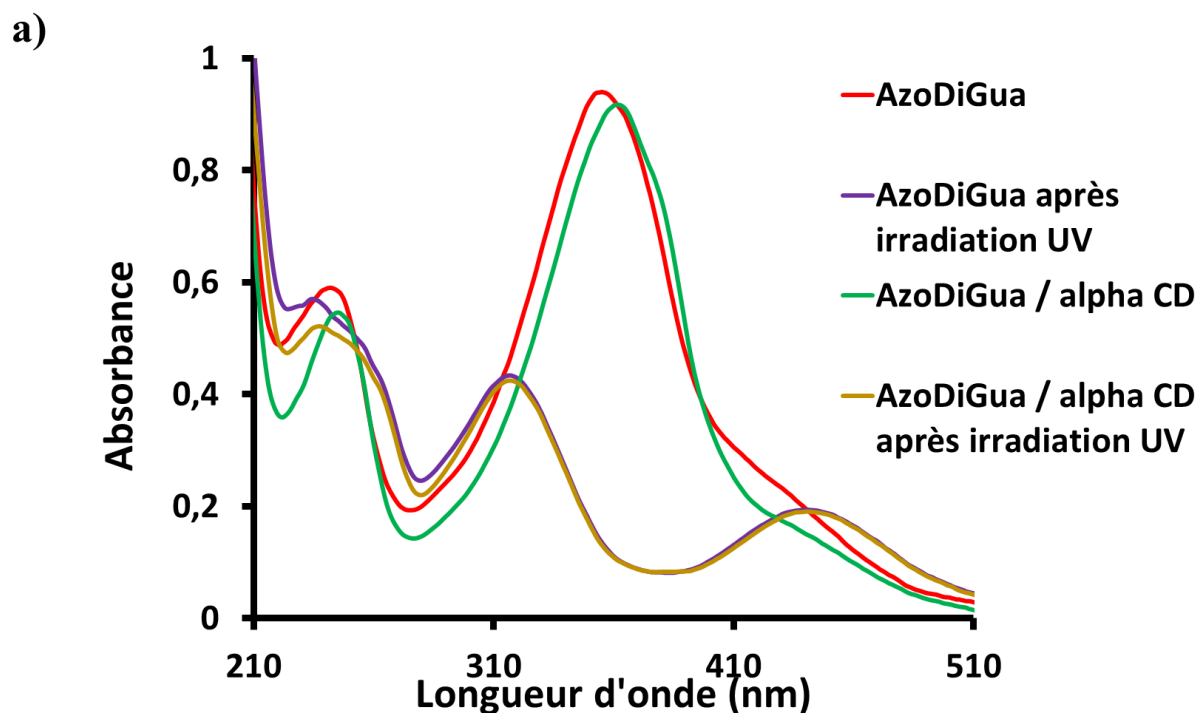


Figure S2-a) Spectre d'absorbance UV-visible de l'AzoDiGua avant et après irradiation UV, du mélange AzoDiGua/ α -CD avant et après irradiation UV **b)** Spectre d'absorbance UV-visible du mélange AzoDiGua/ α -CD avant et après irradiation successive UV et bleue ($[AzoDiGua]=50 \mu M$, $[\alpha CD]=50 \mu M$, $[Tris HCl]=50 mM$, Excitation UV : 365 nm, Excitation bleue : 435 nm, Temps d'irradiation : 1 minute)

Annexe 7 : Films

Unité de temps : secondes

Barre d'échelle : 20 μm

Lien vers les films : https://drive.google.com/drive/folders/1Em-Wnqw-YYncSTvMd-BJ7aGYA-4I6V7L?usp=share_link

Film n°1 : Observation en fonction du temps de l'agrégation en solution de l'ATP et l'AzoDiGua ([ATP]=1 mM, [AzoDiGua]=1 mM, T=20°C, [Tris HCl]=50 mM, pH=7.4)

Film n°2 : Observation des agrégats ATP/AzoDiGua sous irradiation UV ([ATP]=1 mM, [AzoDiGua]=1 mM, T=20°C, [Tris HCl]=50 mM, pH=7.4, Longueur d'onde : 395/25 nm , Puissance : 26 mW.cm⁻²)

Film n°3 : Observation des agrégats ATP/AzoDiGua sous irradiation bleue après avoir irradié cette même solution avec de la lumière UV (film n°2)([ATP]=1 mM, [AzoDiGua]=1 mM, T=20°C, [Tris HCl]=50 mM, pH=7.4, Longueur d'onde : 480/30 nm , Puissance : 40 mW.cm⁻²)

Film n°4 : Observation des agrégats ATP/AzoDiGua sous irradiation bleue ([ATP]=1 mM, [AzoDiGua]=1 mM, T=20°C, [Tris HCl]=50 mM, pH=7.4, Longueur d'onde : 480/30 nm , Puissance : 40 mW.cm⁻²)

REFERENCES

- (1) Wei, M.; Gao, Y.; Li, X.; Serpe, M. J. Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications. *Polym. Chem.* **2017**, *8* (1), 127–143. <https://doi.org/10.1039/c6py01585a>.
- (2) Mendes, P. M. Stimuli-Responsive Surfaces for Bio-Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (11), 2512–2529. <https://doi.org/10.1039/b714635n>.
- (3) Blanco-Gómez, A.; Cortón, P.; Barravecchia, L.; Neira, I.; Pazos, E.; Peinador, C.; García, M. D. Controlled Binding of Organic Guests by Stimuli-Responsive Macrocycles. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (12), 3834–3862. <https://doi.org/10.1039/d0cs00109k>.
- (4) Sun, N.; Jin, Y.; Wang, H.; Yu, B.; Wang, R.; Wu, H.; Zhou, W.; Jiang, J. Photoresponsive Covalent Organic Frameworks with Diarylethene Switch for Tunable Singlet Oxygen Generation. *Chem. Mater.* **2022**, *34* (4), 1956–1964. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.1c04436>.
- (5) Volarić, J.; Szymanski, W.; Simeth, N. A.; Feringa, B. L. Molecular Photoswitches in Aqueous Environments. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (22), 12377–12449. <https://doi.org/10.1039/d0cs00547a>.
- (6) Szymański, W.; Beierle, J. M.; Kistemaker, H. A. V.; Velema, W. A.; Feringa, B. L. Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (8), 6114–6178. <https://doi.org/10.1021/cr300179f>.
- (7) Yusran, Y.; Fang, Q.; Valtchev, V. Electroactive Covalent Organic Frameworks : Design , Synthesis , and Applications. <https://doi.org/10.1002/adma.202002038>.
- (8) Bapat, A. P.; Ray, J. G.; Savin, D. A.; Sumerlin, B. S. Redox-Responsive Dynamic-Covalent Assemblies: Stars and Miktoarm Stars. *Macromolecules* **2013**, *46* (6), 2188–2198. <https://doi.org/10.1021/ma400169m>.
- (9) Wang, A.; Shi, W.; Huang, J.; Yan, Y. Adaptive Soft Molecular Self-Assemblies. *Soft Matter* **2016**, *12* (2), 337–357. <https://doi.org/10.1039/c5sm02397a>.
- (10) Lehn, J. M. From Supramolecular Chemistry towards Constitutional Dynamic Chemistry and Adaptive Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 151–160. <https://doi.org/10.1039/b616752g>.
- (11) Biedermann, F.; Schneider, H. J. Experimental Binding Energies in Supramolecular Complexes. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (9), 5216–5300. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00583>.
- (12) Bucher, C. Introduction à La Chimie Supramoléculaire - Concepts – Chimie Hôte-Invité Introduction a ´ Culaire Supramole Concepts – Chimie Ho. *Tech. l'Ingénieur* **2018**, *33* (0).
- (13) Cochrane, J. R.; Schmitt, A.; Wille, U.; Hutton, C. A. Synthesis of Cyclic Peptide Hemicryptophanes: Enantioselective Recognition of a Chiral Zwitterionic Guest. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (77), 8504–8506. <https://doi.org/10.1039/c3cc44784g>.

- (14) Wälti, M. A.; Ravotti, F.; Arai, H.; Glabe, C. G.; Wall, J. S.; Böckmann, A.; Güntert, P.; Meier, B. H.; Riek, R. Atomic-Resolution Structure of a Disease-Relevant A β (1-42) Amyloid Fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113* (34), E4976–E4984. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600749113>.
- (15) Lomonosoff, G. P.; Wege, C. *TMV Particles: The Journey From Fundamental Studies to Bionanotechnology Applications*, 1st ed.; Elsevier Inc., 2018; Vol. 102. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.06.003>.
- (16) Kramer, B. R.; Lehn, J.; Cian, A. De; Fischer, J. Self-Assembly, Structure, and Spontaneous Resolution. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32* (5), 703–706.
- (17) Chen, J.; Zhu, Y.; Kaskel, S. Porphyrin-Based Metal–Organic Frameworks for Biomedical Applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2021**, *60* (10), 5010–5035. <https://doi.org/10.1002/anie.201909880>.
- (18) Rajasree, S. S.; Li, X.; Deria, P. Physical Properties of Porphyrin-Based Crystalline Metal–organic Frameworks. *Commun. Chem.* **2021**, *4* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s42004-021-00484-4>.
- (19) Fenniri, H.; Deng, B. L.; Ribbe, A. E.; Hallenga, K.; Jacob, J.; Thiyagarajan, P. Entropically Driven Self-Assembly of Multichannel Rosette Nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (SUPPL. 2), 6487–6492. <https://doi.org/10.1073/pnas.032527099>.
- (20) Erbas-Cakmak, S.; Leigh, D. A.; McTernan, C. T.; Nussbaumer, A. L. Artificial Molecular Machines. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (18), 10081–10206. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00146>.
- (21) Zhang, M.; De Bo, G. Mechanical Susceptibility of a Rotaxane. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (40), 15879–15883. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b06960>.
- (22) Zhang, M.; De Bo, G. A Catenane as a Mechanical Protecting Group. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (11), 5029–5033. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c01757>.
- (23) Bissell, R. A.; Córdova, E.; Kaifer, A. E.; Stoddart, J. F. A Chemically and Electrochemically Switchable Molecular Shuttle. *Nature* **1994**, *369* (6476), 133–137. <https://doi.org/10.1038/369133a0>.
- (24) Swinging, E. T. April 19, 1994. **1994**, 9399–9400.
- (25) Patwardhan, S.; Sengupta, S.; Siebbeles, L. D. A.; Würthner, F.; Grozema, F. C. Efficient Charge Transport in Semisynthetic Zinc Chlorin Dye Assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (39), 16147–16150. <https://doi.org/10.1021/ja3075192>.
- (26) Bodenthin, Y.; Pietsch, U.; Möhwald, H.; Kurth, D. G. Inducing Spin Crossover in Metallo-Supramolecular Polyelectrolytes through an Amphiphilic Phase Transition. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (9), 3110–3114. <https://doi.org/10.1021/ja0447210>.

- (27) Guo, C.; Sedgwick, A. C.; Hirao, T.; Sessler, J. L. Supramolecular Fluorescent Sensors: An Historical Overview and Update. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, *427*, 213560. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213560>.
- (28) Travers, A.; Muskhelishvili, G. DNA Structure and Function. *FEBS J.* **2015**, *282* (12), 2279–2295. <https://doi.org/10.1111/febs.13307>.
- (29) Shantanam, S.; MUELLER. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access; 2018; Vol. 176. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-95294-9>.
- (30) Crick, F.; Watson, J. © 1953 Nature Publishing Group. **1953**.
- (31) Acids, N. April 25, 1953. **1953**, *171*, 738–740.
- (32) Neidle, S. Beyond the Double Helix: DNA Structural Diversity and the PDB. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100553. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100553>.
- (33) Pray, L. A. Discovery of DNA Double Helix : Watson and Crick | Learn Science at Scitable Discovery of DNA Structure and Function : Watson and Crick The Landmark Ideas of Watson and Crick Relied Heavily on the Work of Other Scientists . What Did the Duo Aa The First P. *Nat. Educ.* **2008**, *1* (1), 100.
- (34) Bansal, M. DNA Structure: Revisiting the Watson-Crick Double Helix. *Curr. Sci.* **2003**, *85* (11), 1556–1563.
- (35) Sato, K.; Akiyama, M.; Sakakibara, Y. RNA Secondary Structure Prediction Using Deep Learning with Thermodynamic Integration. *Nat. Commun.* **2021**, *12* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21194-4>.
- (36) Kallenbach, N. R.; Ma, R.; Seemant, N. C. 19. Gardner, R. C. et At. *18. Ono, Y. at. Nucleic Acids Res* **1982**, *216* (9), 51–65.
- (37) Petrillo, M. L.; Newton, C. J.; Cunningham, R. P.; Ma, R. -I; Kallenbach, N. R.; Seeman, N. C. The Ligation and Flexibility of Four-arm DNA Junctions. *Biopolymers* **1988**, *27* (9), 1337–1352. <https://doi.org/10.1002/bip.360270902>.
- (38) Seeman, N. C. DNA Engineering and Its Application to Nanotechnology. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17* (11), 437–443. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01360-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01360-8).
- (39) Zheng, J.; Birktoft, J. J.; Chen, Y.; Wang, T.; Sha, R.; Constantinou, P. E.; Ginell, S. L.; Mao, C.; Seeman, N. C. From Molecular to Macroscopic via the Rational Design of a Self-Assembled 3D DNA Crystal. *Nature* **2009**, *461* (7260), 74–77. <https://doi.org/10.1038/nature08274>.

- (40) Mao, X.; Liu, M.; Li, Q.; Fan, C.; Zuo, X. DNA-Based Molecular Machines. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00292>.
- (41) Spiegel, J.; Adhikari, S.; Balasubramanian, S. The Structure and Function of DNA G-Quadruplexes. *Trends Chem.* **2020**, *2* (2), 123–136. <https://doi.org/10.1016/j.trechm.2019.07.002>.
- (42) Bochman, M. L.; Paeschke, K.; Zakian, V. A. DNA Secondary Structures: Stability and Function of G-Quadruplex Structures. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13* (11), 770–780. <https://doi.org/10.1038/nrg3296>.
- (43) Surin, M.; Ulrich, S. From Interaction to Function in DNA-Templated Supramolecular Self-Assemblies. *ChemistryOpen* **2020**, *9* (4), 480–498. <https://doi.org/10.1002/open.202000013>.
- (44) Ruiz-Carretero, A.; Janssen, P. G. A.; Kaeser, A.; Schenning, A. P. H. J. DNA-Templated Assembly of Dyes and Extended π -Conjugated Systems. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (15), 4340–4347. <https://doi.org/10.1039/c0cc05155a>.
- (45) Avakyan, N.; Greschner, A. A.; Aldaye, F.; Serpell, C. J.; Toader, V.; Petitjean, A.; Sleiman, H. F. Reprogramming the Assembly of Unmodified DNA with a Small Molecule. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (4), 368–376. <https://doi.org/10.1038/nchem.2451>.
- (46) Janssen, P. G. A.; Vandenbergh, J.; Van Dongen, J. L. J.; Meijer, E. W.; Schenning, A. P. H. J. SsDNA Templated Self-Assembly of Chromophores. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (19), 6078–6079. <https://doi.org/10.1021/ja0711967>.
- (47) Simmel, F. C.; Yurke, B.; Singh, H. R. Principles and Applications of Nucleic Acid Strand Displacement Reactions. *Chem. Rev.* **2019**. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00580>.
- (48) Dugave, C.; Demange, L. Cis-Trans Isomerization of Organic Molecules and Biomolecules: Implications and Applications. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (7), 2475–2532. <https://doi.org/10.1021/cr0104375>.
- (49) Yagai, S.; Kitamura, A. Recent Advances in Photoresponsive Supramolecular Self-Assemblies. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (8), 1520–1529. <https://doi.org/10.1039/b703092b>.
- (50) Yao, X.; Li, T.; Wang, J.; Ma, X.; Tian, H. Recent Progress in Photoswitchable Supramolecular Self-Assembling Systems. *Adv. Opt. Mater.* **2016**, *4* (9), 1322–1349. <https://doi.org/10.1002/adom.201600281>.
- (51) Russev, M. M.; Hecht, S. Photoswitches: From Molecules to Materials. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (31), 3348–3360. <https://doi.org/10.1002/adma.200904102>.
- (52) Goulet-Hanssens, A.; Eisenreich, F.; Hecht, S. Enlightening Materials with Photoswitches. *Adv. Mater.* **2020**, *32* (20). <https://doi.org/10.1002/adma.201905966>.

- (53) Beharry, A. A.; Woolley, G. A. Azobenzene Photoswitches for Biomolecules. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (8), 4422–4437. <https://doi.org/10.1039/c1cs15023e>.
- (54) Crecca, C. R.; Roitberg, A. E. Theoretical Study of the Isomerization Mechanism of Azobenzene and Disubstituted Azobenzene Derivatives. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110* (26), 8188–8203. <https://doi.org/10.1021/jp057413c>.
- (55) Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1809–1825. <https://doi.org/10.1039/c1cs15179g>.
- (56) Mei, J.; Leung, N. L. C.; Kwok, R. T. K.; Lam, J. W. Y.; Tang, B. Z. Aggregation-Induced Emission: Together We Shine, United We Soar! *Chemical Reviews*. American Chemical Society November 11, 2015, pp 11718–11940. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00263>.
- (57) Xue, L.; Pan, Y.; Zhang, S.; Chen, Y.; Yu, H.; Yang, Y.; Mo, L.; Sun, Z.; Li, L.; Yang, H. Fluorescent Azobenzene-Containing Compounds: From Structure to Mechanism. *Crystals* **2021**, *11* (7), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cryst11070840>.
- (58) Membranes, A. B. Azobenzene-Containing Bilayer Membranes. **1987**, *33* (2), 5175–5183.
- (59) Yoshino, J.; Furuta, A.; Kambe, T.; Itoi, H.; Kano, N.; Kawashima, T.; Ito, Y.; Asashima, M. Intensely Fluorescent Azobenzenes: Synthesis, Crystal Structures, Effects of Substituents, and Application to Fluorescent Vital Stain. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (17), 5026–5035. <https://doi.org/10.1002/chem.201000258>.
- (60) Almaqwashi, A. A.; Paramanathan, T.; Rouzina, I.; Williams, M. C. Mechanisms of Small Molecule-DNA Interactions Probed by Single-Molecule Force Spectroscopy. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (9), 3971–3988. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw237>.
- (61) A., M.; Kushagra, A.; Ravikanth, M.; Ramgopal, V. “Bottom-up” Approaches for Nanoelectronics. *Cut. Edge Nanotechnol.* **2010**, No. March. <https://doi.org/10.5772/8853>.
- (62) Khan, G. S.; Shah, A.; Zia-Ur-Rehman; Barker, D. Chemistry of DNA Minor Groove Binding Agents. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2012**, *115*, 105–118. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.07.003>.
- (63) Patil, A. J.; Mann, S. Self-Assembly of Bio-Inorganic Nanohybrids Using Organoclay Building Blocks. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18* (39), 4605–4615. <https://doi.org/10.1039/b805653f>.
- (64) Bergen, A.; Rudiuk, S.; Morel, M.; Le Saux, T.; Ihmels, H.; Baigl, D. Photodependent Melting of Unmodified DNA Using a Photosensitive Intercalator: A New and Generic Tool for Photoreversible Assembly of DNA Nanostructures at Constant Temperature. *Nano Lett.* **2016**, *16* (1), 773–780. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b04762>.

- (65) Deiana, M.; Pokladek, Z.; Olesiak-Banska, J.; Młynarz, P.; Samoc, M.; Matczyszyn, K. Photochromic Switching of the DNA Helicity Induced by Azobenzene Derivatives. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep28605>.
- (66) Dudek, M.; Deiana, M.; Pokladek, Z.; Pawlik, K.; Matczyszyn, K. Reversible Photocontrol of DNA Melting by Visible-Light-Responsive F4-Coordinated Azobenzene Compounds. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (71), 18963–18970. <https://doi.org/10.1002/chem.201803529>.
- (67) Wang, X.; Huang, J.; Zhou, Y.; Yan, S.; Weng, X.; Wu, X.; Deng, M.; Zhou, X. Conformational Switching of G-Quadruplex DNA by Photoregulation. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (31), 5305–5309. <https://doi.org/10.1002/anie.201002290>.
- (68) Xing, X.; Wang, X.; Xu, L.; Tai, Y.; Dai, L.; Zheng, X.; Mao, W.; Xu, X.; Zhou, X. Light-Driven Conformational Regulation of Human Telomeric G-Quadruplex DNA in Physiological Conditions. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (19), 6639–6645. <https://doi.org/10.1039/c1ob05939d>.
- (69) Tian, T.; Song, Y.; Wang, J.; Fu, B.; He, Z.; Xu, X.; Li, A.; Zhou, X.; Wang, S.; Zhou, X. Small-Molecule-Triggered and Light-Controlled Reversible Regulation of Enzymatic Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (3), 955–961. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b11532>.
- (70) Ramos-Soriano, J.; Galan, M. C. Photoresponsive Control of G-Quadruplex DNA Systems. *JACS Au* **2021**, *1* (10), 1516–1526. <https://doi.org/10.1021/jacsau.1c00283>.
- (71) Estévez-Torres, A.; Baigl, D. DNA Compaction: Fundamentals and Applications. *Soft Matter* **2011**, *7* (15), 6746–6756. <https://doi.org/10.1039/c1sm05373f>.
- (72) Sollogoub, M.; Guieu, S.; Geoffroy, M.; Yamada, A.; Estévez-Torres, A.; Yoshikawa, K.; Baigl, D. Photocontrol of Single-Chain DNA Conformation in Cell-Mimicking Microcompartments. *ChemBioChem* **2008**, *9* (8), 1201–1206. <https://doi.org/10.1002/cbic.200800072>.
- (73) Diguët, A.; Mani, N. K.; Geoffroy, M.; Sollogoub, M.; Baigl, D. Photosensitive Surfactants with Various Hydrophobic Tail Lengths for the Photocontrol of Genomic DNA Conformation with Improved Efficiency. *Chem. - A Eur. J.* **2010**, *16* (39), 11890–11896. <https://doi.org/10.1002/chem.201001579>.
- (74) Schimka, S.; Santer, S.; Mujkic, N. M.; Ble, D.; Wehle, M.; Lipowsky, R.; Santer, M. Compaction. **2016**. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00052>.
- (75) Venancio-Marques, A.; Bergen, A.; Rossi-Gendron, C.; Rudiuk, S.; Baigl, D. Photosensitive Polyamines for High-Performance Photocontrol of DNA Higher-Order Structure. *ACS Nano* **2014**, *8* (4), 3654–3663. <https://doi.org/10.1021/nn500266b>.
- (76) Rudiuk, S.; Yoshikawa, K.; Baigl, D. Enhancement of DNA Compaction by Negatively Charged

- Nanoparticles. Application to Reversible Photocontrol of DNA Higher-Order Structure. *Soft Matter* **2011**, 7 (12), 5854–5860. <https://doi.org/10.1039/c1sm05314k>.
- (77) Estévez-Torres, A.; Crozatier, C.; Diguët, A.; Hara, T.; Saito, H.; Yoshikawa, K.; Baigl, D. Sequence-Independent and Reversible Photocontrol of Transcription/ Expression Systems Using a Photosensitive Nucleic Acid Binder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106 (30), 12219–12223. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904382106>.
- (78) Zhou, L.; Retailleau, P.; Morel, M.; Rudiuk, S.; Baigl, D. Photoswitchable Fluorescent Crystals Obtained by the Photoreversible Coassembly of a Nucleobase and an Azobenzene Intercalator. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141 (23), 9321–9329. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b02836>.
- (79) Deng, J.; Walther, A. ATP-Responsive and ATP-Fueled Self-Assembling Systems and Materials. *Adv. Mater.* **2020**, 32 (42). <https://doi.org/10.1002/adma.202002629>.
- (80) Zingman, L. V.; Alekseev, A. E.; Hodgson-Zingman, D. M.; Terzic, A. ATP-Sensitive Potassium Channels: Metabolic Sensing and Cardioprotection. *J. Appl. Physiol.* **2007**, 103 (5), 1888–1893. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00747.2007>.
- (81) Mishra, A.; Dhiman, S.; George, S. J. ATP-Driven Synthetic Supramolecular Assemblies: From ATP as a Template to Fuel. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2021**, 60 (6), 2740–2756. <https://doi.org/10.1002/anie.202006614>.
- (82) Wu, Y.; Wen, J.; Li, H.; Sun, S.; Xu, Y. Fluorescent Probes for Recognition of ATP. *Chinese Chem. Lett.* **2017**, 28 (10), 1916–1924. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.09.032>.
- (83) Huang, J.; Wu, Y.; Chen, Y.; Zhu, Z.; Yang, X.; Yang, C. J.; Wang, K.; Tan, W. Pyrene-Excimer Probes Based on the Hybridization Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids in Complex Biological Fluids. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, 50 (2), 401–404. <https://doi.org/10.1002/anie.201005375>.
- (84) Wu, C.; Wang, C.; Yan, L.; Yang, C. J. Pyrene Excimer Nucleic Acid Probes for Biomolecule Signaling. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2009**, 5 (5), 495–504. <https://doi.org/10.1166/jbn.2009.1074>.
- (85) Li, X.; Guo, X.; Cao, L.; Xun, Z.; Wang, S.; Li, S.; Li, Y.; Yang, G. Water-Soluble Triarylboron Compound for ATP Imaging in Vivo Using Analyte-Induced Finite Aggregation. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, 53 (30), 7809–7813. <https://doi.org/10.1002/anie.201403918>.
- (86) Xu, Z.; Singh, N. J.; Lim, J.; Pan, J.; Ha, N. K.; Park, S.; Kim, K. S.; Yoon, J. Unique Sandwich Stacking of Pyrene-Adenine-Pyrene for Selective and Ratiometric Fluorescent Sensing of ATP at Physiological PH. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (42), 15528–15533. <https://doi.org/10.1021/ja906855a>.
- (87) Wang, L.; Yuan, L.; Zeng, X.; Peng, J.; Ni, Y.; Er, J. C.; Xu, W.; Agrawalla, B. K.; Su, D.; Kim, B.;

- Chang, Y. T. A Multisite-Binding Switchable Fluorescent Probe for Monitoring Mitochondrial ATP Level Fluctuation in Live Cells. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (5), 1773–1776. <https://doi.org/10.1002/anie.201510003>.
- (88) Li, C.; Numata, M.; Takeuchi, M.; Shinkai, S. A Sensitive Colorimetric and Fluorescent Probe Based on a Polythiophene Derivative for the Detection of ATP. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (39), 6371–6374. <https://doi.org/10.1002/anie.200501823>.
- (89) Chen, Z.; Wu, P.; Cong, R.; Xu, N.; Tan, Y.; Tan, C.; Jiang, Y. Sensitive Conjugated-Polymer-Based Fluorescent ATP Probes and Their Application in Cell Imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8* (6), 3567–3574. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b06935>.
- (90) Cheng, D.; Li, Y.; Wang, J.; Sun, Y.; Jin, L.; Li, C.; Lu, Y. Fluorescence and Colorimetric Detection of ATP Based on a Strategy of Self-Promoting Aggregation of a Water-Soluble Polythiophene Derivative. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (40), 8544–8546. <https://doi.org/10.1039/c5cc01713k>.
- (91) An, N.; Zhang, Q.; Wang, J.; Liu, C.; Shi, L.; Liu, L.; Deng, L.; Lu, Y. A New FRET-Based Ratiometric Probe for Fluorescence and Colorimetric Analyses of Adenosine 5'-Triphosphate. *Polym. Chem.* **2017**, *8* (7), 1138–1145. <https://doi.org/10.1039/c6py02001a>.
- (92) Kumar, M.; Brocorens, P.; Tonnelé, C.; Beljonne, D.; Surin, M.; George, S. J. A Dynamic Supramolecular Polymer with Stimuli-Responsive Handedness for in Situ Probing of Enzymatic ATP Hydrolysis. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms6793>.
- (93) Li, Z.; Zeman, C. J.; Valandro, S. R.; Bantang, J. P. O.; Schanze, K. S. Adenosine Triphosphate Templated Self-Assembly of Cationic Porphyrin into Chiral Double Superhelices and Enzyme-Mediated Disassembly. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (32), 12610–12618. <https://doi.org/10.1021/jacs.9b04133>.
- (94) Adachi, T.; Nakamura, Y. Aptamers : A Review of Their Chemical Properties. *Molecules* **2019**, *24*, 4229.
- (95) Huizenga, D. E.; Szostak, J. W. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry* **1995**, *34* (2), 656–665. <https://doi.org/10.1021/bi00002a033>.
- (96) Jhaveri, S. D.; Kirby, R.; Conrad, R.; Maglott, E. J.; Bowser, M.; Kennedy, R. T.; Glick, G.; Ellington, A. D. Designed Signaling Aptamers That Transduce Molecular Recognition to Changes in Fluorescence Intensity. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (11), 2469–2473. <https://doi.org/10.1021/ja992393b>.
- (97) Yangyuoru, P. M.; Dhakal, S.; Yu, Z.; Koirala, D.; Mwangela, S. M.; Mao, H. Single-Molecule Measurements of the Binding between Small Molecules and DNA Aptamers. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (12), 5298–5303. <https://doi.org/10.1021/ac300427d>.

- (98) Zhou, X.; Su, X.; Pathak, P.; Vik, R.; Vinciguerra, B.; Isaacs, L.; Jayawickramarajah, J. Host-Guest Tethered DNA Transducer: ATP Fueled Release of a Protein Inhibitor from Cucurbit[7]Uril. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (39), 13916–13921. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b07977>.
- (99) Maiti, S.; Fortunati, I.; Ferrante, C.; Scrimin, P.; Prins, L. J. Dissipative Self-Assembly of Vesicular Nanoreactors. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (7), 725–731. <https://doi.org/10.1038/nchem.2511>.
- (100) Wang, C.; Chen, Q.; Wang, Z.; Zhang, X. An Enzyme-Responsive Polymeric Superamphiphile. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (46), 8612–8615. <https://doi.org/10.1002/anie.201004253>.
- (101) Biswas, S.; Kinbara, K.; Niwa, T.; Taguchi, H.; Ishii, N.; Watanabe, S.; Miyata, K.; Kataoka, K.; Aida, T. Biomolecular Robotics for Chemomechanically Driven Guest Delivery Fuelled by Intracellular ATP. *Nat. Chem.* **2013**, *5* (7), 613–620. <https://doi.org/10.1038/nchem.1681>.
- (102) Mo, R.; Jiang, T.; Disanto, R.; Tai, W.; Gu, Z. ATP-Triggered Anticancer Drug Delivery. *Nat. Commun.* **2014**, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4364>.
- (103) Tang, Z.; Mallikaratchy, P.; Yang, R.; Kim, Y.; Zhu, Z.; Wang, H.; Tan, W. Aptamer Switch Probe Based on Intramolecular Displacement. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (34), 11268–11269. <https://doi.org/10.1021/ja804119s>.
- (104) Mishra, A.; Korlepara, D. B.; Kumar, M.; Jain, A.; Jonnalagadda, N.; Bejagam, K. K.; Balasubramanian, S.; George, S. J. Biomimetic Temporal Self-Assembly via Fuel-Driven Controlled Supramolecular Polymerization. *Nat. Commun.* **2018**, *9* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03542-z>.
- (105) Gao, Z.; Qiu, S.; Yan, F.; Zhang, S.; Wang, F.; Tian, W. Time-Encoded Bio-Fluorochromic Supramolecular Co-Assembly for Rewritable Security Printing. *Chem. Sci.* **2021**, *12* (29), 10041–10047. <https://doi.org/10.1039/d1sc03105h>.
- (106) Ching-Lam Yeung, M.; Wing-Wah Yam, V. Phosphate Derivative-Induced Supramolecular Assembly and NIR-Emissive Behaviour of Alkynylplatinum(II) Terpyridine Complexes for Real-Time Monitoring of Enzymatic Activities. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (7), 2928–2935. <https://doi.org/10.1039/c3sc50383f>.
- (107) Morikawa, M. A.; Yoshihara, M.; Endo, T.; Kimizuka, N. ATP as Building Blocks for the Self-Assembly of Excitonic Nanowires. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (5), 1358–1359. <https://doi.org/10.1021/ja043844h>.
- (108) Sigel, H.; Griesser, R. Nucleoside 5'-Triphosphates: Self-Association, Acid–Base, and Metal Ion-Binding Properties in Solution. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34* (10), 875–900. <https://doi.org/10.1039/b505986k>.
- (109) Yao, Z.; Huang, B.; Hu, X.; Zhang, L.; Li, D.; Guo, M.; Zhang, X.; Yuan, H.; Wu, H. C. Colorimetric

Detection of Copper Ions Based on a Supramolecular Complex of Water-Soluble Polythiophene and ATP. *Analyst* **2013**, *138* (6), 1649–1652. <https://doi.org/10.1039/c3an00151b>.

- (110) Mogaki, R.; Hashim, P. K. Chem Soc Rev Modulation of Biomolecular Functions. **2017**, 6480–6491. <https://doi.org/10.1039/c7cs00647k>.
- (111) Roy, B.; Noguchi, T.; Yoshihara, D.; Tsuchiya, Y.; Dawn, A.; Shinkai, S. Nucleotide Sensing with a Perylene-Based Molecular Receptor via Amplified Fluorescence Quenching. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12* (4), 561–565. <https://doi.org/10.1039/c3ob41586d>.
- (112) Noguchi, T.; Shiraki, T.; Dawn, A.; Tsuchiya, Y.; Ngoc Lien, L. T.; Yamamoto, T.; Shinkai, S. Nonlinear Fluorescence Response Driven by ATP-Induced Self-Assembly of Guanidinium-Tethered Tetraphenylethene. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (65), 8090–8092. <https://doi.org/10.1039/c2cc33262k>.
- (113) Okuro, K.; Sasaki, M.; Aida, T. Boronic Acid-Appended Molecular Glues for ATP-Responsive Activity Modulation of Enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (17), 5527–5530. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b02664>.
- (114) Jeschik, N.; Schneider, T.; Meier, C. Photocaged and Mixed Photocaged Bioreversible-Protected ATP Derivatives as Tools for the Controlled Release of ATP. *European J. Org. Chem.* **2020**, *2020* (43), 6776–6789. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202001229>.
- (115) Minagawa, S.; Fujiwara, S.; Hashimoto, T.; Hayashita, T. Supramolecular Zn(II)-Dipicolylamine-Azobenzene-Aminocyclodextrin-ATP Complex: Design and ATP Recognition in Water. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094683>.
- (116) Cakmak, F. P.; Choi, S.; Meyer, M. C. O.; Bevilacqua, P. C.; Keating, C. D. Prebiotically-Relevant Low Polyion Multivalency Can Improve Functionality of Membraneless Compartments. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19775-w>.
- (117) Hoffmann, S. K.; Goslar, J.; Bregier-Jarzebowska, R.; Gasowska, A.; Zalewska, A.; Lomozik, L. Copper(II) Ions Interactions in the Systems with Triamines and ATP. Potentiometric and Spectroscopic Studies. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *177* (September), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.09.004>.
- (118) Wang, C.; Qi, Q.; Li, W.; Dang, J.; Hao, M.; Lv, S.; Dong, X.; Gu, Y.; Wu, P.; Zhang, W.; Chen, Y.; Hartig, J. S. A Cu(II)–ATP Complex Efficiently Catalyses Enantioselective Diels–Alder Reactions. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18554-x>.
- (119) Wilson, J. E.; Chin, A. Chelation of Divalent Cations by ATP, Studied by Titration Calorimetry. *Anal. Biochem.* **1991**, *193* (1), 16–19. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(91\)90036-S](https://doi.org/10.1016/0003-2697(91)90036-S).

- (120) Hoffmann, S. K.; Goslar, J.; Bregier-Jarzebowska, R.; Gasowska, A.; Zalewska, A.; Lomozik, L. Copper(II) Ions Interactions in the Systems with Triamines and ATP. Potentiometric and Spectroscopic Studies. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *177* (May), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.09.004>.
- (121) Prosser, K. E.; Walsby, C. J. Electron Paramagnetic Resonance as a Tool for Studying the Mechanisms of Paramagnetic Anticancer Metallodrugs. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017* (12), 1573–1585. <https://doi.org/10.1002/ejic.201601142>.
- (122) Crini, G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (21), 10940–10975. <https://doi.org/10.1021/cr500081p>.
- (123) Szente, L.; Szemán, J. Cyclodextrins in Analytical Chemistry: Host-Guest Type Molecular Recognition. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (17), 8024–8030. <https://doi.org/10.1021/ac400639y>.
- (124) Shahgaldian, P.; Pieleś, U. Cyclodextrin Derivatives as Chiral Supramolecular Receptors for Enantioselective Sensing. *Sensors* **2006**, *6* (6), 593–615. <https://doi.org/10.3390/s6060593>.
- (125) Szejtli, J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1743–1753. <https://doi.org/10.1021/cr970022c>.
- (126) Fífere, A.; Marangoci, N.; Maier, S.; Coroaba, A.; Maftai, D.; Pinteala, M. Theoretical Study on β -Cyclodextrin Inclusion Complexes with Propiconazole and Protonated Propiconazole. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 2191–2201. <https://doi.org/10.3762/bjoc.8.247>.
- (127) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 1875–1917. <https://doi.org/10.1021/cr970015o>.
- (128) Sakurai, M.; Kitagawa, M.; Hoshi, H.; Inoue, Y.; Chûjô, R. A Molecular Orbital Study of Cyclodextrin (Cyclomalto-Oligosaccharide) Inclusion Complexes. III, Dipole Moments of Cyclodextrins in Various Types of Inclusion Complex. *Carbohydr. Res.* **1990**, *198* (2), 181–191. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(90\)84291-2](https://doi.org/10.1016/0008-6215(90)84291-2).
- (129) Păduraru, D. N.; Niculescu, A. G.; Bolocan, A.; Andronic, O.; Grumezescu, A. M.; Bîrlă, R. An Updated Overview of Cyclodextrin-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081748>.
- (130) Tian, B.; Hua, S.; Liu, J. Cyclodextrin-Based Delivery Systems for Chemotherapeutic Anticancer Drugs: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *232* (December 2019), 115805. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115805>.
- (131) Wankar, J.; Kotla, N. G.; Gera, S.; Rasala, S.; Pandit, A.; Rochev, Y. A. Recent Advances in Host-Guest Self-Assembled Cyclodextrin Carriers: Implications for Responsive Drug Delivery and

Biomedical Engineering. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30* (44). <https://doi.org/10.1002/adfm.201909049>.

- (132) Zhang, X.; Ma, X.; Wang, K.; Lin, S.; Zhu, S.; Dai, Y.; Xia, F. Recent Advances in Cyclodextrin-Based Light-Responsive Supramolecular Systems. *Macromol. Rapid Commun.* **2018**, *39* (11), 1–12. <https://doi.org/10.1002/marc.201800142>.
- (133) Nie, C.; Liu, C.; Sun, S.; Wu, S. Visible-Light-Controlled Azobenzene-Cyclodextrin Host-Guest Interactions for Biomedical Applications and Surface Functionalization. *ChemPhotoChem* **2021**, *5* (10), 893–901. <https://doi.org/10.1002/cptc.202100085>.
- (134) Xia, D.; Wang, P.; Ji, X.; Khashab, N. M.; Sessler, J. L.; Huang, F. Functional Supramolecular Polymeric Networks: The Marriage of Covalent Polymers and Macrocyclic-Based Host-Guest Interactions. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (13), 6070–6123. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00839>.
- (135) Qu, D. H.; Wang, Q. C.; Zhang, Q. W.; Ma, X.; Tian, H. Photoresponsive Host-Guest Functional Systems. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7543–7588. <https://doi.org/10.1021/cr5006342>.
- (136) Qu, D. H.; Wang, Q. C.; Ren, J.; Tian, H. A Light-Driven Rotaxane Molecular Shuttle with Dual Fluorescence Addresses. *Org. Lett.* **2004**, *6* (13), 2085–2088. <https://doi.org/10.1021/ol049605g>.
- (137) Wang, D.; Zhao, W.; Wei, Q.; Zhao, C.; Zheng, Y. Photoswitchable Azobenzene/Cyclodextrin Host-Guest Complexes: From UV- to Visible/Near-IR-Light-Responsive Systems. *ChemPhotoChem* **2018**, *2* (5), 403–415. <https://doi.org/10.1002/cptc.201700233>.
- (138) Yuen, F.; Tam, K. C. Cyclodextrin-Assisted Assembly of Stimuli-Responsive Polymers in Aqueous Media. *Soft Matter* **2010**, *6* (19), 4613–4630. <https://doi.org/10.1039/c0sm00043d>.
- (139) Goujon, A.; Lang, T.; Mariani, G.; Moulin, E.; Fuks, G.; Raya, J.; Buhler, E.; Giuseppone, N. Bistable [C₂] Daisy Chain Rotaxanes as Reversible Muscle-like Actuators in Mechanically Active Gels. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (42), 14825–14828. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b06710>.
- (140) Iwaso, K.; Takashima, Y.; Harada, A. Fast Response Dry-Type Artificial Molecular Muscles with [C₂]Daisy Chains. *Nat. Chem.* **2016**, *8* (6), 625–632. <https://doi.org/10.1038/nchem.2513>.
- (141) Liao, X.; Chen, G.; Liu, X.; Chen, W.; Chen, F.; Jiang, M. Photoresponsive Pseudopolyrotaxane Hydrogels Based on Competition of Host-Guest Interactions. *Angew. Chemie* **2010**, *122* (26), 4511–4515. <https://doi.org/10.1002/ange.201000141>.
- (142) Tamesue, S.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Shinkai, S.; Harada, A. Photoswitchable Supramolecular Hydrogels Formed by Cyclodextrins and Azobenzene Polymers. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2010**, *49* (41), 7461–7464. <https://doi.org/10.1002/anie.201003567>.
- (143) Wang, D.; Wagner, M.; Butt, H. J.; Wu, S. Supramolecular Hydrogels Constructed by Red-Light-

Responsive Host-Guest Interactions for Photo-Controlled Protein Release in Deep Tissue. *Soft Matter* **2015**, *11* (38), 7656–7662. <https://doi.org/10.1039/c5sm01888a>.

- (144) Cusido, J.; Deniz, E.; Raymo, F. M. Fluorescent Switches Based on Photochromic Compounds. *European J. Org. Chem.* **2009**, No. 13, 2031–2045. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200801244>.
- (145) Ma, X.; Cao, J.; Wang, Q.; Tian, H. Photocontrolled Reversible Room Temperature Phosphorescence (RTP) Encoding β -Cyclodextrin Pseudorotaxane. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (12), 3559–3561. <https://doi.org/10.1039/c0cc05488g>.
- (146) Han, W.; Liu, Z.; Wang, S.; Ji, Y.; Zhang, X. Construction of a Novel Photoresponsive Supramolecular Fluorescent Hydrogel through Host-Guest Interaction between β -Cyclodextrin and Azobenzene. *ChemistrySelect* **2020**, *5* (7), 2300–2305. <https://doi.org/10.1002/slct.201904361>.
- (147) Neva, T.; Carbajo-Gordillo, A. I.; Benito, J. M.; Lana, H.; Marcelo, G.; Ortiz Mellet, C.; Tros de Ilarduya, C.; Mendicuti, F.; García Fernández, J. M. Tuning the Topological Landscape of DNA–Cyclodextrin Nanocomplexes by Molecular Design. *Chem. - A Eur. J.* **2020**, *26* (66), 15259–15269. <https://doi.org/10.1002/chem.202002951>.
- (148) González-Pérez, A.; Dias, R. S.; Nylander, T.; Lindman, B. Cyclodextrin-Surfactant Complex: A New Route in DNA Decompaction. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (3), 772–775. <https://doi.org/10.1021/bm7012907>.
- (149) Zhang, X. J.; Zhang, Y. M.; Wang, Z.; Chen, Y.; Liu, Y. Cooperative DNA Compaction by Ternary Supramolecular Complex with Cucurbituril/Cyclodextrin Pair. *ChemistrySelect* **2016**, *1* (4), 685–690. <https://doi.org/10.1002/slct.201600066>.
- (150) Hu, P.; Chen, Y.; Liu, Y. Cyclodextrin-Based Switchable DNA Condenser. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (54), 10839–10842. <https://doi.org/10.1039/c5cc03248b>.
- (151) Alves, P. S.; Mesquita, O. N.; Rocha, M. S. Controlling Cooperativity in β -Cyclodextrin-DNA Binding Reactions. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, *6* (18), 3549–3554. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b01603>.
- (152) Dias, R. S.; Innerlohinger, J.; Glatter, O.; Miguel, M. G.; Lindman, B. Coil-Globule Transition of DNA Molecules Induced by Cationic Surfactants: A Dynamic Light Scattering Study. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (20), 10458–10463. <https://doi.org/10.1021/jp0444464>.
- (153) González-Pérez, A. β -Cyclodextrin in DNA Decompaction: An Imaging Approach. *Front. Biosci. - Elit.* **2010**, *2 E* (2), 684–693. <https://doi.org/10.2741/e128>.
- (154) Villari, V.; Mazzaglia, A.; Darcy, R.; O'Driscoll, C. M.; Micali, N. Nanostructures of Cationic Amphiphilic Cyclodextrin Complexes with DNA. *Biomacromolecules* **2013**, *14* (3), 811–817.

<https://doi.org/10.1021/bm3018609>.

- (155) Bloomfield, V. A. Condensation of DNA by Multivalent Cations: Considerations on Mechanism. *Biopolymers* **1991**, *31* (13), 1471–1481. <https://doi.org/10.1002/bip.360311305>.
- (156) Cao, M.; Deng, M.; Wang, X. L.; Wang, Y. Decompaction of Cationic Gemini Surfactant-Induced DNA Condensates by β -Cyclodextrin or Anionic Surfactant. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (43), 13648–13654. <https://doi.org/10.1021/jp803244f>.
- (157) González-Pérez, A.; Carlstedt, J.; Dias, R. S.; Lindman, B. Cyclodextrins in DNA Decompaction. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2010**, *76* (1), 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.001>.
- (158) Evenou, P.; Rossignol, J.; Pembouong, G.; Gothland, A.; Colesnic, D.; Barbeyron, R.; Rudiuk, S.; Marcelin, A. G.; Ménand, M.; Baigl, D.; Calvez, V.; Bouteiller, L.; Sollogoub, M. Bridging β -Cyclodextrin Prevents Self-Inclusion, Promotes Supramolecular Polymerization, and Promotes Cooperative Interaction with Nucleic Acids. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57* (26), 7753–7758. <https://doi.org/10.1002/anie.201802550>.
- (159) Wenz, G.; Han, B. H.; Müller, A. Cyclodextrin Rotaxanes and Polyrotaxanes. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (3), 782–817. <https://doi.org/10.1021/cr970027+>.
- (160) Cherraben, S.; Scelle, J.; Hasenknopf, B.; Vives, G.; Sollogoub, M. Precise Rate Control of Pseudorotaxane Dethreading by PH-Responsive Selectively Functionalized Cyclodextrins. *Org. Lett.* **2021**, *23* (20), 7938–7942. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c02940>.
- (161) Krishnan, Y.; Simmel, F. C. Nucleic Acid Based Molecular Devices. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (14), 3124–3156. <https://doi.org/10.1002/anie.200907223>.
- (162) Saha, S.; Roy, A.; Roy, K.; Roy, M. N. Study to Explore the Mechanism to Form Inclusion Complexes of β -Cyclodextrin with Vitamin Molecules. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (April), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35764>.
- (163) Song, C.; Zhang, S.; Huang, H. Choosing a Suitable Method for the Identification of Replication Origins in Microbial Genomes. *Front. Microbiol.* **2015**, *6* (SEP), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01049>.
- (164) Mariano, M.; Bernardinelli, O. D.; Pires-Oliveira, R.; Ferreira, G. A.; Loh, W. Inclusion Complexation between α -Cyclodextrin and Oligo(Ethylene Glycol) Methyl Ether Methacrylate. *ACS Omega* **2020**, *5* (16), 9517–9528. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00741>.
- (165) Shi, J.; Guo, D. S.; Ding, F.; Liu, Y. Unique Regioselective Binding of Permethylated β -Cyclodextrin with Azobenzene Derivatives. *European J. Org. Chem.* **2009**, No. 6, 923–931.

<https://doi.org/10.1002/ejoc.200800829>.

- (166) Wang, M.; Zhang, X.; Li, L.; Wang, J.; Wang, J.; Ma, J.; Yuan, Z.; Lincoln, S. F.; Guo, X. Photo-Reversible Supramolecular Hydrogels Assembled by α -Cyclodextrin and Azobenzene Substituted Poly(Acrylic Acid)s: Effect of Substitution Degree, Concentration, and Tethered Chain Length. *Macromol. Mater. Eng.* **2016**, *301* (2), 191–198. <https://doi.org/10.1002/mame.201500295>.
- (167) Ferrazza, R.; Rossi, B.; Guella, G. DOSY-NMR and Raman Investigations on the Self-Aggregation and Cyclodextrin Complexation of Vanillin. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (25), 7147–7155. <https://doi.org/10.1021/jp504406j>.
- (168) Doan, A. T. N.; Doan, V. T. H.; Katsuki, J.; Fujii, S.; Kono, H.; Sakurai, K. Dramatically Increased Binding Constant of Water-Soluble Cyclodextrin Hyperbranched Polymers: Explored with Diffusion Ordered NMR Spectroscopy (DOSY). *ACS Omega* **2022**, *7* (13), 10890–10900. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06194>.
- (169) Hazra, S.; Kumar, G. S. Physicochemical Properties of Inclusion Complexes of Sanguinarine with Natural Cyclodextrins: Spectroscopy, Calorimetry and NMR Studies. *RSC Adv.* **2015**, *5* (3), 1873–1882. <https://doi.org/10.1039/c4ra10204e>.
- (170) Zgani, I.; Idriss, H.; Barbot, C.; Djedaini-Pilard, F.; Petit, S.; Hubert-Roux, M.; Estour, F.; Gouhier, G. Positive Variation of the MRI Signal via Intramolecular Inclusion Complexation of a C-2 Functionalized β -Cyclodextrin. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* (3), 564–569. <https://doi.org/10.1039/c6ob02583h>.
- (171) Gawroński, J.; Grajewski, J. The Significance of Induced Circular Dichroism. *Org. Lett.* **2003**, *5* (18), 3301–3303. <https://doi.org/10.1021/ol0352456>.
- (172) Kiss, E.; Szabó, V. A.; Horváth, P. Simple Circular Dichroism Method for Selection of the Optimal Cyclodextrin for Drug Complexation. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2019**, *95* (3–4), 223–233. <https://doi.org/10.1007/s10847-019-00938-2>.
- (173) Poulson, B. G.; Alsulami, Q. A.; Sharfalddin, A.; El Agammy, E. F.; Mouffouk, F.; Emwas, A.-H.; Jaremko, L.; Jaremko, M. Cyclodextrins: Structural, Chemical, and Physical Properties, and Applications. *Polysaccharides* **2021**, *3* (1), 1–31. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides3010001>.
- (174) Qi, W.; Ma, C.; Yan, Y.; Huang, J. Chirality Manipulation of Supramolecular Self-Assembly Based on the Host-Guest Chemistry of Cyclodextrin. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2021**, *56*, 101526. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101526>.
- (175) Wu, L.; Huang, C.; Emery, B. P.; Sedgwick, A. C.; Bull, S. D.; He, X. P.; Tian, H.; Yoon, J.; Sessler, J. L.; James, T. D. Förster Resonance Energy Transfer (FRET)-Based Small-Molecule Sensors and Imaging Agents. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (15), 5110–5139. <https://doi.org/10.1039/c9cs00318e>.

- (176) Dutta Choudhury, S.; Pal, H. Supramolecular and Suprabiomolecular Photochemistry: A Perspective Overview. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22* (41), 23433–23463. <https://doi.org/10.1039/d0cp03981k>.
- (177) Beatty, M. A.; Borges-González, J.; Sinclair, N. J.; Pye, A. T.; Hof, F. Analyte-Driven Disassembly and Turn-On Fluorescent Sensing in Competitive Biological Media. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (10), 3500–3504. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13298>.
- (178) Sun, S.; Li, F.; Liu, F.; Wang, J.; Peng, X. Fluorescence Detecting of Paraquat Using Host-Guest Chemistry with Cucurbit[8]Urils. *Sci. Rep.* **2014**, *4* (SREP03570). <https://doi.org/10.1038/srep03570>.
- (179) Zhou, J.; Jia, Y.; Wang, X.; Jia, M.; Pan, H.; Sun, Z.; Chen, J. Excited-State Dynamics of Proflavine after Intercalation into DNA Duplex. *Molecules* **2022**, *27* (23). <https://doi.org/10.3390/molecules27238157>.
- (180) Jain, S. S.; Lafratta, C. N.; Medina, A.; Pelse, I. Proflavine-DNA Binding Using a Handheld Fluorescence Spectrometer: A Laboratory for Introductory Chemistry. *J. Chem. Educ.* **2013**, *90* (9), 1215–1217. <https://doi.org/10.1021/ed300481u>.
- (181) Sasikala, W. D.; Mukherjee, A. Structure and Dynamics of Proflavine Association around DNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (15), 10383–10391. <https://doi.org/10.1039/c5cp07789c>.
- (182) Cafferty, B. J.; Musetti, C.; Kim, K.; Horowitz, E. D.; Krishnamurthy, R.; Hud, N. V. Small Molecule-Mediated Duplex Formation of Nucleic Acids with “incompatible” Backbones. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (31), 5436–5439. <https://doi.org/10.1039/c6cc00779a>.
- (183) Kumar, V.; Sengupta, A.; Gavvala, K.; Koninti, R. K.; Hazra, P. Spectroscopic and Thermodynamic Insights into the Interaction between Proflavine and Human Telomeric G-Quadruplex DNA. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (38), 11090–11099. <https://doi.org/10.1021/jp506267b>.
- (184) Sasikala, W. D.; Mukherjee, A. Intercalation and De-Intercalation Pathway of Proflavine through the Minor and Major Grooves of DNA: Roles of Water and Entropy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15* (17), 6446–6455. <https://doi.org/10.1039/c3cp50501d>.
- (185) Xiong, Y.; Li, J.; Huang, G.; Yan, L.; Ma, J. Interacting Mechanism of Benzo(a)Pyrene with Free DNA in Vitro. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *167*, 854–861. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.042>.
- (186) Singh, V. K.; Mishra, H.; Ali, R.; Umrao, S.; Srivastava, R.; Abraham, S.; Misra, A.; Singh, V. N.; Mishra, H.; Tiwari, R. S.; Srivastava, A. In Situ Functionalized Fluorescent WS₂-QDs as Sensitive and Selective Probe for Fe³⁺ and a Detailed Study of Its Fluorescence Quenching. *ACS Appl. Nano Mater.* **2019**, *2* (1), 566–576. <https://doi.org/10.1021/acsanm.8b02162>.
- (187) Santra, D. C.; Bera, M. K.; Sukul, P. K.; Malik, S. Charge-Transfer-Induced Fluorescence Quenching

- of Anthracene Derivatives and Selective Detection of Picric Acid. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (6), 2012–2019. <https://doi.org/10.1002/chem.201504126>.
- (188) Basu, A.; Kumar, G. S. A Biophysical Investigation on the Binding of Proflavine with Human Hemoglobin: Insights from Spectroscopy, Thermodynamics and AFM Studies. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2016**, *165*, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.10.010>.
- (189) Roy, B.; Bar, A. K.; Gole, B.; Mukherjee, P. S. Fluorescent Tris-Imidazolium Sensors for Picric Acid Explosive. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (3), 1306–1310. <https://doi.org/10.1021/jo302585a>.
- (190) Sayed, M.; Pal, H. PH-Assisted Control over the Binding and Relocation of an Acridine Guest between a Macrocyclic Nanocarrier and Natural DNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (14), 9519–9532. <https://doi.org/10.1039/c4cp05335d>.
- (191) Chang, D.; Whiteley, A. T.; Gwilt, K. B.; Lencer, W. I.; Mekalanos, J. J.; Thiagarajah, J. R. Extracellular Cyclic Dinucleotides Induce Polarized Responses in Barrier Epithelial Cells by Adenosine Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117* (44), 27502–27508. <https://doi.org/10.1073/pnas.2015919117>.
- (192) Danilchanka, O.; Mekalanos, J. J. XCyclic Dinucleotides and the Innate Immune Response. *Cell* **2013**, *154* (5), 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.014>.
- (193) Opoku-Temeng, C.; Zhou, J.; Zheng, Y.; Su, J.; Sintim, H. O. Cyclic Dinucleotide (c-Di-GMP, c-Di-AMP, and CGAMP) Signalings Have Come of Age to Be Inhibited by Small Molecules. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (60), 9327–9342. <https://doi.org/10.1039/c6cc03439j>.
- (194) Van Giesen, K. J. D.; Thompson, M. J.; Meng, Q.; Lovelock, S. L. Biocatalytic Synthesis of Antiviral Nucleosides, Cyclic Dinucleotides, and Oligonucleotide Therapies. *JACS Au* **2023**, *3* (1), 13–24. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00481>.
- (195) Nakayama, S.; Kelsey, I.; Wang, J.; Roelofs, K.; Stefane, B.; Luo, Y.; Lee, V. T.; Sintim, H. O. Thiazole Orange-Induced c-Di-GMP Quadruplex Formation Facilitates a Simple Fluorescent Detection of This Ubiquitous Biofilm Regulating Molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (13), 4856–4864. <https://doi.org/10.1021/ja1091062>.
- (196) Nakayama, S.; Kelsey, I.; Wang, J.; Sintim, H. O. C-Di-GMP Can Form Remarkably Stable G-Quadruplexes at Physiological Conditions in the Presence of Some Planar Intercalators. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (16), 4766–4768. <https://doi.org/10.1039/c0cc05432a>.
- (197) Zhang, Z.; Kim, S.; Gaffney, B. L.; Jones, R. A. Polymorphism of the Signaling Molecule C-Di-GMP. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (21), 7015–7024. <https://doi.org/10.1021/ja0613714>.
- (198) Egli, M.; Gessner, R. V.; Williams, L. D.; Quigley, G. J.; Van Der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Rich,

- A.; Frederick, C. A. Atomic-Resolution Structure of the Cellulose Synthase Regulator Cyclic Diguanylic Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87* (8), 3235–3239. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.8.3235>.
- (199) Xuan, T. F.; Wang, Z. Q.; Liu, J.; Yu, H. T.; Lin, Q. W.; Chen, W. M.; Lin, J. Design and Synthesis of Novel C-Di-GMP G-Quadruplex Inducers as Bacterial Biofilm Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (15), 11074–11089. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00465>.
- (200) Zhou, J.; Sayre, D. A.; Zheng, Y.; Szmecinski, H.; Sintim, H. O. Unexpected Complex Formation between Coralyne and Cyclic Diadenosine Monophosphate Providing a Simple Fluorescent Turn-on Assay to Detect This Bacterial Second Messenger. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (5), 2412–2420. <https://doi.org/10.1021/ac403203x>.
- (201) T. Pessine, F. B.; Calderini, A.; L., G. Review: Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. *Magn. Reson. Spectrosc.* **2012**, *1*. <https://doi.org/10.5772/32029>.

Titre : Intercalant d'ADN photosensible : une nouvelle brique d'autoassemblage supramoléculaire pour des systèmes fonctionnels stimulables et dynamiques

Résumé :

Développer des systèmes stimuli-répondants à base d'ADN ou dérivés d'ADN est d'un grand intérêt pour pouvoir contrôler certaines de leurs fonctions. Au cours de cette thèse, nous avons ainsi développé un nouveau concept permettant de fabriquer des systèmes à base d'ADN ou dérivés d'ADN stimulables basé sur l'utilisation d'intercalants d'ADN photosensibles capable d'interagir avec la double hélice. L'intercalant d'ADN étudié dans ce travail de thèse est l'AzoDiGua. Il s'agit d'un azobenzène fonctionnalisé avec deux unités guanidinium ayant une géométrie bolaforme et possédant des propriétés d'intercalation et de fluorescence induite par agrégation. Dans une première étude, nous avons développé des agrégats supramoléculaires formés par co-assemblage entre l'AzoDiGua et le nucléotide ATP en solution dans des conditions biocompatibles. Ces agrégats se sont avérés être fluorescents et stimulables sous l'action de différents stimuli tels que la lumière (photoisomérisation), les métaux (chélation), une enzyme (hydrolyse) ou encore une cyclodextrine (complexation hôte-invité). Dans une seconde étude, nous avons développé un système capable de contrôler l'appariement des bases d'ADN à température constante par l'intercalation. Pour ce faire, nous avons construit un pseudo-rotaxane photoswitchable formé par l'inclusion de l'AzoDiGua au sein de la cavité hydrophobe d'une α -cyclodextrine. Ce pseudo-rotaxane a ensuite été utilisé pour contrôler dynamiquement l'intercalation de l'AzoDiGua au sein de l'ADN et ainsi l'hybridation/melting d'ADN à température constante.

Mots clés : *Interactions intermoléculaires, autoassemblage, complexe hôte-invité, intercalation, fluorescence, systèmes stimulables, ATP, cyclodextrines, azobenzène, hybridation d'ADN, physico-chimie*

Techniques : *Spectroscopie de fluorescence, dichroïsme circulaire, RMN, RPE, microscopie optique, spectroscopie d'absorption UV-visible, calorimétrie ITC, courbes FRET de fusion d'ADN*

Title: Photosensitive DNA intercalator: a new brick of supramolecular self-assembly for dynamic and stimuli-responsive functional system

Summary:

Developing stimuli-responsive systems based on DNA or DNA derivatives is of great interest to control some biological processes. During this work, we developed a new concept enabling to build dynamic DNA or DNA derivatives supramolecular systems based on the use of photosensitive DNA intercalators. For this purpose, we synthesized an azobenzene molecule, AzoDiGua, functionalized with two guanidinium properties with a bolaform geometry and having intercalation and aggregation-induced fluorescence properties. Firstly, we developed supramolecular aggregates formed by the coassembly of AzoDiGua and ATP nucleotide in solution and biocompatible conditions. These species were found to be fluorescent and responsive to a variety of stimuli such as light (photoisomerization), metals (chelation), an enzyme (hydrolysis) and a cyclodextrin (host-guest complexation). Secondly, we developed a new pseudo-rotaxane formed by the inclusion of AzoDiGua within the hydrophobic cavity of an α -cyclodextrin. This pseudo-rotaxane was then used as a trigger to dynamically control the intercalation of AzoDiGua and thus the hybridization/melting of double-stranded DNA at constant temperature.

Key words: *Intermolecular interactions, self-assembly, host-guest complex, intercalation, fluorescence, stimuli-responsive systems, ATP, cyclodextrins, azobenzene derivatives, DNA melting, physical chemistry*

Skills: *Fluorescence spectroscopy, circular dichroism, NMR, EPR, optical microscopy, UV-vis absorption spectroscopy, ITC calorimetry, FRET DNA melting curves*

