UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 470 :
CHIMIE DE PARIS SUD

Laboratoire : UMR9187/U1196 "Chimie, modélisation et imagerie pour la biologie" - Institut Curie

THÈSE DE DOCTORAT

CHIMIE
par

Xiao XIE

Développement des sondes fluorescentes pour la détection de l'ADN quadruplex

Date de soutenance : 28/01/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Marie-Paule TEULADE-FICHOU	Directrice de recherche (Orsay, France)
Rapporteurs :	Jean-Louis MERGNY	Directeur de recherche (Bordeaux, France)
	Martine DEMEUNYNCK	Directrice de recherche (Grenoble, France)
Examinateurs :	Rachel MEALLET-RENAULT	Professeur (Orsay, France)
	Sylvain LADAME	Maître de conférences (London, Royaume-Uni)
	Anton GRANZHAN	Chargé de recherche CNRS (Orsay, France)

RESUME

Développement des sondes fluorescentes pour la détection de l'ADN quadruplex

Les acides nucléiques simple-brins contenant des répétitions de guanines peuvent former des structures secondaires non canoniques dites G-quadruplexes, composées de plusieurs couches de quartets de guanine. Malgré de nombreuses études *in vivo*, les preuves de présence de structures quadruplexes *in vivo* restent indirectes. L'objectif de ce travail était la recherche de sondes fluorescentes capables de signaler la présence d'ADN quadruplex et détecter sa structure (topologie).

Deux séries de sondes fluorescentes ont été envisagées et préparées : les colorants styryles (majoritairement distyryles) et les dérivés PDC-coumarines. La conception de ces deux séries est basée sur l'échafaudage bisquinolinium pyridodicarboxamide (PDC-360A), un ligand sélectif ayant une bonne affinité vis-à-vis des structures d'ADN quadruplexes, mais qui est non-fluorescent. En s'inspirant de cette molécule et du motif styryle, connu pour ses propriétés spectroscopiques, nous avons préparé une librairie de colorants distyryles. Une deuxième série, les dérivés PDC-coumarine, est synthétisée afin d'introduire la propriété fluorescente de la coumarine dans le PDC par une liaison covalente.

Les propriétés de colorant de ces deux librairies (65 composés) ont été étudiées en présence de nombreuses structures d'ADN (quadruplex et duplex) en utilisant un criblage par fluorescence sur microplaques et des méthodes de titration. Nos résultats montrent que certains colorants synthétisés possèdent une haute réponse fluorimétrique (facteur d'augmentation de fluorescence de 200 à 600) vis-à-vis de différentes structures d'ADN et d'ARN quadruplex, ayant une très faible réponse fluorimétrique vis-à-vis de l'ADN duplex. Cela permet de marquer sélectivement l'ADN quadruplex dans la solution ou sur les gels d'électrophorèse. Ces résultats représentent une première étape vers l'utilisation de ces sondes dans un contexte biologique, par exemple dans l'imagerie de fluorescence.

SYNOPSIS

Development of fluorescent probes for detection of quadruplex DNA

Single-stranded nucleic acids containing guanine repeats can form non-canonical secondary structures called G-quadruplexes. These structures are composed of several guanine quartets, maintained by hydrogen bonds and metal cations (K^+ or Na^+) coordinated between G-quartets. In spite of being well-studied *in vitro*, the evidence for the presence of quadruplex DNA structures *in vivo* remains mainly indirect. The objective of this work was research of fluorescent probes that can signal the presence of quadruplex DNA and detect its structure (topology).

Two series of fluorescent probes were considered and prepared: styryls dyes (mostly distyryls) and PDC-coumarin derivatives. The design of these two series is based on the molecular scaffold of bisquinolinium pyridodicarboxamide (PDC-360A), a selective ligand with good affinity for quadruplex DNA structures but which is not fluorescent. Inspired by this molecule and the styryl motif, which is known for its spectroscopic properties, we considered a library of distyryles dyes. A second series, the PDC-coumarin derivatives, was developed to introduce the fluorescence property of coumarin in the PDC by a covalent link.

The properties of dyes of these two libraries (65 compounds) were studied in the presence of a number of DNA structures (quadruplex and duplex) by a fluorescent screening using microplate and titration methods. Our results show that some of synthesized dyes display high fluorescence response (i.e. fluorescence increase factor from 200 to 600) for different quadruplex DNA and RNA structures, while having a very low fluorimetric response for duplex DNA. This allows a selective visualization of quadruplex DNA in solution or in electrophoresis gel. These results represent the first steps towards the use of these probes in a biological context, for example in fluorescence imaging.

TABLE DES MATIÈRES

Curriculum vitae **5**

Remerciements **7**

1 Introduction et bibliographie **9**

1.1 Structures de l'ADN 9

1.1.1 Structure primaire 9

1.1.2 Structure secondaire majoritaire : la double hélice droite 10

1.1.3 Autres structures secondaires 10

1.2 L'ADN quadruplex 13

1.2.1 Généralités 13

1.2.2 G-quadruplexes monomériques intramoléculaires 15

1.2.3 G-Quadruplex télomérique 17

1.2.4 G-Quadruplexes dans les promoteurs des oncogènes 19

1.3 Rôles biologiques de l'ADN quadruplex 22

1.3.1 Généralités 22

1.3.2 G-quadruplex dans le télomère humain 23

1.3.3 G-quadruplex dans les promoteurs des oncogènes 24

1.3.4 G-quadruplex dans les séquences transcrites 25

1.4 Ligands de l'ADN et de l'ARN quadruplexes 26

1.4.1 Ligands s'empilant sur G-quartet 28

1.4.2 Ligands de sillons 31

1.5 Sondes fluorescentes d'ADN et d'ARN quadruplexes 32

1.5.1 Principes de la fluorescence 32

1.5.2 Sondes fluorescentes : généralités 34

1.5.3 Sondes fluorescentes pour les G-quadruplexes 36

1.6 Fluorophores biphotoniques 43

1.6.1 Principe de l'absorption à deux photons 43

1.6.2 Fluorophores biphotoniques 44

2 Résultats et discussions 47

2.1 Conception générale de ligands fluorescents de l'ADN quadruplex 47

2.2 Sondes fluorescentes basées sur le fluorophore styryle 48

2.2.1 Conception 48

2.2.2 Etudes de sondes « prototypes » 50

2.2.3 Synthèse d'une bibliothèque de colorants styryles 69

2.2.4 Criblage de sondes fluorescentes pour l'ADN quadruplex sur microplaques 85

2.2.5 Titrations fluorimétriques du colorant 1j 89

2.2.6 Imagerie cellulaire 91

2.2.7 Fluorescence du colorant 1j sous excitation biphotonique. 95

2.2.8 Analyse multiplexe de structures de l'ADN à l'aide des sondes fluorescentes 97

2.2.9 Conclusions 104

2.3 Sondes fluorescentes de type PDC-coumarine 106

2.3.1 Conception 106

2.3.2 Synthèse 108

2.3.3 Etudes de l'interaction des PDC-coumarines avec l'ADN 111

2.3.4 Conclusion 117

3 Conclusions et perspectives 119

3.1 Conclusions 119

3.2 Perspectives 121

4 Partie expérimentale 123

4.1 Analyses 123

4.1.1 Généralités 123

4.1.2 Analyses cristallographiques 123

4.1.3 Titrations spectrophotométriques et spectrofluorimétriques 124

4.1.4 Criblage fluorimétrique sur le lecteur de plaques 125

4.1.5 Dénaturation thermique de l'ADN 125

4.2 Synthèse 126

4.2.1 Généralités 126

4.2.2 Synthèse des colorants styryles 127

4.2.3 Synthèse des PDC-coumarines 174

Bibliographie 187

Annexes 202

CURRICULUM VITAE

Xiao XIE
3 Allée de la Gambauderie
91190 Gif sur Yvette,
Ile de France, France

Nationalité : chinoise
Né le 17/04/1986
Tél: +33 (0)6 26 51 76 55
E-mail: xie-xiao@hotmail.fr

Formation

2011-2014	**Doctorat en Chimie Bio-organique** de l'institut Curie – Université Paris Sud ***« Sondes fluorescentes pour la détection d'ADN quadruplex»***
2011	**Master 2 Chimie organique** de l'Université Paris-Sud
2010	**Master 1 Chimie** de l'Université Pierre et Marie Curie
2009	**Licence Chimie Biomoléculaire** de l'Université Montpellier II
2007	**DUT CHIMIE** au département chimie de l'IUT1 de Grenoble

Expérience professionnelle

2011 (5 mois)	Stage à l'Institut Curie à Orsay sous responsabilité du Dr Anton GRANZHAN ***« Synthèse de dérivés hydrosolubles du triptycène et leur interaction avec l'ADN »***
2010 (5 mois)	Stage à Sanofi-Aventis (centre de recherche à Chilly-Mazarin) sous responsabilité du Dr Alain BRAUN ***« Synthèse de molécules chimiques à visée thérapeutique »***
2008 (1 mois)	Stage technicien supérieur à l'Ecole nationale supérieure de chimie de Montpellier « ***Synthèse organique à visée anti-cancéreuse»***
2007 (1 mois)	Stage technicien supérieur chez AZASYNTH-Montepellier ***« Synthèse de briques moléculaire et de librairies de composés hétérocycliques***
2007 (3 mois)	Stage technicien supérieur au Département Chimie Molécule-Grenoble sous d responsabilité du Dr Didier BOTURYN « ***Synthèse de peptides à visée anti-cancéreuse*** »

Publications

X. Xie, B. Choi, E. Largy, R. Guillot, A. Granzhan, M.-P. Teulade-Fichou, Asymmetric Distyrylpyridinium Dyes as Red-Emitting Fluorescent Probes for Quadruplex DNA, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 1214–1226.

Conférences

1. 01/09/2014 – 04/09/2014 - **Poster**, 5th EuCheMS Chemistry Congress, Istanbul, Turkey
2. 13/07/2014 - 18/07/2014 - **Poster**, The XXVth IUPAC Symposium on Photochemistry, Bordeaux, France
1. 23/03/2014 – 27/03/2014 - **Poster**, Rencontres de Chimie Organique Biologique (RECOB15), Aussois, France
3. 07/07/2013 - 12/07/2013 - **Poster**, The 18th European Symposium on Organic Chemistry (ESOC 2013), Marseille, France
4. 31/05/2012 - **Poster**, 16ème Journée de Chimie Organique et Chimie Organique Biologique de la Montagne – Sainte – Geneviève, Paris, France

Compétences professionnelles

- Synthèse organique, RMN, Spectroscopie de masse, Chromatographie, Spectroscopie IR, AA, UV-visible etc.
- **Informatique** : Word, Excel, PowerPoint, ChemDraw, Scifinder etc.
- **Modélisation moléculaire** : Scigress, Hyperchem

Langues

Français	Courant	**Anglais**	Moyen
Chinois	Langue maternelle	**Allemand**	Notions

Divers

Violon (12 ans de pratique) Tennis de table Tennis sur court Lecture

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire « Conception, Synthèse et Vectorisation de Biomolécules », UMR176-Institut Curie.

Je remercie tout d'abord Marie-Paule Teulade-Fichou, Directeur de Recherche au CNRS, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et dirigé ma thèse. Je la remercie pour son support, ses conseils et son enthousiasme tout au long de ce travail

Je tiens à remercier tout particulier Anton Granzhan, Chargé de Recherche au CNRS, encadrant de ma thèse et mon stage de M2, pour sa décision de me garder en thèse après mon stage, sa gentillesse, son sérieux et surtout le temps qu'il m'a consacré.

Je remercie Dilan qui est arrivée en même temps que moi et travaillait à côté de moi, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et la correction du français de ce manuscrit.

Je remercie les stagiaires Véronique et Gaëll qui m'ont beaucoup aidé pour avancer la thèse.

Un grand merci à Reuben, Elsa, Ana, Su, Éric, Fabien, Blaise, Elodie, Naoko, Ténin, Aude, Chi-Hung, Corinne, Tom, Nicolas, Marianne, Florence, Delphine et toute l'équipe UMR176.

Je souhaite remercier ma fiancée Yang SI. Pour m'avoir accompagné et soutenu pendant ces trois ans de thèse.

En dernier, je remercie mon père Chongde XIE, ma mère Jine Zhang. Pour leur soutien lointain et précieux.

1 INTRODUCTION ET BIBLIOGRAPHIE

1.1 Structures de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une macromolécule présente dans les cellules vivantes, qui porte l'information génétique nécessaire au développement d'un organisme. Il est constitué de plusieurs dizaines de millions à 150 milliards de nucléotides (génome le plus grand découvert jusqu'à présent) selon les organismes [1]; la taille du génome humain est approximativement de 3,2 milliards de paires de nucléotides. Les nucléotides sont composés de désoxyribose, de groupes phosphate et de bases azotées. L'information génétique est codée par quatre bases azotées (adénine, guanine, cytosine et thymine, Figure 1).

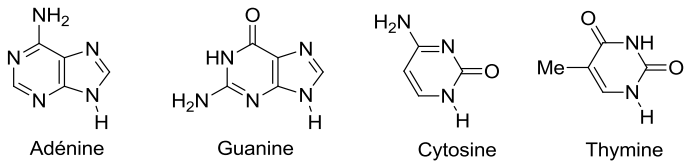


Figure 1. Structures des bases canoniques de l'ADN.

1.1.1 Structure primaire

La structure primaire de l'ADN représente un polymère linéaire de nucléosides reliés par des esters de phosphate, plus précisément par des liaisons de groupes hydroxyles 5' avec les groupes hydroxyles 3' des sucres (5' et 3' signifient les positions 5 et 3, respectivement, du furanose) [2]. Le sens d'un brin d'ADN est de 5' à 3' dans des organismes vivants (Figure 2).

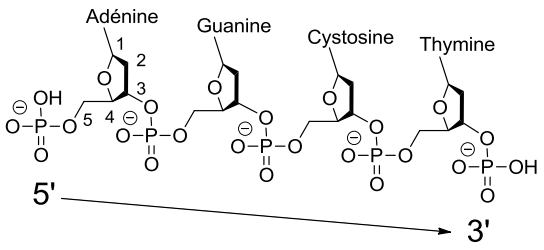


Figure 2. Structure primaire de l'ADN de la séquence d(AGCT).

1.1.2 Structure secondaire majoritaire : la double hélice droite

La structure majoritaire de l'ADN, découverte par Watson et Crick en 1953 [3], est une double-hélice droite (ADN-B, Figure 4b) composée de deux brins primaires qui sont complémentaires grâce à l'appariement de bases canonique A-T et C-G (Figure 3). Il s'agit de la forme dominante de l'ADN double-brin en solution.

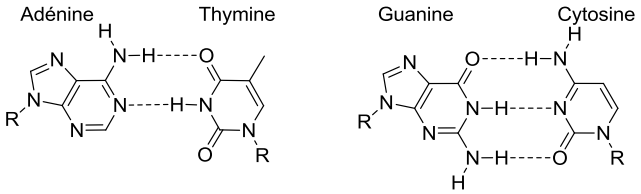


Figure 3. Appariements canoniques A-T et G-C par des liaisons de type Watson-Crick.

Une autre double-hélice droite ADN-A (Figure 4a) a une structure plus courte et compacte que la structure ADN-B. La plupart des formes découvertes sont généralement classées dans les familles A et B [4].

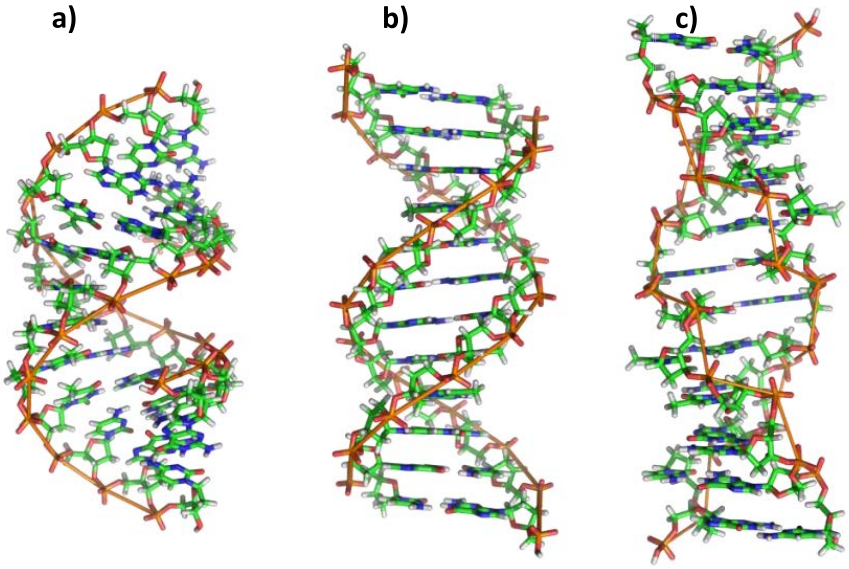


Figure 4. Les structures de l'ADN-A (a), -B(b), et –Z(c)[5].

1.1.3 Autres structures secondaires

L'ADN-Z (Figure 4c) est une hélice gauche, contrairement à l'ADN A et l'ADN B qui sont des hélices droites, et présente une structure en zig-zag. Sa formation est favorisée par des séquences alternées de purines-pyrimidines [6].

L'ADN triplex (à trois brins) se produit lorsqu'un simple brin d'ADN se lie par des liaisons hydrogènes de Hoogsteen dans le grand sillon d'ADN-B double-brin, riche en purines. Ce simple brin est ainsi antiparallèle par rapport au duplex d'ADN (Figure 5)

[7]. Cette structure se forme à pH physiologique et est stabilisée par un surenroulement négatif [7]. Les séquences capables de former des triplexes sont communes chez les eucaryotes mais beaucoup moins chez les prokaryotes [8]. Les triplexes sont supposés être responsables de l'instabilité génomique en provoquant des fractures dans les doubles brins [9].

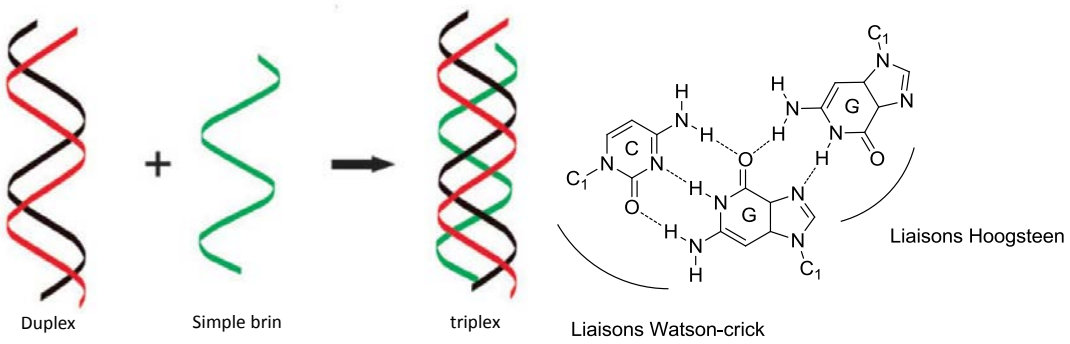


Figure 5. Formation de triplex (images extraites de réf [10]) et exemple d'un triplet de base C · G x G.

La formation de la structure cruciforme (jonction de Holiday) est favorisée par le surenroulement négatif dans l'ADN-B, qui forme une croix à quatre bras et ressemble à une jonction (Figure 6) [11]. Ce motif de croix nécessite au moins 6 nucléotides répétées inversées et est situé près de l'origine de réplication, des jonctions des points d'arrêt et des promoteurs dans les organismes diversifiés [12]. Les cruciformes pourraient jouer des rôles positifs dans la stabilisation du chromosome Y humain [13], [14].

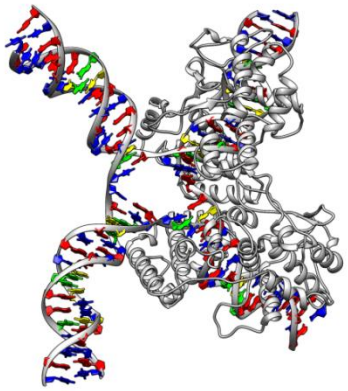


Figure 6. Structure de cruciforme (PDB : 3CRX) [15]. Guanines en vert, thymines en bleu, adénines en rouge et la squelette glycophosphate en blanc. Image générée avec UCSF [16].

La structure du i-motif est formée par deux double-brins parallèles de type C-C^+ intercalés l'un entre l'autre avec une orientation de tête-à-queue (Figure 7) [17]. Deux

brins complémentaires riches en cytosine forment un double-brin parallèle aux paires de bases semi protonées C-C$^+$, qui sont maintenues elles-mêmes par trois liaisons hydrogène.

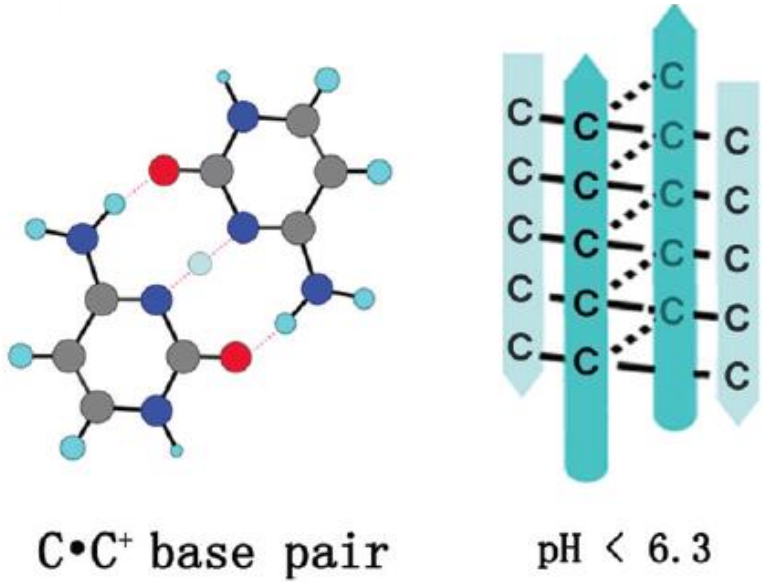


Figure 7. Structure du i-motif (image extraite de réf [18]).

Des simples brins contenant des répétitions de guanines peuvent former des structures secondaires non-canoniques dites G-quadruplexes. Dans ces structures secondaires, les guanines s'associent entre elles via leurs faces dites «Hoogsteen », ce qui permet ainsi la formation d'une couche composée de 4 guanines (un G-quartet). Les G-quadruplexes sont composés de plusieurs couches de quartets maintenues par leur empilement des liaisons hydrogènes, et des cations métalliques (K^+ ou Na^+) octacoordinés entre les quartets (Figure 8).

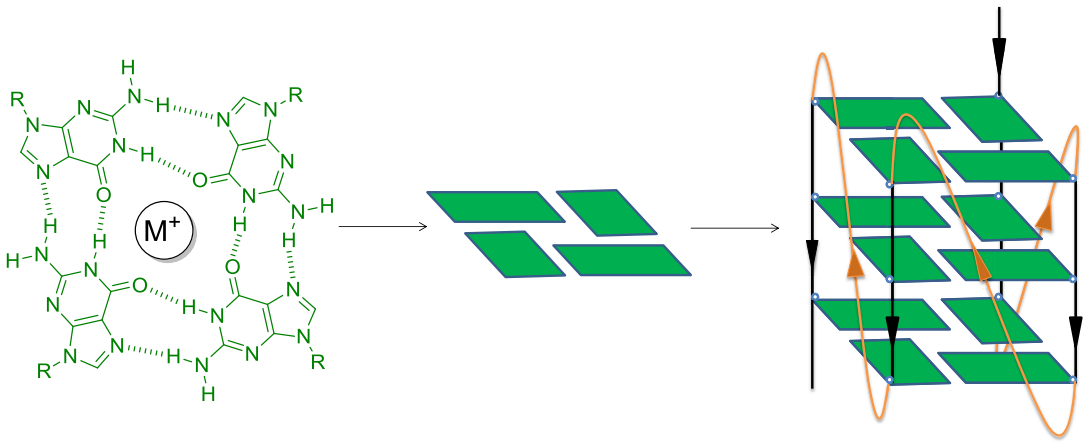


Figure 8. Interaction entre 4 guanines autour d'un cation central (K^+, Na^+ ou NH_4^+) formant un G-quartet ; exemple de structure de type G-quadruplexe produit par l'empilement de G-quartets obtenu à partir de la séquence télomérique humaine.

1.2 L'ADN quadruplex

1.2.1 Généralités

Le phénomène d'agrégation de l'acide guanylique (GMD) en solution a été découvert en 1901. En revanche, la structure exacte du G-quartet a été décrite par Gellert et ses collaborateurs par la méthode de diffraction des rayons X en 1962. Le G-quartet est composé de quatre guanines coplanaires de façon symétrique, maintenues par des liaisons hydrogène de type Hoogsteen [19].

Les G-quartets, ayant une surface π large, ont tendance à s'empiler les uns sur les autres par interaction d'empilement π-π. Les structures du G-quadruplex sont formées par l'empilement de plusieurs (au moins deux) G-quartets, et sont stabilisées par des cations intercalés entre les G-quartets et sont coordinées avec les atomes d'oxygène du groupement carbonyle de la guanine (Figure 9). Ces cations sont généralement métalliques (K^+ et Na^+). La forme K^+ est considérée comme biologiquement plus pertinente en raison de la concentration intracellulaire élevée de K^+ (~ 140 mM) par rapport à celle de Na^+ (5-15 mM). Le K^+ a aussi une meilleure coordination avec les huit guanines O6 et une faible énergie de déshydratation [20].

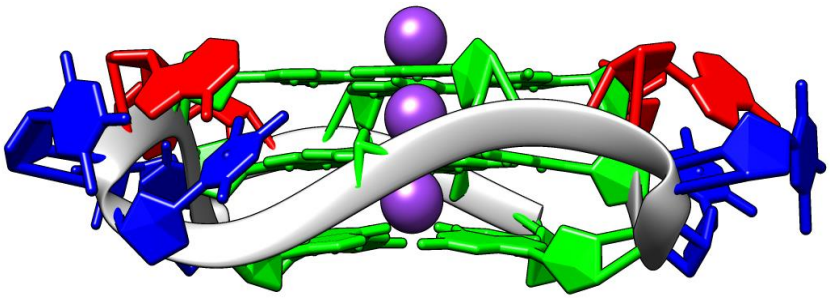


Figure 9 : Exemple du G-quadruplex à l'état solide (en cristal) formé par la séquence télomérique humaine avec coordination de cations potassium K^+ (violet) (rayons X, PDB : 1KF1 [21]). Guanines en vert, thymines en bleu, adénines en rouge et le squelette glycophosphate en blanc. Image générée avec UCSF Chimera [16] .

Les G-quadruplexes peuvent être formés à partir d'un, deux, ou quatre brins d'ADN (ou d'ARN) séparés (Figure 8) et contiennent généralement quatre répétitions de guanines au minimum. Les G-quadruplexes unimoléculaires sont formés d'un seul brin contenant au minimum quatre répétitions, ainsi chaque répétition contient au moins deux guanines (il existe des cas exceptionnels comme le c-kit87up, 1.2.4 , Figure 18). Les G-quadruplexes bimoléculaires sont formés de deux brins, soit chaque brin

contenant minimum deux répétions (2+2), soit un brin contient trois répétions et l'autre une répétition (3+1). Les G-quadruplexes tétramoléculaires sont composés de quatre brins dont chacun contient une répétition de guanine (Figure 10).

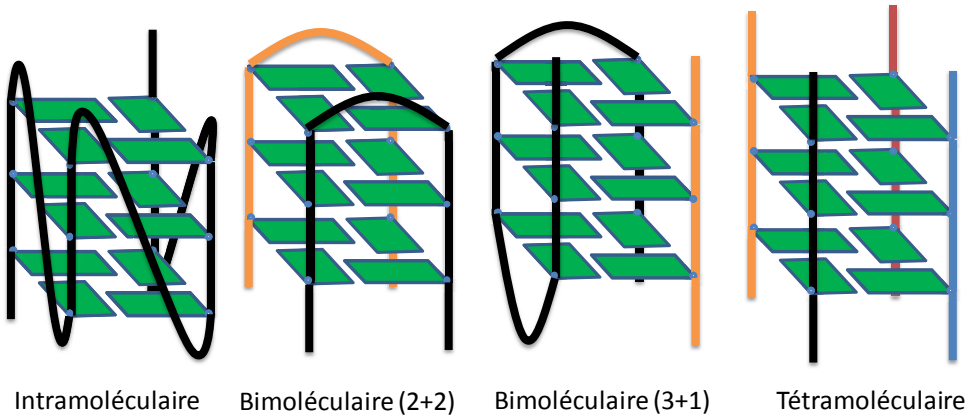


Figure 10. G-quadruplexes formés à partir d'un, deux et quatre brins d'ADN (ou d'ARN) séparés. Les boucles sont colorées en orange.

Les guanines qui composent les G-quartets peuvent avoir une conformation *syn* ou *anti* en fonction de l'angle de liaison glycosidique (Figure 11), ce qui est liée à la conformation du G-quadruplex. Les quatre guanines constituées d'un G-quartet peuvent être toutes *syn*, *anti*, ou avoir des conformations différentes au sein du même quadruplex.

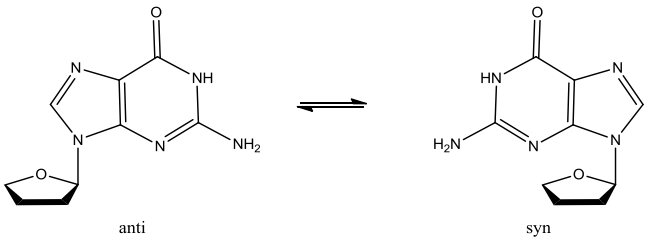


Figure 11. Conformations *syn* et *anti* d'une guanine.

Les G-quadruplexes peuvent adopter une grande variété de topologies, en conséquence de différentes combinaisons possibles entre les directions des brins, les variations de la longueur et la séquence des boucles [22].

Selon l'orientation mutuelle 5'→ 3' (1.1.1, Figure 2) des quatre brins, les G-quadruplexes peuvent avoir des topologies suivantes (Figure 12) :

- les quatre brins peuvent être parallèles (polarité identique),
- trois brins sont parallèles et un est dans le sens contraire (polarité hybride),

- deux brins sont dans un sens et deux dans le sens inverse, avec les paires adjacentes parallèles ou antiparallèles (polarité inverse).

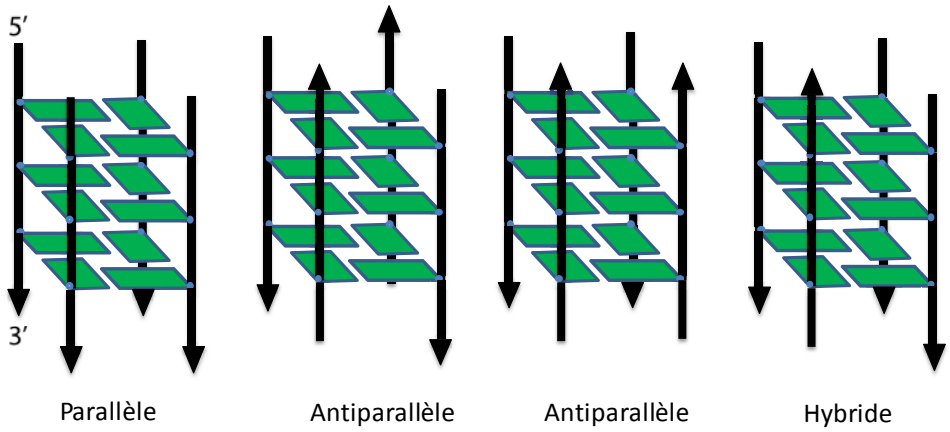


Figure 12. Structure des G-quadruplexes parallèle, hybride et antiparallèle.

Les boucles sont des chaînes de nucléotides qui relient les brins dans une structure unimoléculaire du G-quadruplex. Il existe trois types de boucles: diagonale, hélicale et latérale (Figure 13). La boucle diagonale relie les bases d'un même G-quartet qui sont diagonales et qui n'ont pas de liaisons hydrogènes entre eux. En revanche, la boucle latérale relie les bases adjacentes d'un même G-quartet qui sont liées par des liaisons hydrogènes. Dans ces deux cas, les bases liées à la boucle appartiennent aux brins antiparallèles et ont des angles de liaison glycosidique différents. La boucle hélicale du G-quadruplex est la connexion de bases situées dans différents G-quartets sur les brins adjacents parallèles, avec le même angle de liaison glycosidique [23].

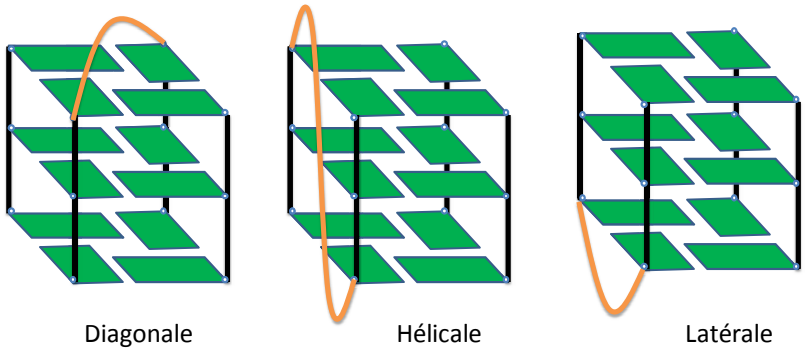


Figure 13. Les trois différents types de boucle : hélicale, latérale et diagonale. Les boucles sont colorées en orange.

1.2.2 G-quadruplexes monomériques intramoléculaires

Les G-quadruplexes intramoléculaires formés d'un seul brin d'ADN sont d'un grand intérêt biologique en raison de leur potentiel à se former dans les régions du génome telles que le télomère, qui se trouve à l'extrémité des chromosomes et qui est

responsable de la sénescence et de la mort cellulaire. Ces structures peuvent aussi se former dans les promoteurs des oncogènes, qui agissent comme des activateurs ou répresseurs de la transcription des gènes. Contrairement aux quadruplexes tétramoléculaires ou bimoléculaires, les structures intramoléculaires se forment rapidement et sont plus complexes. Ces structures intramoléculaires présentent une grande diversité de conformation [24].

Etant donné qu'il y a trois boucles dans le cas d'un quadruplex monomérique intramoléculaire, et trois types de boucles, nous avons donc 27 combinaisons possibles. Par contre, certaines d'entre elles ne sont pas stériquement possibles. Par exemple, une topologie contenant deux diagonales successives est impossible. L'exclusion de ces combinaisons donne 13 combinaisons possibles dans le sens horaire, et 13 combinaisons possibles (Figure 14) dans le sens antihoraire. Ainsi, il existe 26 combinaisons possibles [24].

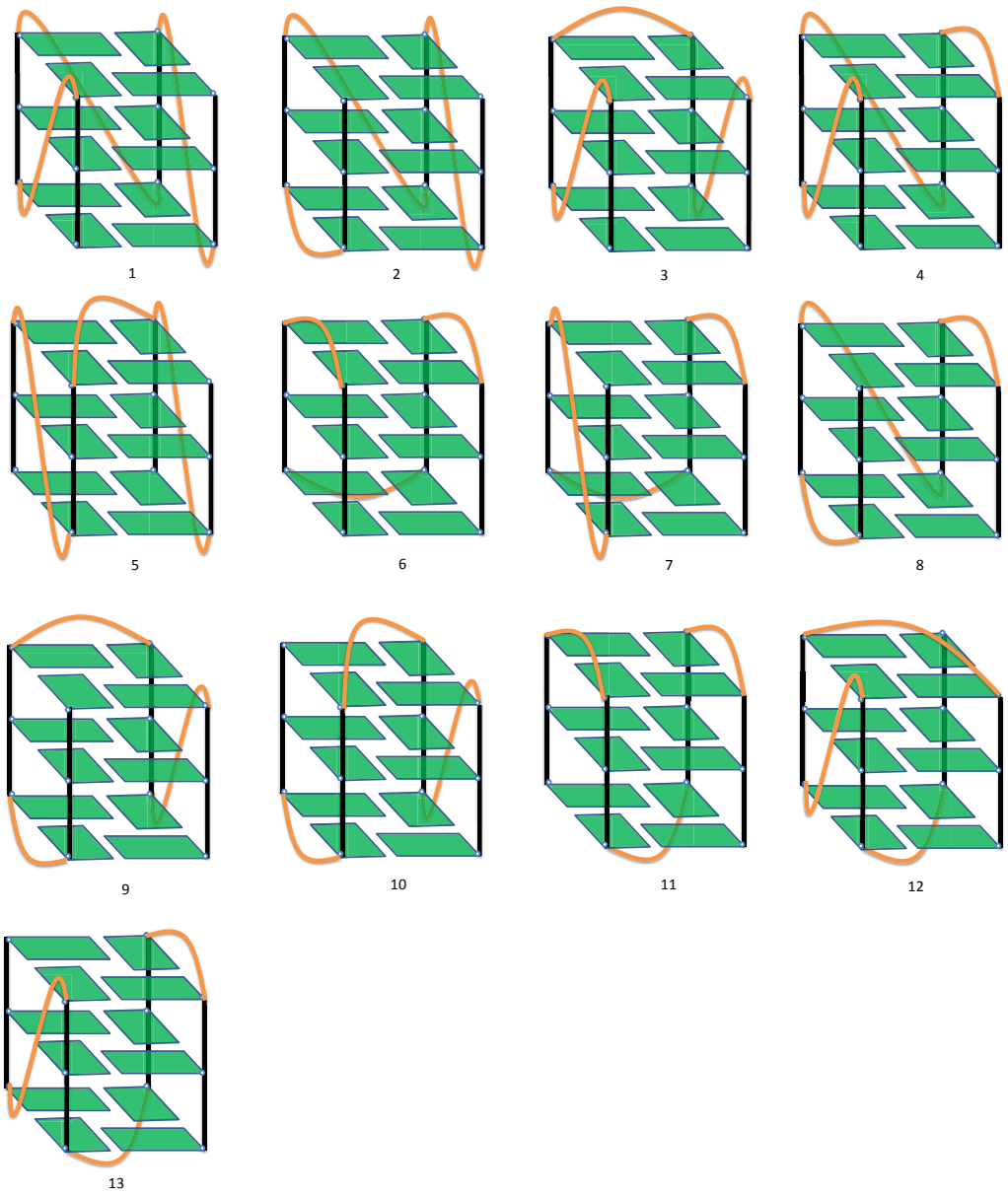


Figure 14 : Les treize combinaisons susceptibles d'exister pour un quadruplex intramoléculaire possédant trois boucles (colorées en orange) et une polarité des brins orientée dans le sens des aiguilles d'une montre. L'orientation des guanines n'est pas précisée (Figure d'après réf [24]).

De nombreuses structures de G-quadruplexes monomériques ont été étudiées par RMN et RX ces dernières années, avec différents types de G-quadruplex comme les télomères (humain ou bactérien), les promoteurs des oncogènes, les mini-satellites etc.

1.2.3 G-Quadruplex télomérique

La même séquence peut avoir des topologies différentes de G-quadruplex. Par exemple, la séquence d[AGGG(TTAGGG)$_3$] (abregée 22AG, Tableau A1, Annexes), contient quatre répétitions de (TTAGGG). Elle se trouve dans le télomère humain et peux avoir quatre conformations différentes (antiparallèle, parallèle, et deux formes

hybride) selon les différentes conditions ioniques (K^+ ou Na^+) et son état de matière (en solution ou en cristaux).

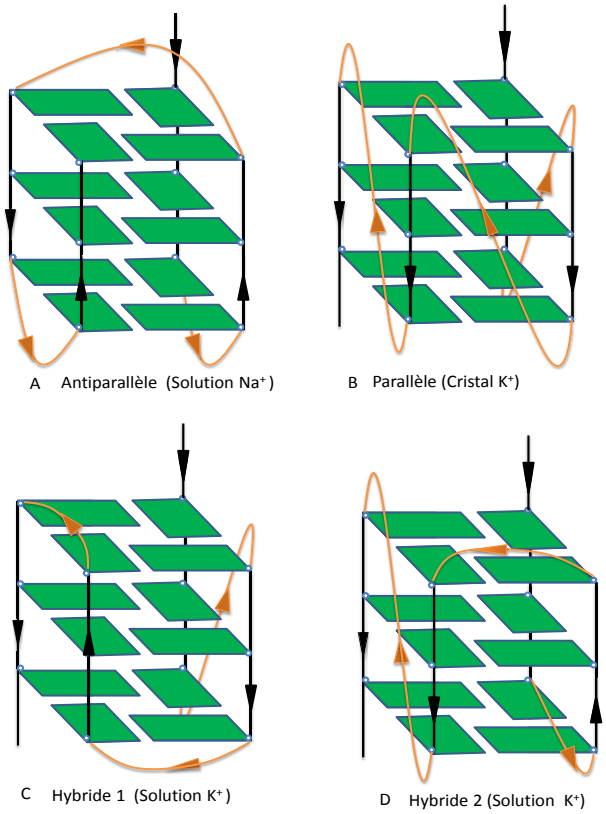


Figure 15. Différentes topologies de G-quadruplex monomérique intramoléculaire obtenues en RMN et RX, (A) d[AGGG(TTAGGG)$_3$] dans une solution de Na^+; (B) d[AGGG(TTAGGG)$_3$] dans un cristal contenant de K^+; (C) d[TAGGG (TTAGGG)$_3$] dans une solution de K^+ (Forme 1) et (D) d[TAGGG(TTAGGG)$_3$TT] en solution de K^+ (Forme 2). Les boucles sont de couleur orange (Figure d'après ref [25]**)**.

Dans une solution riche en Na^+, cette séquence forme un G-quadruplex intramoléculaire antiparallèle composée de trois G-quartets empilés, où chaque G-quartet est constitué de guanines en conformation glycosidique *anti-anti-syn-syn*. Les trois boucles de séquence TTA sont successivement de type latérale, diagonale et latérale, de telle sorte que chaque brin a deux brins adjacents parallèles et anti-parallèles (Figure 15A) [26].

Une structure G-quadruplex formée par la même séquence, mais très différente, a été observée dans les cristaux contenant des K^+ par le groupe de Stephen Neidle [21]. Dans cette structure, les quatre brins sont parallèles, les boucles de connexion sont de type hélicale, et toutes les guanines adoptent une conformation glycosidique *anti* (Figure 15B).

En solution riche en K^+, cette séquence de télomère humain forme au moins deux formes de G-quadruplexes intramoléculaires de type (3 + 1) (Figure 15C et Figure 15D) [27], [28]. Les deux formes contiennent une boucle hélicale et deux boucles latérales. Elles se différencient par l'ordre de boucles, qui sont de différents types. La boucle hélicale est formée par la première séquence TTA dans la Forme hybride 1 (Figure 15D) et par la troisième séquence TTA dans la Forme hybride 2 [27] (Figure 15C).

1.2.4 G-Quadruplexes dans les promoteurs des oncogènes

La séquence de promoteur d'oncogène sous abréviation C-myc (Pu27 : d[TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG]) possède cinq répétitions de trois ou plus de guanine, et peut former des G-quadruplexes de différentes topologies à partir de la même séquence, comme dans le cas de la séquence télomérique 22AG. Par contre, la modification de certaines bases permet de réduire le polymorphisme de cette séquence.

Le Myc22-G14T/G23T (d[TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA]) est une séquence modifiée de C-myc et forme une structure parallèle en solution en présence de l'ion K^+, composée de trois G-quartets avec quatre brins d'ADN parallèles qui sont reliés par trois boucles hélicales (Figure 16). Cette structure ressemble à celle du G-quadruplex 22AG sous forme de cristaux en présence de K^+.

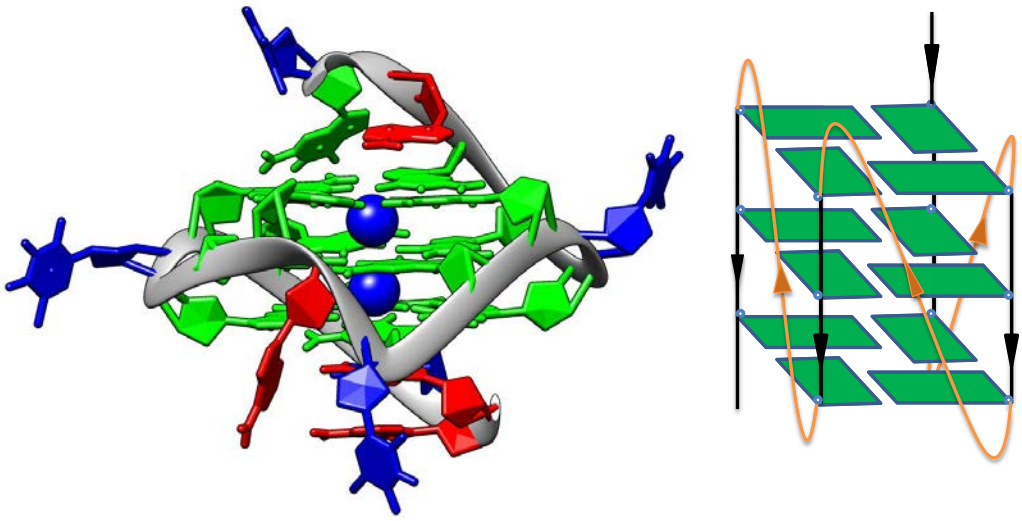


Figure 16. G-quadruplex formée par la séquence C-myc avec des cations potassium K^+ (bleu) (RMN, PDB : 1XAV [29]). Guanines en vert, thymines en bleu, adénines en rouge et le squelette glycophosphate en blanc. Image produite avec UCSF Chimera [16] .

Dans cette structure, il y a deux boucles (la première et la troisième) composées d'un seul nucléotide (thymine), chacun reliant deux brins parallèles. Les deux boucles adoptent des conformations très similaires, avec un brin de squelette de sucre étendu, et la base thymine qui s'oriente vers l'extérieur (Figure 7A, B). Il s'agit d'un exemple du G-quadruplex parallèle avec des boucles hélices composées d'un seul nucléotide, ce qui semble très stable [29].

Une autre séquence modifiée de C-myc est le Pu19_A2a11, qui présente aussi une topologie parallèle, avec deux boucles (la première et la troisième) composées d'un seul nucléotide comme celles du Myc22-G14T/G23T, mais il s'agit de l'adénine au lieu de la thymine [30].

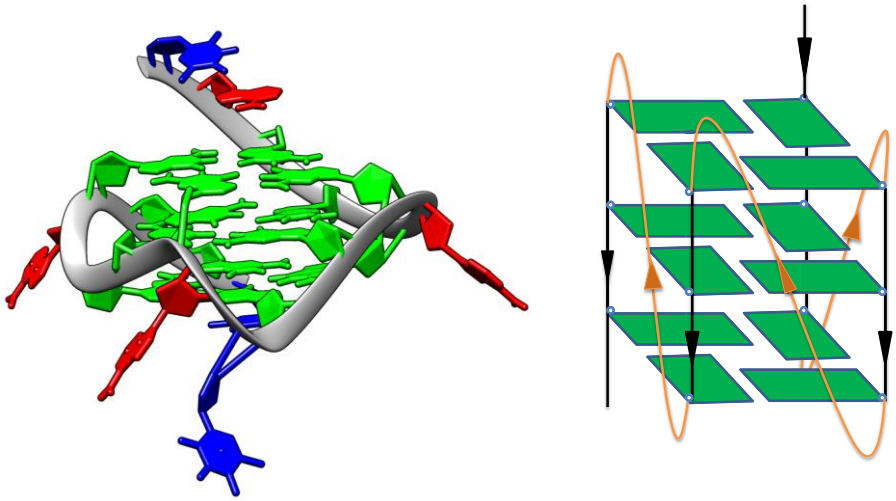


Figure 17. G-quadruplex formée par la séquence C-myc avec des cations potassium K^+ (bleu) (RMN, PDB : 2LBY [30]). Guanines en vert, thymines en bleu, adénines en rouge et le squelette glycophosphate en blanc. Image produite avec UCSF Chimera [16].

La séquence de promoteur des oncogène c-kit87up (d[AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG]), contenant quatre répétitions de trois guanines consécutives, a été supposée initialement de former une structure de G-quadruplex parallèle classique (Figure 18) [31].

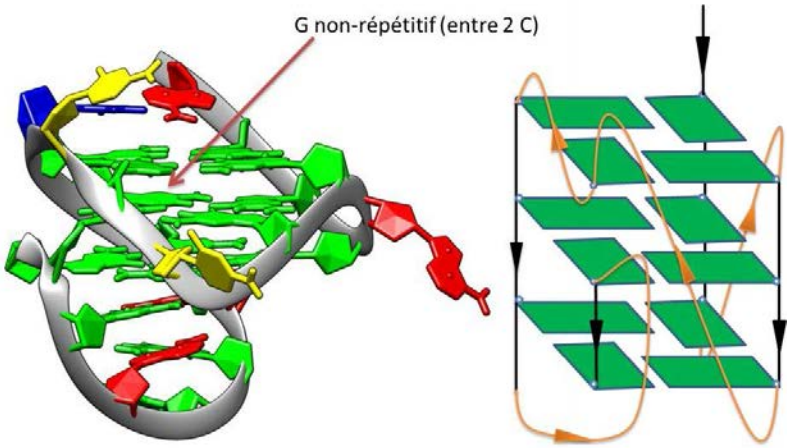


Figure 18. G-quadruplex formée par la séquence C-kit87up (RMN, PDB : 2O3M [32]). Guanines en vert, thymines en bleu, adénines en rouge et le squelette glycophosphate en blanc. Image générée avec UCSF Chimera [16] .

En revanche, des études RMN ont révélé plusieurs nouveaux éléments topologiques. La caractéristique la plus intéressante de cette structure est la participation d'une guanine isolée dans la formation du G-quartet, malgré la présence de quatre régions de guanine, chacune contenant trois guanines consécutives. En général, les domaines de répétitions de guanines sont plus favorables pour former les colonnes qui soutiennent les couches de G-quartet. Ce nouveau principe montre que le résidu guanine dans les régions non répétitives peut aussi participer à la formation du noyau de G-quadruplex [32].

La séquence de G-quadruplex télomérique humain peut avoir différentes topologies en fonction de la *nature* du cation métallique coordinné (K^+, Na^+) comme nous l'avons mentionné précédemment. La séquence du promoteur c-kit2 (d[CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGGT) peut aussi adopter différentes structures selon la *concentration* d'ion K^+. Des études RMN ont montré que cette séquence forme un monomère intramoléculaire parallèle de trois G-quartets dans le tampon contenant 20 mM de KCl. La même séquence forme un dimère parallèle possédant deux motifs de G-quadruplex, chacun contenant trois G-quartets dans le tampon de 100 mM de KCl (Figure 19) [25].

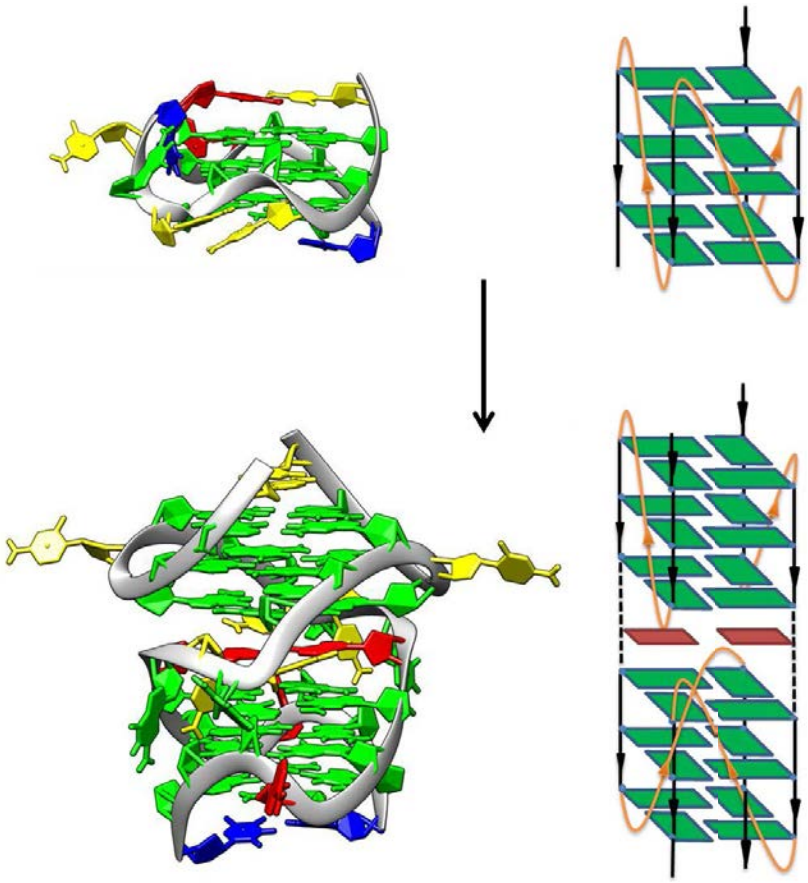


Figure 19. G-quadruplex formé par la séquence C-kit2 (RMN, PDB : 2KYP, 2KYO [33]). Guanines en vert, thymines en bleu, adénines en rouge et le squelette glycophosphate en blanc. Image générée avec UCSF Chimera [16].

La forme dimère est thermodynamiquement plus stable en solution que le monomère. Les deux unités de c-kit2 adoptent une orientation parallèle dans la structure du G-quadruplex. Cette forme parallèle est différente par rapport aux autres dimères de G-quadruplex décrits dans la littérature. La dimérisation des G-quadruplexes monomériques parallèles résulte en orientation anti-parallèle des brins dans le dimère [33].

1.3 Rôles biologiques de l'ADN quadruplex

1.3.1 Généralités

Les G-quadruplexes possèdent une haute stabilité thermodynamique dans des conditions quasi-physiologiques et peuvent exister dans les cellules vivantes. Enfin, la présence de G-quadruplexes dans les cellules humaines a été démontrée à l'aide d'un anticorps artificiel spécifique aux G-quadruplexes en 2013 [34] .

Des séquences d'ADN riches en guanine et capables de former la structure G-quadruplex ont été trouvées dans les télomères des eucaryotes, et dans plus de 40% des promoteurs de gènes humains [35]. Des séquences d'ARN capables de former des G-quadruplexes ont été identifiées dans les régions 5' de séquence non traduites (5'-*untranslates region*, UTR) de plus de 3000 gènes [36]. Ces structures de G-quadruplex sont capables de reconnaitre les acides nucléiques et les protéines avec une spécificité et une affinité élevée. Elles peuvent se comporter comme les aptamers qui bloquent les fonctions des protéines [37].

Les séquences riches en guanine peuvent avoir certaines activités anti-prolifératives sélectives pour le cancer [38]. Ces séquences induisent un arrêt de phrase S et une apoptose dans les cellules cancéreuses [39]. Par exemple, la nucléoline qui a la capacité de se lier aux G-quadruplexes pourrait être surexprimée à la surface cellulaire des cellules cancéreuses, par rapport aux cellules normales. Elle a été suggérée de transporter des séquences riches en guanine à travers la membrane plasmique du noyau. Les séquences riches en guanine pourraient aussi empêcher la nucléoline de se lier à ses substrats naturels, et de cette façon, contribuer à la mort de la cellule [37].

1.3.2 G-quadruplex dans le télomère humain

Le télomère se trouve à la fin des chromosomes des vertébrés, et est constitué de milliers de répétitions de (GGGTTA). Chez l'homme, il y a environ huit milles bases de cette séquence sous forme de double-brin, suivies d'un simple brin (« overhang ») pouvant aller jusqu'à 250 bases [40]. Le télomère protège les extrémités des chromosomes, et est raccourci à chaque cycle de la division cellulaire car les deux brins d'ADN n'ont pas exactement la même taille, donc une petite séquence n'est pas répliquée.

La réversion de cette dégradation est assurée par un enzyme spécialisé appelé la télomérase. Cet enzyme prolonge l'extrémité du télomère permettant de conserver la longueur du chromosome. L'activité de la télomérase est élevée dans les cellules germinales, les embryons en développement et les très jeunes enfants, mais elle est régulée à la baisse dans la plupart des cellules, à partir de quatre ans environ [41]. Une

fois que l'ADN télomérique atteint une longueur critique courte, la voie de dommage de l'ADN est activée, ce qui entraine une sénescence et une mort cellulaire.

Les cellules tumorales doivent maintenir la longueur des télomères afin de se diviser infiniment. La plupart des tumeurs (85 à 90 %) possèdent une activité assez importante de télomérase, qui est responsable de la prolifération cellulaire. La télomérase est donc une cible intéressante et prometteuse pour les domaines thérapeutiques [42].

Dans des conditions physiologiques, l'ADN télomérique est capable de former la structure du G-quadruplex [43]. Les G-quadruplexes peuvent inhiber l'activité de la télomérase en empêchant l'hybridation de l'ADN simple brin avec la matrice d'ARN de la télomérase (Figure 20) [44]. Par conséquent, la stabilisation des G-quadruplexes dans l'ADN télomérique humain avec de petits ligands est une stratégie anticancéreuse prometteuse [45]. En effet, il a été montré que certains ligands de G-quadruplex ont la capacité d'inhiber la télomérase ou d'affecter l'allongement des télomères [46]–[48].

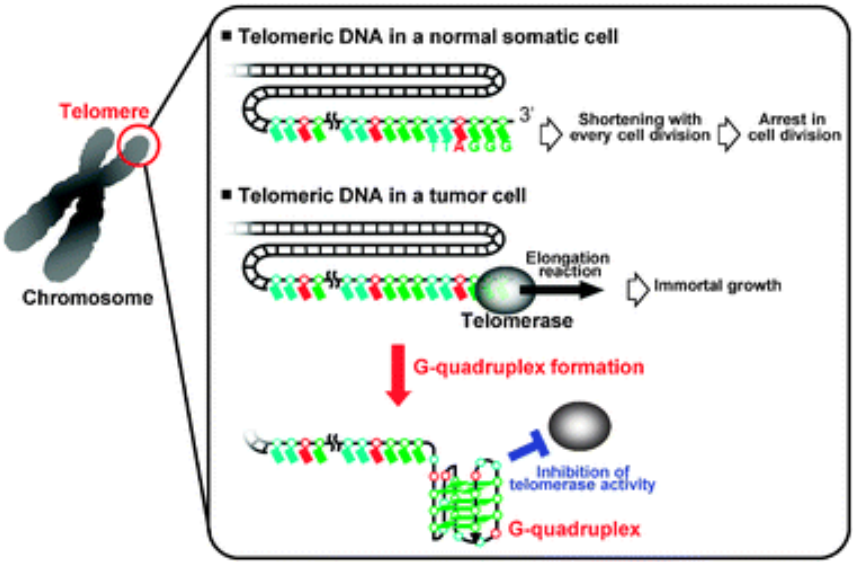


Figure 20. Rôles biologiques de l'ADN télomérique et de la télomérase; Les G-quadruplex peuvent inhiber l'activité de la télomérase. La thymine, l'adénine et la guanine sont tirés en bleu, rouge et vert, respectivement. Image extraite de réf [49], copyright RSC, 2012.

1.3.3 G-quadruplex dans les promoteurs des oncogènes

Après des recherches sur les G-quadruplexes dans le télomère, l'intérêt thérapeutique s'est orienté vers les structures de G-quadruplex dans les promoteurs des gènes au cours de la dernière décennie [50].

Actuellement, il n'y a pas de preuves directes de l'existence de structure G-quadruplex

dans les régions promotrices des gènes. En revanche, l'identification des protéines ou d'enzymes, qui jouent un rôle important sur la formation de ces structures quadruplexes ou sur leur déroulement (une fois qu'ils sont formés), peuvent fournir des preuves circonstancielles de leur présence dans les cellules [51].

En général, les structures du G-quadruplex dans les séquences régulatrices de gènes peuvent agir comme des activateurs ou des répresseurs de la transcription des gènes (Figure 21) [32]. Des séquences formant les G-quadruplexes ont été identifiées dans les régions promoteurs des oncogènes importants tels que c-Myc, c-Kit, Bcl-2, KRAS, VEGF, HIF-1α, PDGF-A, PDGFRß, RB1, hTERT, et c-myb [52]. Les séquences des G-quadruplexes dans les régions promotrices des oncogènes exercent souvent un effet d'extinction de gène quand ils se chevauchent avec des sites de liaison de facteurs de la transcription [32].

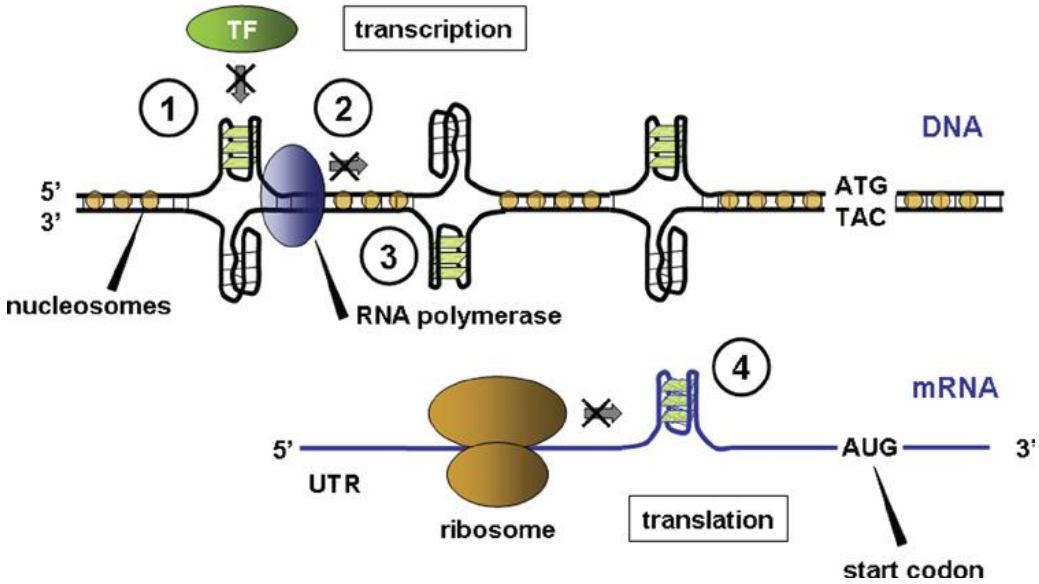


Figure 21. Influence des G-quadruplexes sur l'expression génique. (1) Les G-quadruplexes dans les régions promotrices peuvent inhiber le facteur de transcription (TF) et empêcher la synthèse de l'ARN. (2) La présence du G-quadruplex induit une configuration ouverte de chromosome qui facilite l'initiation de la transcription. (3) Les G-quadruplexes dans le brin matrice inhibent la polymérisation d'ARN. (4) Les G-quadruplexes dans le brin codant sont transférés à l'ARN messager et inhibe la traduction. Image extraite de réf [37], copyright T&F, 2012.

1.3.4 G-quadruplex dans les séquences transcrites

La régulation de l'expression des gènes par des séquences G-quadruplex peut se produire avant ou après la transcription. Les G-quadruplexes dans l'ADN codant

bloquent la polymérisation d'ARN lors de la transcription du gène (Figure 21). En revanche, Les séquences de G-quadruplex qui apparaissent après la transcription dans l'ARN messager pourraient inhiber la traduction [37].

Les séquences de G-quadruplex dans les régions 5' non traduite (5'-UTR) de l'ARN messager régulent potentiellement la traduction des proto-oncogènes NRAS, Bcl-2, de la protéine humaine Zic-1, et la matrice métalloprotéinase MT3 [53]–[56]). Il a été démontré que l'ARN G-quadruplex naturel NRAS qui se trouve dans la 5'-UTR du proto-oncogène humain inhibe la traduction, car sa suppression augmente par 3,7 fois l'efficacité de la traduction [53]. La stabilisation de cet ARN G-quadruplex par un ligand diminue l'efficacité de la traduction du NRAS-UTR contenant de l'ARN messager *in vitro* [57].

Les séquences du G-quadruplex ont été également trouvées dans les exons et les introns de gènes liés au cancer, par exemple, le récepteur des œstrogènes humains, qui est le médiateur de la stimulation de croissance hormonale dans les cancers du sein. Dans ce gène, l'ADN G-quadruplex stable est formé à l'intérieur de l'exon C qui réprime la traduction de l'ARN messager des œstrogènes humains [58]. Une autre séquence de G-quadruplex a été trouvée dans un intron du gène de la topoisomérase 1 et fonctionne en tant que régulateur négatif de la transcription [37].

1.4 Ligands de l'ADN et de l'ARN quadruplexes

La formation et les fonctions des G-quadruplexes sont actuellement d'un grand intérêt en raison de leurs rôles dans les processus biologiques importants tels que le vieillissement et le cancer, et leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques [59], [60]. Les ligands qui se lient sélectivement aux G-quadruplexes sont devenus intéressants au cours des dernières années, car ils peuvent interférer avec les fonctions biologiques et provoquer la prolifération des cellules cancéreuses [61].

La stabilisation des G-quadruplexes par des ligands peut être exploitée dans les domaines thérapeutiques pour moduler l'expression des gènes et l'allongement des télomères. Les cibles les plus importantes pour le développement de médicaments

anticancéreux sont ainsi les G-quadruplexes dans les télomères et dans les régions promotrices des oncogènes [37].

De nombreux groupes ont montré que les ligands ciblés aux G-quadruplexes possèdent des activités biologiques, telles que la capacité d'interférer avec la fonction de la télomérase, de réguler la transcription et l'expression de gènes, et de modifier la biosynthèse de l'ARN [62]. Ces ligands de G-quadruplex montrent des effets cohérents avec la stabilisation du G-quadruplex, ce qui peut fournir une bonne indication pour l'importance fonctionnelle de ces structures dans la physiologie cellulaire [37].

Les G-quadruplexes possèdent plusieurs sites (Figure 22) disponibles pour l'interaction avec des petites molécules, principalement les G-quartets terminaux. Chaque quartet est composé de quatre guanines situées dans le même plan, ce qui forme une surface aromatique plane et particulièrement large par rapport au duplex et autres structures secondaires de l'ADN. Donc, les molécules avec de grands systèmes aromatiques planaires pourraient interagir sélectivement avec les G-quartets terminaux par empilement π-π, par rapport aux autres structures secondaires de l'ADN.

Un autre site d'interaction est le sillon de G-quadruplex, qui peut promouvoir des liaisons hydrogènes entre les ligands et les groupements phosphates. La structure du G-quadruplex possède généralement quatre sillons qui ne sont pas plans, et ont des tailles et des géométries différentes par rapport à celles du duplex. Les sillons varient également en fonction de la topologie du G-quadruplex. Ces différences pourraient être potentiellement utilisées non seulement pour la reconnaissance sélective du G-quadruplex par rapport au duplex, mais aussi pour la reconnaissance sélective des différentes structures du G-quadruplex selon leurs topologies.

Les ligands interagissant par l'empilement π - π et de sillon contenant des groupements latéraux ou des chaînes peuvent aussi interagir avec les boucles, et le squelette phosphate, le canal central du G-quadruplex, en s'empilant sur des bases des boucles ou en formant des liaisons hydrogènes intermoléculaires (Figure 22). Ces interactions «secondaires» pourraient renforcer l'affinité et la sélectivité des ligands pour le G-quadruplex.

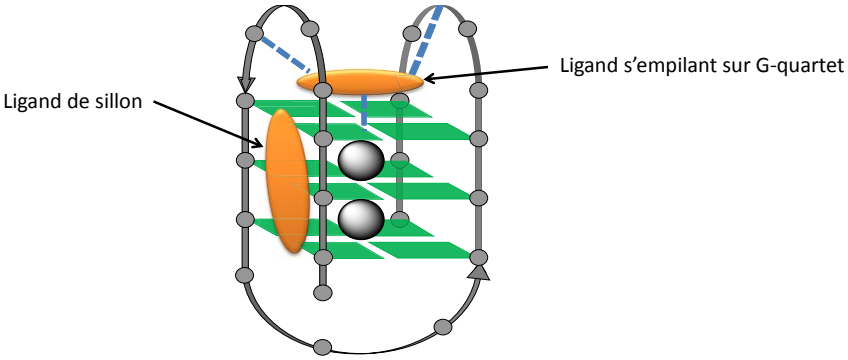


Figure 22. Deux principaux modes de liaison (ligand d'empilement π – π et ligand de sillon) et les sites d'interaction «secondaires» (pointillés en bleu) sur le G-quadruplex obtenu à partir de la séquence télomérique humaine AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG.

Les G-quadruplexes peuvent d'adopter de nombreuses conformations. Par conséquent, le plus grand défi dans la conception des ligands est la reconnaissance sélective des G-quadruplexes, c'est-à-dire la discrimination entre eux et les autres formes de l'ADN, spécialement celle du duplex. La connaissance du mode d'interaction des G-quadruplexes avec des ligands est donc très importante pour la conception de ligand sélectif de G-quadruplexes.

1.4.1 Ligands s'empilant sur G-quartet

La majorité des ligands de G-quadruplex décrit dans la littérature possèdent de grands systèmes aromatiques planaires, interagissant préférentiellement avec le G-quartet terminal par empilement π - π. Ces ligands possèdent des activités biologiques, par exemple, l'induction de la sénescence cellulaire, la suppression de l'activité de la télomérase ou de la transition des oncogènes, etc. Ils peuvent être classés en trois familles : les composés aromatiques polycycliques condensés, les composés de type polyaryle non condensés, et les composés macrocycliques.

1.4.1.1 Composés aromatiques polycycliques condensés

Le BRACO-19, le RHPS4, le SYUIQ, le naphtalène diimide, les pérylène di-imides et le diamidoanthraquinone sont des représentants de la famille des composés aromatiques polycyclique condensés (Figure 23). Ces ligands possèdent une surface plane et particulièrement large, conjuguée entre plusieurs cycles. Cela permet potentiellement avoir un large recouvrement avec le G-quartet terminal de l'ADN quadruplex et avoir également des propriétés de fluorescence.

Le BRACO-19, qui a été le premier ligand conçu de manière rationnelle, se base sur l'hypothèse que le cœur aromatique s'empile sur le G-quartet terminal, les chaînes latérales occupant les sillons de l'ADN quadruplex. Ce ligand présente une activité anticancéreuse *in vitro* dans les tumeurs de xénogreffe [63].

Le naphtalène diimide tétra-substitué se lie particulièrement fort au quadruplex télomérique humain [64], et présente une sélectivité élevée sur l'ADN quadruplex versus duplex. Il induit la sénescence des cellules cancéreuses par des effets directs sur le télomère. [65].

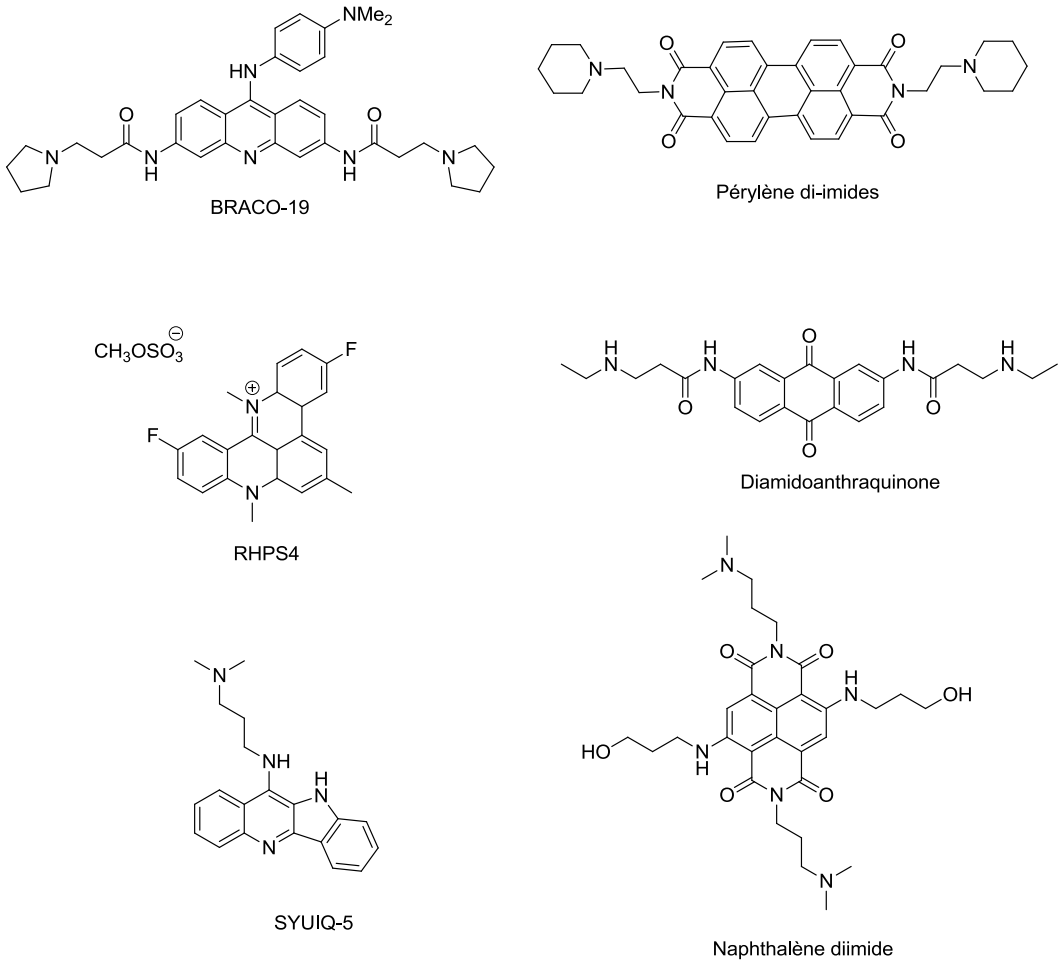


Figure 23. Structures de ligands aromatiques polycycliques condensés.

1.4.1.2 Composés de type polyaryle non condensés

Le PDC-360A, le PhenDC, le ToxaPy, le « bisaryldiketene » et le « pyridostatin » appartiennent à la famille des polyaryles non-condensés (Figure 24). Ces ligands possèdent plusieurs surfaces aromatiques ayant un certain degré de flexibilité. Le PDC-360A est un des meilleurs ligands parmi les ligands de G-quadruplex, qui stabilise

fortement les structures de l'ADN quadruplex et possède également une sélectivité d'un facteur supérieur à 150 par rapport au duplex [44], [66]. Une étude RMN montre que le PhenDC (analogue de PDC-360A) est empilé sur le G-quartet de l'ADN quadruplex (Figure 25) [67]. Le PDC-360A est utilisé pour la conception de sonde fluorescente de G-quadruplex.

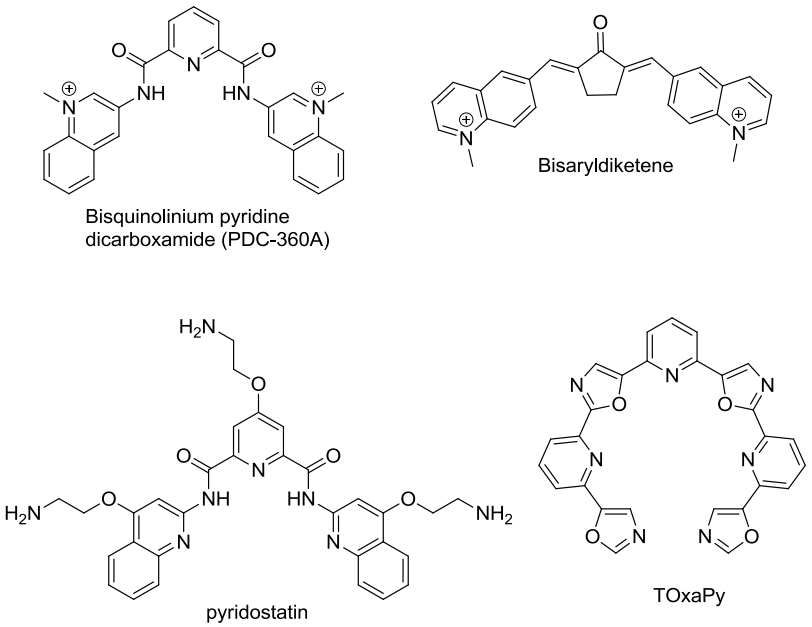


Figure 24. Structures de ligands polyhétéroaryles non-condensés.

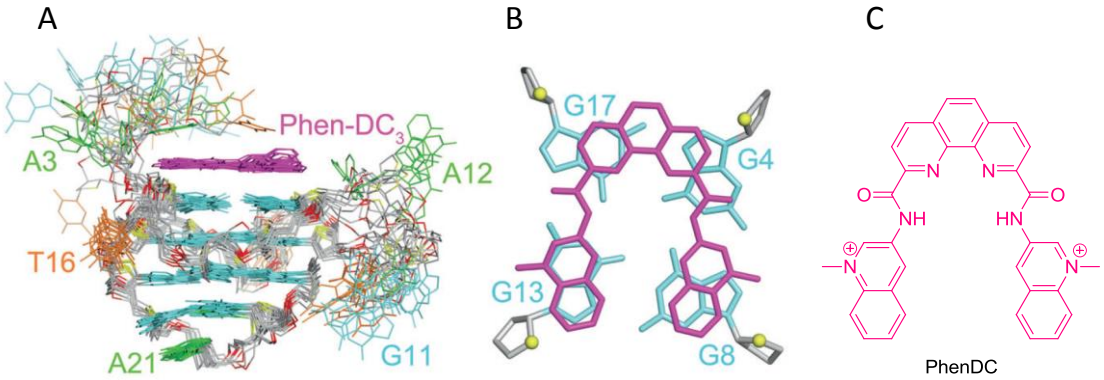


Figure 25. Complexe de Pu24T-PhenDC en solution (code PDB :2MGN). A) dix structures raffinées superposées. B) Image de l'empilement de PhenDC sur le G-quartet. C) Structure de PhenDC. Guanines en cyan, thymines en orange, adénines en vert et le squelette glycophosphate en gris. Image extrait d'après la réf [67] .

1.4.1.3 Composés macrocycliques

Le TMPyP4 (tétra-N-méthyl-pyridyl-porphyrine) et la télomestatine sont des macrocycles (Figure 26) possédant une large surface aromatique. Ils se lient au G-quadruplex avec une grande affinité [68]. Le TMPyP4 inhibe l'activité de la télomérase [69] et régule l'expression d'oncogènes tels que le c-myc [70]. Néanmoins, le TMPyP4 n'a pas de grande sélectivité pour le G-quadruplex par rapport à l'ADN double-brin [71].

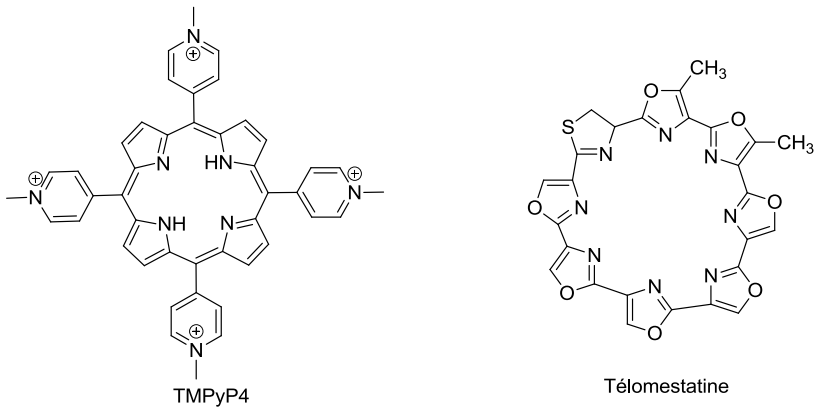


Figure 26. Structures de ligands macrocycliques.

1.4.2 Ligands de sillons

Contrairement aux ligands interagissant avec le G-quadruplex par l'empilement, peu de ligands de sillon ont été découverts jusqu'à présent. La distamycine est un ligand classique de petit sillon de l'ADN-B. La structure 3D de son interaction avec un G-quadruplex parallèle de séquence $d(TG_4T)_4$ a été rapportée par Martino (Figure 27) [72]. Les résultats ont montré que les dimères antiparallèles de distamycine se retrouvent dans les deux sillons opposés de G-quadruplex et sont liés par quatre liaisons hydrogènes. Le groupement amidinium du ligand chargé positivement interagit avec la charge négative des groupements phosphates du G-quadruplex par des interactions électrostatiques. Cette structure révèle que le distamycine est insérée dans le sillon, ce qui confirme le potentiel des ligands à cibler les sillons de l'ADN quadruplex.

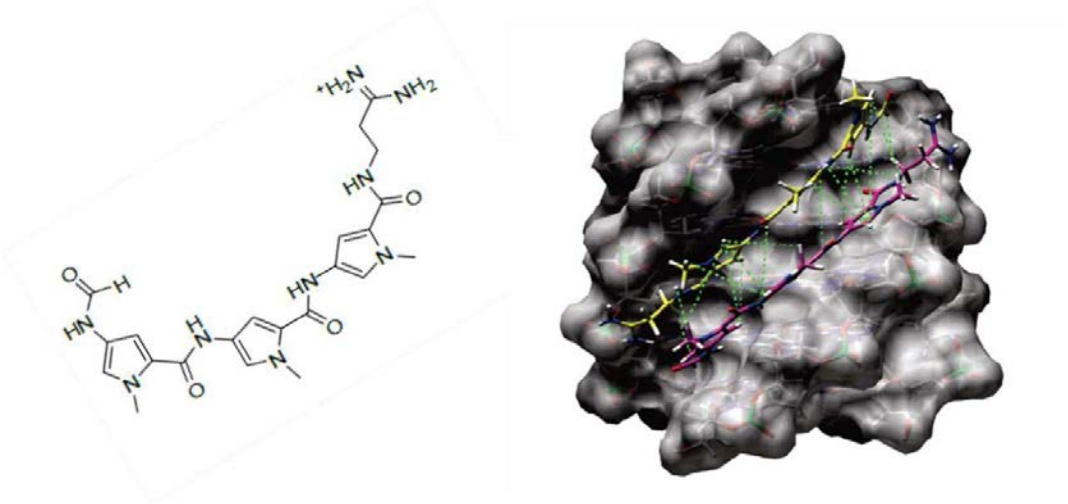


Figure 27. Structure de distamycine et son complexe avec le G-quadruplex.

1.5 Sondes fluorescentes d'ADN et d'ARN quadruplexes

1.5.1 Principes de la fluorescence

Le diagramme de Perrin-Jablonsky (Figure 28) représente les différents états électroniques d'une molécule, comme l'état électronique fondamental (S_0), les états excités (S_1, S_2,…) et les états triplets (T_1,T_2,…).

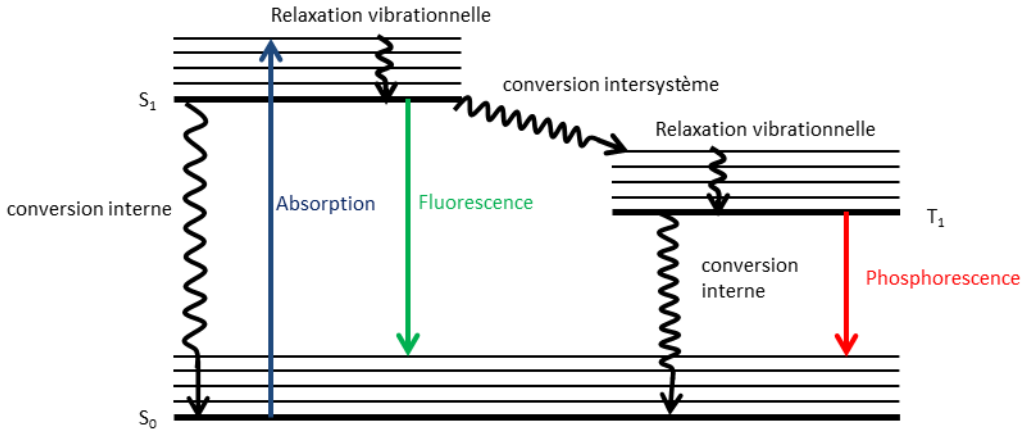


Figure 28. Diagramme de Jablonski, les phénomènes radiatifs sont indiqués par des flèches droites, les phénomènes non radiatifs par des flèches courbes.

L'absorption d'un photon par une molécule conduit au passage d'un état fondamental (S_0) à un état excité (S_1, S_2…). L'électron de l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie, HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) passe à une orbitale inoccupée de plus basse énergie, LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital). La molécule excitée par absorption d'un photon peut revenir à l'état fondamental par des transitions non-radiatives : la conversion interne, la relaxation vibrationnelle, et la

conversion intersystème ; ainsi que par des transitions radiatives : la phosphorescence et la fluorescence.

La transition de conversion interne non-radiative est une voie de désexcitation fréquente pour revenir de l'état S_1 à l'état fondamental (S_0) en transférant l'excès d'énergie au solvant autour de la molécule excitée pendant la collision. Cette transition est la suite de la relaxation vibrationnelle de l'état vibrationnel de haute énergie (S_2, S_3…) vers l'état de plus faible énergie (S_1).

La conversion intersystème correspond au renversement de spin : la molécule excitée passe dans un état triplet (T_n), suivi d'une relaxation vibrationnelle pour passer à l'état triplet excité de plus faible énergie.

La fluorescence et la phosphorescence sont des formes de la luminescence produites par des transitions radiatives d'une molécule photo-excitée, qui se désexcite en émettant un photon qui passe de l'état excité S_1 (fluorescence) ou T_1 (phosphorescence) à l'état fondamental (S_0). La phosphorescence est une transition interdite ayant lieu lentement, mais peut être favorisée par le couplage spin-orbite.

Contrairement à la phosphorescence, la fluorescence est un processus très rapide, en raison de l'accord avec les règles de sélection qui maintiennent la molécule dans un état singulet. Le rapport entre la quantité de photons émises et absorbées s'appelle le rendement quantique (ϕ) et signifie l'efficacité relative de la fluorescence d'une molécule. La valeur de ce rapport est comprise entre 0 et 1, et dépend fortement de l'environnement de la molécule comme le solvant, la température. La molécule est plus fluorescente quand cette valeur est plus grande.

Le photon émis par la fluorescence a une énergie plus faible que celle du photon absorbé, ce qui est dû à la perte d'énergie de relaxation vibrationnelle. Cela explique le fait que les longueurs d'onde de fluorescence sont plus grandes que celles d'absorption. La différence de longueurs d'onde maximum d'émission et d'absorption est le déplacement de Stokes (Figure 29). Plus cette différence est grande, plus la détection de fluorescence est facile en raison de l'influence de la source d'excitation.

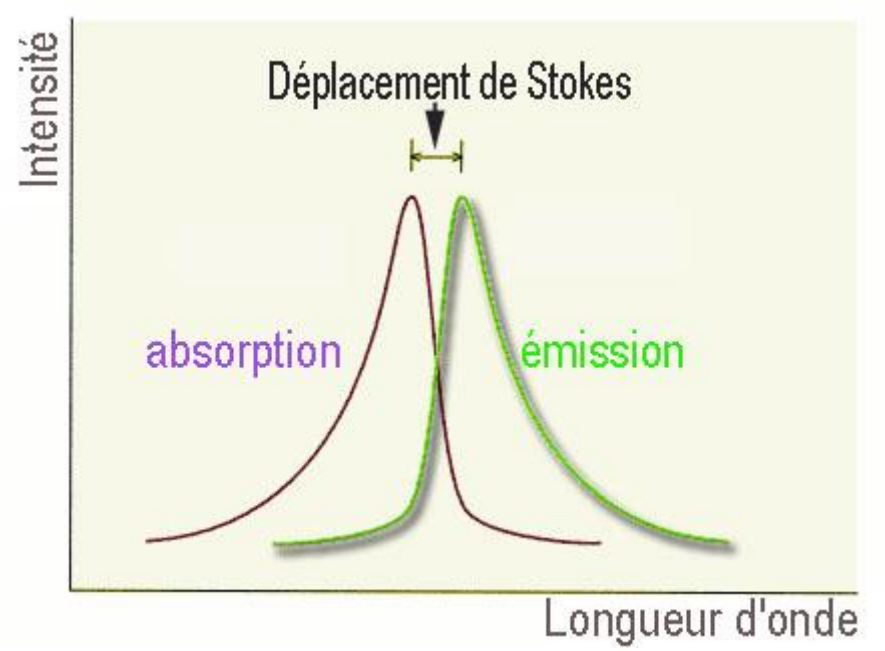


Figure 29. Diagramme de déplacement des longueurs d'onde entre la lumière reçue et émise [73] .

La détection de fluorescence est une technique d'analyse couramment utilisée dans les domaines de physico-chimie, biochimie et biologie. Cette technique utilisant des sondes fluorescentes permet de détecter des composés chimiques et des biomolécules à de très faibles concentrations et d'étudier la structure et la dynamique d'une matière ou d'un système vivant. Grâce à la grande sensibilité et sélectivité de cette technique, celle-ci est capable d'apporter des informations spatiales et temporelles sur le phénomène étudié [74].

1.5.2 Sondes fluorescentes : généralités

Une sonde fluorescente moléculaire est une molécule qui possède une propriété de fluorescence, dont le signal peut être capté par des méthodes photométriques dans le but de détecter et d'étudier un analyte de manière sélective.

Il existe principalement trois types de sondes fluorescentes : les sondes « Light-up », qui démontrent une augmentation de la fluorescence en présence d'analyte, les sondes « Light-off » démontrant une diminution de la fluorescence en présence d'analyte, et les ligands marqués, qui ont une fluorescence permanente et possèdent une haute affinité spécifique pour des analytes.

Parmi les sondes mentionnées ci-dessus, les sondes « Light-up » sont les plus utilisées grâce à la sensibilité élevée de la sonde et la simplicité relative de mise en œuvre. Il

s'agit d'une molécule « pro-fluorescente », c'est-à-dire d'un fluorophore dont la fluorescence est intrinsèquement éteinte par une voie de désexcitation non-radiative, comme par exemple la rotation intramoléculaire ou le transfert d'électron photoinduit (PET). L'interaction de la sonde avec l'analyte inhibe cette voie de désexcitation, ce qui conduit à l'augmentation de la voie radiative (la fluorescence).

Dans le premier cas, les sondes se sont basées sur la limitation de rotation du pont conjugué entre deux ou plusieurs systèmes aromatiques empêchant ainsi des processus de relaxation non-radiative lors de liaison avec l'analyte (cible) (Figure 30) [75], [76]. Le thiazole orange (TO), une sonde fluorescente de l'ADN double-brin, est un exemple de ce type de sonde (relaxation rotative non-radiative). Dans le cas de la sonde seule, la rotation du point conjugué est libre, et l'énergie de la molécule excitée peut être perdue principalement par des transitions non-radiatives et non pas par la fluorescence. En présence de l'analyte (ADN), la rotation est limitée par des contraintes stériques ou des interactions entre la sonde et son analyte. Il y a donc moins de perte d'énergie par les transitions non radiatives et la sonde devient alors plus fluorescente.

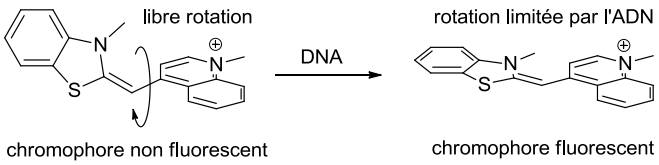


Figure 30. Thiazole orange, exemple de sonde « light up ».

Un dérivé de coumarine, la 4-[(bis(pyridin-2-ylméthyl)amino)méthyl]-7-méthoxychromen-2-one est une sonde PET capable de détecter des cations comme Zn^{2+}, Cd^{2+}, et Pb^{2+} par la fluorescence (Figure 31). La fluorescence intrinsèque est inhibée thermodynamiquement par le processus de transfert d'électron photoinduit entre l'amine tertiaire et la coumarine excitée. La complexation de l'amine tertiaire et du cation métallique change le potentiel d'oxydation de l'amine tertiaire, empêche le processus de PET et régénère la fluorescence de la coumarine [77].

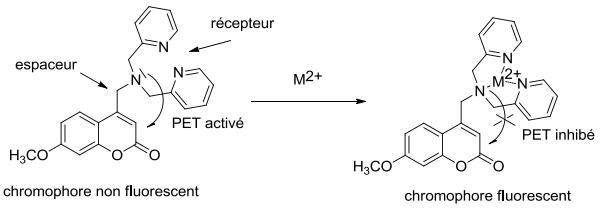


Figure 31. Exemple du phénomène PET dans la 4-[(Bis(pyridin-2-ylméthyl)amino)méthyl]-7-méthoxychromen-2-one (gauche) et son inhibition dans le complexe avec un cation métallique (Zn,Cd,Pt).

1.5.3 Sondes fluorescentes pour les G-quadruplexes

Malgré de nombreuses études *in vivo*, les preuves de présence de structures quadruplexes *in vivo* restent indirectes [36]. La recherche de composés pouvant signaler la présence de G-quadruplex représente un défi de taille, mais est d'un grand intérêt, notamment en raison de l'utilisation croissante des sondes fluorescentes en biologie cellulaire et l'apparition de nouvelles microscopies en fluorescence [78]. Pendant ces dernières années, quelques sondes fluorescentes capables de discerner l'ADN quadruplexe du duplexe ont été développées. Ces sondes de type «light up» sont des structures généralement planes qui peuvent s'empiler sur les quartets terminaux du G-quadruplexe, ce qui empêche les processus de relaxation non-radiative [76].

Colorants cyanines : Les colorants cyanines sont en général des colorants de l'ADN double-brin, avec des différents modes d'interaction, comme l'intercalation dans l'ADN et l'insertion dans le sillon. Ils peuvent aussi interagir avec les G-quadruplexes par différents modes d'interaction, et le mode d'empilement sur le G-quartet terminal semble être préférentiel.

Le thiazole orange (TO, Figure 30) mentionné précédemment est un composé de la famille des cyanines, connu pour ses propriétés de fluorescence, et largement utilisé en tant que sonde fluorescente pour les acides nucléiques. Son rendement quantique de fluorescence est d'environ 2 x 10^{-4} lorsque le colorant est libre en solution, mais augmente à 0,1 environ lorsqu'il est lié à l'ADN double-brin et au poly (dA), ou à 0,4 dans le cas du poly (dG) [75], [79]. Le thiazole orange a une augmentation de la fluorescence d'un facteur 50 à 1000 en fonction de la séquence et de la conformation de l'acide nucléique. Par contre, ce composé possède une sélectivité très faible pour les structures d'ADN quadruplex, avec une augmentation de la fluorescence

comparable à celle du en présence du duplex d'un facteur de 500 à 3,000 fois pour les quadruplexes de télomère humain, les promoteurs d'oncogène et les mini-satellites (c-myc, c-kit, CEB1) [80]–[82].

Le TO-PRO-3 (Figure 32) est un analogue de TO avec une longueur d'onde d'émission plus élevée (λ_{em} = 718 nm en présence de l'ADN quadruplex c-kit2). La fluorescence du TO-PRO-3 est fortement augmentée en présence de l'ADN double-brin [61] et G-quadruplex [80], avec des facteurs d'augmentation compris entre 120 et 250, en fonction de la séquence de l'ADN. Par contre, il n'y pas de distinction entre les différentes structures du duplex et du G-quadruplex.

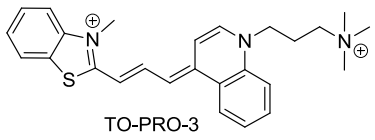


Figure 32. Structure de TO-PRO-3.

Pour améliorer la sélectivité du thiazole orange, un dérivé pyridodicarboxamide–TO (PDC-*M*-TO) (Figure 33), fusionné du thiazole orange et du bisquinolinium pyridodicarboxamide (PDC-360A) a été synthétisé [66], [83], [84]. Le PDC-360A, qui possède une forte affinité et sélectivité pour les structures d'ADN G-quadruplex, est un des meilleurs ligands sélectifs du G-quadruplex mais il n'est pas fluorescent. Le dérivé PDC-M-TO, combinant les avantages de PDC et TO, stabilise fortement l'ADN quadruplex télomérique même en présence de large excès de l'ADN duplex, et est en même temps une sonde de type « light-up ». L'augmentation de la fluorescence de PDC-M-TO (λ_{ex} = 500 nm, λ_{em} = 550 nm) lorsqu'il est lié au quadruplex télomérique (22AG) est diminué d'environ 36% par rapport au TO seul. La fluorescence augmente d'environ huit fois plus en présence d'ADN quadruplexe qu'en présence de duplexe. La sélectivité de ce composé fusionné est ainsi améliorée par rapport au TO grâce à la partie PDC. La sélectivité modérée de PDC-M-TO pour les G-quadruplexes est due à l'affinité du motif TO pour l'ADN double-brin. La coloration sélective de l'ADN quadruplex a pu être observée dans le gel électrophorèse, mais la sensibilité reste faible, due à une sélectivité modérée pour les G-quadruplexes.

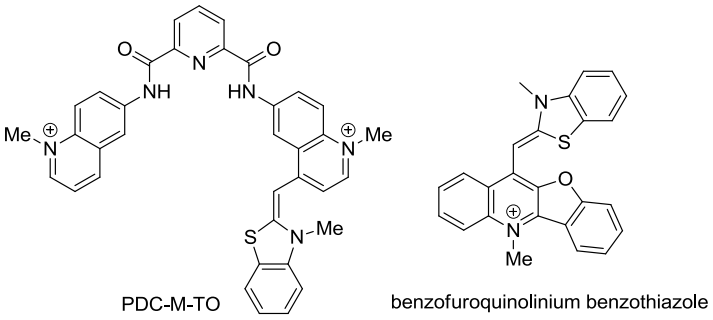
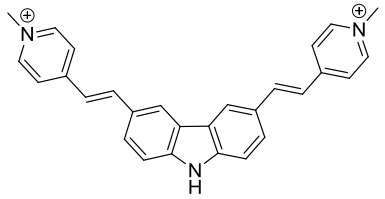


Figure 33. Sondes fluorescentes pour ADN G-quadruplex, dérivés du thiazole orange.

Un autre dérivé du thiazole orange est le benzofuroquinolinium benzothiazole substitué (Figure 33) [85], qui est aussi une sonde de l'ADN quadruplex de type « light-up ». La benzofuroquinoléine possède un système aromatique plan, connu pour sa sélectivité vis-à-vis de l'ADN quadruplex. Le TO est lié avec le benzofuroquinoléine par un pont conjugué de méthine. Cette sonde se lie par empilement sur le G-quartet terminal avec une conformation quasi-plane comme le benzofuroquinoline. La rotation autour du pont méthine est ainsi limitée de manière efficace. Cette sonde est quasiment non-fluorescente dans l'eau (φ = 0.0012) et présente une forte augmentation de la fluorescence (facteur ≈ 300-350) lorsqu'il est lié aux différents ADN quadruplexes. L'augmentation de la fluorescence est plus faible en présence de l'ADN duplex (facteur ≈ 40-50). Ceci présente une sélectivité comparable à la sonde PDC-M-TO précédemment mentionnée.

Ces sondes montrent une sélectivité plutôt faible pour les ADN quadruplexes, sachant que l'ADN duplexe est prédominant dans le génome comparé à l'ADN quadruplex. Par contre, la conception de la fusion du fluorophore et le ligand connu de G-quadruplex est une voie intéressante pour l'innovation et la conception de nouvelles sondes G-quadruplex.

Dérivés du carbazole : En 2003, le groupe de T.-C. Chang a rapporté la synthèse d'un dérivé de carbazole comportant deux branches de vinylpyridinium en positions 3 et 6 (Figure 34). Ce composé (BMVC) stabilise significativement le quadruplex télomérique humain.



BMVC

Figure 34. Structure de dérivé carbazole (BMVC).

Le BMVC appartient à la famille des colorants des styryles cationiques qui se caractérisent par une désactivation rapide de leur état excité par des vibrations rotationnelles autour de liaison vinylique. Il en résulte une faible capacité de fluorescence [86], [87]. La fluorescence augmente dans des solvants visqueux (glycérol) ou en présence de matrices polymériques biologiques telles que l'ADN, par limitation de vibrations rotationnelles.

Les propriétés photophysiques de ce colorant ont été étudiées avec l'ADN quadruplex, principalement le quadruplex télomérique humain. Le BMVC se lie à l'ADN quadruplex télomérique humain d[$(T_2AG_3)_4$] avec une valeur de K_d nanomolaire [88]. Par contre, il se lie aussi aux structures d'ADN duplex comme l'ADN de veau et les duplexes linéaires courts.

Le BMVC distingue le G-quadruplex et le duplexe par la différence de longueurs d'ondes d'émission maximale. En effet, une différence de 30 nm est observée en présence de l'ADN double-brin (λ_{max} = 545 nm) et en présence de quadruplex (λ_{max} = 575 nm).

Cette différence de longueur d'onde est utilisée pour signaler les différentes structures du quadruplex et du duplex, et est aussi appliquée à la détection de la présence d'ADN quadruplex au niveau des chromosomes. Les chromosomes en métaphase ont été observés par microscopie de fluorescence et la fluorescence a été collectée à partir de diverses régions. Les régions proximales de télomère montrent une émission de fluorescence autour de 565 nm, alors que les autres régions chromosomiques montrent une émission de fluorescence autour de 545 nm. En se basant sur ces résultats obtenus, les auteurs ont conclu la présence de structures quadruplex dans le télomère.

Une autre méthode pour distinguer les G-quadruplexes de l'ADN double-brin par le BMVC utilise la différence en temps de vie de la fluorescence lorsque le BMVC est lié à l'ADN quadruplex ou duplex. La durée de vie dans le quadruplex télomérique (1,96 ns dans la condition de Na^+) est supérieure par rapport au double-brin (1,46 ns) .

Les G-quadruplexes et les duplexes peuvent être différenciés en utilisant le BMVC par ces deux méthodes ci-dessus. Cependant, elles ont besoin de techniques spécifiques et la précision en termes de résolution spatiale et de contraste d'imagerie ne sont pas abordées.

Autres sondes de type « light-up » : La porphyrine TMPyP4 est un ligand très connu du G-quadruplex (Figure 35). Les porphyrines sont une famille de composés fluorescents, qui présentent des rendements quantiques très variables en fonction des différents substituants et de leur forme (libre ou métallée). La plupart des porphyrines interagissant avec le G-quadruplex [89]–[91] montrent une faible fluorescence due au transfert d'électrons de guanines à l'état excité de la porphyrine, probablement favorisé par l'effet accepteur d'électrons du pyridinium. Cependant, l'augmentation de la fluorescence de TMPyP4 a été mentionnée dans plusieurs cas. Le rendement quantique de fluorescence de TMPyP4 dans l'eau est modéré (ϕ = 0,05), et accroît environ 1,5 à 2,5 fois en présence d'ADN quadruplex télomérique dans les conditions de Na^+ [91]. En revanche, une forte baisse de fluorescence (> 70%) de TMPyP4 a été observée en présence de l'ADN quadruplex télomérique dans les conditions de K^+. [90]. La séquence télomérique est capable de former des G-quadruplexes des structures différentes dans des conditions ioniques différentes. Ces études montrent que la fluorescence de TMPyP4 dépend fortement de la structure du quadruplex.

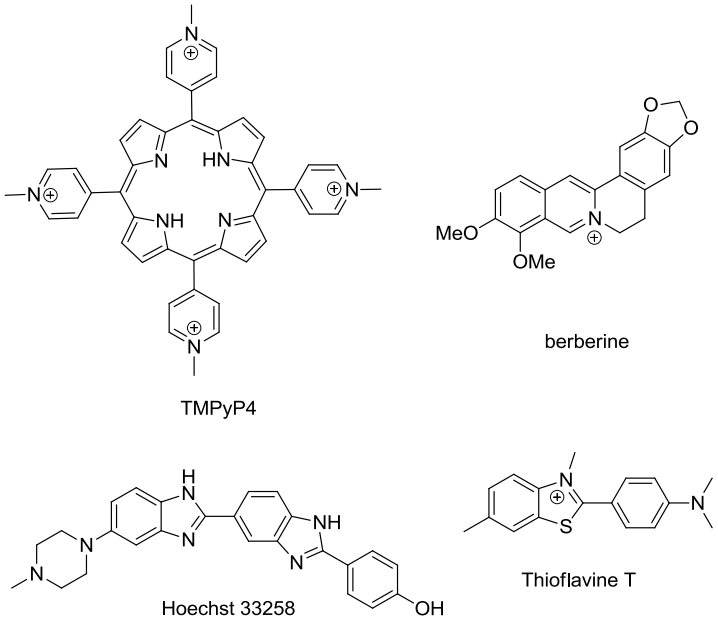


Figure 35. Structures de TMPyP4, berberine, Hoechst 33258 et thioflavine T.

Plusieurs produits naturels aromatiques possèdent une faible fluorescence dans le tampon aqueux et leur interaction avec l'ADN quadruplex peut augmenter significativement l'intensité de la fluorescence. Parmi eux se trouvent les alcaloïdes d'isoquinoléine et la berberine (Figure 35), qui a été initialement identifiée comme l'inhibiteur de topoisomérases I et II [92]. Ce composé a une tête de pont d'azote quaternaire, et peut s'empiler sur le G-quartet terminal. La berbérine a un rendement quantique très faible dans la solution aqueuse ($\phi = 4{,}5\times 10^{-4}$) [93] qui augmente d'un facteur de 50 lors de l'addition de l'ADN quadruplex. Le maximum de spectre d'émission de fluorescence (λ_{max} = 522 nm) est légèrement décalé vers le bleu (5 nm).

La Thioflavine T devient fluorescente en présence d'ADN quadruplex et double-brin, par contre le facteur d'augmentation de fluorescence en présence de l'ADN quadruplex est significativement plus grand que celui en présence de l'ADN double-brin. Cela peut être utilisé pour le criblage à haut débit pour détecter la formation de structure de G-quadruplex [94].

Le Hoechst 33258 [80], [95] et bromure d'ethidium [96] possèdent aussi une augmentation de la fluorescence en présence du G-quadruplex, mais plus faible que celles du duplex qui est différent que la thioflavine.

Sondes permanentes : Les sondes « light-up » mentionnées ci-dessus sont basées sur la limitation de rotation interne de molécule dans le complexe avec le G-quadruplex,

ce qui limite la perte d'énergie par la conversion interne, conduisant à une augmentation de la fluorescence. Une autre approche consiste à lier un ligand du G-quadruplex (non fluorescent) et un fluorophore par une liaison covalente. Ce type de composés hybrides représente la sonde permanente. Le motif fluorescent ne devrait pas influencer la partie qui est responsable de la reconnaissance du G-quadruplex. En même temps, la fluorescence de la partie fluorophore ne devrait pas être affectée par l'analyte.

Le 4,4-difluoro-4-borata-3a-azonia-4a-aza-s-indacene (BODIPY) est un fluorophore neutre avec un rendement quantique important et est stable dans des conditions physiologiques, non sensible à la variation de pH.

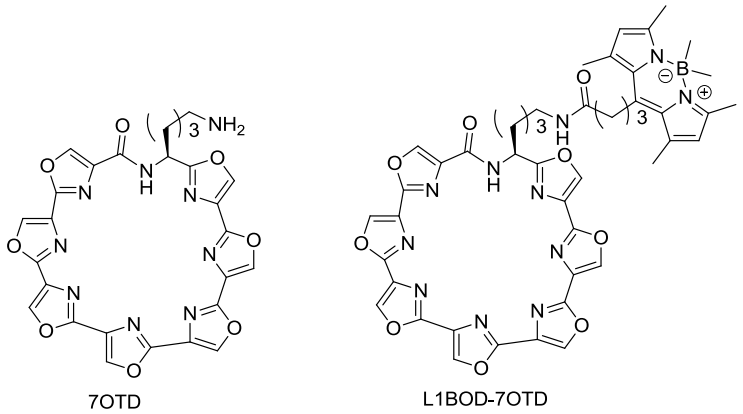


Figure 36. Structures de 7OTD et L1BOD-7OTD.

Nagasawa et al. ont développé un dérivé fluorescent de téloméstatine, un ligand connu du G-quadruplexe télomérique. Le macrocycle 7OTD (Figure 36) est un analogue synthétique de téloméstatine, qui est plus facile à préparer et aussi plus efficace en termes d'affinité et de sélectivité pour les quadruplexes, en particulier pour les séquences télomériques. Le 7OTD est donc un bon candidat pour la fonctionnalisation par un marqueur fluorescent. Le L1BOD-7OTD est la combinaison de BODIPY et de 7OTD, qui présente une fluorescence dans la zone verte (λ = 501 nm) en l'absence ou en présence de différentes structures de G-quadruplex [97]. Cette fluorescence stable permet l'utilisation du macrocycle marqué pour colorer spécifiquement les structures du G-quadruplex dans les gels d'électrophorèse. La coloration sélective du télomérique quadruplex $d[T_2AG_3]_4$ a été observée. En revanche, aucune fluorescence n'a été détectée avec des séquences duplex ou séquence simple brin. La coloration sélective a

également été observée avec d'autres structures de G-quadruplex (c-myc, c-KIT22, bcl2).

1.6 Fluorophores biphotoniques

1.6.1 Principe de l'absorption à deux photons

Le phénomène de l'absorption à deux photons a été décrit pour la première fois par Maria Goeppert-Mayer en 1931 [98]. Il s'agit d'une absorption simultanée de deux photons de fréquences identiques qui conduit au passage d'un état fondamental (S_0) à un état excité (S_1, S_2,…) (Figure 37). La somme des énergies de ces deux photons est égale à l'énergie de l'absorption à un photon. La première expérience de l'excitation à deux photons a été réalisée en 1961 dans un cristal dopé à l'europium [99].

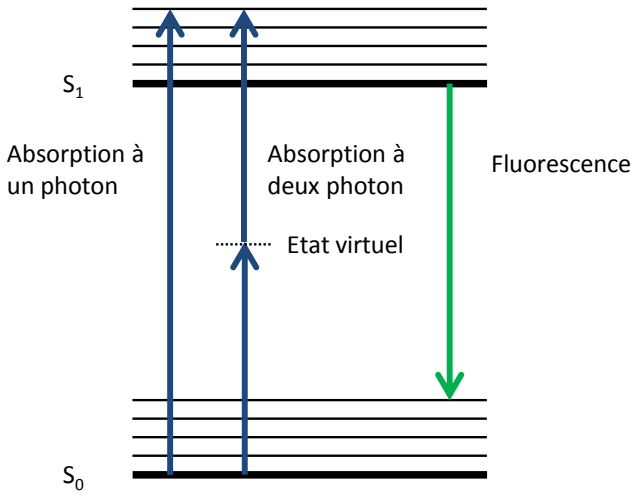


Figure 37. Diagramme de l'absorption à un ou deux photons.

Contrairement à l'absorption à un photon qui est linéaire en fonction de l'intensité de la lumière, l'absorption à deux photons est un processus de troisième ordre (non linéaire) et elle est proportionnelle au carré de l'intensité de la lumière. Ce processus implique un état virtuel entre l'état fondamental S_0 et l'état excité S_1, S_2…, qui correspond à l'énergie du premier photon absorbé.

La capacité d'absorption à deux photons d'une molécule est caractérisée par la section efficace, noté δ ou σ, exprimée en unités Goeppert-Mayer (GM), ou 1 GM = 10^{-50} cm^4 s $photon^{-1}$. Cette unité résulte du produit de deux sections (une pour chaque photon,

chacune en cm^2) et d'un temps (dans lequel les deux photons doivent arriver pour agir ensemble).

L'absorption à deux photons est peu probable, elle est généralement obtenue à l'aide de lasers pulsés à l'échelle des femtosecondes avec une intensité de laser suffisamment élevée, uniquement au point focal du faisceau. L'émission se produit également sur ce point focal dans l'échantillon. Ce processus d'excitation à deux photons localisée peut être utilisé dans la microscopie à fluorescence, car il permet d'avoir une profondeur de pénétration plus importante par rapport à la microscopie linéaire conventionnelle. Cela conduit à une meilleure résolution spatiale de l'image et limite la phototoxicité et le photoblanchiment en dehors du point focal.

Il existe d'autres applications biologiques, notamment la conception de composés produisant de l'oxygène singulet sous excitation biphotonique [100], [101], ou la photolibération de composés cagés [102]. L'absorption à plusieurs photons autre que deux est également possible.

1.6.2 Fluorophores biphotoniques

En générale, la plupart des fluorophores peuvent être excités à deux photons, par exemple la fluorescéine et la rhodamine B (Figure 38) peuvent être excités à 782 nm et 840 nm à deux photons, avec des valeurs de section efficace de 38 et 210 GM, respectivement [103]. La plupart des fluorophores utilisés dans les applications à un photon représentent des valeurs de section efficace relativement faibles à deux photons.

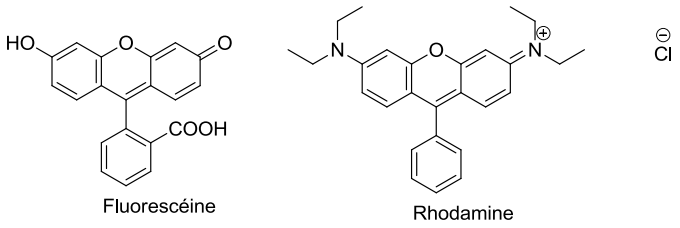


Figure 38. Structures de fluorescéine et rhodamine B.

L'objectif d'améliorer la valeur de la section efficace est démontré par de nombreuses études, pour comprendre la relation entre la structure de la molécule et la section efficace du fluorophore. Des composés organiques avec une géométie quadrupolaire

de type D - π - A – π - D ou A - π - D - π – A (A = accepteur d'électron, D = donneur d'électron) ont été découverts pour leurs valeurs de section efficace élevées. L'introduction de groupements électrodonneurs donne une conséquence d'un transfert de charge lors de l'excitation et donc une augmentation des moments dipolaires de transition, ainsi qu'une diminution de l'énergie de transition entre les différents états. Ce phénomène de transfert de charge est augmenté lorsqu'on ajoute des groupements électroattracteurs au centre de la molécule et augmente la longueur de la conjugaison.

Cho et al. ont confirmé que plus la force des groupements électrodonneurs et/ou électroattracteurs est élevée, plus la section efficace d'absorption à deux photons serait élevée [104]. Plusieurs groupes de recherche ont synthétisé différents composés en étudiant l'influence de la nature des groupements électrodonneurs et électroattracteurs, et du squelette conjugué sur l'absorption à deux photons, mais aussi sur le rendement quantique de fluorescence et sur la photostabilité des composés.

Une autre stratégie utilise des fluorophores octupolaire (Figure 39), dérivés de la fonctionnalisation symétrique d'un noyau triphénylamine avec des groupements accepteurs forts via phénylène-éthynylène, pour obtenir un rendement quantique élevé de fluorescence. Ces fluorophores possèdent des valeurs de section efficace très élevées dans la région rouge-NIR [105]. Les fluorophores à deux photons sont utilisés en tant que sondes de l'ADN double-brin et leurs valeurs de section efficace sont largement augmentées en présence d'ADN double-brin.

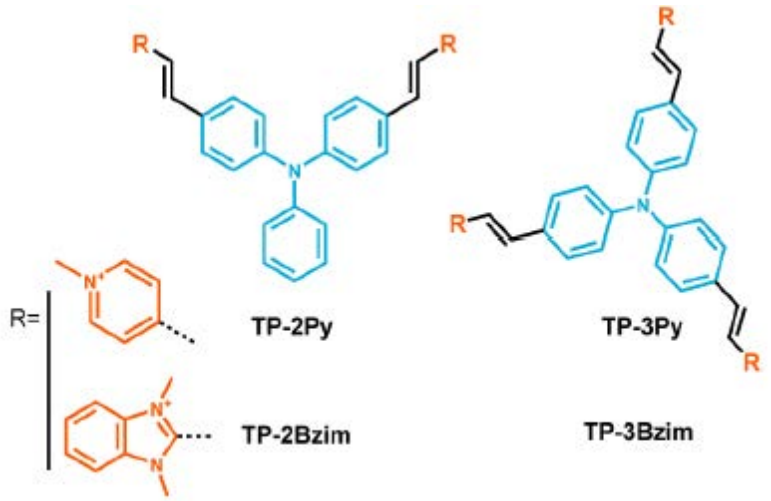


Figure 39. Exemple de fluorophore octupolaire utilisé comme sonde d'ADN double-brin (image extraite de réf [105]).

Dans la littérature courante, il n'y avait pas d'exemple de sondes à deux photons sélectives pour l'ADN quadruplex. La synthèse de ce type de sondes fait donc l'un des objectifs de cette thèse.

2 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

2.1 Conception générale de ligands fluorescents de l'ADN quadruplex

L'objectif de cette thèse est de synthétiser et d'étudier des sondes fluorescentes d'ADN quadruplex. Deux séries de sondes ont été envisagées : les colorants styryles et les PDC-coumarines (Schéma 1). La conception de ces deux séries est basée sur la molécule pyridodicarboxamide bisquinoléinium (PDC-360A), un ligand sélectif ayant une bonne affinité vis-à-vis des structures d'ADN quadruplexes, comme mentionné dans les chapitres précédents. En revanche, cette molécule synthétisée auparavant dans notre laboratoire est non-fluorescente, même en complexes avec les ADN quadruplexes. En s'inspirant de cette molécule et du motif styryle, connue pour ses propriétés spectroscopiques, nous avons envisagé une librairie de colorants distyryles, avec une structure rapprochée de celle du PDC, tout en gardant les propriétés spectroscopiques du styryle. Une deuxième librairie de PDC-coumarine est synthétisée pour introduire la propriété fluorescente de la coumarine dans le PDC par une liaison covalente.

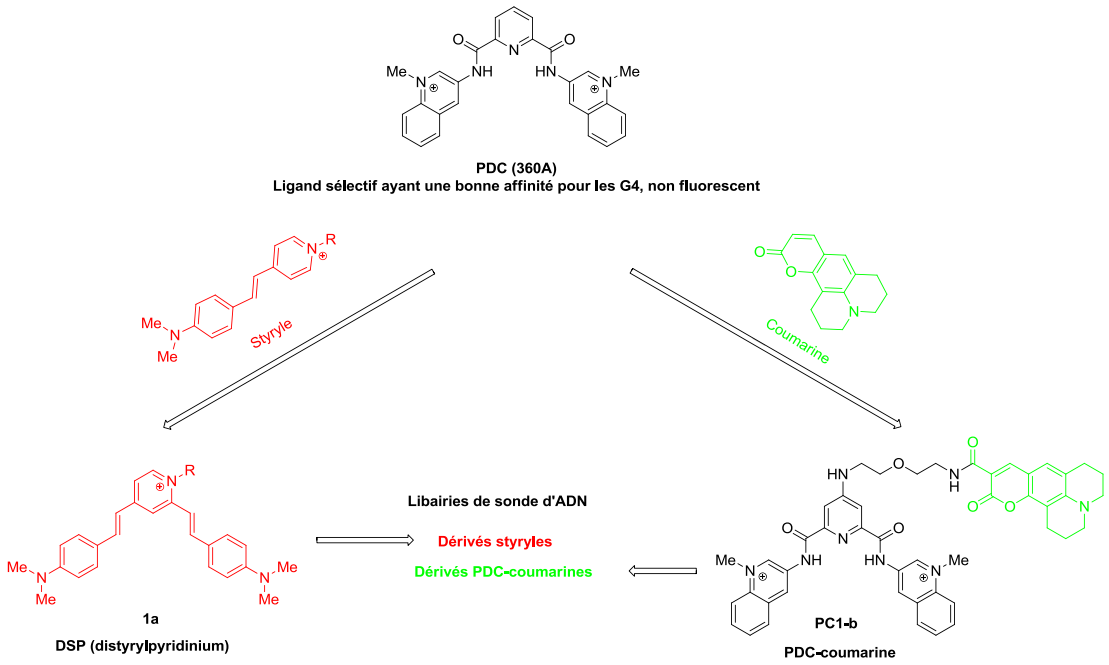


Schéma 1. Deux séries de sondes d'ADN quadruplex conçues en s'inspirant du ligand PDC.

2.2 Sondes fluorescentes basées sur le fluorophore styryle

2.2.1 Conception

Les fluorophores de type styryle sont des colorants contenant le groupement Ar-CH=CH-R et qui constituent une classe importante parmi les colorants fonctionnels. Ils peuvent être utilisés pour le stockage optique d'information, en tant que colorants lasers, sensibilisateurs optiques et sondes fluorescentes dans le domaine biomédical, ainsi que pour d'autres nombreuses applications dans la science et la technologie [106].

Le styryle C61 (Figure 40) est une sonde « light-up » sélective de l'ADN duplex par rapport à l'ARN (facteur de sélectivité ≈ 10 fois), potentiellement utilisable dans l'imagerie de cellules vivantes. Il présente de nombreux avantages par rapport aux sondes commercialisées les plus utilisées. La longueur d'onde d'excitation pour le styryle C61 est dans la zone verte, par rapport à Hoechst qui est dans l'ultrat-violet, ce qui provoque moins de dommage cellulaire [107].

D'autres colorants de type styryle mentionnés précédemment, comme le BMVC (Figure 40) est une sonde pour les acides nucléiques, qui peut différencier l'ADN quadruplex et duplex par leur différence de longueur d'onde d'émission maximale et par le temps de vie de la fluorescence en présence de ces deux formes d'ADN [108]. Cependant, ces méthodes ont besoin de techniques spécifiques. La précision en termes de résolution spatiale et de contraste d'imagerie ne sont pas abordées.

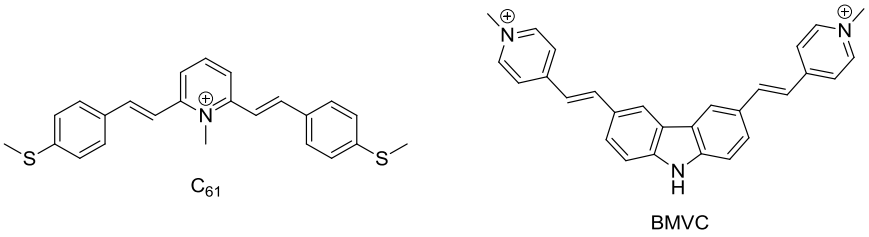


Figure 40. Structure de C61 et BMVC.

Le mécanisme d'augmentation de la fluorescence en présence d'ADN des deux styryles montrés ci-dessus peut être expliqué par la limitation de l'isomérisation E-Z des fonctions alcène et par l'inhibition de la rotation des ponts conjugués (Schéma 2) exercée par l'ADN dans son complexe avec le styryle. Cela provoque une perte de

l'énergie de la molécule excitée par des transitions non radiatives beaucoup moins importante que celle du styryle libre et conduit à une augmentation de la fluorescence.

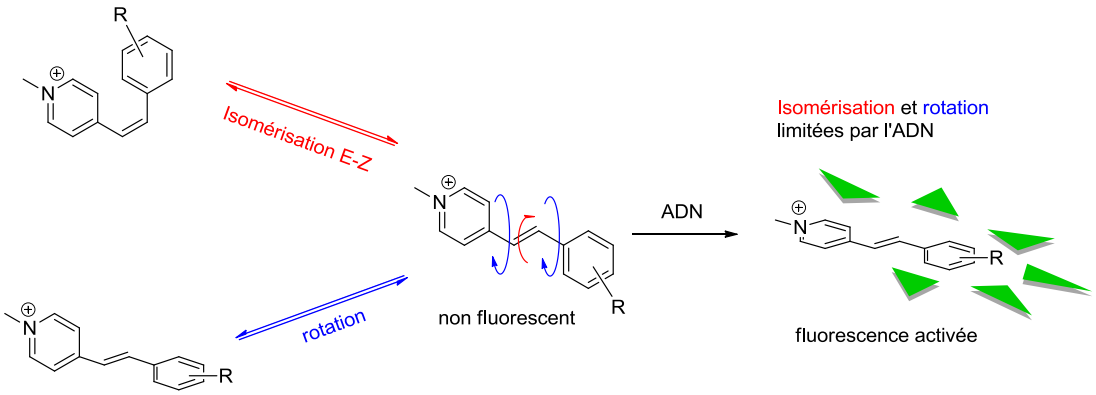


Schéma 2. Voies de désexcitation du styryle (flèche rouge : isomérisation E-Z, flèches noirs : rotation).

Ces exemples démontrent les bonnes propriétés photophysiques et le fort potentiel de sondes de type styryle utilisées dans l'imagerie de cellule, ainsi que leur capacité à distinguer l'ADN quadruplex du duplex. Nous avons donc combiné les motifs PDC et styryle pour obtenir des sondes possédant ces propriétés photophysiques du styryle et une affinité et sélectivité élevées vis-à-vis du G-quadruplex du PDC.

La géométrie du PDC joue un rôle important dans l'affinité du G-quadruplex, grâce aux deux liaisons hydrogène. Le PDC libre adopte la forme en V qui est supposée être capable de reconnaitre sélectivement le G-quartet de l'ADN quadruplexe par empilement π - π, tout comme son analogue PhenDC (1.4.1.2, Figure 25). En présence de Cu^{2+}, le cœur du PDC contenant un atome d'azote et les groupements carbonyles, est chélaté avec le métal, la forme en V du PDC n'est plus maintenue par les deux liaisons hydrogène. Le complexe du [PDC][Cu] de vient linéaire (Figure 41) et ne peut plus couvrir le G-quartet aussi bien que la forme en V, et perd donc son affinité *vis-à-vis* de l'ADN quadruplex [109]. Un autre exemple est le Inv-PDC (Figure 41), avec des groupements amide inversés par rapport au PDC et qui représente donc une forme linéaire qui perd également son affinité pour l'ADN quadruplex [110].

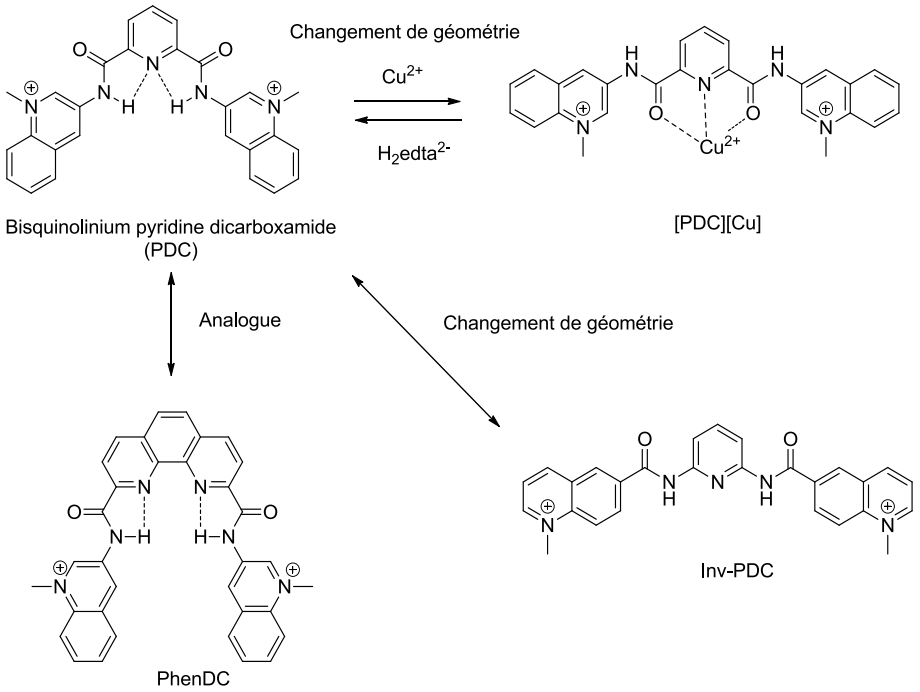


Figure 41. Structures de PDC et PhenDC en forme de V (forme maintenue par deux liaisons hydrogène) ; Structures de PDC (en complexe avec Cu) et Inv-PDC en forme linéaire (en complexe avec Cu).

Le di-styryle **1a** et ses dérivés synthétisés, inspirés du PDC sont proches de lui (libre en forme V et complexe linéaire), avec un cœur pyridinium et deux groupements styryles latéraux. Les cycles aromatiques sont liés par des ponts conjugués, qui sont différents du PDC, ce qui donne des propriétés fluorescentes à ce type de molécule. Différents systèmes D - π - A - π - D (A = accepteur d'électron, D = donneur d'électron) sont introduits dans ces sondes pour avoir un panel large de longueurs d'onde maximales de fluorescence, afin d'étudier l'influence de différents groupements sur l'augmentation de la fluorescence et étudier la sélectivité des sondes *vis-à-vis* des différentes structures de l'ADN quadruplex, duplex et simple brin. Cette géométrie quadrupolaire (donneur-accepteur-donneur) est également connue pour ses propriétés optiques non-linéaires et présente un grand intérêt dans le domaine de l'imagerie des tissus biologiques.

2.2.2 Etudes de sondes « prototypes »

2.2.2.1 Synthèse de sondes « prototypes »

Dans un premier temps, nous avons synthétisé le distyryle asymétrique, 2,4-bis(4-diméthylaminostyryl)-1-méthylpyridinium **(1a)**, et son isomère symétrique, 2,6-bis(4-

diméthylaminostyryl)-1-méthylpyridinium (**2a**). Ces composés styryles, connus dans la littérature ont été obtenus par une réaction de condensation de Knoevenagel entre les dérivés pyridiniums et le 4-(diméthylamino) benzaldéhyde, dans le MeOH ou l'EtOH, au reflux en utilisant la pipéridine comme catalyseur (Schéma 1). Les cœurs pyridiniums ont été obtenus par une réaction de méthylation sur l'atome d'azote des lutidines (2,4- ou 2,6-) en utilisant l'iodométhane (Schéma 3).

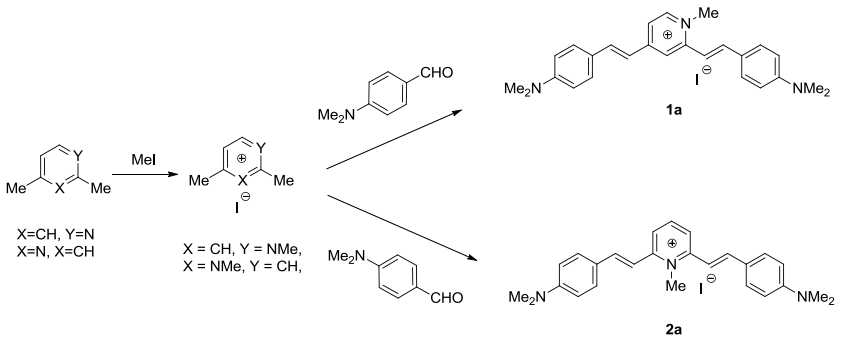


Schéma 3. Schéma de synthèse de distyryles **1a** et **2a**.

Ces styryles sont chargés positivement sur l'atome d'azote du cœur pyridinium et le contre ion, l'iodure, est chargé négativement, ce qui permet d'avoir une solubilité suffisante dans le milieu aqueux, et ainsi d'étudier leur interaction avec les ADN dans les conditions quasi-physiologiques. Ils ont été purifiés par recristallisation. Leurs caractérisations (RMN, masse, analyse élémentaire) sont en accord avec la littérature [111].

2.2.2.2 Études cristallographiques de 1a et 2a

La structure des deux isomères asymétrique (**1a**) et symétrique (**2a**) a été ensuite étudiée par la diffraction des rayons X (en collaboration avec R. Guillot, université Paris – Sud) (Figure 42). Cela a révélé des différences significatives entre les deux isomères au niveau de la géométrie moléculaire.

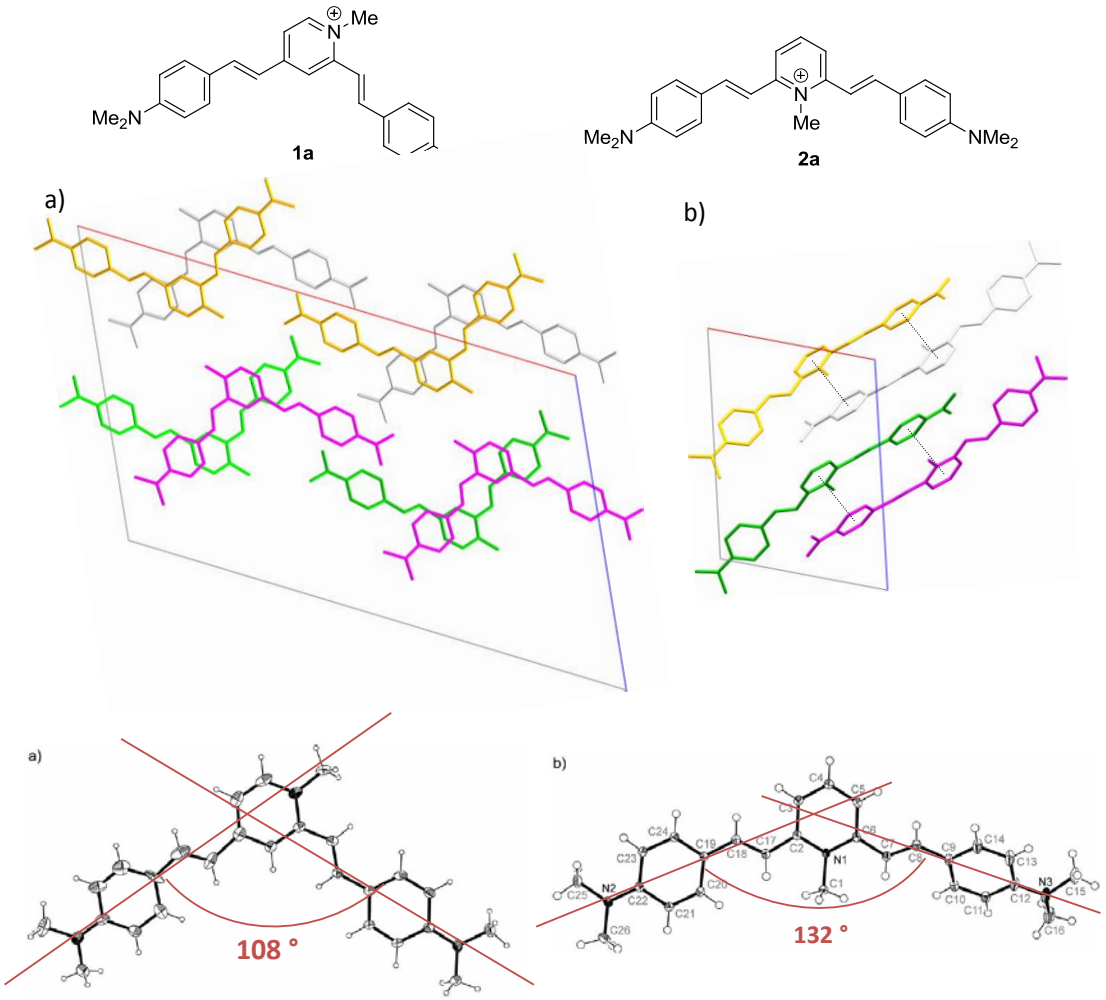


Figure 42. Structures de **1a** et **2a** en état solide.

Ces études montrent que le styryle asymétrique **1a** adopte une structure en forme L due à la gêne stérique du groupement méthyle en position 1 du noyau pyridinium, ce qui force la double liaison en position 2 à adopter une conformation *s-trans*. Cette forme est caractérisée par un angle de 108° entre les deux groupements substituants du 4-(diméthylamino) phényle, avec une géométrie assez proche de PDC-360A.

L'isomère symétrique **2a** adopte une forme plus étendue (Figure 42), avec un angle de 132° entre les deux groupements substituants du 4-(diméthylamino)phényle, ce qui est plus grand que dans le cas de **1a**. Cette forme plus étendue est structurellement proche du complexe PDC-360A · [Cu^{2+}] et Inv-PDC (Figure 41).

Les études cristallographiques montrent également que le styryle **1a** est quasi-plan, ses groupements latéraux étant sur le même plan que le cœur pyridinium. Par contre, les groupements latéraux de **2a** sont tournés significativement en dehors du plan du

cœur pyridinium, avec les angles de torsion C5-C6-C7-C8, C3-C2-C17-C18 qui sont respectivement de 30,8° et 25,5°.

Les modes d'empilement de ces deux distyryles dans le cristal sont similaires, les molécules styryles sont empilées les uns sur les autres d'une façon sous forme antiparallèle, avec un recouvrement du cœur pyridinium et d'un seul groupement latéral, et le deuxième groupement latéral est empilé sur le groupement latéral des styryles avoisinants (Figure 42).

2.2.2.3 Calculs quanto-chimiques

Pour connaitre les moments dipolaires et la nature des transitions électroniques dans les colorants distyryles, nous avons effectué des calculs selon la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) avec une corrélation d'échange CAM-B3LYP, qui est bien adaptée pour le traitement des phénomènes de transfert de charge [112], et une base D95V. L'optimisation de la géométrie à l'état fondamental indique que les deux groupements latéraux de **2a**, sont tournés à 26° en dehors du plan du cœur pyridinium (Figure 43). En revanche, la structure de l'état fondamental optimisée de **1a** est plane. Ces résultats sont en accord avec les données des études cristallographiques (*vide supra*).

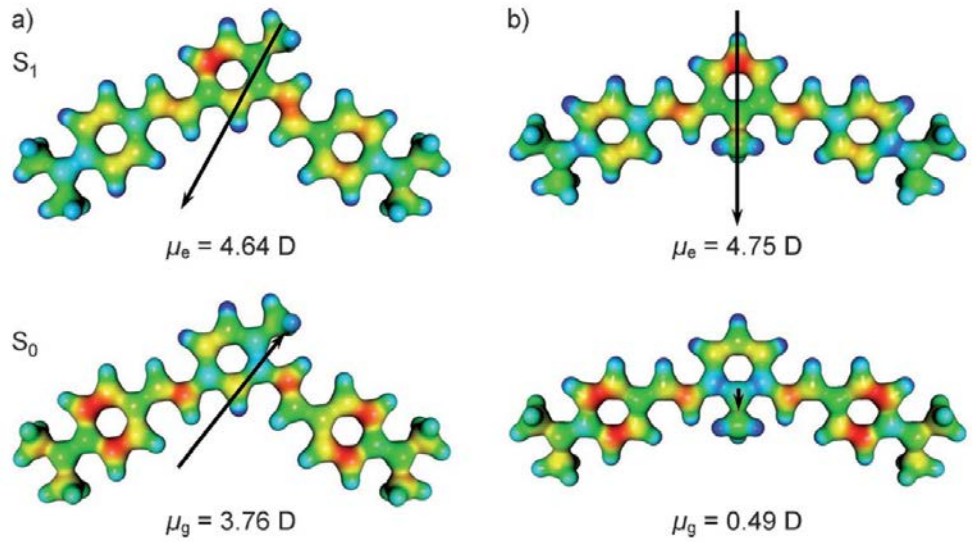


Figure 43 : Distribution de charge calculée par TD-DFT dans l'état fondamental électronique (S_0) et dans le premier état excité (S1) des cations a) **1a** et b) **2a** dans le vide (négatif = rouge, positifs = bleu). Les flèches représentent l'orientation et l'importance des moments dipolaires calculés dans les états électroniques correspondants.

Le calcul TD-DFT (*Time-dependent density functional theory*) au même niveau que la théorie indique que les énergies de transitions verticales (480 et 465 nm) sont en excellent accord avec les données expérimentales (478 et 468 nm pour **1a** et **2a**, respectivement, Tableau 1), ce qui approuve donc le choix de la méthode de calcul.

L'analyse de la densité électronique dans l'état fondamental et dans le premier état excité de composés **1a** et **2a** (Figure 43) confirme le caractère de transfert de charge de ces transitions électroniques : l'excitation est accompagnée d'une réorientation (dans le cas de **1a**) ou une augmentation importante (dans le cas de **2a**, de 0,49 D à 4,75 D) des moments dipolaires de cation des colorants. Lors de l'excitation, la densité électronique est transférée à partir des substituants latéraux diméthylaminostyryles aux positions 1,2,4-(**1a**) ou aux positions 1,2,6- (**2a**) du noyau pyridinium.

Les calculs quanto-chimiques permettent également d'expliquer les différences du comportement d'agrégation de **1a** et **2a** en milieu aqueux (*vide infra,* Figure 44). Le grand moment dipolaire statique de colorant **1a** (μ_g = 3,76 D) favorise les interactions intermoléculaires entre les cations de colorants, conduisant à l'agrégation, probablement antiparallèle qui est observé à l'état solide (Figure 42), alors que dans le cas du **2a**, le moment dipolaire de l'état fondamental est trop petit (μ_g = 0,49 D) pour l'agrégation aux concentrations utilisées.

En se basant sur les résultats obtenus à partir de l'étude cristallographique et les calculs théoriques, le styryle **1a** est supposé être meilleur ligand de l'ADN quadruplex que le colorant **2a**, car il possède une forme L qui est structurellement proche de PDC-360A en forme V (ligand connu de l'ADN quadruple). Sa planéité pourrait également faciliter l'empilement sur le G-quartet terminal de l'ADN quadruplex qui est également plan.

Nous étudierons par la suite l'influence de la géométrie (linéarité, planéité) de deux colorants sur l'interaction entre les distyryles, les ADN quadruplex et double-brin par des études spectroscopiques d'absorption et d'émission, et par la dénaturation thermique de l'ADN.

2.2.2.4 Etudes photophysiques

Propriétés spectroscopiques des colorants 1a et 2a : Les isomères **1a** et **2a** ont des longueurs d'onde d'absorption (478 et 484 nm, respectivement) et des valeurs d'extinction molaire d'absorption (log ε = 4,5 et log ε = 4,65, respectivement) très proches dans le tampon aqueux (Tableau 1).

Tableau 1**.** Propriétés Spectroscopiques des colorants **1a** and **2a** dans le tampon[a] et dans méthanol.

Colorant	Tampon				MeOH		
	λ_{abs}[b], nm	log ε	λ_{em}[c], nm	ϕ_f[d]	λ_{abs}, nm	log ε	λ_{em}, nm
1a	478, 618[e]	4.50	~680	0.8×10^{-4}	507	4.78	674
2a	468	4.65	~650	0.3×10^{-4}	494	4.81	629

[a] 10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2. [b] Absorption maximum, à 298 K et *c*(colorant) = 10 µM. [c] Emission maximum, à *c*(dye) = 2.5 µM. [d] Rendement quantique de la fluorescence, mesuré avec le Rhodamine 6G comme référence. [e] Epaulement (corresponds à l'aggregate de type J).

Phénomène d'agrégation de 1a: L'absorption du colorant **1a** présente un petit épaulement à 618 nm (Tableau 1, Figure 44) à une concentration relativement forte (10 µM) à 25 °C dans le tampon (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2), qui n'existe pas dans le méthanol. Cet épaulement est largement augmenté en diminuant la température du tampon, mais diminue jusqu'à la disparition en augmentant la température, ce qui est caractéristique de l'agrégat de type J.

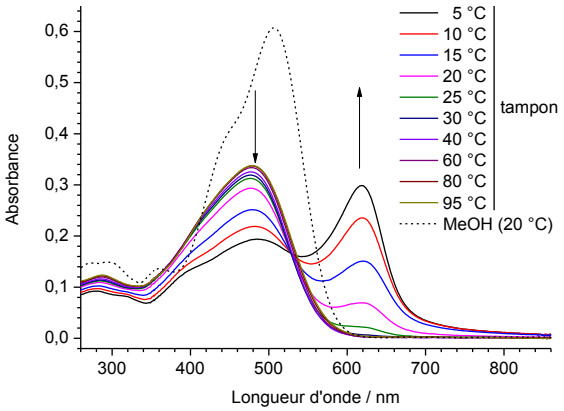


Figure 44. Spectre d'absorption du colorant **1a** (10 µM) dans le tampon aqueux (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2) à 5–95 °C et dans le MeOH à 20 °C.

Les interactions de colorants **1a** et **2a** avec des acides nucléiques ont été initialement étudiées par des titrations spectrophotométriques (UV-VIS) avec les ADN c-kit2 (ADN quadruplexe synthétique parallèle) et l'ADN de thymus de veau (« ct ADN », ADN double-brin natif) (Figure 45). Pour les séquences et structures d'ADN utilisées dans ce travail, cf. Tableau A1 (Annexe).

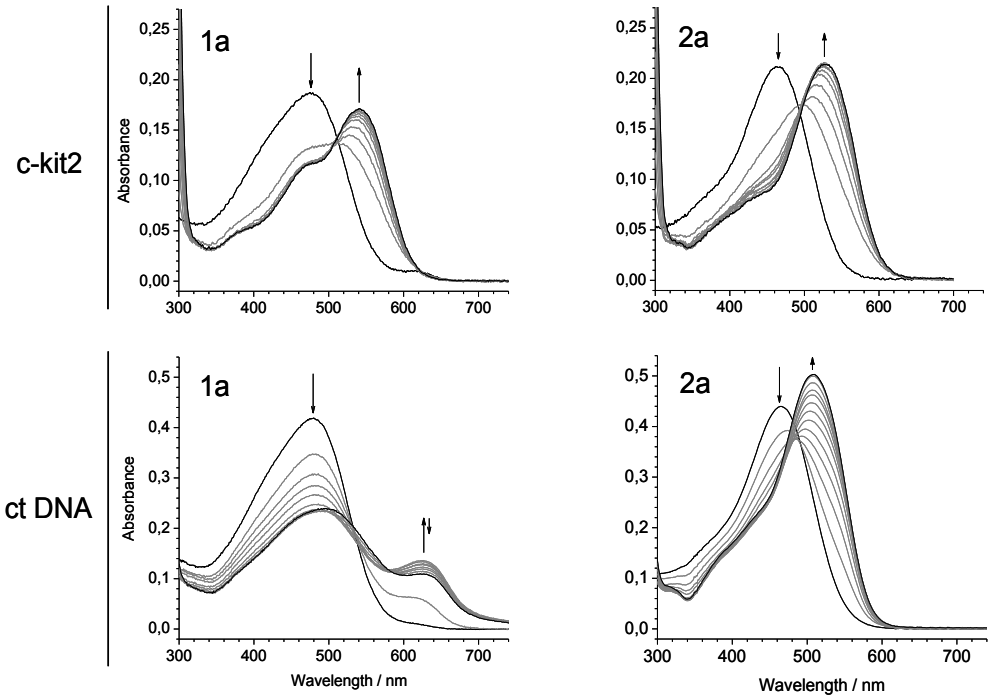


Figure 45. Titrations spectrophotométriques des colorants **1a** et **2a** avec c-kit2 (0 à 25 µM) et ct ADN (0 à 130 µ M bp). La concentration des colorants était de 5 µM (pour des titrations avec c-kit2) ou de 10 µM (pour des titrations avec ct ADN) dans le tampon de 10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2. Les flèches indiquent les changements de spectres absorbants observés pendant les titrations.

Les interactions des deux colorants **1a** et **2a** avec l'ADN quadruplex et double-brin sont caractérisées par une forte réduction des pics d'absorption des colorants libres et par la formation de nouveaux pics lors de l'addition de l'ADN quadruplex (c-kit2) et double-brin (CT ADN), sauf dans le cas de **1a** avec l'ADN double-brin (CT ADN). Ces changements sont dûs à la formation des complexes de colorant-ADN, ce qui réduit l'énergie de transition électronique (état fondamental → premier état excité) de **1a** et **2a**. Les nouveaux pics sont décalés vers le rouge à 60 et à 65 nm dans les cas de l'ADN G-quadruplex (c-kit2) avec les deux colorants, et à 40 nm dans le cas de l'ADN double-brin (CT ADN) avec le colorant **2a**. Les différences de décalage indiquent que les sites de liaison (polarité, géométrie) dans l'ADN quadruplex et double-brin ne sont pas les mêmes pour le colorant **2a**.

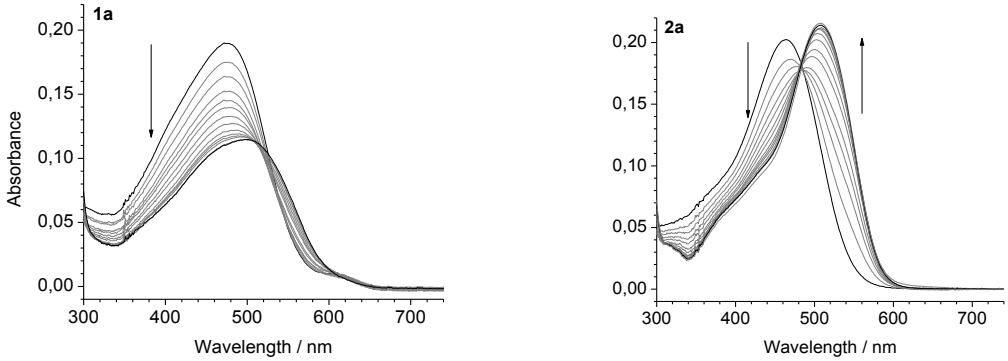


Figure 46. Titrations Spectrophotometriques des colorants **1a** et **2a** avec ct ADN (de 0 à 90 µM bp). La concentration des colorants est de 5 µM dans le tampon aqueux (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2).

L'épaulement observé dans le spectre du colorant **1a** qui est significativement augmenté en présence de l'ADN double-brin CT ADN à 10 µM (λ = 625 nm), est caractéristique de l'agrégat J mentionné précédemment. Des titrations spectrophotométriques ont été éffectuées avec CT ADN avec une concentration de **1a** plus faible (5 µM), ce qui défavorise la formation de l'agrégat J. Dans ce cas, il n'y a pas d'augmentation de cet épaulement ni de nouvelle formation de pic en ajoutant du CT ADN (Figure 46). Ces résultats prouvent la formation de l'agrégat J du colorant **1a**, ce qui correspond aux calculs quanto-chimique et aux spectres du colorant **1a** à température variée (Figure 44).

Les spectres des titrations de **2a** à 5 µM avec CT ADN sont similaires à ceux observés à 10 µM, avec une forte réduction des pics d'absorption du colorant libre et une formation de nouveau pic lors de l'addition de l'ADN double-brin (CT ADN). Il y a donc une interaction entre le colorant **2a** et l'ADN CT.

Le colorant **1a** interagit donc sélectivement avec l'ADN quadruplex contrairement au colorant **2a**, qui interagit avec les ADN quadruplex et duplex. Cela confirme qu'une structure de forme en L proche de celle de PDC-360A, est importante pour la sélectivité vis-à-vis de l'ADN quadruplex. Le colorant **2a** (qui possède une structure proche de PDC-360A [Cu^{2+}]) interagit avec l'ADN quadruplex et duplex avec une différence au niveau de décalage de la longueur d'onde d'absorption maximale dans les titrations d'absorption. Cela pourrait être une caractéristique de distinction entre ces deux structures différentes de l'ADN.

2.2.2.5 Fluorescence des colorants en présence de l'ADN

Titrations fluorimétriques : L'interaction du colorant **1a** avec les ADN quadruplexe (télomérique humain 22AG, Figure 47) et duplexe (ds-lac, Figure 47) a été ensuite étudiée par les titrations fluorimétriques. Le colorant était excité à 510 nm qui est le point isosbestique dans les titrations spectrophotométriques de **1a** par c-kit2 (un point d'absorption constante lors de l'addition de l'ADN, cela permet d'éliminer l'influence du changement de l'intensité d'absorption au fur et à mesure de l'addition de l'ADN).

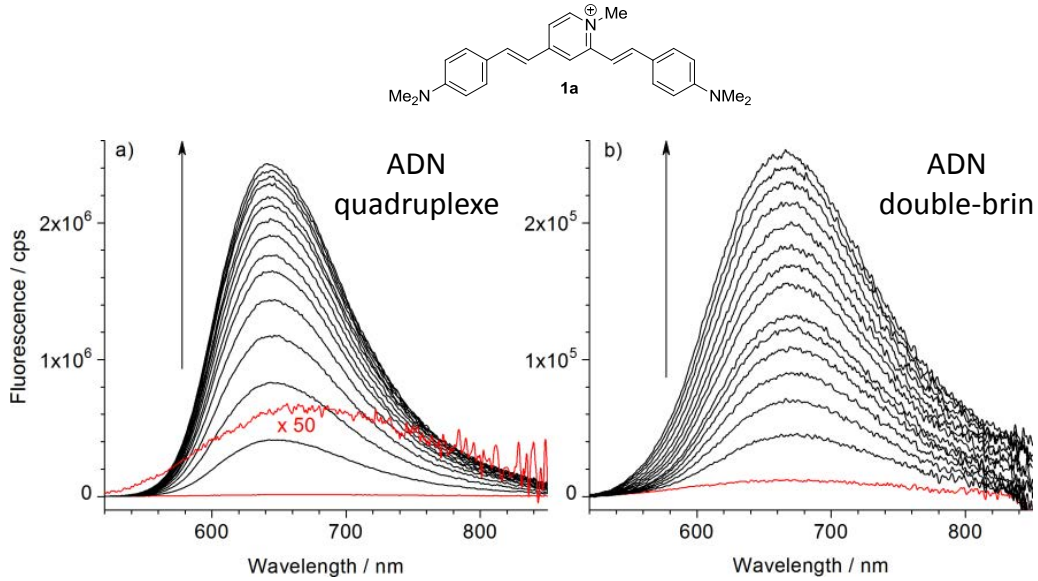


Figure 47. Titrations fluométriques de **1a** par 22AG (a, quadruplex) et ds-lac (b, duplex), (c = 2,5 µM dans tampon, longueur d'excitation λ_{ex} = 510 nm), les courbes rouges représentent les spectres du ligand sans ADN, les flèches indiquent l'augmentation de la fluorescence pendant les titrations.

La fluorescence du colorant **1a** est très faible dans la solution aqueuse ($\phi \approx 0{,}01\%$), mais augmente lors de l'addition de l'ADN. Cela est dû à la limitation de rotation autour des liaisons simples et de l'isomérisation *cis-trans* de double liaison par la complexation du styryle – ADN quadruplex. Cela exerce alors une contrainte stérique ou une formation de liaison hydrogène qui fixe et stabilise la conformation des groupements styryles (Schéma 2).

Cependant, le facteur d'augmentation de la fluorescence révèle une forte différence entre l'ADN quadruplex et duplex. La fluorescence du colorant **1a** est largement augmentée par le quadruplex 22AG (110 fois, Figure 47). En revanche, l'addition de l'ADN double-brin (ds-lac) entraîne une augmentation de la fluorescence beaucoup plus faible (moins de 20 fois, Figure 47). Ces résultats montrent que le ligand **1a** possède une bonne sélectivité en tant que sonde fluorescente pour l'ADN quadruplex.

Ensuite, un plus grand nombre de structures d'ADN quadruplex et double-brin a été étudié avec le colorant asymétrique **1a** (2,4-disubstitué) et son isomère symétrique **2a** (2,6-disubstitué)**,** dans le but d'analyser les propriétés de la fluorescence et la sélectivité des colorants, ainsi que l'influence de la structure de la cible sur la réponse fluorimétrique. Les ADN choisis couvrent plusieurs types d'ADN : quadruplex télomérique (22AG), quadruplex des promoteurs des oncogènes (c-myc, c-kit87up et c-kit2), quadruplex d'aptamère de la trompine (TBA), duplexes synthétiques (ds-lac, DrewAT) et duplex natif (CT ADN) (Figure 48). Les deux colorants étaient excités respectivement à 510 et 497 nm (points isosbestiques) sur le même principe que l'expérience de titrations fluorimétriques de **1a** par c-kit2.

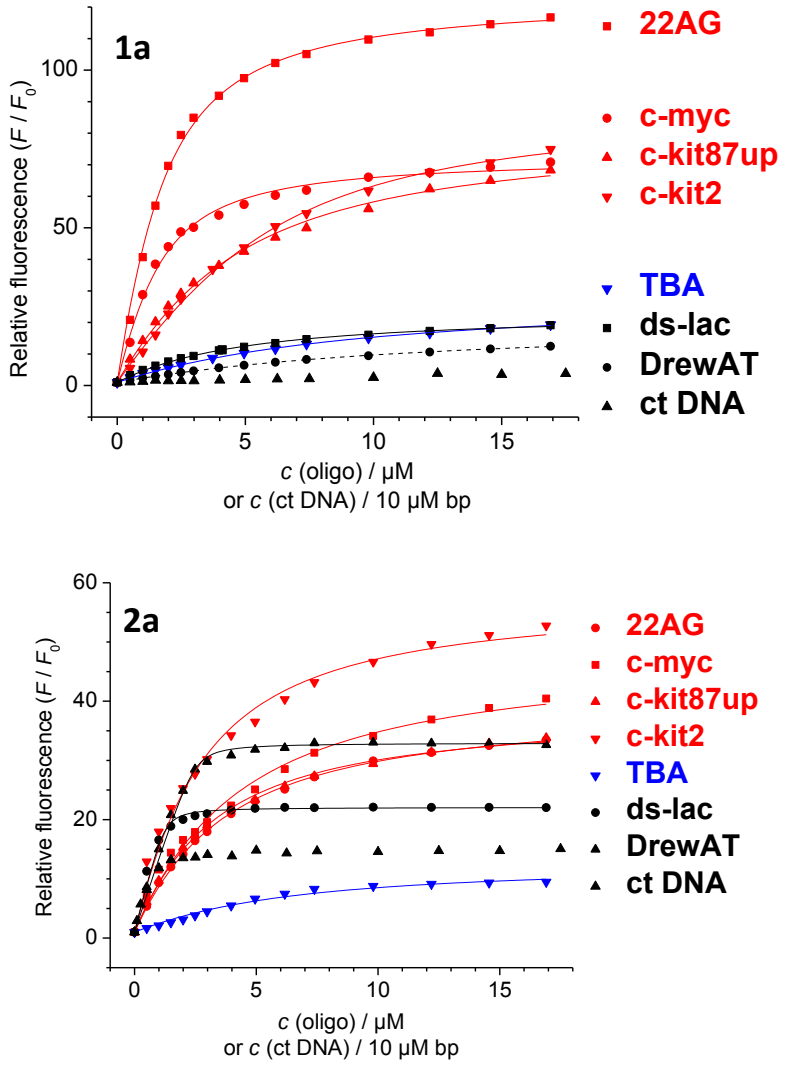


Figure 48. Titrations fluorimétriques de différentes structures de l'ADN aux solutions de fluorophores **1a**, et **2a** (c = 2.5 µM dans tampon, λ_{ex} = 510 nm pour **1a**, et 493 nm pour **2a**).

Dans le cas du colorant **1a**, les structures quadruplexes des oncogènes (c-myc, c-kit87up, c-kit2) induisent une augmentation plus faible de la fluorescence par rapport à l'ADN quadruplex télomérique 22AG (40 à 60 fois à la saturation pour les deux colorants). En revanche, l'ADN quadruplex TBA (G-quadruplex avec deux G-quartets, qui est différent par rapport aux autres G-quadruplexes utilisés dans ces travaux) induit un effet encore plus petit (20 fois) dans les deux cas.

En revanche, l'addition de l'ADN duplex (ds-lac, DrewAT, ct ADN) entraîne une augmentation de la fluorescence beaucoup plus faible pour **1a** (moins de 20 fois), ce qui est différent par rapport à l'ADN quadruplex. Le **1a** est donc une sonde fluorescente sélective pour les ADN quadruplexes.

Contrairement au colorant asymétrique **1a**, la réponse fluorimétrique de son analogue symétrique **2a** ne peut pas distinguer entre les structures d'ADN quadruplex et duplex (Figure 4). L'effet le plus fort est observé en présence du quadruplex c-kit2 (augmentation de la fluorescence d'un facteur 50), alors qu'en présence des autres structures quadruplexes et doubles brins, le facteur d'exaltation est compris entre 20 et 40, avec une exception pour le TBA (environ 10).

Ces expériences montrent que le colorant **1a** possède une meilleure sélectivité (en termes de fluorescence) que le composé **2a** pour les ADN quadruplexes. Il pourrait bien compléter l'ensemble des sondes fluorescentes de l'ADN quadruplex « light-up » et permettre la découverte de certaines applications pour la détection de l'ADN quadruplex.

Titrations fluorimétriques en présence de compétiteur : La sélectivité du **1a** pour l'ADN quadruplex a été confirmée également par des titrations avec l'ADN quadruplex 22AG en présence de l'ADN double-brin compétiteur (Figure 49). La fluorescence est légèrement augmentée (environ 10 fois) en présence de large excès d'ADN double-brin (CT ADN, 200 µM en paires de bases), mais une forte augmentation (jusqu'à 100 fois) est observée lors de l'addition de l'ADN quadruplex 22AG, malgré la présence du compétiteur.

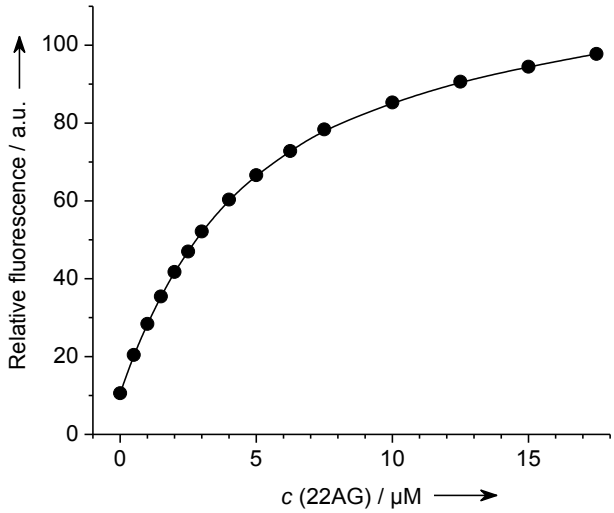


Figure 49. Titration fluorimétrique du **1a** (*c* = 2.5 µM) par l'ADN quadruplex 22AG (λ=510 nm) en présence de large excès d'ADN duplex CT ADN (200 µM de paires de bases).

Ces résultats démontrent le fort potentiel du colorant **1a** en tant que sonde fluorescente de l'ADN quadruplex dans l'environnement biologique, même en présence d'ADN double-brin très majoritaire. Cela pourrait permettre de détecter la formation de l'ADN quadruplex dans des cellules par des méthodes fluorimétriques.

Constantes d'affinité : Les constantes d'affinité et les stoechiométries de colorants **1a** et **2a** pour les ADN quadruplexes et duplexes ont été déterminés à partir de titrations fluorimétriques en utilisant le modèle de sites indépendants (Tableau ***2***) [113]***.***

Tableau 2. Constantes d'affinité (K_a) et stoechiométries (n) de colorants **1a** et **2a** pour les ADN quadruplexes et duplexes, déterminés à partir de titrations fluorimétrique. Conditions expérimentales : c (colorant) = 2.5 µM dans le tampon de 10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2.

	1a		**2a**	
	n	K_a / 10^6 M^{-1}	n	K_a / 10^6 M^{-1}
ADN quadruplex				
22AG	2	0.47	2	0.17
c-myc	2	0.55	2	0.14
c-kit87up	1	0.31	2	0.20
c-kit2	0.5	0.76	2	0.24
TBA	1	0.13	1	0.21
ADN double-brin				
ds-lac	2	0.12	2	8.91
DrewAT	1	0.09	1	18.4

Les constantes d'affinité du **1a** varient de 0,31 à 0,71 × 10^6 M^{-1} pour les G-quadruplexes (sauf pour le TBA qui est un cas particulier de l'ADN quadruplex ayant deux G-quartets) et de 0,12 à 0,09 × 10^6 M^{-1} pour le duplex ds-lac et DrewAT. Ces valeurs montrent une différence significative entre les ADN quadruplexes et double-brin, ce qui montre que le **1a** est plus afin pour les G-quadruplexes.

Les constantes d'affinité du **2a** pour les G-quadruplexes varient de 0,14 à 0,24 × 10^6 M^{-1}, ce qui montre que le **2a** est moins afin que le **1a** pour les G-quadruplexes. Par contre, ses valeurs de constantes d'affinité sont très grandes avec les ADN double-brin, de 8,91 à 18,4 × 10^6 M^{-1} avec ds-lac et DrewAT, donc le facteur d'augmentation est d'environ 70 par rapport à celui des ADN quadruplexes. Le **2a** possède ainsi une bonne sélectivité pour les ADN doubles brins en termes d'affinité.

Le colorant **1a** se lie aux ADN quadruplexes avec une stœchiométrie (colorant : ADN) de 2 : 1 pour le 22AG et c-myc, de 1 : 1 pour le c-kit87up et le TBA, et de 1 : 2 pour c-kit2 (c'est à dire une molécule de colorant **1a** pour deux molécules d'ADN quadruplex).

Ces valeurs de stœchiométrie ont été confirmées par la méthode des variations continues (Job plot, Figure 50).

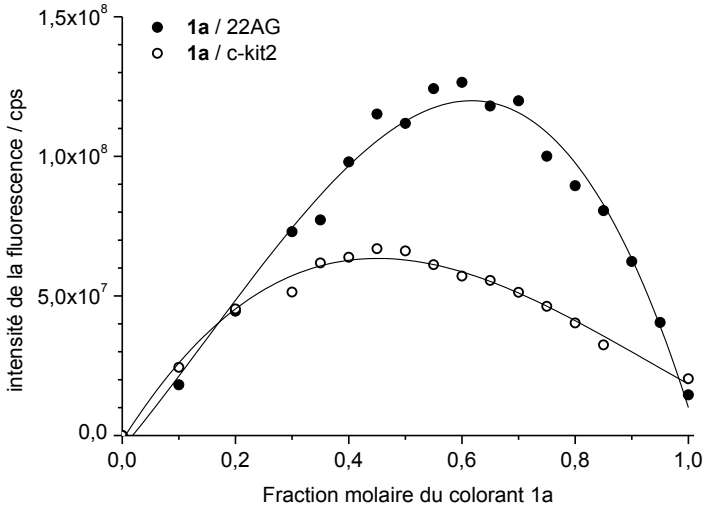


Figure 50. Job plots (mesures de la fluorescence) pour les mélanges du **1a** avec 22AG et c-kit2. La concentration totale *c* (ADN) + *c* (colorant) = 5 μM.

Ces résultats confirment l'hypothèse que la géométrie du colorant joue un rôle important pour la sélectivité. Le changement de géométrie peut inverser la sélectivité du colorant pour les différentes structures secondaires de l'ADN (le **1a** et le **2a** sont sélectifs pour l'ADN quadruplex et duplex respectivement).

2.2.2.6 Expériences de dénaturation thermique

Les deux styryles possèdent différentes valeurs de constantes d'affinité pour les structures d'ADN, comme cela a été démontré par les titrations fluorimétriques. Les mesures d'affinité et de sélectivité de deux styryles vis-à-vis de l'ADN quadruplex et double-brin ont aussi été effectuées par les expériences de dénaturation thermique de l'ADN. La dénaturation thermique est une méthode rapide et simple pour la détermination de l'effet de stabilisation d'une structure de l'ADN par ligand.

Les structures secondaires d'ADN (quadruplex ou double-brin) se transforment en simple-brins à une température élevée, en raison de la rupture des liaisons hydrogènes. La température de dénaturation (T_m°) est la température à laquelle 50% des brins se désapparient (dans le cas de l'ADN duplex) ou se déroulent de leurs structures secondaires (dans le cas de l'ADN quadruplex). Cette température peut être augmentée par un ligand qui stabilise la structure secondaire de l'ADN. L'effet de la

stabilisation de l'ADN par ligand est indiqué par la différence de température de dénaturation en présence et en absence de ligand ($\Delta T_m = T_m - T_m°$) (Figure 51).

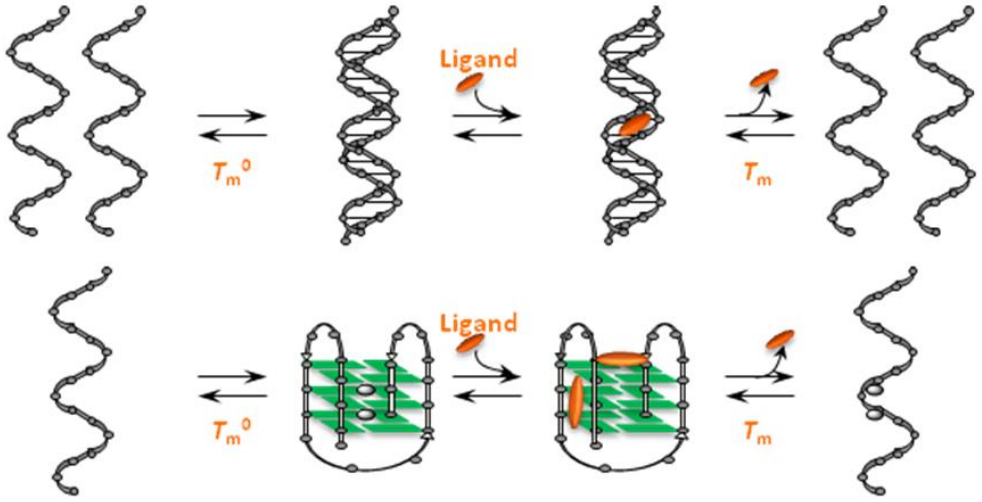


Figure 51. Principe de la dénaturation thermique avec et sans ligand de l'ADN quadruplex et double-brin.

L'absorption d'ADN simple-brin est différente de celle du double-brin apparié et celle de l'ADN quadruplex. L'évolution de la température change la nature de l'ADN quadruplex et du double-brin, ce qui conduit au changement de l'absorption de l'ADN (Figure 52).

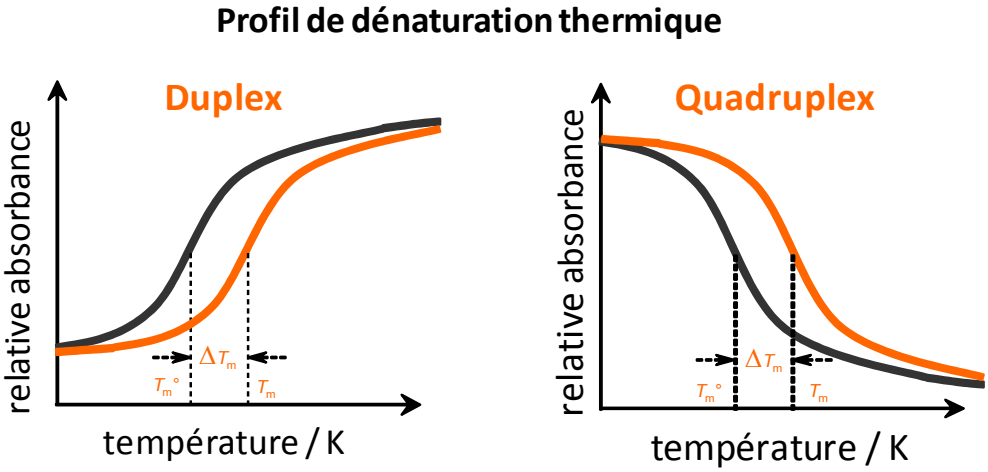


Figure 52. Courbe d'absorbance de l'ADN en fonction de la température avec ou sans ligand de stabilisation.

Les exemples de courbes d'absorbance en fonction de la température de l'ADN duplex (Ds-lac) et quadruplex (22AG) seul et en présence de ligand **1a** et **2a** sont montrées ci-dessous (Figure 53). L'absorption est mesurée à 260 nm pour l'ADN duplex et à 295 nm

pour l'ADN quadruplex, pour avoir une différence maximale d'absorption entre la structure secondaire de l'ADN et sa forme simple-brin.

La température de dénaturation thermique en présence ou en absence de ligand d'ADN est estimée à partir du point maximal du dérivé de la courbe d'absorbance, en fonction de la température (Figure 53).

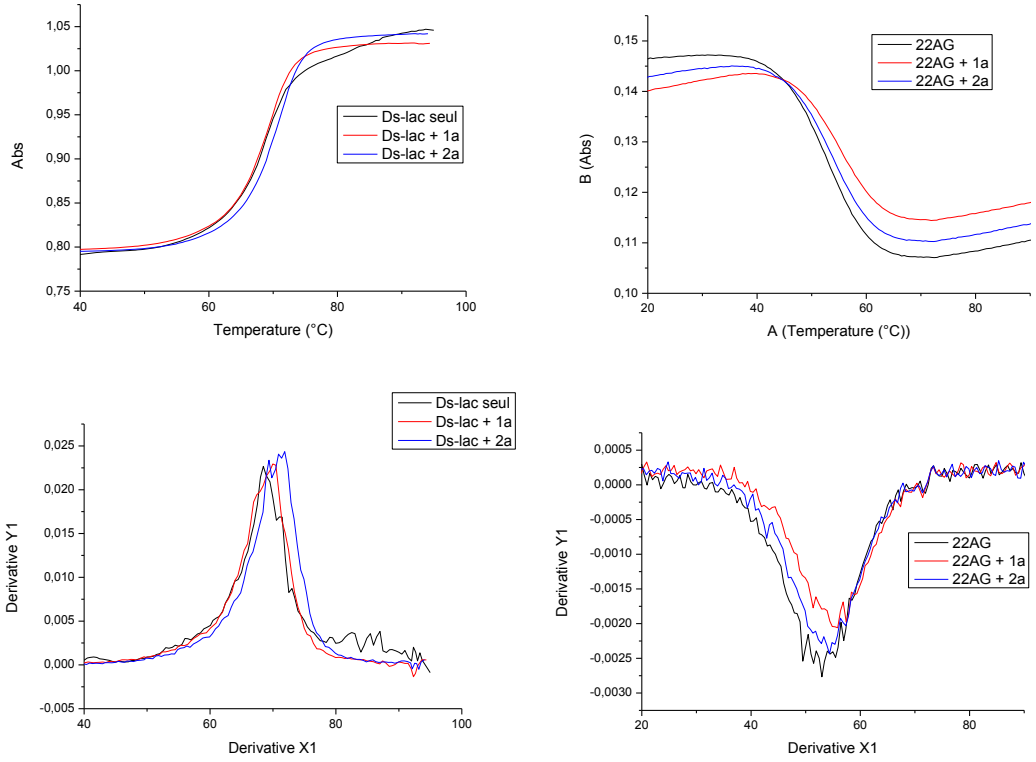


Figure 53. Courbes d'absorbance en fonction de la température de l'ADN duplex (Ds-lac) et quadruplex (22AG) seul et en présence de ligands **1a** et **2a**, et leurs dérivations en fonction de la température.

Les données de la dénaturation thermique (Tableau 3) indiquent que les colorants distyryles **1a** et **2a** sont très différents en terme de leur capacité de stabilisation de l'ADN quadruplex et duplex. Ainsi, le colorant **1a** montre une stabilisation modérée ou élevée pour la plupart des structures de l'ADN quadruplex, avec la plus haute stabilisation pour c-myc et c-kit2 (respectivement, 11,3 et 9,4 °C). En revanche, le **1a** induise de petits effets, voir mêmes négligeables pour le TBA (2,1 °C) et le duplex ds-lac (0,9 °C). Ces résultats montrent le potentiel du colorant **1a** à stabiliser sélectivement les ADN quadruplexes, et préférentiellement les ADN quadruplexes à brins parallèles (c-myc et c-kit2 par rapport à la forme hybride (22AG), et la forme spéciale (c-kit87up en parallèle mais avec la participation de guanine isolée).

Contrairement au colorant **1a**, le colorant **2a** présente une stabilisation beaucoup plus faible que le **1a** pour toutes les structures quadruplexes, alors qu'il induit une stabilisation légèrement plus forte pour l'ADN duplex (ΔT_m = 3.08 °C), confirmant ainsi sa faible affinité pour les ADN quadruplexes et sa faible capacité de discrimination entre les ADN de divers structures.

Tableau 3. Les changements de température de dénaturation d'ADN (ΔT_m / °C) duplex et quadruplex induits par des ligands **1a**, **2a** et TMPyP4 à partir des expériences de la dénaturation thermique révélée en UV. Conditions expérimentales: *c* (ADN) = 2 µM, *c* (colorant) = 10 µM dans le tampon riche en K^+ (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 90 mM LiCl, 10 mM KCl, pH 7.2); λ = 260 nm pour le duplex et 295 nm pour le quadruplex ADN; l'erreur estimée ±1.0 °C. [a] Température de fusion en absence de colorants.

ADN	$T_m^{\,0}$ / °C[a]	**1a**	**2a**	TMPyP4
ADN quadruplexes				
22AG	52.7	6.0	2.6	6.5
c-myc	73.0	11.3	6.3	> 22
c-kit87up	49.9	6.0	3.1	3.1
c-kit2	56.4	9.4	5.9	23.4
TBA	41.1	2.1	1.5	−2.4
ADN duplex				
ds-lac	68.8	0.9	3.0	8.1

2.2.2.7 Expériences de coloration de gel

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est une méthode utilisée pour séparer et identifier les macromolécules biologiques, notamment les ADN qui sont des molécules chargées négativement. Un champ électrique appliqué sur le gel entraine la migration des ADN, de la borne négative vers la borne positive. Les ADN de différentes masses et charges migrent à différentes vitesses. Les molécules chargées positivement migrent de la borne positive vers la borne négative. En générale, plus la charge est importante, plus la vitesse de migration est importante pour les molécules de même masse. De même, plus la masse est importante, moins la vitesse de migration le sera.

L'augmentation de la fluorescence observée sur les interactions entre **1a** et les structures de l'ADN quadruplex nous a incités à étudier ces colorants en tant que marqueurs fluorescents en électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif.

Il a été observé précédemment que l'ADN quadruplex est mal visualisé dans l'électrophorèse sur le gel natif avec des colorants fluorescents commerciaux, tels que le bromure d'éthidium, GelRed ou SYBR Safe [114]–[116].

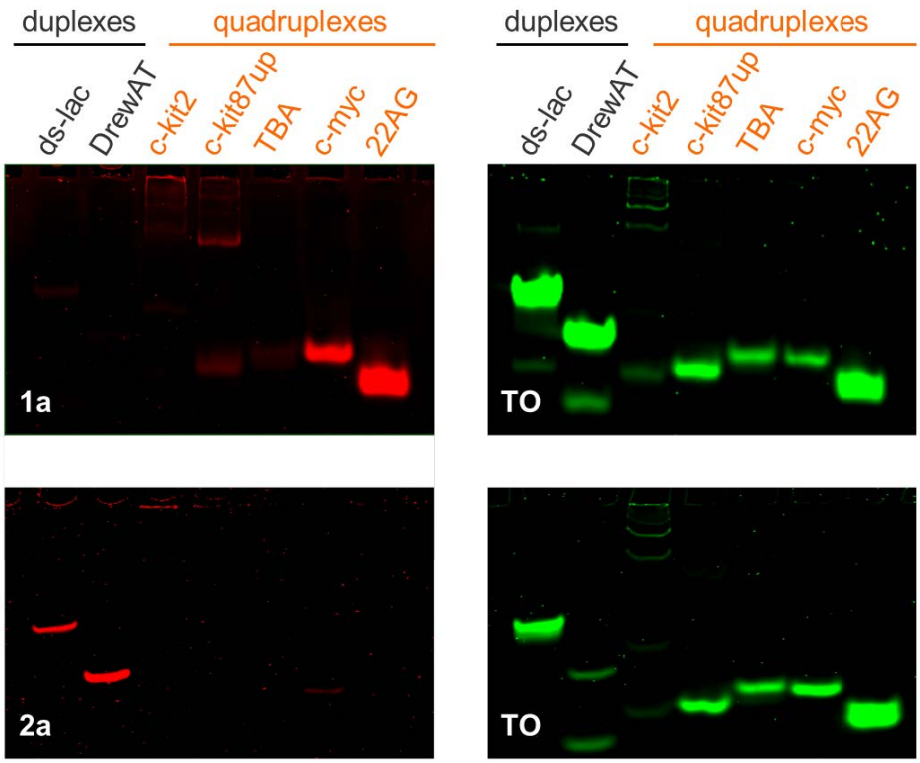


Figure 54. A gauche : Gel d'électrophorèse d'acides nucléiques duplex et quadruplex (75 pmol par puit) après coloration par **1a** et **2a** (2 µM dans le tampon TBE avec 20 mM KCl). Excitation : 532 nm; détection : 670 nm (Filtre passe-bande de 30 nm). A droite : le même gel coloré par TO (à 2 µM). Excitation : 532 nm; détection : 526 nm (filtre passe courte).

La coloration du gel avec la solution du **1a** (Figure 54), suivie par la détection de fluorescence à 670 nm, permet de visualiser de manière sélective les taches correspondant à l'ADN quadruplex télomérique (22AG) et c-myc. En revanche, presque aucune fluorescence n'a été observée dans les bandes contenant les ADN duplex (ds-lac, DrewAT) et TBA.

La coloration du gel avec le colorant **2a** (Figure 54) a révélé de manière sélective les bandes correspondantes aux duplexes ds-lac et DrewAT, en accord avec la haute affinité de **2a** à ces oligonucléotides.

La coloration postérieure du même gel avec la solution du thiazole orange (TO), suivie par la détection de la fluorescence à 526 nm, permet de visualiser toutes les taches de l'ADN quadruplexe et double-brin, car le TO est un colorant non-sélectif de l'ADN.

Ces études de coloration de gel démontrent que les colorants **1a** et **2a** sont très sensibles et permettent de détecter et de distinguer les différentes structures d'ADN (quadruplex et duplex) à une très faible quantité (5 pmol par puit). Les résultats obtenus sont en accord avec les études précédentes : **1a** permet de visualiser de façon sélective l'ADN quadruplex, tandis que **2a** révèle les structures de l'ADN double-brin.

2.2.2.8 Discussion

Nous avons démontré les changements distincts de propriétés spectroscopiques (absorption UV-Vis et fluorescence) de colorants isomères **1a** et **2a** lors de l'interaction de ces colorants avec les différentes structures de l'ADN, et la stabilisation de certaines structures vis-à-vis de la dénaturation thermique. Ainsi, le colorant 2,4-sustitué **1a** possède une bonne sélectivité pour l'ADN quadruplex au niveau de sa réponse fluorimétrique et les constantes d'affinité (K_a jusqu'à $0{,}8 \times 10^6$ M^{-1}). En revanche, son interaction avec l'ADN double-brin est plutôt faible (K_a = 0.09 - $0{,}12 \times 10^6$ M^{-1}).

Il faut remarquer que dans certaines conditions, l'interaction du **1a** avec l'ADN double-brin (ct ADN) favorise l'agrégation du colorant en agrégat de type J. L'agrégation de colorants induit par l'ADN double-brin n'est pas sans précédents dans la littérature [117]. Ainsi, le colorant cyanine $DISC_{3+}(S)$ (Figure 55) est connu pour ses propriétés de former les agrégats de type J en présence de l'ADN [118].

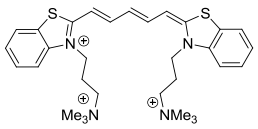


Figure 55. Structure du $DISC_{3+}(S)$

En même temps, nous supposons que la forme des agrégats du colorant **1a** n'est pas favorable pour l'interaction avec l'ADN double-brin, ce qui explique l'absence de stabilisation de cette forme de l'ADN par **1a**. Enfin, nous démontrons que la sonde **1a** possède de bonnes propriétés spectrales. Elle pourrait alors bien compléter l'ensemble des sondes d'ADN quadruplex « light-up » et trouver des applications pour la détection

d'ADN quadruplex sélective en solution. Elle permet également de marquer sélectivement l'ADN quadruplex dans électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Ces résultats représentent une première étape vers l'utilisation de ces sondes dans un contexte biologique.

La géométrie du colorant joue un rôle essentiel sur l'affinité et la sélectivité de l'ADN quadruplex et les propriétés spectrales en se complexant avec les ADN quadruplexes. Le colorant asymétrique **1a** est structurellement proche du PDC-360A, qui est une sonde sélective pour l'ADN quadruplex. Son isomère symétrique, le colorant **2a,** ne peut pas distinguer les différentes structures de l'ADN quadruplex et double-brin.

En se basant sur ces réflexions, nous avons synthétisé une librairie de styryles composée principalement de distyryles asymétrique de forme en L.

2.2.3 Synthèse d'une bibliothèque de colorants styryles

2.2.3.1 Généralités

En se basant sur les résultats des études des styryles « prototypes » **1a** et **2a**, nous avons synthétisé une bibliothèque de mono, di, tri et tétra-styryles avec différentes fonctions (groupement latéral, chaîne, cœur etc., Figure 56).

Leur contre-ion de base est l'iodure ou le bromure : en fonction de leur solubilité dans l'eau, l'échange d'ion en bromure ou en chlorure a été effectué pour améliorer la solubilité dans le milieu aqueux, en utilisant la résine à échange d'ions.

Les styryles sont représentés en 6 séries par rapport à la molécule de base **1a**:

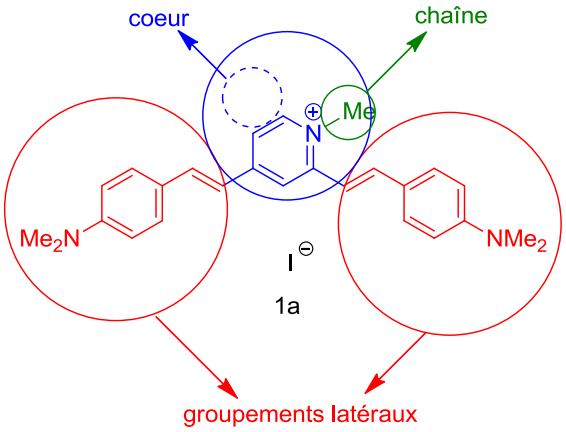


Figure 56. Les variations de colorants styryles par rapport au **1a**.

- I. variation de la chaîne;
- II. variation des groupements latéraux (donneurs d'électrons);
- III. variation du cœur (accepteurs d'électrons);
- IV. variation du cœur et des groupements latéraux;
- V. monostyryles;
- VI. tri et tétra-styryles;

Les composés styryles ont été obtenus par la réaction de condensation de Knoevenagel entre les cœurs pyridiniums (ou autres cœurs) et les différents aldéhydes dans le MeOH ou l'EtOH, en utilisant la pipéridine comme catalyseur au reflux pendant 3 à 6 h. Les cœurs pyridiniums ont été obtenus par une réaction de substitution des chaînes iodées ou bromées avec l'atome d'azote de la pyridine (ou d'autres hétérocycles).

Les synthèses utilisant d'autres méthodes sont précisées ci-dessous.

2.2.3.2 Variation de la chaîne

Synthèse : le styryle **1a** avec une « chaîne » courte (méthyle), possède de bonnes propriétés spectrales et une sélectivité pour les ADN quadruplexes. Cinq styryles [**1a(2) – 1a(6)**] similaires du **1a**, ont été synthétisés avec différentes chaînes (chargées ou non) en gardant les mêmes groupements latéraux ($C_6H_4NMe_2$) et le cœur (2,4-pyridinium), pour étudier l'influence sur leurs propriétés de ce changement (Schéma 4).

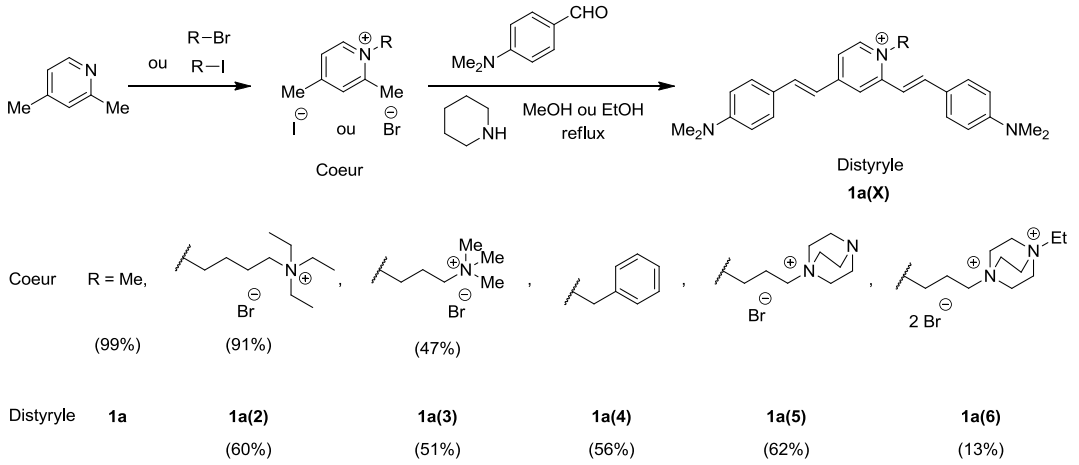


Schéma 4. Synthèse générale des distyryles avec la variation de la chaîne.

Ces styryles ont été synthétisés par la méthode générale, sauf le **1a(4)** qui a été synthétisé dans un ordre de synthèse différent, pour avoir l'intermédiaire commun le distyryle non chargé sur l'amine du cœur pyridine (Schéma 5). Cela permettrait ainsi d'économiser du temps pour synthétiser ces styryles avec des chaînes différentes.

Synthèse du composé 1a(4) : Pour le composé **1a(4)**, la condensation entre le cœur pyridine et l'aldéhyde est d'abord réalisée, puis une substitution est effectuée pour brancher la chaîne benzylique. La première étape de condensation nécessite une température beaucoup plus élevée (150 °C dans toluène) et une plus longue durée (plusieurs jours) par rapport à la condensation de précurseurs chargés. Le rendement de l'étape de condensation est très faible (5%).

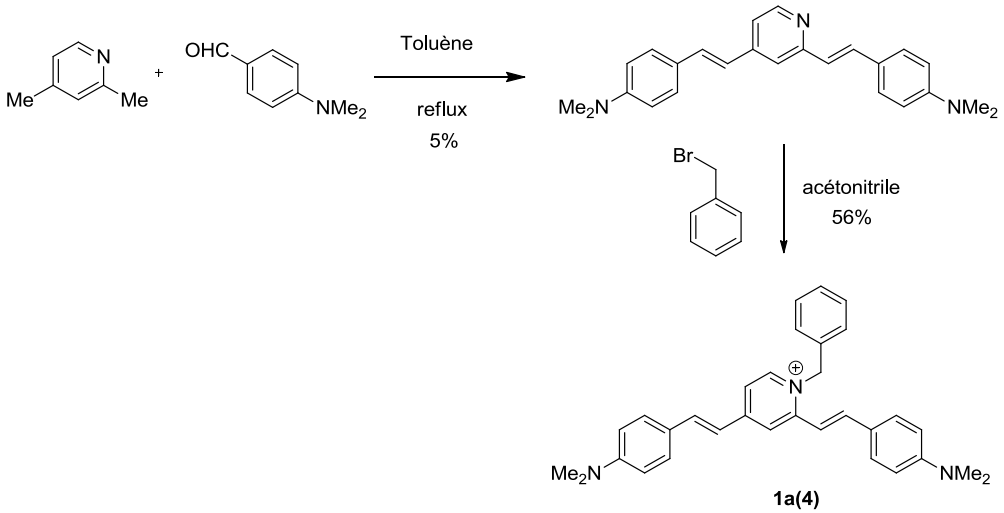


Schéma 5. Synthèse du **1a(4)**.

La charge positive sur l'amine du cœur pyridinium est supposée être importante pour la formation du mésomère, facilitant la réaction de condensation. Sans cette charge, la réaction est moins probable, ce qui donne un très faible rendement (Schéma 6). La méthode générale est donc appliquée pour le reste de cette série de synthèse.

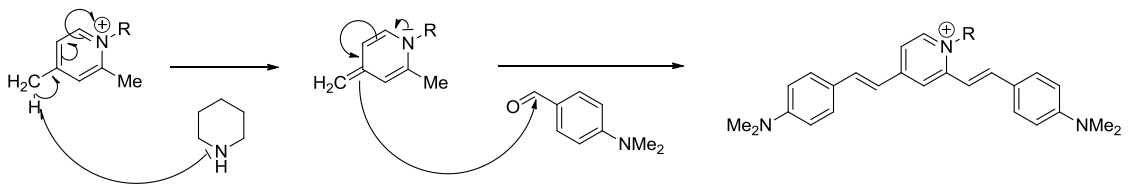


Schéma 6. Mécanisme de mésomérisation du pyridinium et la condensation Knoevenagel.

Synthèse des cœurs hétérocycliques (5) et (6) : Le cœur hétérocyclique **(5)** a été synthétisé à partir du bromure 1-(3-bromopropyl)-2,4-diméthylpyridin-1-ium et du 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane par une réaction de substitution. Le cœur **(5)** a ensuite réagi avec le bromoéthane pour obtenir le cœur hétérocyclique **(6)**. Le bromure 1-(3-bromopropyl)-2,4-diméthylpyridin-1-ium a été obtenu par une réaction de mono substitution entre le 2,4-diméthylpyridine et le 1,3-dibromopropane (Schéma 7).

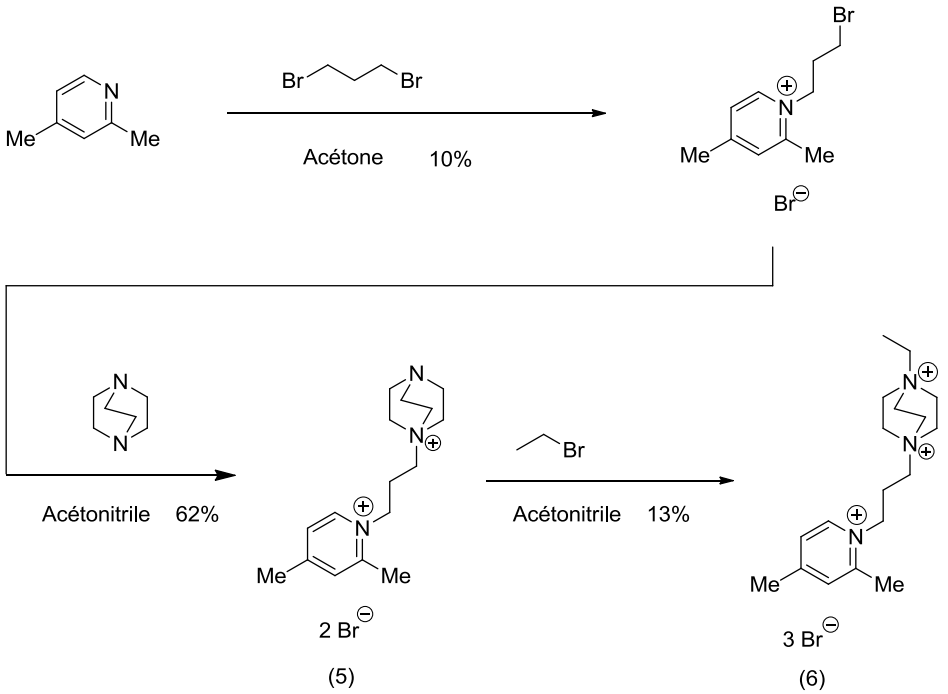


Schéma 7. Synthèse des cœurs avec les chaînes **(5)** et **(6)**.

Etude du colorant 1a(2) en présence de l'ADN : Les styryles avec des chaînes chargées positivement [sauf le **1a(4)**] sont supposés interagir avec les groupements phosphates de l'ADN qui sont chargés négativement, par interaction électrostatique. Cela permettait d'augmenter l'affinité du styryle vis-à-vis de l'ADN. La solubilité de ces styryles dans le milieu aqueux est également augmentée par l'élévation de la polarité des styryles, grâce aux chaînes chargées.

Les études spectroscopiques de styryle **1a(2)** ont prouvé cette conception. Il possède des propriétés spectrales et une sélectivité similaires à ceux de **1a**, qui sont démontrées par des titrations d'absorption et d'émission avec les ADN, (Figure 57, Figure 58). Les différences de décalage du pic dans les titrations d'absorption indiquent que les sites de liaison (polarité, géométrie) dans l'ADN quadruplex (60 nm) et double-brin (40 nm) ne sont pas les mêmes pour le colorant **1a(2)**. Les titrations d'émission

montrent qu'il est capable de distinguer les structures de d'ADN quadruplex et duplex aussi bien que le colorant **1a**.

La solubilité du styryle **1a(2)** dans le milieu aqueux est améliorée par rapport à son analogue **1a** car il n'y a pas d'épaulement du pic principal (caractéristique d'agrégation) dans son spectre d'absorption à la température ambiante (cela est différent par rapport au colorant **1a**, Figure 44).

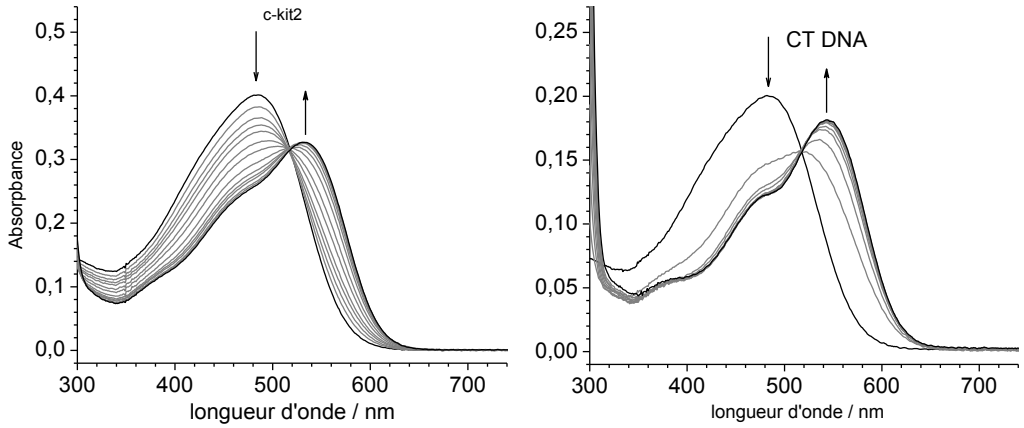


Figure 57. Titrations spectrophotométriques du colorant **1a(2)** avec c-kit2 (0 à 25 µ M) et ct ADN (0 à 130 µ M bp). La concentration des colorants est de 5 µM (pour des titrations avec c-kit2) ou de 10 µM (pour des titrations avec ct ADN) dans le tampon de 10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2. Les flèches indiquent les changements de spectres absorbants observés pendant les titrations.

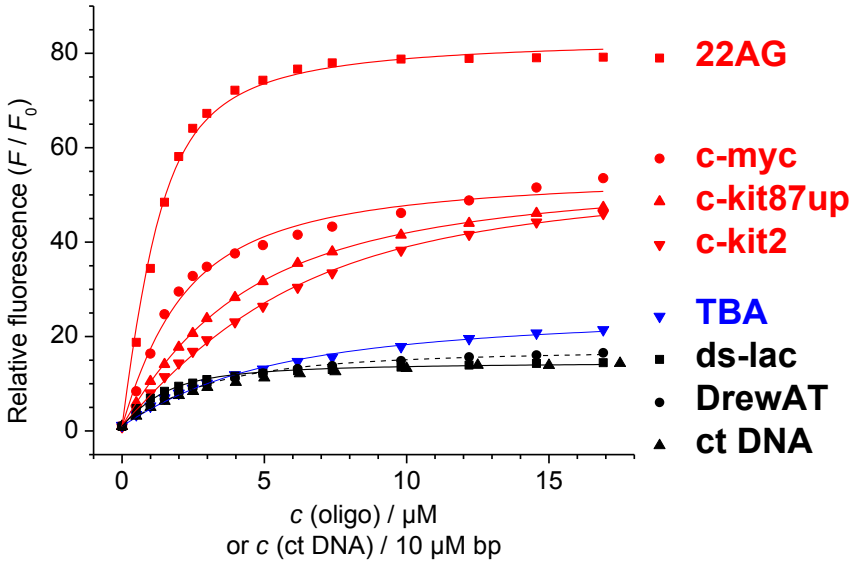


Figure 58 Titrations spectrophotométriques du colorant **1a(2)** avec c-kit2 (0 à 25 µM) et ct ADN (0 à 130 µM bp). La concentration des colorants est de 5 µM (pour des titrations avec c-kit2) ou de 10 µM (pour des titrations avec ct ADN) dans le tampon de 10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2. Les flèches indiquent les changements de spectres absorbants observés pendant les titrations.

La chaîne chargée positivement peut augmenter l'affinité du colorant pour les ADN, en interagissant avec les groupements phosphates de l'ADN. Les changements de la température de dénaturation de l'ADN par le colorant **1a(2)** (Tableau 4) sont significativement plus élevés que ceux du colorant **1a**.

Tableau 4. Les changements de température de dénaturation d'ADN (ΔT_m / °C) duplex et quadruplex induits par les colorants **1a** et **1a(2)**, selon les expériences de dénaturation thermiques révélées en UV. Conditions expérimentales: *c*(ADN) = 2 µM, *c*(colorant) = 10 µM dans le tampon riche en K^+ (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 90 mM LiCl, 10 mM KCl, pH 7.2); λ = 260 nm pour le duplex et 295 nm pour le quadruplex ADN; l'erreur estimée ±1.0 °C. [a] Température de fusion en absence de colorants.

ADN	T_m^0 / °C[a]	1a	1a(2)	TMPyP4
ADN quadruplexes				
22AG	52.7	6.0	9.1	6.5
c-myc	73.0	11.3	15.0	> 22
c-kit87up	49.9	6.0	8.9	3.1
c-kit2	56.4	9.4	13.9	23.4
TBA	41.1	2.1	2.0	−2.4
ADN duplex				
ds-lac	68.8	0.9	2.0	8.1

Le **1a(2)** permet également de marquer sélectivement l'ADN quadruplex dans le gel de polyacrylamide (Figure 59) comme le **1a**, qui possède une affinité plus élevée pour les ADN quadruplexes.

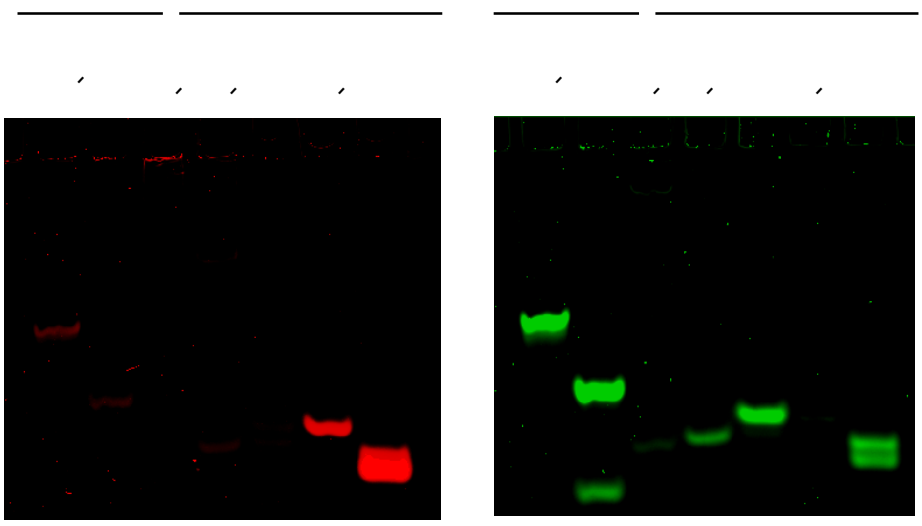


Figure 59. A gauche : Gel électrophorèse d'acides nucléiques duplex et quadruplex (75 pmol par puit) après la coloration avec **1a(2)** (2 µM dans le tampon TBE avec 20 mM KCl). Excitation : 532 nm; détection : 670 nm (Filtre passe-bande de 30 nm). A droite : le même gel coloré avec TO (à 2 µM). Excitation : 532 nm; détection : 526 nm (filtre passe courte).

Etudes photophysiques : Cette série de distyryles possèdent des propriétés photophysiques similaires, avec des longueurs d'onde maximales d'absorption, autour de 520 nm dans le MeOH et 480 nm dans le tampon aqueux. Leurs valeurs logε (MeOH) sont d'environ 4.8 dans le MeOH (Tableau 5). Ceci montre que la modification des chaînes des distyryles par rapport au **1a** ne modifie pas les propriétés photophysiques.

Tableau 5. Propriétés spectroscopiques des colorants dans le tampon (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2) et dans le méthanol.

Colorant	λ_{max} dans MeOH (nm)	log ε MeOH	λ_{max} dans Tampon (nm)	log ε Tampon
1a	507	4,78	478	4,52
1a(2)	516	4,78	485	4,63
1a(3)	523	4,81	493	4,65
1a(4)	520	4,81	491	4,40
1a(5)	523	4,76	493	4,68
1a(6)	528	4,81	495	4,64

2.2.3.3 Variation des groupements latéraux (donneurs d'électron)

Synthèse : Ensuite, 28 styryles asymétriques, possédant le même cœur (accepteur d'électron) et la même chaîne méthyle que **1a**, mais avec différents groupements

latéraux, ont été synthétisés, dont 27 homo-distyryles (Schéma 8) et 1 hétéro-styryle (Schéma 9).

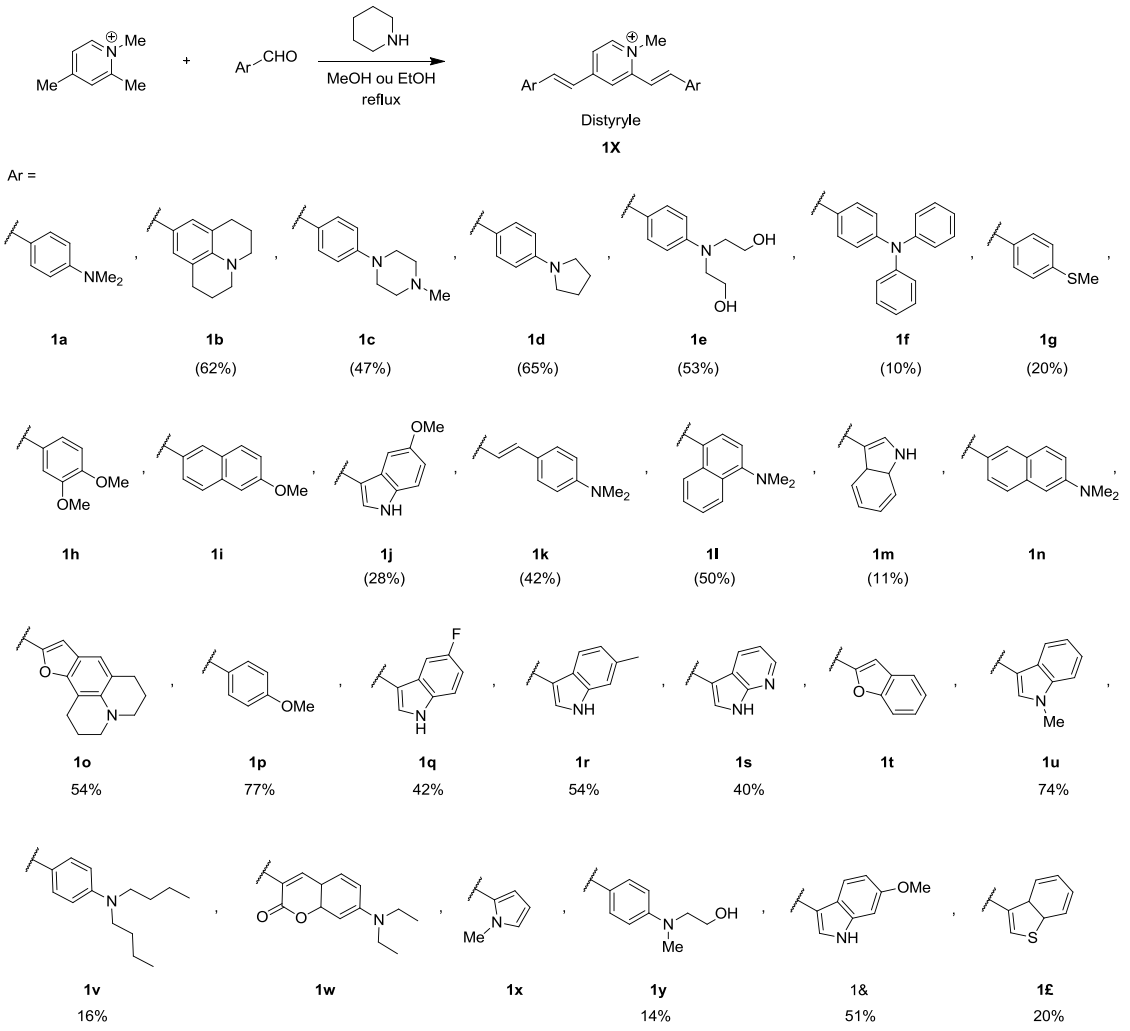


Schéma 8. Synthèse générale des homo-distyryles avec variation des groupements latéraux.

Ces homo-distyryles synthétisés possèdent donc différents donneurs, avec des structures et des densités électroniques différentes. Cela va donner des propriétés spectrales différentes (avec et sans les ADN), permettant d'étudier l'influence du changement de donneur d'électron sur ces propriétés. Ces styryles ont été synthétisés par la méthode générale.

L'hétéro-distyryle (**1ai**) possède deux groupements latéraux différents. Dans la littérature courante, il n'y avait pas d'hétéro-distyryle de ce type jusqu'à présent.

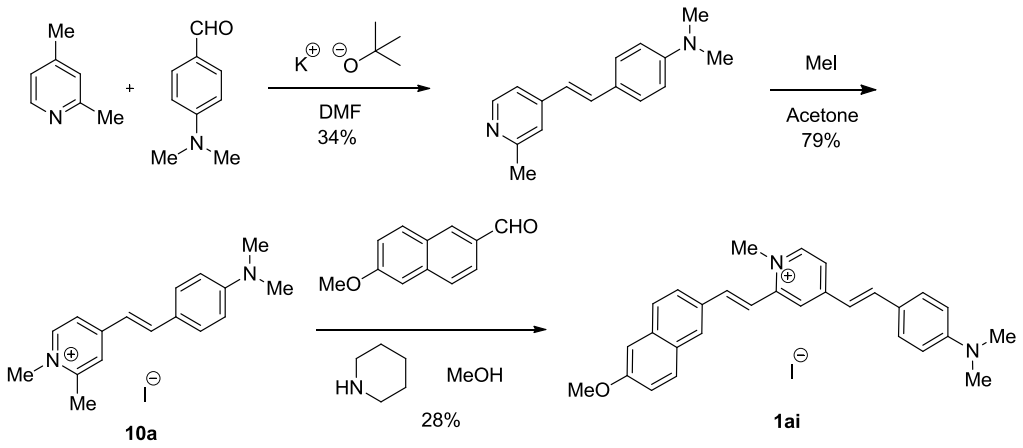


Schéma 9. Synthèse de l'hétéro-distyryle **1ai**.

Le composé hétéro-distyryle est synthétisé par une réaction de condensation entre la 2,4-diméthylpyridine (position 4 étant plus réactive) et le 4-(diméthylamino)benzaldéhyde, pour obtenir la (E)-N,N-diméthyl-4-(2-(2-méthylpyridin-4-yl)vinyl)aniline, qui subit ensuite une méthylation en position 1 avec l'iodométhane. Le sel pyridinium obtenu subit ensuite une deuxième réaction de condensation de Knoevenagel en position 2 avec le 6-méthoxy-2-naphthaldéhyde, pour obtenir le composé hétéro-distyryle **1ai** avec un rendement de 8%.

Etudes photophysiques : Les distyryles de cette série possèdent des propriétés photophysiques très différentes, avec des longueurs d'onde maximales d'absorption entre 408 et 606 nm et des valeurs de logε entre 4,53 et 4,86 dans le MeOH, (Tableau 6). Ceci montre que la modification des groupements latéraux des distyryles par rapport au **1a** modifie significativement leurs propriétés photophysiques. En effet, plus les groupements latéraux sont riches en densité électronique, plus la longueur d'onde maximale d'absorption (dans le MeOH) est grande.

Nous remarquons également que le colorant hétéro-distyryle **1ai** possède un seul pic d'absorption (λ_{max} = 490 nm dans MeOH) dont le maximum se trouve entre ceux de deux analogues homo-distyryles **1a** (λ_{max} = 507 nm dans MeOH) et **1i** (λ_{max} = 425 nm dans MeOH). Cela signifie qu'au sein de la molécule **1ai**, les deux donneurs d'électron ne fonctionnent pas séparément, mais sont inclus dans le même système de chromophore.

Tableau 6. Propriétés spectroscopiques des colorants dans le tampon (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2) et dans le méthanol (classés selon λ_{max} croissante dans le MeOH).

Colorant	λ_{max} dans MeOH (nm)	logε MeOH	λ_{max} dans Tampon (nm)	logε Tampon
1p	408	4,65		
1£	411	4,52		
1g	420	4,70	406	4,60
1h	422	4,65	403	4,61
1t	422	4,74		
1i	425	4,74	414	4,37
1s	434	4,70		
1q	457	4,74		
1m	466	4,75	458	4,43
1l	469	4,57	447	4,36
1c	472	4,73	419	4,64
1r	473	4,75		
1j	475	4,74		
1u	475	4,75		
1x	475	4,73		
1&	476	4,74	460	4,18
1ai	490	4,68	482	5,24
1f	493	4,83		
1a	507	4,78	478	4,52
1e	508	4,80	486	4,73
1y	510	4,79		
1d	522	4,86	504	4,37
1v	523	4,86		
1k	533	4,82	510	4,42
1b	551	4,79	507	4,38
1o	606	4,79		

2.2.3.4 Variation du cœur hétérocyclique

Synthèse : Pour étudier l'influence du changement de l'accepteur d'électron sur les propriétés de fluorescence des colorants et leurs complexes avec l'ADN quadruplex, huit distyryles avec différents cœurs d'accepteur en gardant les mêmes groupements latéraux par rapport au **1a** et **2a** ont été synthétisés par la condensation de Knoevenagel entre les aldéhydes et les cœurs hétérocycliques (Schéma 10).

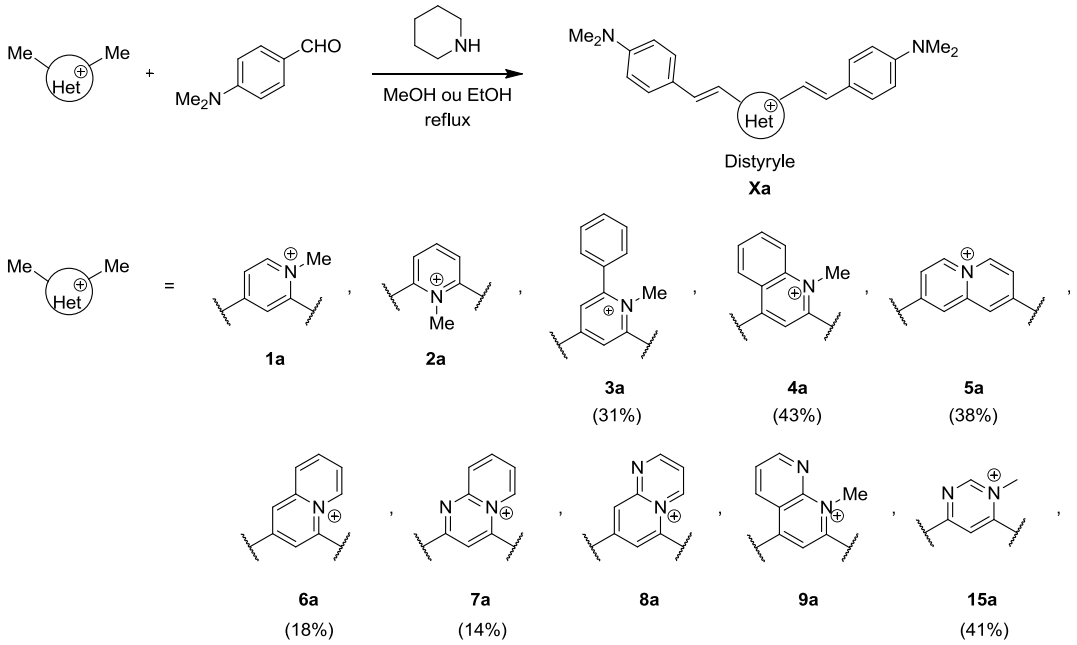


Schéma 10. Synthèse générale des distyryles avec la variation du cœur hétérocyclique (Het^+).

Ces cœurs possèdent des structures et des densités électroniques différentes. La force de l'accepteur d'électron est donc différente pour ces styryles, ce qui donne des propriétés spectrales différentes en absence et en présence de l'ADN. Les dérivés hétérocycliques ont été synthétisés par des méthodes précisées ci-dessous (Schéma 11).

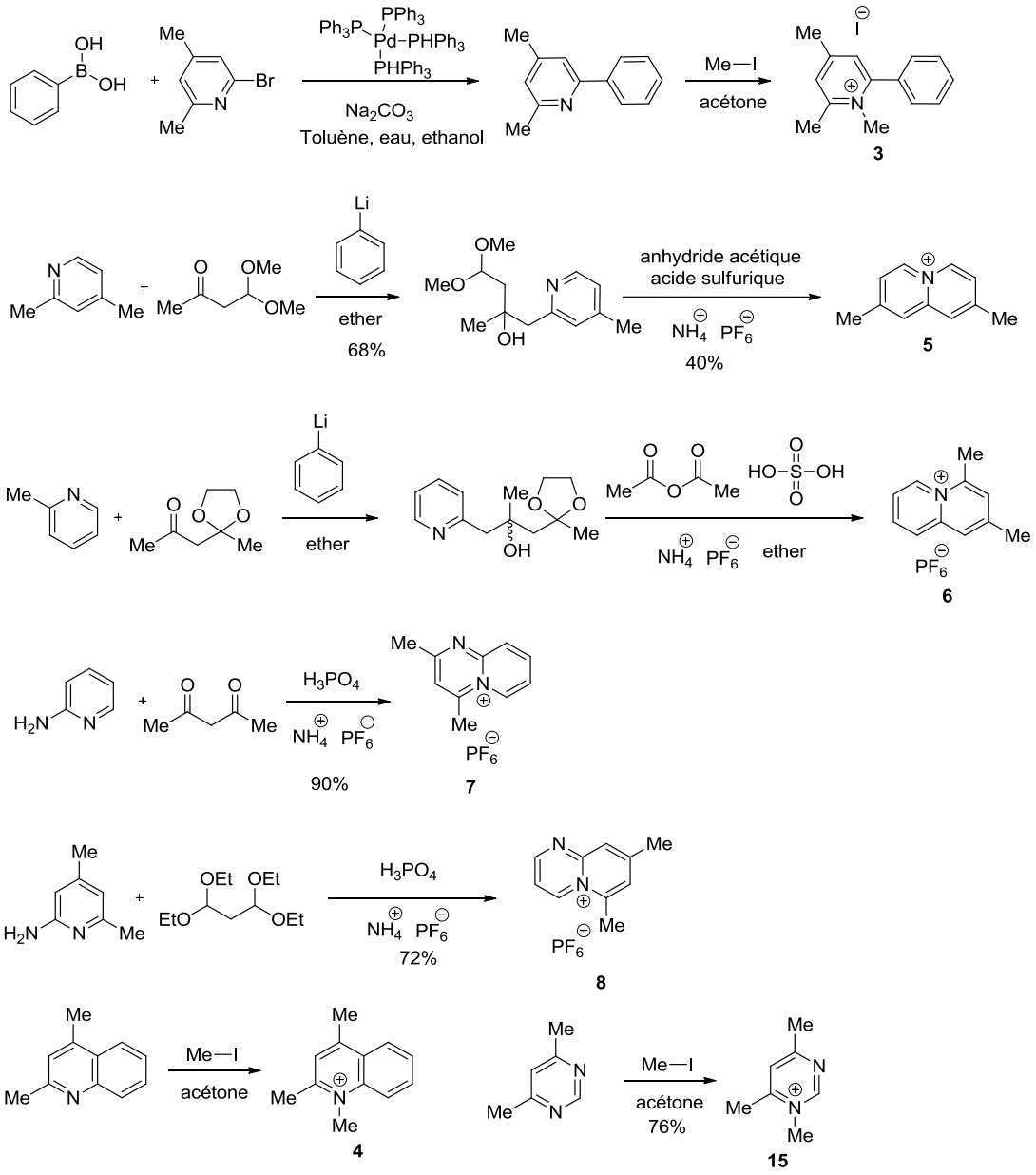


Schéma 11. Synthèse des cœurs hétérocycliques

Les cœurs **1** et **2** ont été synthétisés par des méthodes décrites précédemment (2,4- ou 2,6-lutidine). Les cœurs **4** et **15** ont été obtenus par la même méthode à partir de la 2,4-diméthylquinoléine et la 4,6-diméthylpyrimidine, respectivement.

Le cœur **3** a été synthétisé par une réaction de méthylation sur l'azote de la 2,4-diméthyl-6-phenylpyridine. Le dernier a été obtenu par un couplage de Suzuki entre l'acide phénylboronique et la 2-bromo-4,6-diméthylpyridine.

Les cœurs **5**, **6**, **7** et **8** ont été obtenus par des réactions de cyclo-déshydratation selon les protocoles décrits dans la littérature [119]–[121].

Etudes photophysiques : Ces distyryles (avec variation du cœur hétérocycle par rapport au **1a**) possèdent des propriétés photophysiques très différentes montrées dans le Tableau 7 (les colorants sont classés par λ_{max} dans le MeOH), tout comme les styryles avec variation des groupements latéraux. Plus le cœur hétérocyclique est pauvre en électron, plus la longueur d'onde maximale d'absorption (dans le MeOH) est grande.

Tableau 7. Propriétés spectroscopiques des colorants dans le tampon (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2) et dans le méthanol (classés par λ_{max} dans le MeOH).

Colorant	λ_{max} *dans MeOH (nm)*	logε MeOH	λ_{max} dans Tampon (nm)	logε Tampon
6a	473	4,79	432	4,52
2a	494	4.81	468	4.65
1a	507	4,78	478	4,52
3a	512	4,79	476	4,59
5a	517	4,94	463	4,21
7a	551	4,75	658	4,43
4a	565	4,74	492	4,36
15a	569	4,91	564	4,66
9a	597	4,75	520	4,34

2.2.3.5 Variation du cœur et des groupements latéraux

Synthèse : Le distyryle **1a(2)** avec la chaîne triethylammonio butyle montre une bonne solubilité dans le milieu aqueux et une meilleure affinité pour les ADN grâce à cette chaîne chargée. Plusieurs distyryles ayant la même chaîne mais différents groupements latéraux ont été synthétisés, dans l'objectif d'améliorer l'affinité du distyryle pour les ADN et augmenter la solubilité de certains distyryles qui sont très peu solubles avec la chaîne méthyle.

Le distyryle symétrique **2a** avec les groupements latéraux diméthylamine phényle montre une affinité inversée entre les ADN quadruplexes et duplexes, par rapport à son isomère asymétrique **1a**. Quelques autres distyryles symétriques avec des groupements latéraux différents ont été synthétisés et étudiés comme références. Ils peuvent être comparés avec leurs isomères asymétriques.

Ces styryles ont été synthétisés par la méthode générale (Schéma 12).

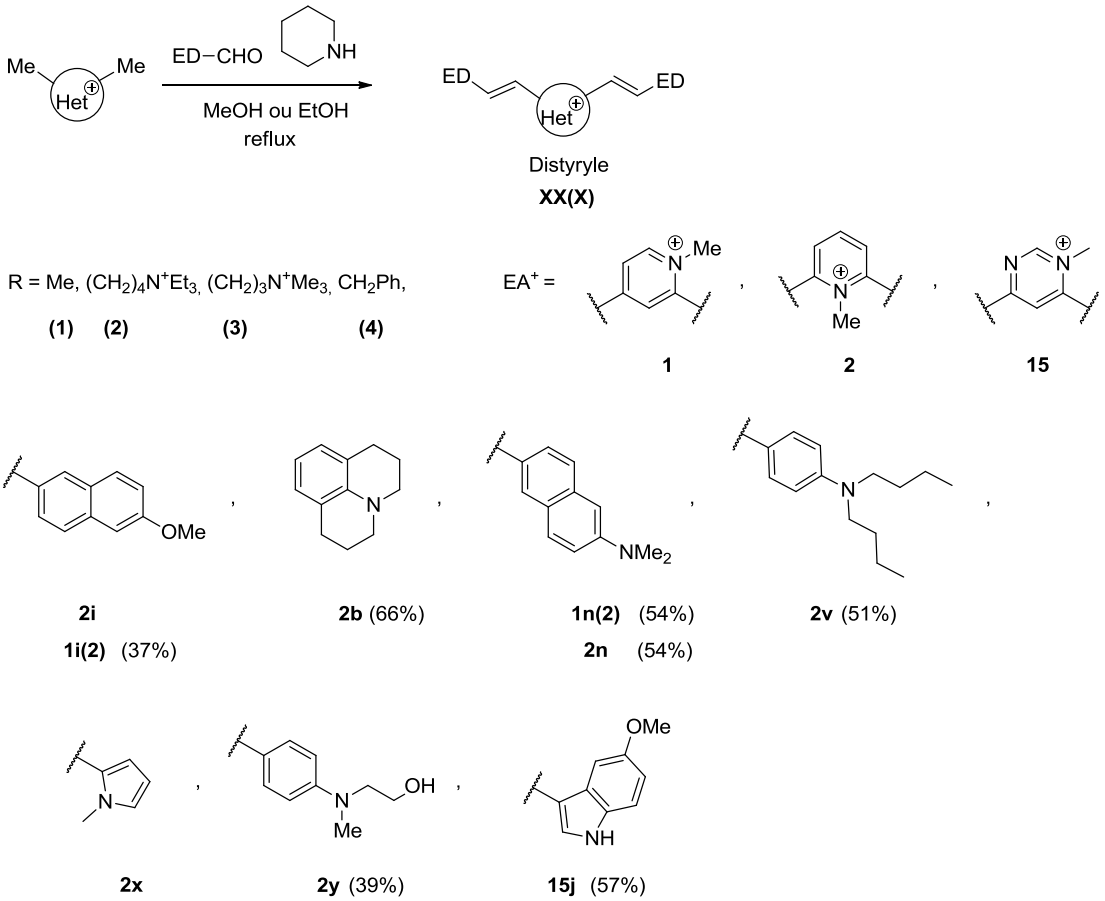


Schéma 12. Schéma de synthèse générale des styryles avec la variation du cœur hétérocyclique et la variation des groupements latéraux.

Etudes photophysiques : Ces distyryles possèdent des propriétés photophysiques très différentes (Tableau 8, les colorants sont classés par λ_{max} dans MeOH). Plus la différence de densité électronique entre les groupements latéraux et le cœur hétérocyclique est grande, plus la longueur d'onde maximale d'absorption dans le MeOH est grande.

Tableau 8. Propriétés spectroscopiques des colorants dans le tampon (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2) et dans le méthanol.

Colorant	λ_{max} dans MeOH (nm)	logε MeOH	λ_{max} dans Tampon (nm)	logε Tampon
1a(2)	430,00	4,73	411,00	4,52
1n(2)	507,00	4,75	474,00	4,48
2b	535,00	4,82	512,00	4,53
2n	489,00	4,81	478,00	4,01
2v	512,00	4,89		
2y	496,00	4,82		
15j	521,00	4,88		
2x	467,00	4,76		

2.2.3.6 Monostyryles

Synthèse : Des monostyryles avec des groupements latéraux et des positions différentes ont été synthétisés pour comparer leurs propriétés avec celles des distyryles précédemment décrits (Schéma 13).

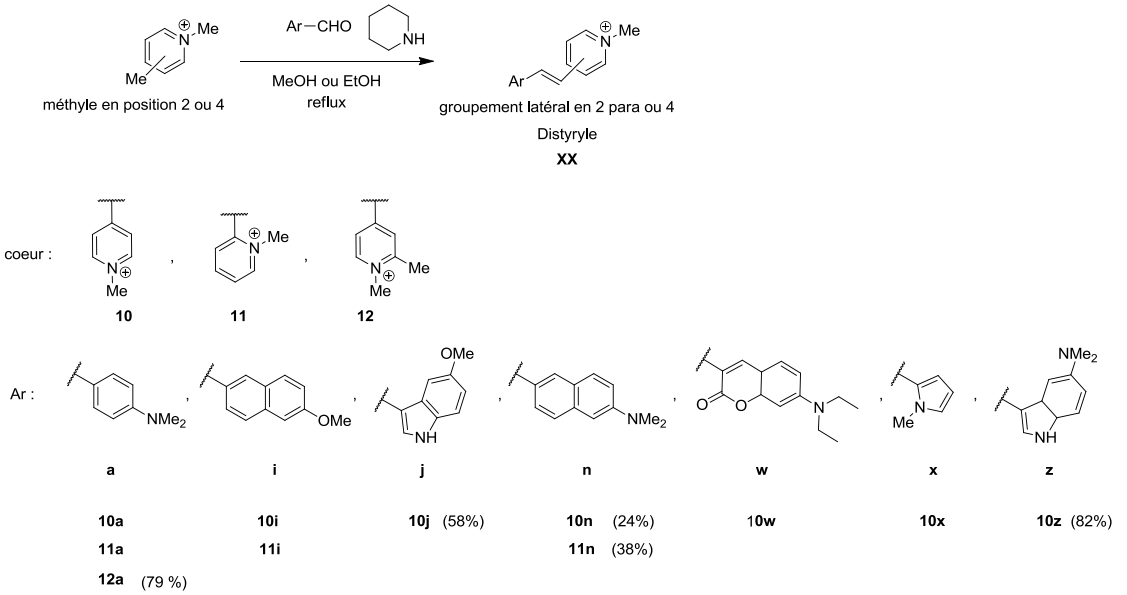


Schéma 13. Synthèse générale des mono-styryles.

Ces mono-styryles sont utilisés comme références pour comparer avec leurs analogues distyryles. Par contre, certains d'entre eux possèdent des propriétés spectrales très intéressantes en présence d'ADN quadruplex.

Etudes photophysiques : Leurs propriétés photophysiques sont différentes par rapport à celles des distyryles, avec des longueurs d'onde maximales et des valeurs d'extinction molaire moins importantes dans le MeOH par rapport à **1a** et ses dérivés (λ_{max} < 500 nm) (Tableau 9).

Tableau 9. Propriétés spectroscopiques des colorants mono-styryles dans le tampon et dans le méthanol.

Colorant	λ_{max} dans MeOH (nm)	logε MeOH	λ_{max} dans Tampon (nm)	logε Tampon
10a	474,00	4,70	448,00	4,52
12a	466,00	4,66	438,00	4,49
11a	461,00	4,62	435,00	4,45
10i	401,00	4,56	385,00	4,45
11i	404,00	4,68		
10j	445,00	4,63		
10n	472,00	4,56	422,00	4,45
11n	458,00	4,52	409,00	4,42
10z	450,00	4,52		
10x	440,00	4,58		

2.2.3.7 Les tri- et tétra-styryles

Synthèse : Les tri- et tétra-styryles ont aussi été synthétisés par la condensation de Knoevenagel, en utilisant le mélange EtOH-CH_3Cl comme solvant pour améliorer la solubilité des produits lors de la réaction. Un échange d'ion en chlorure s'est avéré nécessaire pour améliorer la solubilité des produits dans le milieu aqueux (Schéma 14).

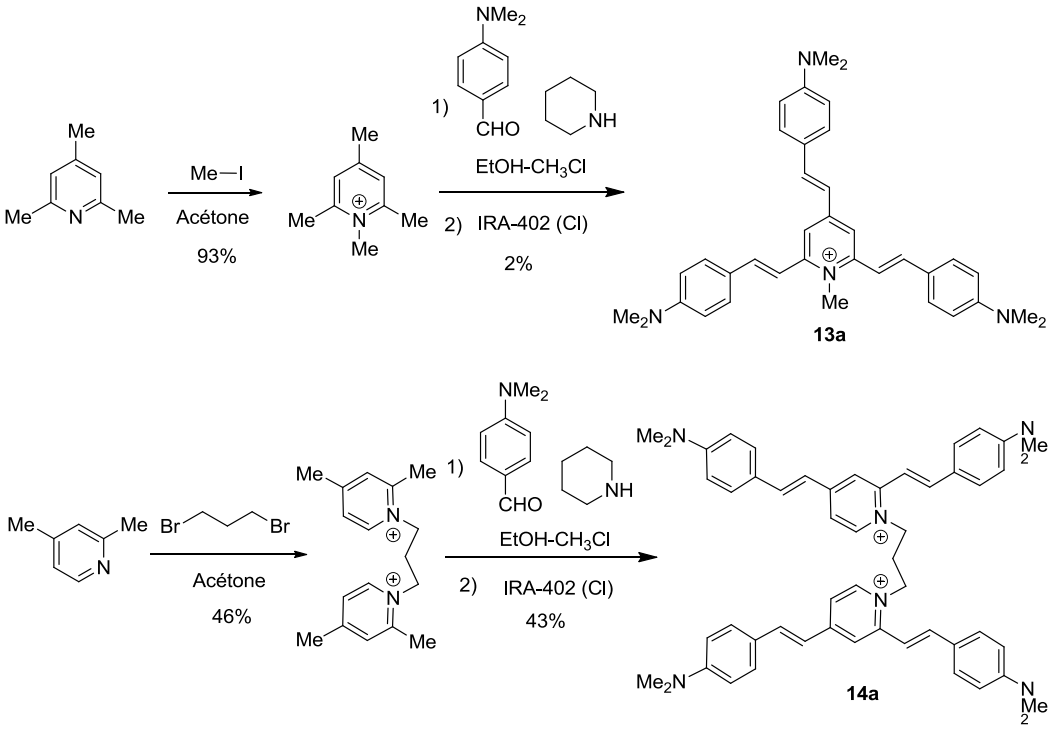


Schéma 14. Synthèse des tri- et tétra-styryles (**13a** et **14a**).

Etudes photophysiques : Ces colorants ont des longueurs d'onde maximale dans le MeOH (respectivement de 500 et 510 nm) similaires à celles du colorant **1a** (507 nm).

Par exemple, leurs valeurs d'extinction molaire (MeOH) sont proportionnellement plus importantes selon le nombre de groupements latéraux qu'ils possèdent (Tableau 10).

Tableau 10. Propriétés spectroscopiques des colorants dans le tampon et dans le méthanol.

Référence du ligand	λ_{max} dans MeOH (nm)	logε MeOH	λ_{max} dans Tampon (nm)	logε Tampon
13a	500,00	4,95	533,00	4,60
14a	510,00	5,06		

Pour résumer, nous avons synthétisé une bibliothèque de colorants styryles comprenant 11 mono-styryles, 49 di-styryles, un tri-styryle et un tétra-styryle. L'identité et la pureté de tous les composés sont validées par l'analyse élémentaire, LC-MS, RMN ^{1}H et RMN ^{13}C.

2.2.4 Criblage de sondes fluorescentes pour l'ADN quadruplex sur microplaques

2.2.4.1 Généralités sur le criblage

Pour évaluer l'augmentation de la fluorescence et la sélectivité de sondes, synthétisées dans le cadre de notre travail, en présence de nombreuses structures d'ADN, nous avons appliqué une méthode de criblage par fluorescence sur les microplaques à 96 puits. Chaque plaque permet d'analyser ainsi 96 échantillons, huit par colonnes et douze par ligne. Chaque puits est analysé automatiquement par le lecteur de plaques avec un réglage de longueur d'ondes d'excitation et d'émission, en utilisant différentes combinaisons de filtres.

C'est une analyse beaucoup plus rapide que des titrations fluorimétriques dans la cuve, car 12 colorants et 7 ADN différents, c'est-à-dire 84 combinaisons (une ligne de colorant seul sans ADN comme référence) peuvent être analysées sur la même plaque (Figure 60).

12 colorants différents par colonne

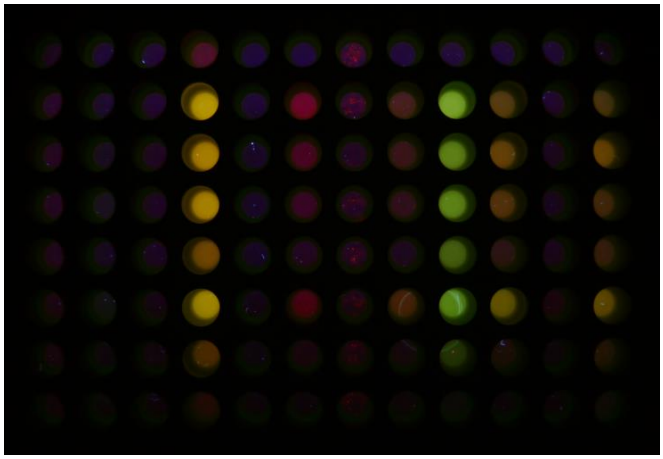


Figure 60. Exemple de plaque préparée (visualisation sous lumière à λ = 312 nm).

2.2.4.2 Résultats du criblage sur microplaques

Cette méthode nous a permis d'analyser l'intensité de fluorescence des 62 styryles synthétisés en présence de 14 différentes structures de l'ADN et de l'ARN (duplexes, quadruplexes, cf. Tableau A1). Les résultats du criblage sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11. Résumé des valeurs de l'exaltation de la fluorescence (F/F_0) de différents colorants (c = 2,5 µM) en présence d'un panel d'ADN quadruplex, double hélice et d'ARN (c = 5 µM). Les cellules sont colorées en fonction des valeurs (F/F_0) : les interactions engendrant une augmentation de fluorescence plus élevée sont en couleur plus foncée.

										500	400	300	200	100	50	0
colorant	**filtres**	**22AG**	**c-kit2**	**25CEB**	**c-kit87up**	**46AG**	**c-src1**	**ct DNA**	**c-myb**	**TBA**	**HRAS**	**c-myc**	**TERRA**	**NRAS**	**ct RNA**	
1a	544 / 620	82	30	22	34	99	10	3	6	4	36	40	170	15	4	
1a(2)	544 / 620	61	22	20	24	76	9	6	9	4	69	39	122	16	3	
1a(3)	544 / 620	38	16	13	16	41	7	4	5	3	27	27	103	11	3	
1a(4)	544 / 620	32	8	9	9	30	3	2	3	2	8	12	20	4	2	
1a(5)	584 / 670	124	45	39	44	112	19	10	7	9	147	52	267	39	8	
1a(6)	590 / 670	326	102	110	118	215	57	25	20	39	190	148	311	102	11	
1b	620 / 670	11	13	14	8	28	5	3	6	3	18	38	111	11	2	
1c	485 / 544	34	27	26	27	97	12	7	4	7	63	26	59	12	6	
1d	544 / 620	68	39	24	50	346	7	2	6	5	35	46	120	21	3	
1e	544 / 620	62	49	41	45	112	15	14	13	10	41	59	114	20	7	
1f	520 / 620	4	3	4	4	4	3	2	3	3	3	4	5	3	3	
1g	485 / 544	19	39	19	57	73	8	3	8	3	23	42	45	32	3	
1h	485 / 544	20	46	17	47	59	18	4	12	5	22	28	144	33	7	
1i	485 / 544	13	7	6	19	30	3	6	4	2	5	10	39	14	1	
1i(2)	485 / 544	20	17	13	21	49	9	12	7	7	11	19	19	21	6	
1j	544 / 584	553	185	141	269	352	75	4	33	45	367	163	268	176	7	
1k	584 / 670	4	3	4	4	7	2	1	2	2	4	3	5	3	1	
1l	544 / 620	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	3	2	2	
1m	544 / 584	52	85	49	81	115	51	7	18	21	119	76	353	69	16	
1n(2)	544 / 620	3	2	2	2	3	1	1	1	1	3	2	3	2	1	
1o	544 / 620	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	
1p	544 / 620	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1q	544 / 590	39	93	29	67	52	13	1	10	3	28	67	355	61	11	
1r	485 / 544	39	88	27	35	98	8	2	8	28	177	204	320	55	13	
1s	485 / 544	203	191	168	150	209	51	9	84	85	214	326	456	144	34	
1t	544 / 620	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
1u	544 / 584	45	193	27	34	41	11	1	8	99	205	252	383	128	33	
1v	620 / 670	2	3	3	4	2	2	2	3	2	2	4	46	2	2	
1w	544 / 620	23	13	26	13	35	6	2	5	2	27	38	50	15	1	
1z	485 / 544	17	31	54	23	50	8	48	11	5	46	238	16	26	9	
1x	544 / 620	148	346	115	393	485	111	36	56	26	341	282	689	200	63	
1y	590 / 670	104	85	72	109	113	32	11	14	22	118	112	147	60	7	
1&	485 / 520	54	8	18	25	80	6	5	5	5	25	11	40	5	2	
1£	485 / 544	3	6	3	9	6	2	3	2	2	2	4	7	6	2	
1ai	544 / 620	32	24	27	25	61	8	3	12	3	20	31	25	13	4	
2a	544 / 620	14	19	12	22	28	9	12	9	3	19	20	168	9	4	
2b	584 / 670	3	5	4	4	5	2	2	1	2	3	4	22	2	2	
2i	485 / 544	3	3	4	3	5	4	2	1	2	4	5	34	2	2	
2n	584 / 670	2	2	2	2	3	2	2	3	2	3	3	4	3	2	
2v	544 / 620	51	62	76	74	118	20	35	11	10	68	105	69	45	3	
2v	485 / 544	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
2x	544 / 590	90	216	86	186	181	33	3	28	6	100	204	195	113	9	
2y	544 / 620	25	30	35	39	55	18	22	8	4	62	46	52	28	2	
3a	584 / 670	50	29	25	35	66	7	7	6	4	51	28	97	12	3	
4a	544 / 620	11	5	4	5	20	2	3	11	2	12	2	6	3	2	
5a	544 / 620	9	5	4	7	12	3	2	2	0	2	5	8	1	0	
6a	544 / 620	51	10	23	32	96	15	5	7	5	45	48	154	18	6	
7a	620 / 670	15	6	9	5	43	5	2	3	2	17	12	56	6	3	
9a	620 / 720	4	7	10	4	19	7	2	2	2	14	2	20	5	2	
10a	544 / 620	84	161	83	244	184	44	5	15	5	83	338	169	92	8	
10i	544 / 620	1	2	7	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1	1	
10j	485 / 544	51	101	34	81	166	14	12	14	10	78	94	78	100	16	
10n	520 / 670	24	19	13	22	38	5	3	4	2	16	14	16	8	2	
10w	544 / 584	7	7	5	7	11	2	6	3	3	9	13	10	6	2	
10x	485 / 544	2	6	2	7	6	2	1	2	1	2	9	6	11	1	
10z	485 / 544	7	21	8	11	17	3	3	4	2	8	21	21	32	7	
11a	544 / 620	60	215	61	265	166	70	2	1	3	59	302	10	13	11	
11n	544 / 620	31	11	15	35	102	8	5	8	2	35	29	62	20	3	
12a	544 / 620	90	167	118	239	172	50	2	18	4	53	185	144	61	8	
13a	584 / 670	7	8	7	8	12	3	2	2	1	4	5	31	4	2	
14a	584 / 670	19	11	13	20	55	6	2	5	4	3	10	24	8	2	
15a	620 / 670	89	12	11	18	62	4	2	4	3	21	17	54	6	2	
15j	520 / 620	132	80	57	83	121	23	3	22	32	139	111	178	43	12	
16a	584 / 670	42	25	28	41	68	12	6	60	6	32	16	117	33	5	
Thioflav T	460 / 544	168	76	38	102	176	21	2	16	9	102	111	94	203	10	

Les colorants **1a** et **2a** mentionnés ci-dessous sont utilisés comme références. Cette approche nous a permis d'identifier certains colorants ayant un facteur d'augmentation de la fluorescence de 200 à 600 en présence de certaines structures de l'ADN quadruplex, ce qui représente une amélioration significative par rapport au colorant "prototype" **1a.** Ces études ont montré l'efficacité de la conception des sondes de l'ADN quadruplex.

Les valeurs de rapport de l'intensité de la fluorescence (F/F_0) en présence et en absence d'ADN quadruplex obtenues sur la microplaque pour les colorants **1a** et **2a** sont généralement en accord avec les expériences de titrations fluorimétriques.

Une dizaine de colorants avec des valeurs de rapport (F/F_0) supérieures à 200 pour les ADN quadruplexes ont été sélectionnées par le criblage, dont plusieurs distyryles asymétriques (analogues de **1a**) qui ont des valeurs de rapport meilleures par rapport au composé **1a**. Deux colorants monostyryles ont aussi montré de bons rapports d'intensité de la fluorescence comme le **10a** et le **11a** (Figure 61) (environ 200 pour le c-kit2 et le c-kit87up). Ces composés sélectionnés possèdent également une bonne sélectivité vis-à-vis de l'ADN quadruplex, car le rapport de la fluorescence augmente de 2 à 25 en présence de l'ADN duplex, ce qui est plutôt faible par rapport à l'ADN quadruplex.

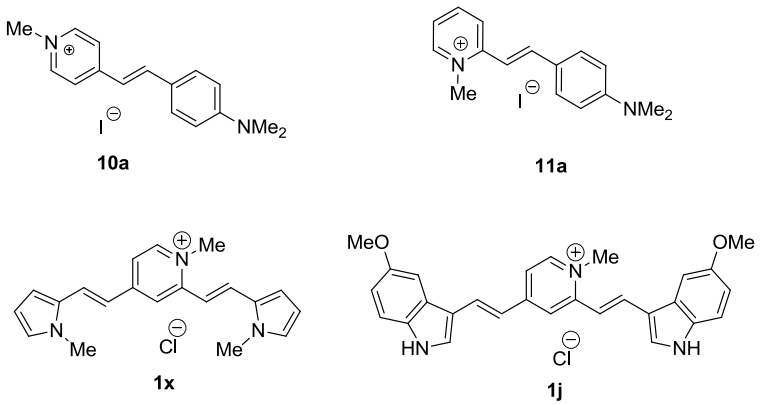


Figure 61. Structures de colorants **10a**, **11a**, **1x** et **1j**.

Nous avons remarqué également que pour plusieurs colorants, l'intensité de la fluorescence est non seulement très différente en présence de l'ADN quadruplex et duplex, mais aussi qu'elle change en présence de quadruplexes de topologies différentes. Par exemple, le **11a** (Figure 61) a des rapports fluorimétriques élevés pour

les ADN quadruplexes parallèles (F/F_0 = 215 en présence c-kit2, 302 en présence de c-myc), mais seulement de 60 en présence de 22AG, qui est un quadruplex hybride. Le **11a** possède donc une sélectivité optique pour les ADN quadruplexes parallèles. En revanche, le colorant **1j** est sélectif pour l'ADN hybride avec un rapport de F/F_0 égale à 553 en présence de 22AG mais seulement de 185 en présence de c-kit2 et de 163 avec le c-myc. Ces colorants sont intéressants pour l'analyse multiplexe (2.2.8.5).

Le composé **1x** (Figure 61) possède la valeur de rapport (F/F_0 = 689) la plus élevée en présence d'ARN quadruplex (TERRA), et il possède également des valeurs de rapport importantes pour les autres structures du G-quadruplex : F/F_0 = 485 (46AG), 393 (c-kit87up), 346 (c-kit2). En revanche, sa valeur de rapport en présence d'ADN double-brin est relativement élevée : F/F_0 = 36 (ct ADN).

Le composé **1j** (Figure 61) est caractérisé par une augmentation de la fluorescence la plus élevée en présence d'ADN quadruplex : F/F_0 = 553 (22AG), 352 (c-kit87up), 366 (HRAS), mais seulement de 4 en présence de CT-ADN et qui permet une détection spécifique de l'ADN quadruplex. Nous avons ainsi étudié en détail les propriétés de ce composé.

2.2.5 Titrations fluorimétriques du colorant 1j

Le colorant **1j** sélectionné par le criblage sur les plaques (valeur de F/F_0 = 553 pour 22AG) a été étudié par les titrations fluorimétriques avec les ADN quadruplex (22AG) et l'ADN double-brin natif (CT ADN) (Figure 62).

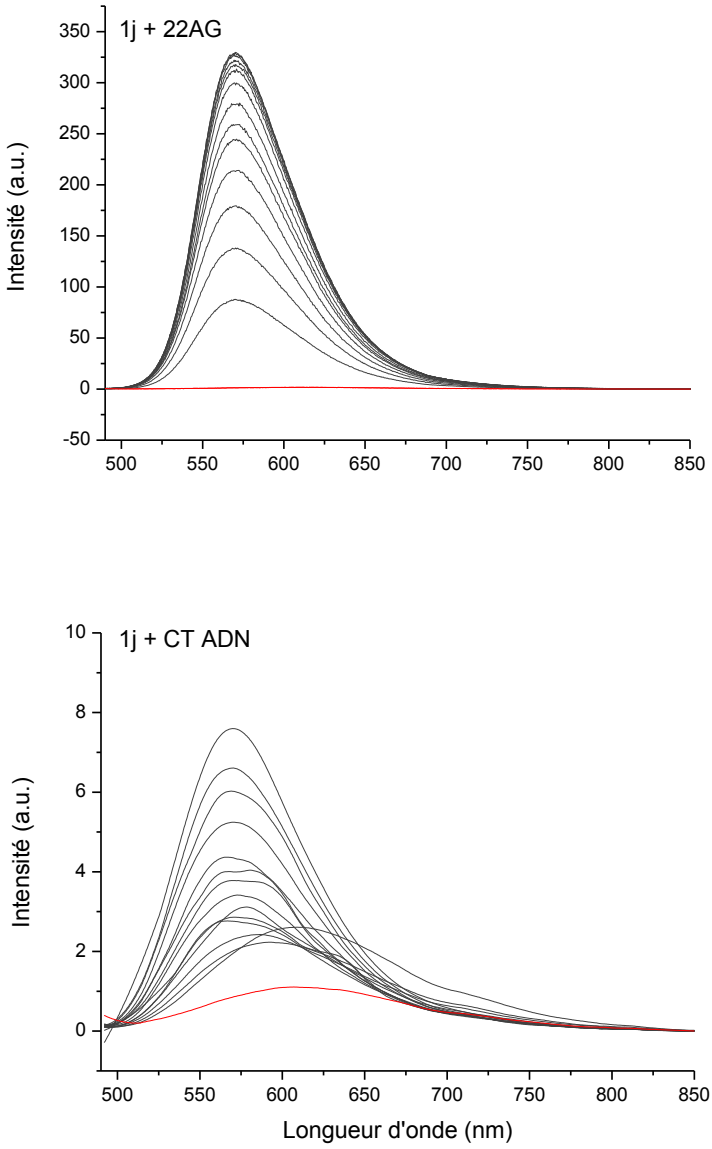


Figure 62. Titrations fluorimétriques de **1j** (c = 2.5 µM) par 22AG (quadruplex) et ds-lac (duplex), longueur d'excitation λ_{ex} = 477 nm, les courbes rouges représentent les spectres du ligand sans ADN.

Les titrations fluorimétriques ont révélé que la valeur de F/F_0 du colorant **1j** est de 330 en présence de 22AG et seulement de 8 en présence de CT ADN à 570 nm. Ces résultats montrent une meilleure sélectivité et propriété de la fluorescence et une amélioration considérable par rapport au colorant « prototype » **1a** (F/F_0 = 110 avec 22AG).

Les rendements quantiques ont été mesurés en utilisant la Rhodamine 6G comme référence. Nous avons observé un rendement quantique de 0,3% pour le colorant **1j**

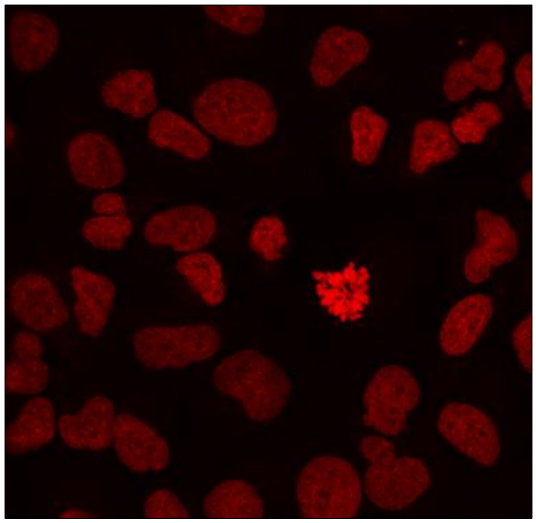
en absence d'ADN et 28% pour le **1j** en présence de 22AG dans le milieu aqueux. Les rendements quantiques du **1j** sont environ 30 fois plus élevés que ceux de **1a**, que ce soit avec l'ADN quadruplex 22AG ou sans ADN.

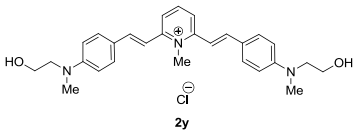
En conclusion, le colorant **1j** possède de meilleures propriétés spectrales et aussi une meilleure sélectivité par rapport au colorant prototype **1a**, avec un très bon rendement quantique de 28% (en complexe avec 22AG). Il peut être utilisé pour la détection de l'ADN quadruplex, par exemple dans les solutions ou dans le criblage fluorimétrique des séquences d'ADN formant des structures quadruplexes.

2.2.6 Imagerie cellulaire

Le colorant **1j** (analogue de **1a**) a été ensuite testé dans l'imagerie de cellules cancéreuses fixées en collaboration avec F. Poyer (Institut Curie - Orsay), dans la tentative de visualiser l'ADN quadruplex. Le colorant disytyryle symétrique **2y** (analogue de **2a**), qui est une bonne sonde de l'ADN duplex (F/F_0 = 22 pour le CT ADN), a été utilisé comme référence (Figure 63).

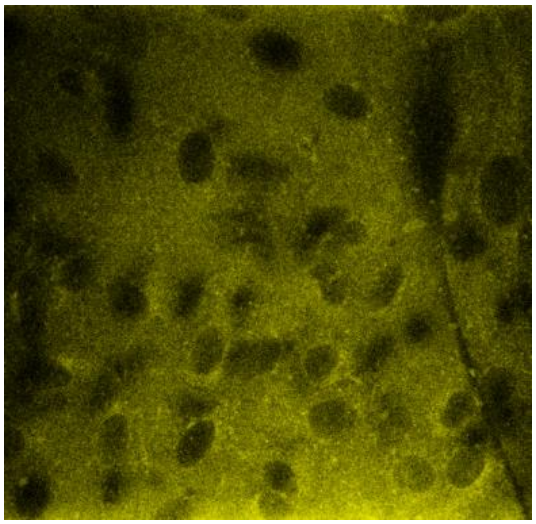
a) 2y

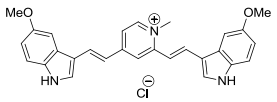




2y

b) 1j





1j

Figure 63. Imagerie de cellules A549 fixées, avec un temps d'incubation de 2h après l'ajout de colorant. La concentration de colorants est de 0,15 µM pour **2y** (a) et de 1 µM pour **1j** (b).

Le colorant **2y** colore bien l'ADN. Ainsi, dans les cellules se trouvant dans l'interphase, il révèle le noyau avec un bon contraste. Dans le cas de cellules se trouvant en métaphase, le colorant **2y** met en évidence les chromosomes (Figure 63. a : cellule au centre d'image). Ce comportement ressemble à celui d'autre colorants sélectifs pour l'ADN double-brin tels que Hoechst 33258 ou les dérivés de la triphénylamine [122]. Le colorant **2y** peut aussi être utilisé dans les applications en imagerie visant la visualisation de l'ADN double-brin.

En revanche, les essais d'imagerie cellulaire à l'aide du colorant **1j** ne sont pas concluants (Figure 63. b). En effet, nous avons observé la fluorescence du fond (milieu intra-cellulaire), avec une faible augmentation d'intensité de fluorescence autour des noyaux cellulaires. En même temps, il n'y a pas de fluorescence de **1j** dans les noyaux cellulaire. Deux explications sont possibles pour ce phénomène :

- Soit il n'y a pas d'ADN quadruplex dans les noyaux, ou sa quantité est trop faible pour la détection ;
- Soit le colorant ne rentre pas dans le noyau des cellules fixées.

Ces résultats soulignent, encore une fois, l'influence de fines variations de la géométrie des colorants et de la nature des donneurs d'électrons sur les propriétés biologiques et photophysiques. Néanmoins, d'autres expériences en imagerie (qui n'ont pas pu être réalisées dans le cadre de cette thèse) sont nécessaires pour étudier les propriétés du colorant **1j** (et d'autres sondes d'ADN quadruplex) au niveau cellulaire.

Le colorant **1j** a également été testé dans une expérience d'imagerie de la bactérie *E.coli* vivante (en collaboration avec Y. Si et R. Méallet-Renault, ENS Cachan). L'auto-fluorescence d'*E.coli* seule (Figure 64.a-b) est très faible. Mais après une incubation en présence du colorant **1j** pendant 2h, certaines bactéries deviennent fluorescentes (Figure 64.c-d, Figure 65). Il s'agit de bactéries se trouvent dans la phase de division et formant des « pôles » qui deviennent très brillants après coloration par le colorant **1j**.

Les « pôles » bactériens sont très peu étudiés [123], [124]. Ils représentent probablement les domaines d'agrégation de plusieurs protéines au moment de la division bactérienne, pour l'instant, il n'est pas claire que l'ADN soit présent dans les pôles. Vu la capacité du colorant **1j** de détecter sélectivement l'ADN quadruplex et non pas l'ADN double-brin, il existe une possibilité que l'ADN quadruplex ou des structures secondaires alternatives soient présents dans le pôle et est visualisé par le colorant. Il est également possible que le colorant **1j** marque sélectivement l'une des protéines (ou leur agrégats) formant les pôles. En effet, il n'est pas exclu que **1j** interagisse avec des protéines.

Des expériences supplémentaires sont nécessaire afin d'identifier la cible cellulaire de **1j** dans les bactéries. Néanmoins, la capacité de ce colorant de marquer très sélectivement les bactéries expriment les pôles est très intéressant et peut être utilisé pour les études bactériologiques.

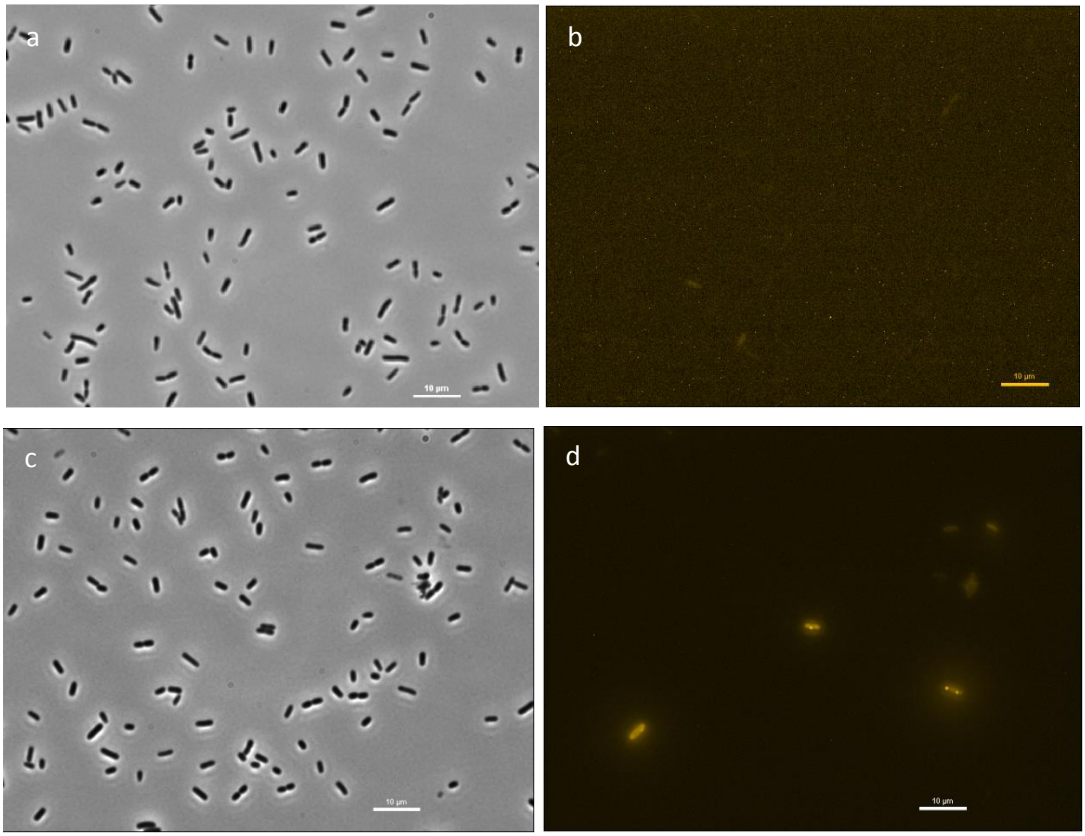


Figure 64. Imagerie d'*E. coli* (K-12 MG1655 BW25113) seule (a: image de contraste, b: image de fluorescence) et avec un temps de l'incubation de 2h après avoir ajouté le colorant **1j** (c: image de contraste, d: image de fluorescence).

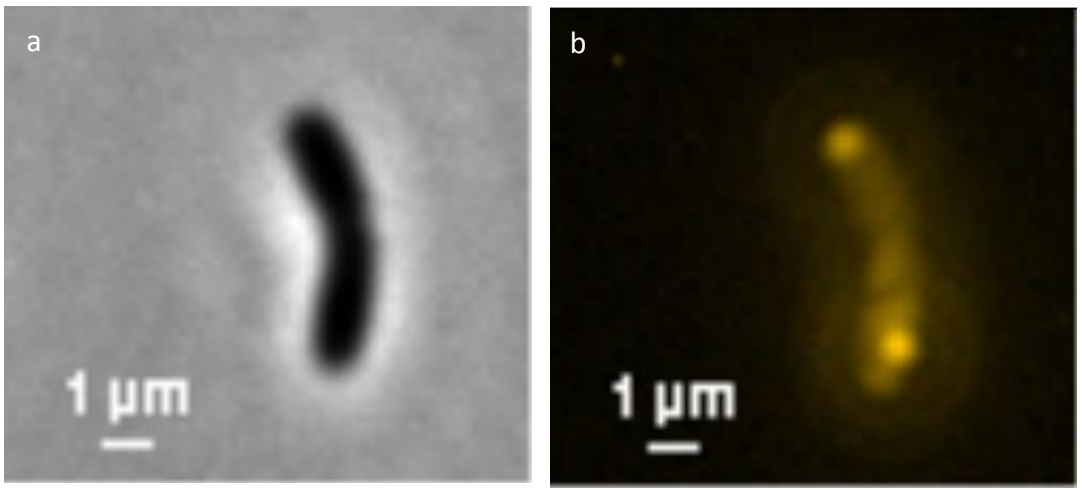


Figure 65. Imagerie d'une seule bactérie *E. coli* au cours de division, en incubation avec **1j** (a: images de contraste, b: images de fluorescence).

2.2.7 Fluorescence du colorant 1j sous excitation biphotonique.

Une étude de la fluorescence sous excitation biphotonique du colorant **1j** en présence d'ADN quadruplex (22AG) et duplex (CT ADN) a été réalisée en collaboration avec C. Fionareli (CEA Saclay), afin de comparer la sélectivité pour l'ADN quadruplex avec celle observée à un photon. Le schéma de l'expérience de la fluorescence sous excitation biphotonique est représenté ci-dessous (Figure 66).

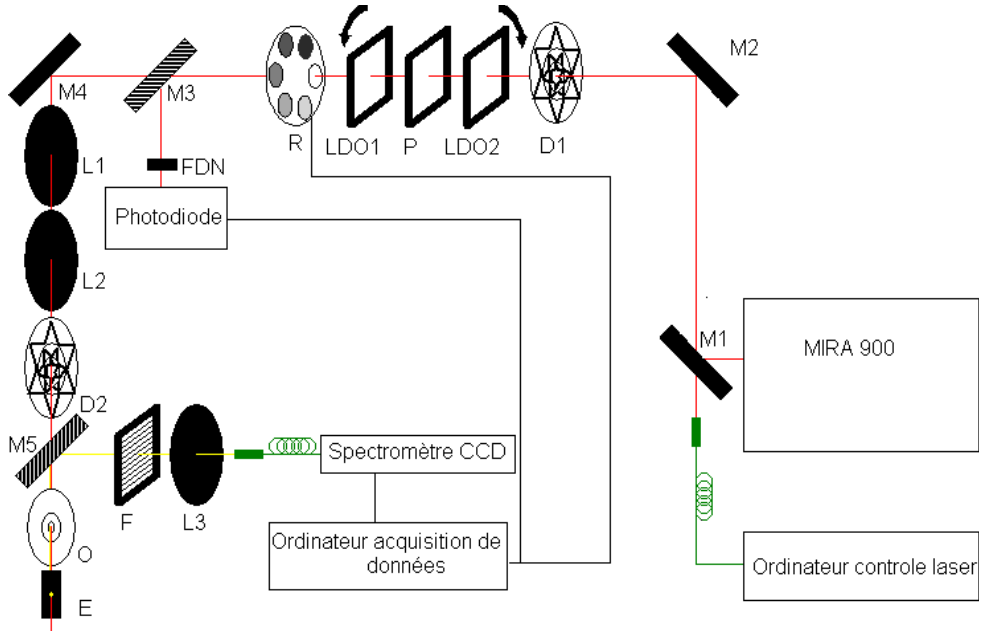


Figure 66. Schéma de l'expérience de la fluorescence sous excitation biphotonique.

Nous avons observé la fluorescence du colorant **1j** en présence d'ADN quadruplex 22AG (2 équivalents molaires) en utilisant l'excitation par un laser pulsé avec des longueurs d'onde entre 800 et 900 nm. Le phénomène d'absorption de deux photons est confirmé par la dépendance quadratique (non-linéaire) du signal de fluorescence de la puissance du laser. La longueur d'onde d'excitation maximale à deux photons est d'environ 830 nm, ce qui représente à peu près deux fois le petit pic de 440 nm à un photon, caractéristique de l'absorption à deux photons. Cette excitation à deux photons provoque une fluorescence avec une longueur d'onde maximale à 585 nm, qui est identique à celle à un photon d'absorption (Figure 67). Les propriétés d'absorption à deux photons en présence et en absence d'ADN sont représentées dans Tableau 12.

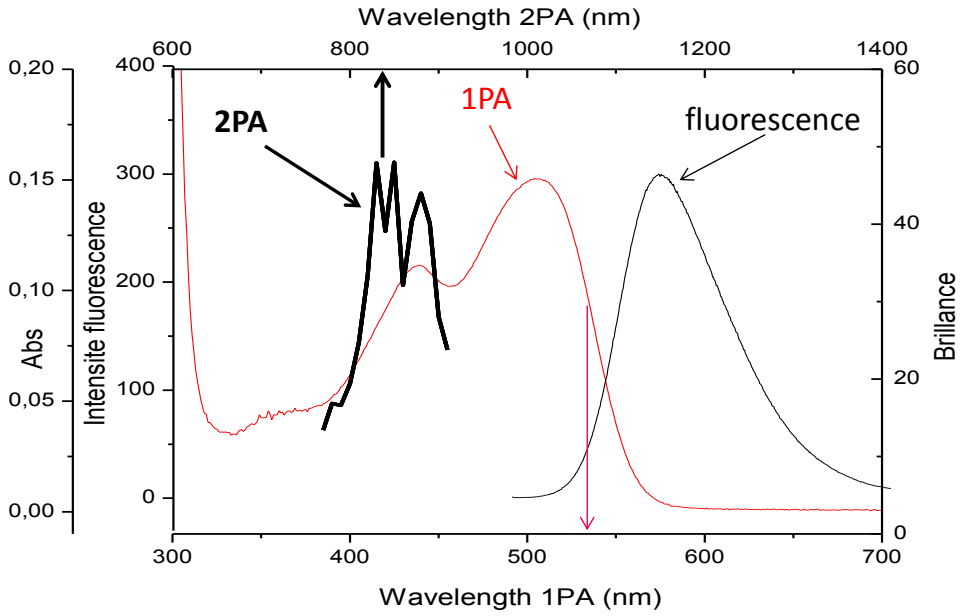


Figure 67. Expérience de la fluorescence à deux photons du colorant **1j** (c = 100 µM) en présence de l'ADN quadruplex 22AG (c = 200 µM). Rouge : absorption à un photon, noir épais : absorption à deux photons ; noir fin : fluorescence.

Tableau 12. Propriétés d'absorption à deux photons du colorant **1j** en absence et en présence d'ADN quadruplex et double-brin.

	Sans ADN	AND quadruplex (22AG)	AND duplex (ct ADN)
$\lambda_{max(2PA)}$/nm	830	830	830
Section éfficace, σ/GM	220	160	143
Brilliance, σ·ϕ	0,66	48	4,3
Durée de vie de fluorescence, τ/PS	n/d	3,04	1,43

En présence d'ADN quadruplex, la valeur de brillance (δ×Φ) de **1j** est d'environ 50 soit environ 11 fois plus élevées par rapport à celle en présence d'ADN duplex, et 73 fois plus élevée par rapport à celle en absence de l'ADN. (Tableau 12 ; Figure 68). Ceci est suffisant pour l'utilisation dans des applications telles que la microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire.

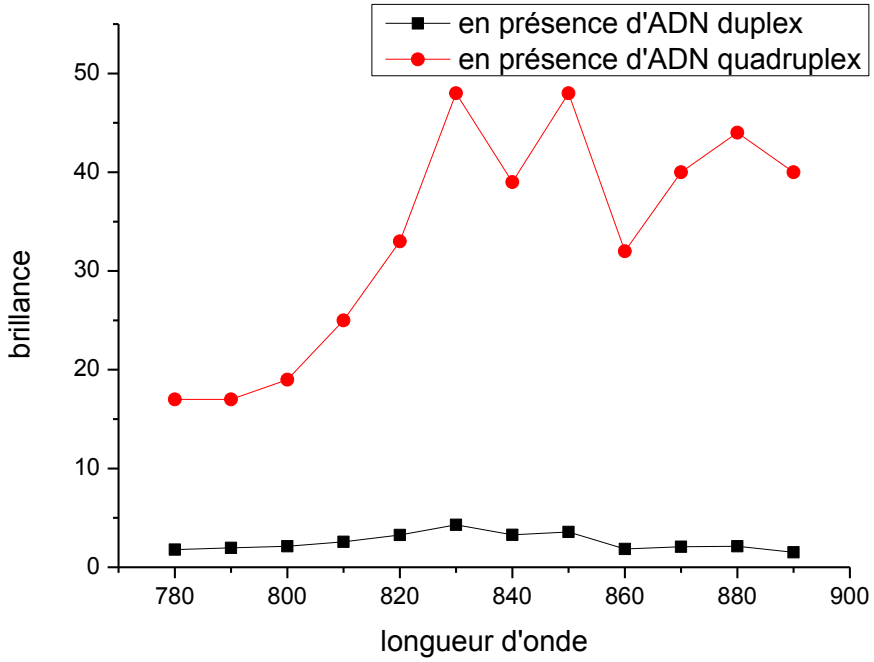


Figure 68. Graphique de la valeur de la brillance en fonction de la longueur d'onde de **1j**, en présence de l'ADN quadruplex (22AG) et duplex (CT ADN).

2.2.8 Analyse multiplexe de structures de l'ADN à l'aide des sondes fluorescentes

2.2.8.1 Généralités

Les acides nucléiques peuvent être classés en simple brin, en duplex ou en d'autres structures secondaires comme le G-quadruplex. A leur tour, les structures G-quadruplex peuvent être classées selon différentes topologies parallèles, antiparallèles ou hybrides (Figure 69). Ces différentes topologies possèdent des différences structurales significatives, comme les sillons et les boucles. Les résultats du criblage sur les microplaques ont démontré que certains colorants, synthétisés dans le cadre de notre travail, sont capables de différencier les structures d'ADN duplexes et quadruplexes par leurs réponses fluorimétriques, et d'autres arrivent à « distinguer » les différentes topologies d'ADN quadruplex.

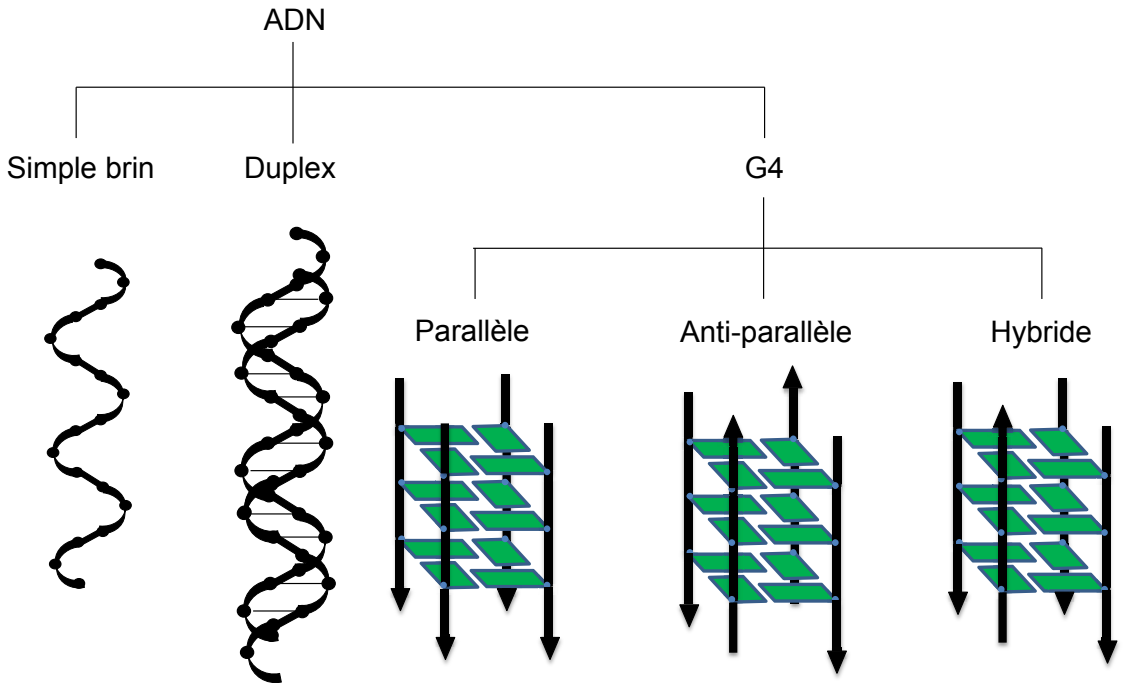


Figure 69. Classement structurel des ADN.

2.2.8.2 Analyse à une dimension

Dans la littérature, le groupe de J.-L. Mergny a utilisé un colorant commercial, la Thioflavine T, une sonde de type « light up » de l'ADN, pour distinguer les structures de l'ADN quadruplex et d'autres structures [94]. Le facteur d'augmentation de la fluorescence de la Thioflavine T en présence d'ADN quadruplex (20 à 130) est en moyenne significativement plus grand que celui en présence d'ADN non-G-quadruplex (5 à 40). Cette étude montre le potentiel de prédiction de la capacité d'une séquence d'ADN à former une structure quadruplex. La réponse fluorimétrique de la Thioflavine T peut être utilisée comme facteur différentiant.

Néanmoins, il existe un recouvrement non négligeable entre les groupes G-quadruplexes et les autres structures de l'ADN. Nous souhaitons utiliser plusieurs colorants pour améliorer la capacité de différentiation des structures secondaires de l'ADN.

2.2.8.3 Analyse à deux dimensions

Pour améliorer la discrimination entre les différentes structures d'ADN et les différentes topologies d'ADN quadruplex, nous avons dans un premier temps utilisé une combinaison de deux colorants synthétisés dans le cadre de notre travail. Les styryles **1j** et **11a** sont très sélectifs pour les ADN quadruplexes avec des valeurs de

sélectivité allant jusqu'à 100, contrairement à l'ADN duplex. Le **1j** possède aussi une sélectivité pour les ADN quadruplexes hybrides (22AG et 46AG), tandis que le **11a** est sélectif pour les ADN quadruplexes parallèles (c-kit2, c-kit87up, c-myc : cf. Tableau A1, annexes).

La fluorescence de ces deux colorants seuls (c = 2,5 µM) et en présence de 29 structures d'ADN (dont 9 ADN quadruplexes parallèles, 5 anti-parallèles, 4 hybrides, 4 ADN duplexes et 7 ADN double-brins, cf. tableau A1) a été mesurée sur la microplaque à 96 puits (Figure 70).

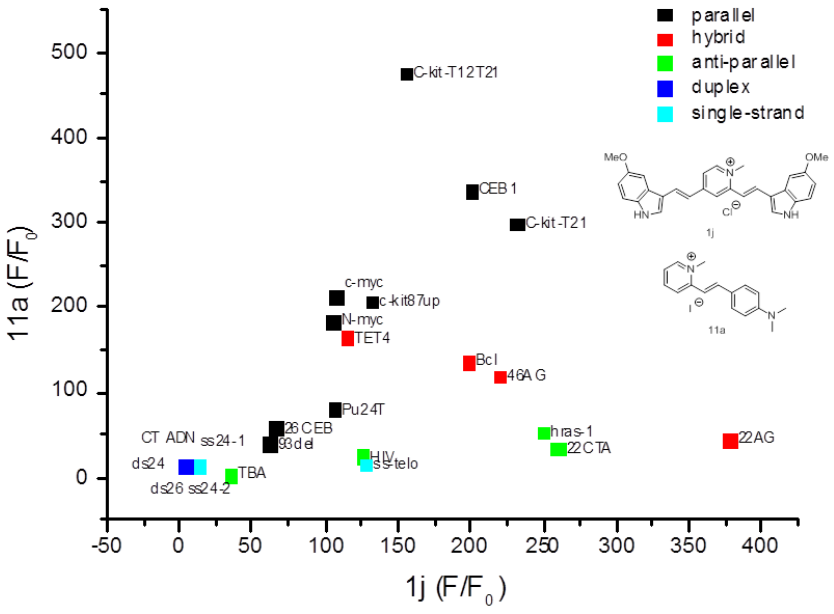


Figure 70. Analyse à deux dimensions à l'aide de colorants.

Les valeurs du rapport de la fluorescence des deux styryles en présence de différentes structures d'ADN, permettent de tracer un graphique à deux dimensions, avec les valeurs de F/F_0 de **1j** à l'axe X, et celles de **11a** à l'axe Y. Ces valeurs peuvent être classées en plusieurs zones en fonction de la structure de l'ADN (parallèle, hybride, anti-parallèle, duplex, simple brin). Les zones correspondent à l'ADN quadruplexes parallèles et hybrides sont bien séparées, de même, elles se distinguent des autres structure d'ADN. Néanmoins, les zones correspondent à l'ADN quadruplex anti-parallèle, duplex et simple-brin présentent des recouvrements importants.

2.2.8.4 Analyse à trois dimensions.

Pour améliorer les séparations des zones de différentes structures d'ADN, un graphique à trois dimensions, avec les valeurs de rapport de la fluorescence des trois styryles synthétisés, a été obtenu en ajoutant le colorant **1u**, représentant la troisième dimension sur le graphique (Figure 71).

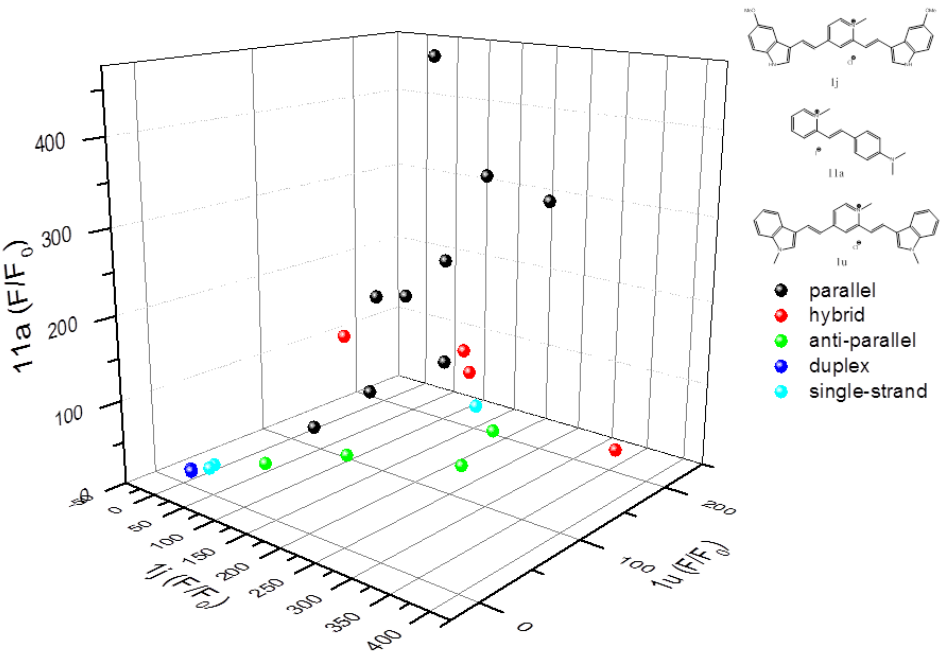


Figure 71. Analyse à trois dimensions.

Les zones à trois dimensions sont beaucoup mieux séparées par rapport au graphique à deux dimensions. Le colorant **1u** est relativement sélectif pour les ADN anti-parallèles, ce qui permet de séparer la zone de l'ADN quadruplex anti-parallèle des zones de l'ADN duplexe et simple brin.

2.2.8.5 Analyse multiplexe

En théorie, plus le nombre de dimension est grand, plus la séparation entre les groupes est meilleure. Pour améliorer d'avantage la séparation entre les groupes d'ADN, six styryles synthétisés, possédant une bonne sélectivité pour l'ADN quadruplex, et six colorants commercialisés, largement utilisés pour l'ADN duplex, ont été choisis pour une analyse multiplexe (Figure 72).

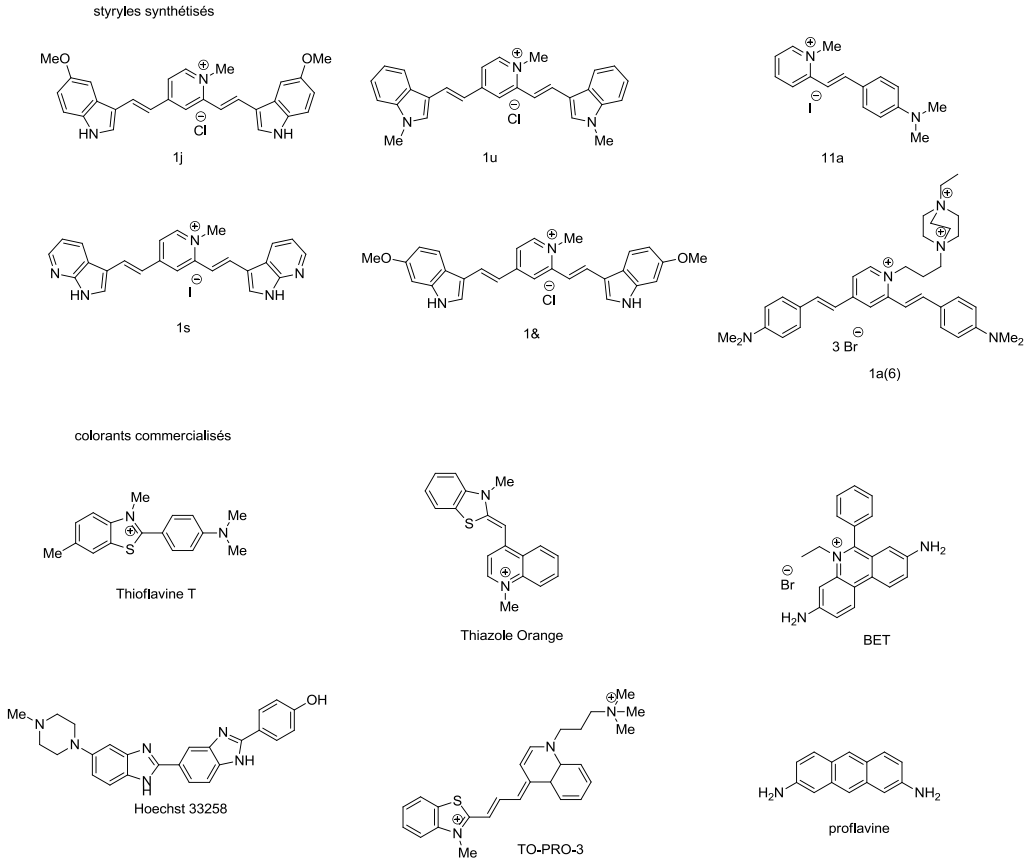


Figure 72. Structures des colorants utilisés dans l'étude multiplex.

La fluorescence de ces douze colorants en absence et en présence de différentes structures d'ADN (quadruplex parallèle, hybride, anti-parallèle, duplex et simple-brin) a été mesurée en plaque 96 puits. Les valeurs de rapport de la fluorescence en présence et en absence d'ADN (F/F_0) sont représentées dans le Tableau 13.

Tableau 13. Rapport de la fluorescence (F/F_0) en présence et en absence d'ADN (2 équivalents molaires)

ADN	Topologie	1j	1u	11a	1s	1&	1a(6)	Thioflavin T	Thiazole orange	BET	Hoechst	TO-PRO3	Proflavin
filtres		544/584	544/584	544/620	485/520	485/520	590/670	440/485	485/520	544/590	355/460	670/720	440/485
26CEB	*parallel*	66,7	141	57,3	191	15,8	99,6	81,2	147	7,15	8,49	84,7	0,37
C-kit-T21	*parallel*	232	220	299	316	24	141	430	481	11,2	13	104	0,17
C-kit-T12T21	*parallel*	155	149	475	209	22,7	97,2	404	556	16,7	13,2	145	0,21
22AG	*hybrid*	378	181	43,4	154	26,6	252	346	329	3,92	5,59	92,7	0,57
N-myc	*parallel*	105	154	183	170	9,36	58	177	242	6,06	10,5	70,3	0,39
Pu24T	*parallel*	106	197	79,4	229	20,6	120	210	317	6,13	10,3	104	0,54
c-kit87up	*parallel*	132	106	206	111	17,2	67,3	210	291	7,16	8,6	51,1	0,37
hras-1	*anti-parallel*	250	146	51,4	113	30,8	144	206	548	17,7	10,4	105	0,32
c-myc	*parallel*	107	197	212	284	15,8	97,1	200	242	7,64	13,7	96,6	0,29
TBA	*anti-parallel*	35,3	54,6	2,59	51,5	6,6	30,2	19,8	99,2	1,21	3,69	16,1	0,94
HIV	*anti-parallel*	126	79,7	23,9	115	12,3	55,5	57,6	193	8,87	4,1	46,6	0,71
46AG	*hybrid*	220	142	118	194	55,2	166	347	672	22,3	12,3	81,6	0,39
22CTA	*anti-parallel*	260	105	34,4	139	30,8	212	649	327	5,97	7,44	72,7	0,62
Bcl	*hybrid*	198	152	135	213	29,4	134	172	292	15,4	10,4	69,7	0,38
TET4	*hybrid*	115	85,1	164	120	13,2	78,3	150	131	9,2	6,42	47,6	0,27
93del	*parallel*	62,4	86,3	38,5	93,6	5,6	25	65,7	89,7	5,03	8,45	25,2	0,33
CEB1	*parallel*	200	173	338	177	17,6	82,3	336	488	6,29	12,8	51,5	0,38
ds26	*duplex*	3,95	4,8	12,9	9,68	3,56	20,3	5,17	437	31,8	48,9	31,7	0,41
ss-telo	*single-strand*	128	219	14,5	233	75,4	187	46,3	251	5,46	18,5	102	0,62
ss24-1	*single-strand*	11,5	16,8	11,5	19,5	7,74	38,9	38,1	126	17,4	3,81	37,9	0,51
ss24-2	*single-strand*	12,3	20,4	13,9	25,7	9,11	36,1	17,1	189	22,4	4,21	36,2	0,44
ds24	*duplex*	3,79	4,65	15,4	9,36	3,36	19,5	6,36	437	31,9	37,6	31,5	0,28
CT ADN	*duplex*	4,72	4,42	13,1	7,91	4,99	20,4	5,48	377	31,9	45	23,4	0,36

Pour analyser et visualiser ces données, nous avons utilisé deux méthodes d'analyse statistique multifactorielle : l'analyse en composantes principales (PCA) et l'analyse discriminante linéaire (LDA). Ces méthodes d'analyse permettent de réduire un grand nombre de dimension à deux ou trois, ce qui permet de les visualiser facilement.

L'analyse en composantes principales (PCA) est une analyse sans prédiction, qui consiste à transformer des variables liées entre elles (dites "corrélées" en statistique) en nouvelles variables décorrélées les unes des autres. Ces nouvelles variables sont nommées "composantes principales", ou axes principaux. Cette analyse permet de réduire le nombre de variables et de rendre l'information moins redondante. Les

résultats de cette analyse appliquée aux données du Tableau 13 sont représentés sur la Figure 73.

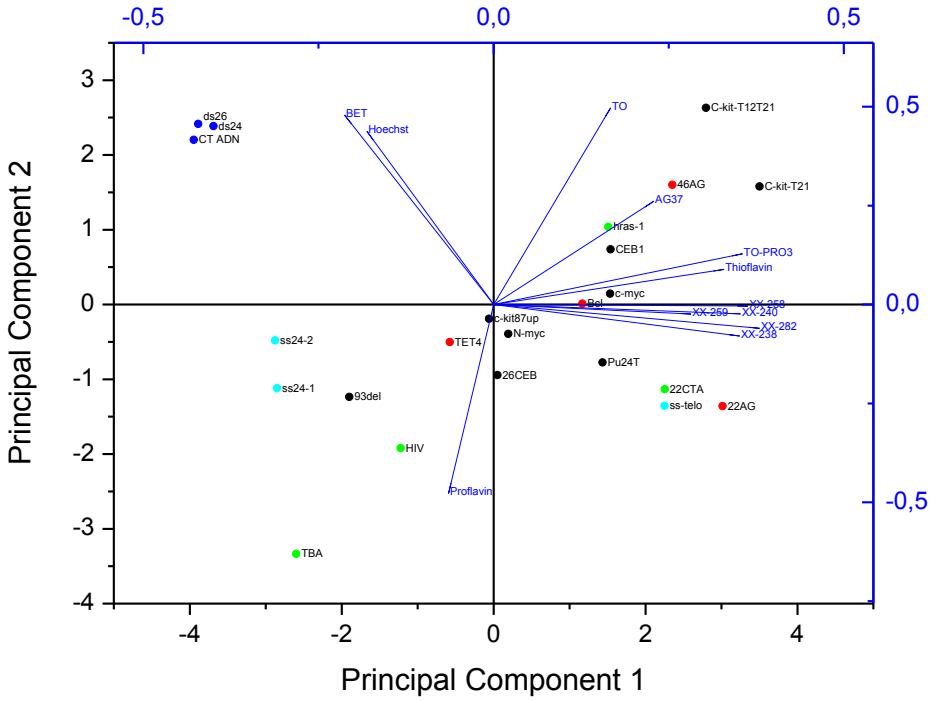


Figure 73. Analyse en composantes principales. Couleurs : bleu, ADN double-brin ; cyan, ADN simple-brin ; rouge, ADN quadruplex hybride ; vert, ADN quadruplex antiparallèle ; noir, ADN quadruplex parallèle. Les lignes bleues démontrent la contribution de chaque colorant pour le classement.

Les ADN sont regroupés par leurs similarités via leurs valeurs de rapport de la fluorescence, selon les calculs de cette méthode d'analyse. Les différentes structures et topologies sont colorées manuellement. Les ADN double-brin (ds26, ds24 et CT ADN en bleu) et simple brin (ss24-1 et ss24-2, sauf ss-telo) sont particulièrement bien regroupés et séparés des autres ADN. Par contre, les ADN quadruplexes ne sont pas correctement regroupés par ces méthodes. Bien qu'ils sont bien séparés des structures double-brin et (majoritairement) simple-brin.

L'analyse discriminante linéaire est une méthode d'analyse prédictive. Les ADN sont classés en zones en fonction de leurs topologies connues à priori, et l'analyse cherche les meilleurs facteurs pour que ces zones s'éloignent le plus possible (Figure 74).

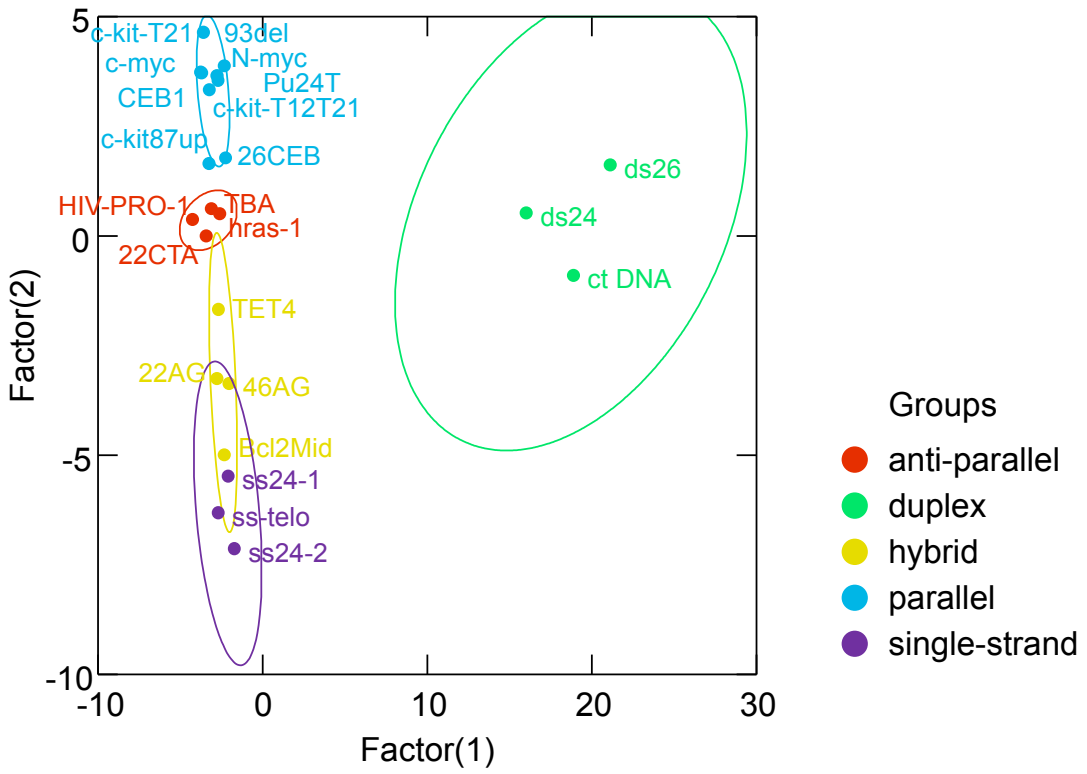


Figure 74. *Analyse discriminante linéaire.*

Les différents types de structure d'ADN sont bien séparés les uns des autres, notamment les ADN duplexes. Les différentes topologies de l'ADN quadruplex sont aussi bien séparées. Il y a un petit recouvrement entre les ADN quadruplexes hybrides et simple brin. Cela pourrait être amélioré par ajout de colorant sélectif pour une de ces deux structures. Ces études sont très intéressantes pour analyser la capacité d'une séquence d'ADN à former la structure quadruplex et prédire sa topologie.

2.2.9 Conclusions

Les études avec les colorants prototypes **1a** et **2a** ont montré l'importance de la géométrie du colorant sur leur affinité et leur sélectivité vis-à-vis de l'ADN quadruplex. En effet, la forme en L (**1a**) possède une meilleure affinité et sélectivité que la forme «linéaire» (**2a**) pour l'ADN quadruplex. En revanche, la forme « linéaire » (**2a**) présente une meilleure affinité et sélectivité pour l'ADN duplex.

Une bibliothèque de sonde de type styryle a été développée en se basant sur les résultats obtenus des études de colorants prototypes. Ces sondes synthétisées présentent de larges variations au niveau des spectres d'absorbance (du jaune jusqu'à

l'infrarouge) et de fluorescence, en fonction de leurs structures et de leurs groupement fonctionnels (nature du donneur et d'accepteur).

Les colorants ont été testés sur les microplaques en présence des différentes conformations d'ADN et d'ARN quadruplexes, ainsi que l'ADN duplex. Les résultats ont été assemblés et analysés pour sélectionner les meilleurs ligands fluorescents vis-à-vis d'ADN quadruplex. Les composés styryles sélectionnés ayant une bonne sélectivité et de bonnes propriétés fluorescentes pour les G-quadruplexes (ex : **1j**) ont été évalués par d'autre méthodes biophysiques (UV, fluorescence, T_m, CD, imagerie etc.). Il semble que certains composés styryles symétriques pourraient être des sondes de l'ADN duplex, exemple **2y**, qui peut être utilisé pour l'imagerie cellulaire.

Ces sondes de type styryle possèdent aussi une bonne propriété d'excitation à deux photons (**1j**), et pourraient être utilisées en microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire, afin de détecter la formation de l'ADN quadruplex dans des cellules.

L'analyse multiplexe a été développée en utilisant une matrice de plusieurs colorants avec de nombreuses structures d'ADN connues. Elle permet d'analyser la capacité d'une séquence d'ADN à former la structure quadruplex et prédire sa topologie.

2.3 Sondes fluorescentes de type PDC-coumarine

2.3.1 Conception

Une deuxième série de sondes fluorescentes est conçue pour introduire un fluorophore (coumarine) dans la molécule d'un ligand d'ADN quadruplex PDC, par une liaison covalente (Figure 75). La coumarine est composée d'un cycle benzène lié à un cycle pyrone. C'est une substance naturelle connue pour sa propriété de fluorescence. Cette famille de fluorophores est caractérisée par un rendement quantique élevé de fluorescence (par exemple, le rendement quantique des coumarines 480 et 120 est de 58% et 45% dans l'EtOH à température ambiante [74]) et par des propriétés photophysiques et photochimiques très modulables. La coumarine possède une bonne photostabilité et est un excellent candidat du fluorophore pour le developpement des sondes fluorescentes [125].

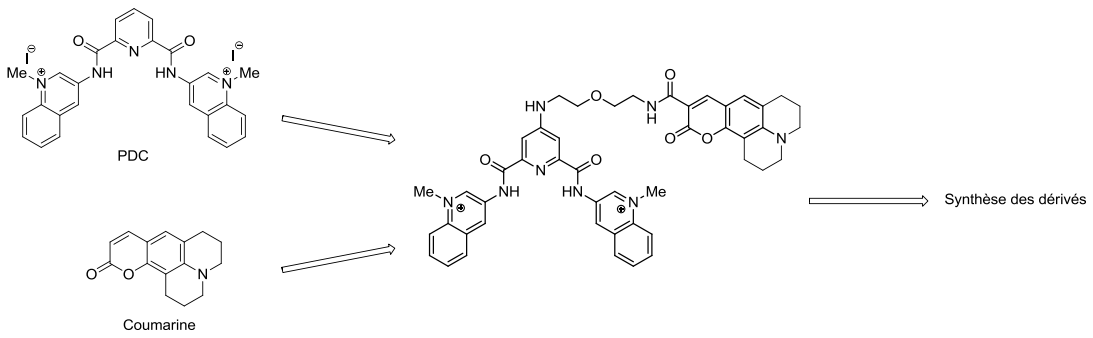


Figure 75. Série de sondes d'ADN quadruplex conçues sur la base du ligand PDC et du fluorophore coumarine.

Nous avons conçu cette librairie de sondes fluorescentes PDC-coumarine en se basant sur le mécanisme d'inhibition de fluorescence par le transfert d'électron photo induit (PET), qui est différent du mécanisme de la fluorescence de styryle basé sur l'inhibition de la rotation intramoléculaire. Le phénomène du PET a été largement utilisé pour la conception des sondes d'architecture chromophore-espaceur-récepteur (cf. 1.5.2) [126]. Le signal de ces sondes dépend de la reconnaissance moléculaire qui peut inhiber ou déclencher le processus PET entre un chromophore et un récepteur liés de manière covalente, conduisant à l'augmentation («light up»), ou à l'extinction («light off») de la fluorescence [127].

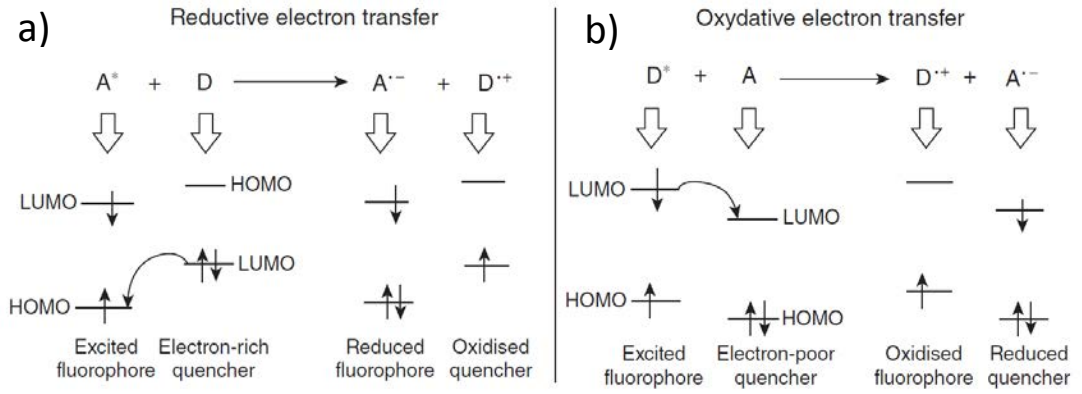


Figure 76. Illustration des transferts d'électron a) réducteur et b) oxydant (image extraite de réf [74]).

Un dérivé de coumarine, le 4-[(Bis(pyridin-2-ylméthyl)amino)méthyl]-7-methoxychromen-2-one (page 36, Figure 31) est un bon exemple de sonde PET qui correspondant au transfert d'électron réducteur (Figure 76, a).

Un autre exemple de l'extinction de la fluorescence de la coumarine par le phénomène PET oxydant (Figure 76, b) entre la coumarine (donneur) et le viologène méthylé (accepteur) a été montré dans la littérature [128], et prouvé théoriquement en utilisant l'équation de Weller [129]. Qui démontre la faisabilité du PET sous condition $\Delta G_{Et} < 0$:

$$\Delta G_{Et} = E_{ox} - E_{red} - E_{00} - C$$

La variation d'énergie au cours du transfert d'électron peut être calculée à partir de valeurs du potentiel d'oxidation du donneur (E_{ox}), potentiel de réduction de l'accepteur (E_{red}), l'énergie d'excitation du fluorophore ($E_{00,}$ calculée à partir des longueurs maximales d'absorption et d'émission de la coumarine) et un terme électrostatique (C), qui dépend du solvant utilisé. La valeur de ΔG_{et} calculée pour la combinaison de la coumarine et le vilogène méthylé est négative, le phénomène PET est donc favorisé.

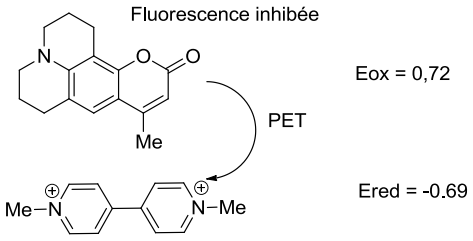


Figure 77. Exemple de PET entre la coumarine et le viologène méthylé [128].

Dans le cas des PDC-coumarines, la coumarine est reliée avec la squelette PDC par une chaîne polyéthylène glycol aminée. Nous supposons que dans les molécules de type PDC-coumarine, la fluorescence de la coumarine peut être inhibée par un transfert d'électron photo induit (PET) entre l'unité coumarine et l'unité quinoléinium du squelette PDC dont le potentiel de réduction est proche de celui du viologène méthylé. Dans ce cas, le donneur (coumarine) photo-excité (au lieu de revenir à son état fondamental par émission de la fluorescence) induit le transfert d'électron de l'orbitale LUMO de l'unité coumarine vers l'orbitale LUMO de l'unité PDC. L'électron ne peut ainsi pas revenir à l'état fondamental de la coumarine. Cela provoque l'extinction de la fluorescence de la coumarine. L'interaction de la partie PDC avec le G-quartet terminal de l'ADN quadruplex via empilement π - π pourrait changer le potentiel redox correspondant au niveau d'énergie le plus élevé du récepteur PDC. Le transfert d'électron devient donc moins favorable, ce qui rétablit la fluorescence de la coumarine (Figure 78).

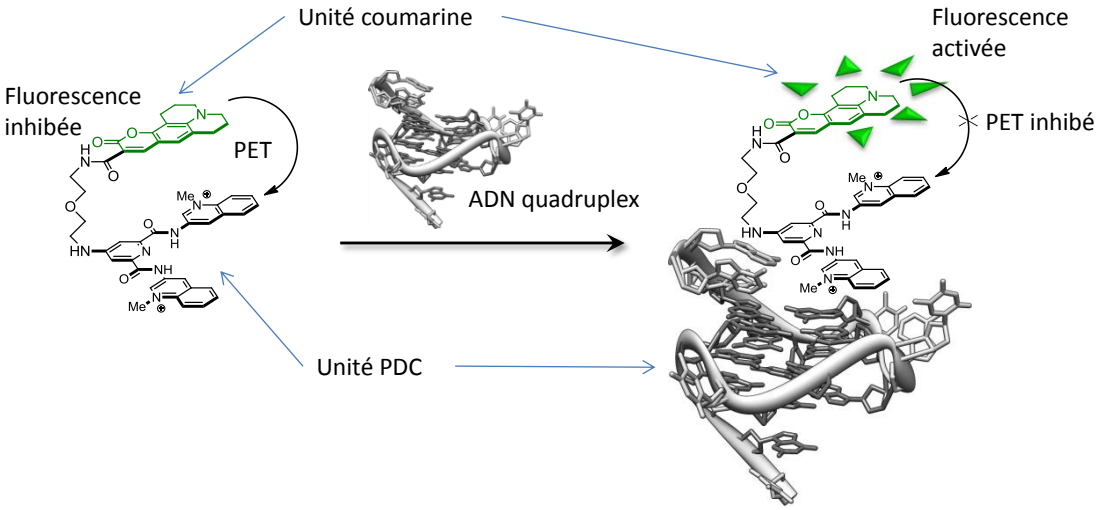


Figure 78. Principe du fluorophore PDC-coumarine.

2.3.2 Synthèse

2.3.2.1 Fluorophores de type PDC-coumarine

Cinq sondes fluorescentes de type PDC-coumarines ont été synthétisées et possèdent la même unité PDC mais différents groupements coumarines et espaceurs (Figure 79).

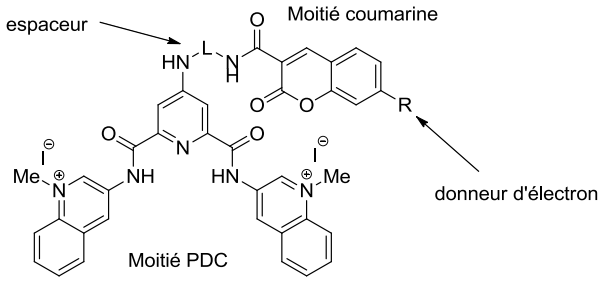


Figure 79. Structure générale des PDC-coumarines.

2.3.2.2 Synthèse du PDC-Cl

Le PDC-Cl est obtenu en deux étapes à partir de l'acide chélidamique. La première étape est une chloration sur les deux fonctions acides et la fonction oxo de l'acide chélidamique, par le chlorure de thionyle. L'intermédiaire obtenu est ensuite mis en réaction avec la 3-aminoquinoléine pour obtenir le PDC-Cl (Schéma 15).

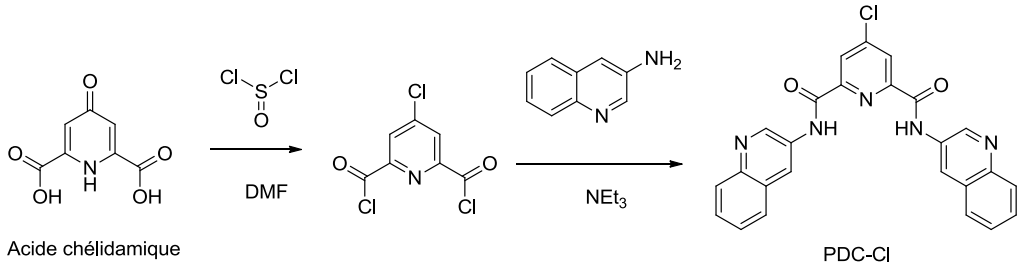


Schéma 15. Synthèse du PDC-Cl.

2.3.2.3 Synthèse des esters activés des acides coumarine-3-carboxyliques

Des esters activés des acides coumarine-3-carboxyliques ont également été synthétisés en deux étapes. D'abord une réaction de Knoevenagel entre un salicylaldéhyde 4-substitué et le diméthyl malonate en présence de la pipéridine utilisée comme base est réalisée. L'acide obtenu est ensuite mis en réaction avec le N-hydroxysuccinimide (NHS) pour obtenir les esters activés (Schéma 16).

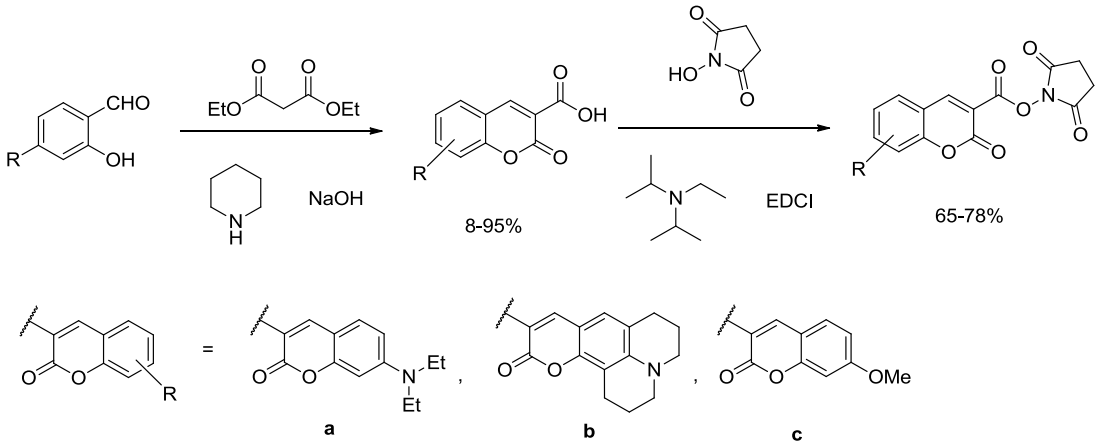


Schéma 16. Synthèse des esters activés des acides coumarine-3-carboxyliques.

2.3.2.4 Synthèse des PDC-coumarines

Trois dérivés PDC-coumarines (**PC1-a**, **PC2-a**, **PC3-a**) ont été synthétisés avec la même squelette PDC et le même espaceur (Schéma 17), mais avec trois groupements coumarines différents, pour évaluer les propriétés de la fluorescence des sondes possédant différentes coumarines.

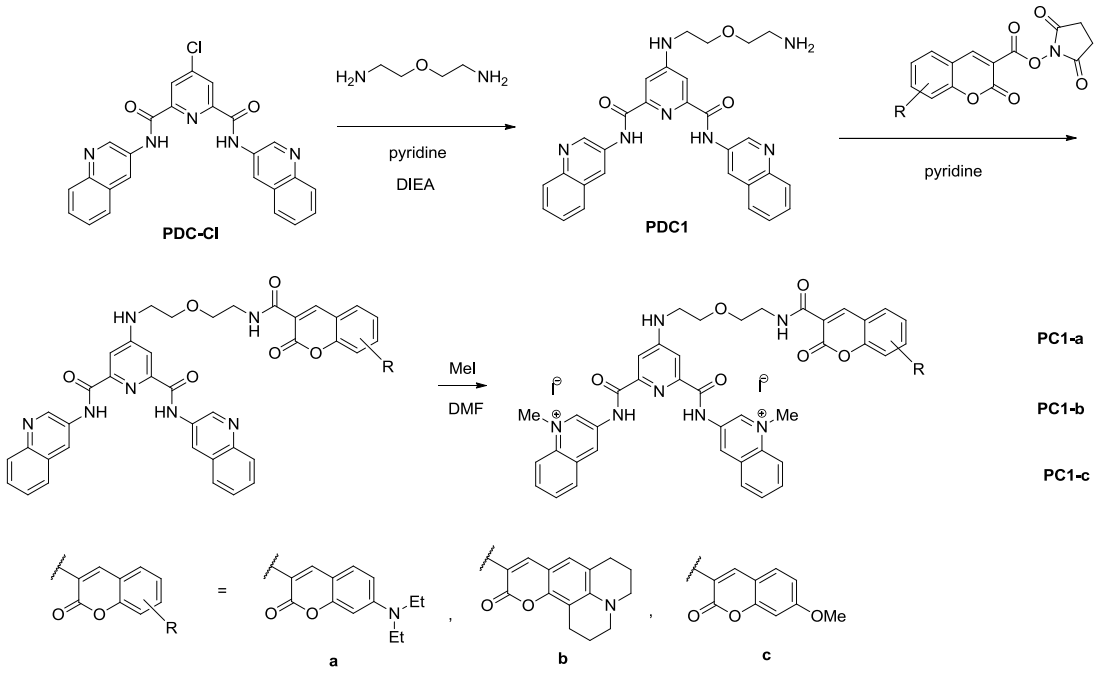


Schéma 17. Synthèse des PDC-coumarines avec des motifs coumarines différentes.

L'intermédiaire commun, le **PDC1** a été obtenu par une réaction de substitution (S_NAr) entre le PDC-Cl et le 2,2'-oxydiéthanamine, suivie d'une réaction de couplage avec différents esters activés des acides coumarine-3-carboxyliques. Les trois PDC-

coumarines ont été obtenus par une réaction de méthylation des azotes des groupements quinoléines des composés obtenus dans la dernière étape.

Deux autres sondes de PDC-coumarine possédant la même squelette coumarine que le **PC1-a**, mais des différents espaceurs (Schéma 18) ont été synthétisées par des méthodes précédentes décrites, pour étudier l'influence de la distance entre la squelette PDC et la squelette coumarine, sur leurs propriétés de fluorescence en se complexant avec l'ADN quadruplex.

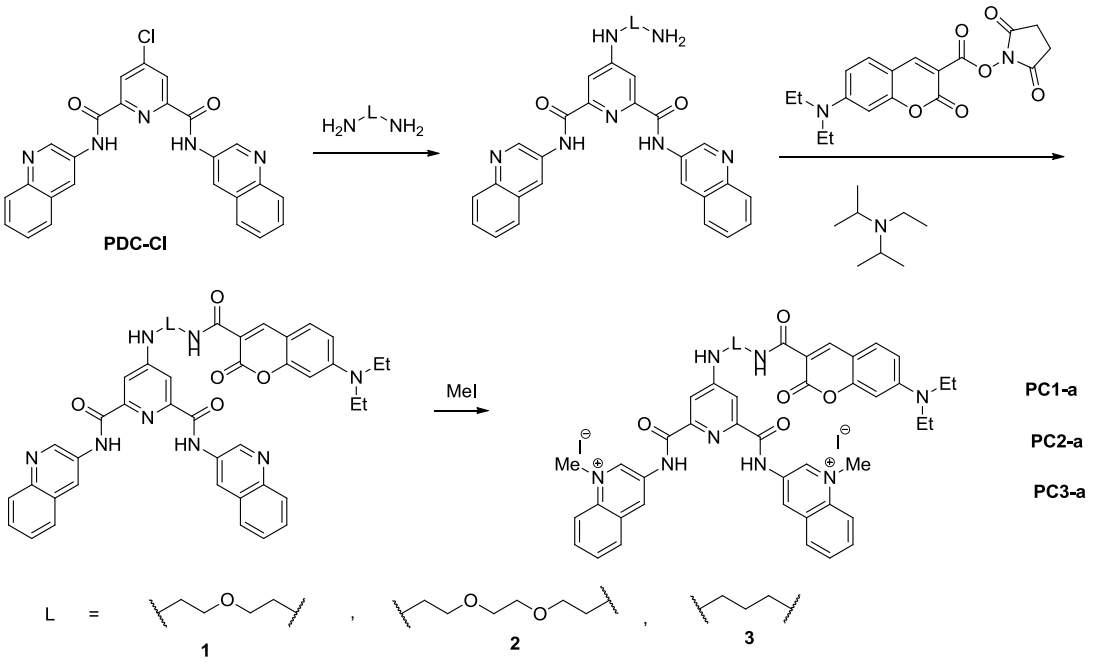


Schéma 18. Synthèse des PDC-coumarines avec différents espaceurs.

2.3.3 Etudes de l'interaction des PDC-coumarines avec l'ADN

2.3.3.1 Etude de l'interaction du PC1-b avec l'ADN quadruplex et le double-brin

Les propriétés de fluorescence du **PC1-b** ont été étudiées en présence d'ADN quadruplexes 22AG et C-kit87up ainsi que l'ADN natif double-brin (CT ADN) (Figure 80).

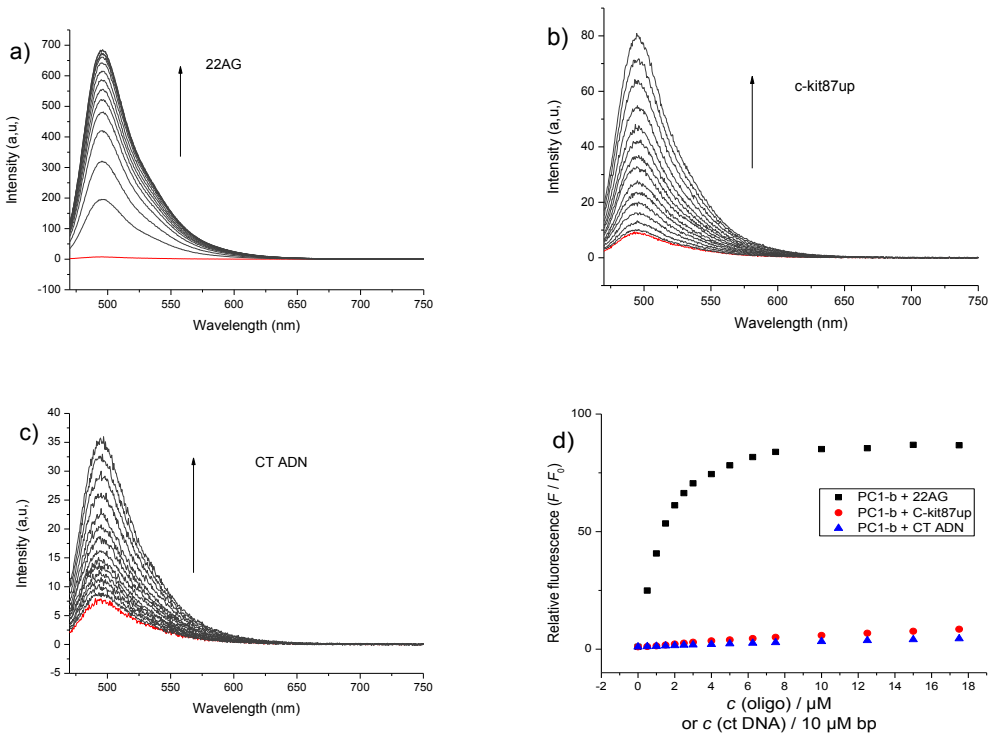


Figure 80. Titrations fluorimétriques de **PC1-b** (c = 2.5 µM) par a) 22AG, b) C-kit87up (ADN quadruplex, jusqu'à 17.5 µM) et c) CT ADN (ADN natif, jusqu'à 175 µM bp) ; λ_{ex} = 440 nm, les courbes rouges représentent les spectres du ligand sans ADN, les flèches indiquent l'augmentation de la fluorescence pendant les titrations. d) Isothermes de titration en fonction de la concentration de l'ADN.

Dans ces trois cas nous avons observé une augmentation de l'intensité de fluorescence. La fluorescence de **PC1-b** est augmentée jusqu'à 87 fois en présence d'ADN quadruplex 22AG, mais seulement de 9 et 5 fois en présence d'ADN quadruplex (c-kit87up) et d'ADN double-brin (CT ADN) respectivement. Cela montre que le **PC1-b** est sélectif pour le quadruplex 22AG.

2.3.3.2 Etudes de PDC-coumarines avec des motifs coumarines différentes

Nous avons ensuite comparé les trois PDC-coumarines avec des motifs coumarines différents à l'aide de titrations fluorimétriques avec l'ADN quadruplex 22AG (Figure 81).

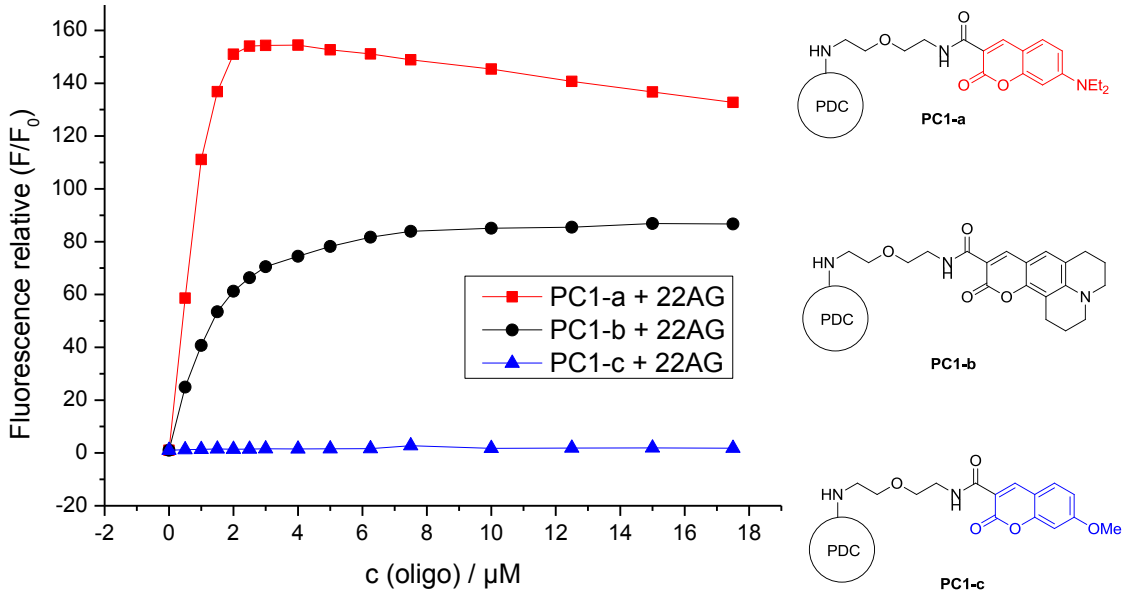


Figure 81. Titrations fluorimétriques du 22AG aux solutions de sondes **PC1-a**, **PC1-b** et **PC1-c** (c = 2.5 µM dans tampon, λ_{ex} = 420 nm pour **PC1-a**, 440 nm pour **PC1-b** et 353 nm pour **PC1-c**).

La fluorescence du **PC1-a** est largement augmentée (jusqu'à 150 fois) en présence de l'ADN quadruplex 22AG. La fluorescence de **PC1-b** est également augmentée jusqu'à 87 fois avec le 22AG. En même temps, l'intensité de la fluorescence du complexe **PC1-b** avec 22AG est beaucoup plus forte que celle du **PC1a**-22AG (environ 2 fois), car l'intensité de la fluorescence intrinsèque de **PC1-b** est environ trois fois plus élevée que le **PC1-a**.

Contrairement aux **PDC1-a** et **PDC1-b**, la fluorescence du **PC1-c** est augmentée par moins de 2 fois avec le 22AG et le CT ADN. Ceci démontre l'influence de la densité électronique de la partie coumarine sur les propriétés de la fluorescence (intrinsèque et en présence de l'ADN quadruplexe). La densité électronique de la fonction coumarine dans **PDC1-c** est moins importante que dans les cas du **PC1-a** et du **PC1-b**.

2.3.3.3 Etude des PDC-coumarines avec différents espaceurs

La fluorescence du **PC1-a**, **PC2-a** et **PC3-a** en présence d'ADN quadruplex 22AG a été étudiée pour établir l'influence de longueur d'espaceur sur les propriétés de la fluorescence (Figure 82).

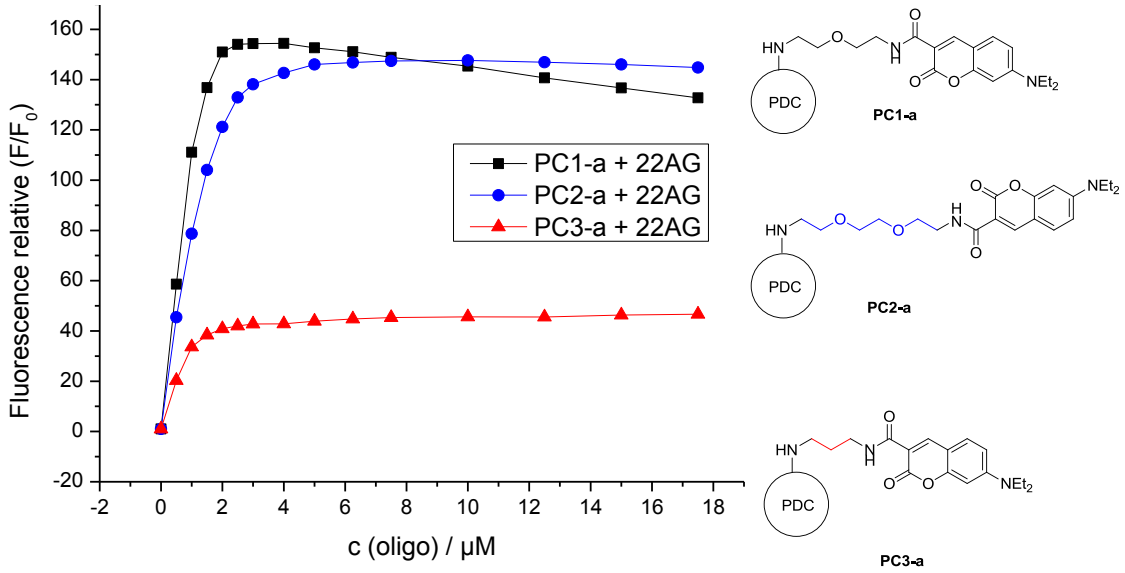


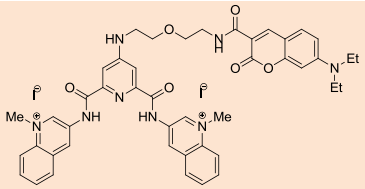
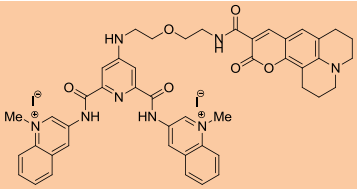
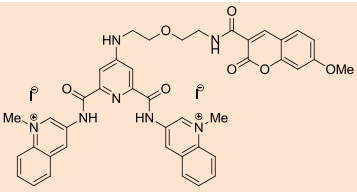
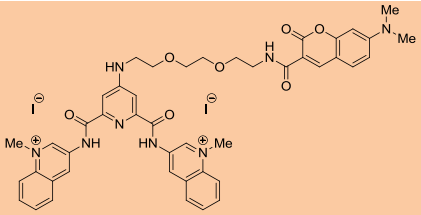
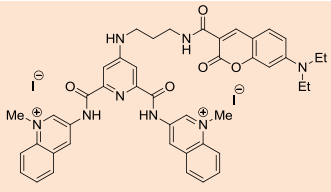
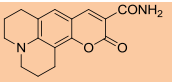
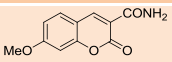
Figure 82. Titrations fluorimétriques de 22AG aux solutions de sondes **PC1-a, PC2-a** et **PC3-a** (*c* = 2.5 µM dans le tampon, λ_{ex} = 460 nm pour **PC1-a,** 450 nm pour **PC2-a** et **PC3-a).**

Les courbes d'exaltation de la fluorescence en présence de 22AG sont assez similaires pour le **PC1-a** et le **PC2-a**, avec des facteurs d'augmentation de 133 et 145 respectivement en présence de sept équivalents de 22AG. Quant au **PC3-a** qui possède un espaceur plus court que ceux du **PC1-a** et du **PC2-a**, le facteur d'augmentation de la fluorescence est de 47 en présence de sept équivalents de 22AG, ce qui est plus faible par rapport aux **PC1-a** et **PC2-a**. Cette valeur de faible augmentation est due à sa fluorescence intrinsèque qui est presque trois fois plus élevée par rapport à ces analogues avec différents espaceurs. Cela peut être expliqué par le phénomène du PET moins favorable dans le cas du **PC3-a** comparé à ces analogues. Nous supposons qu'une distance minimale entre l'unité coumarine (donneur) et la fonction quinoléinium (accepteur) de l'unité PDC est nécessaire pour assurer le bon positionnement des deux parties et induire le phénomène du PET. Ces résultats démontrent que la longueur de l'espaceur joue un rôle important sur le phénomène du PET.

2.3.3.4 Résumé des études fluorimétriques de cinq sondes

Les cinq PDC-coumarines synthétisés ont été analysés avec les trois ADN quadruplexes (22AG, C-kit87up) et double-brin (CT ADN) pour étudier leur sélectivité vis-à-vis des ADN quadruplexes. Les résultats sont représentés ci-dessous (Tableau 14).

Tableau 14. Facteurs d'augmentation de la fluorescence des sondes (*c* = 2,5 µM) en présence de sept équivalents d'ADN, et les rendements quantiques des sondes.

Colorant	Structure	F/F_0 (7 éq)			ϕ_F (sans ADN)
		22AG	C-kit87up	CT ADN	
PC1-a		133	50	4,3	0,04%
PC1-b		87	8,5	4,5	0,12%
PC1-c		2	n/d	2,2	0,13%
PC2-a		145	81	7.9	0,05%
PC3-a		47	65	3,7	0,11%
C2					87%
C3					69%

Les rendements quantiques de fluorescence des PDC-coumarines sont compris entre 0.04 et 0.13%, ce qui est très faible par rapport aux coumarines « modèles » qui sont très fluorescentes (ϕ = 87% pour le **C2** et 69% pour le **C3**). Cela signifie que la fluorescence des parties coumarines des PDC-coumarines est effectivement inhibée par le phénomène du PET vers la partie PDC.

Le **PC1-a** présente un facteur de sélectivité de 30 pour l'ADN quadruplex 22AG comparé à l'ADN double-brin (CT ADN), et un facteur de 12 pour l'ADN quadruplex C-kit87up. Il s'agit d'une sonde sélective pour les ADN quadruplexes. Ses analogues **PC2-a** et **PC3-a** présentent des propriétés de fluorescence similaires et une sélectivité pour les ADN quadruplexes.

Le **PC1-b** possède un bon facteur de sélectivité (20) pour le 22AG versus CT ADN. En même temps, sa réponse fluorimétrique vis-à-vis d'autre structure quadruplex (c-kit87up) est plutôt faible (F/F_0 = 8,5). La sonde est donc capable de distinguer les différents ADN quadruplex, 22AG et C-kit87up. Ce résultat bien qu'inattendu nous a motivé à étudier l'interaction de **PC1-b** avec d'autres ADN quadruplexes, double-brins et simple-brins pour vérifier sa sélectivité sur certains ADN quadruplexes (Figure 83).

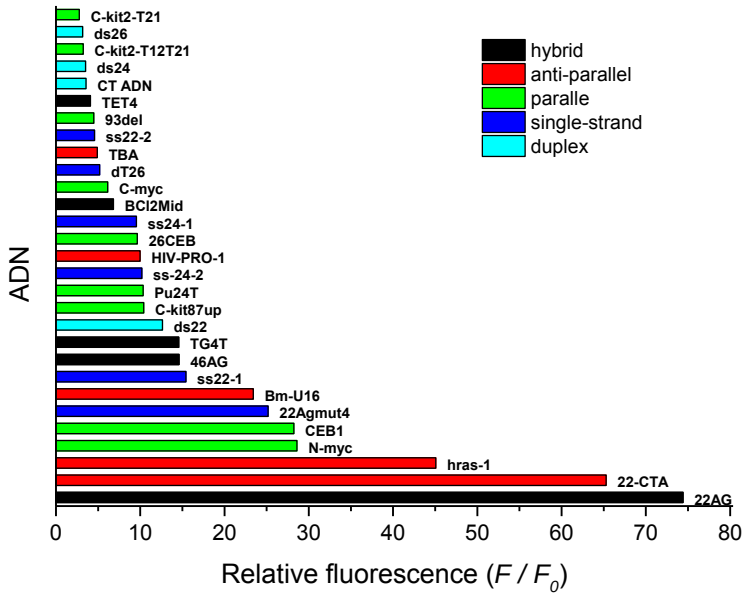


Figure 83. Mesures de la fluorescence du **PC1-b** (2,5 µM) en présence de 29 structures d'ADN quadruplexes, double-brins et simple brins (5 µM).

En effet, **le PC1-b** est sélective pour certains structures d'ADN quadruplex, avec un facteur d'augmentation de la fluorescence de 74 et de 65 en présence d'ADN quadruplex 22AG et 22-CTA, et 45 en présence de Hras-1. Les autres structures d'ADN représentent un facteur inférieur à 30, comme les ADN quadruplexes C-kit2-T12T21 et C-kit2-T21, les ADN double-brins ds24 et ds26, et l'ADN natif CT ADN, qui ont des valeurs de facteurs compris entre 2 et 4. Ce qui prouve la bonne sélectivité du **PC1-b** pour certaines structures d'ADN. En effet, les structures de 22CTA et Hras sont anti-parallèles (cf. Tableau A1), tandis que le quadruplex télomérique 22AG est connu pour changer la conformation de hybride en anti-parallèle en présence de ligands.

2.3.4 Conclusion

Nous avons réussi à introduire le fluorophore dans le ligand PDC pour obtenir des nouvelles sondes fluorescentes de l'ADN quadruplex. Cette conception est innovante, car elle est basée sur le phénomène du PET, tandis que les autres sondes d'ADN quadruplex sont sur le principe de l'inhibition de la rotation. Elle nous permet potentiellment de conserver l'affinité et la sélectivité du PDC et les bonnes propriétés spectrales des coumarines afin de compléter l'ensemble des sondes fluorescentes de l'ADN quadruplexe « light-up ».

3 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

3.1 Conclusions

Les G-quadruplexes représentent une forme secondaire d'ADN dont l'importance et les effets biologiques ne sont pas encore déchiffrés. Leur présence dans les cellules humaines a été démontrée à l'aide d'anticorps artificiels spécifiques à ces structures, et par l'identification de protéines ou d'enzymes, qui jouent un rôle important dans la reconnaissance de ces structures ou dans leur déroulement. Néanmoins, les preuves de présence de structures quadruplexes *in vivo* restent indirectes dans la plupart des cas. La recherche des sondes moléculaires pouvant signaler la présence de G-quadruplex représente donc un grand intérêt. Notamment, les sondes fluorescentes de type « *light-up* » pour l'ADN quadruplex sont très recherchées en raison de la sensibilité et la simplicité de mise en œuvre de la microscopie de fluorescence. Dans ce contexte, la microscopie biphotonique présente des avantages en termes de résolution spatiale supérieure par rapport à la microscopie « classique ». De plus, ces sondes peuvent offrir un grand intérêt pour analyse du polymorphisme des G-quadruplexes.

Le but de cette thèse était de développer des sondes fluorescentes de type « light-up » capables de détecter les structures d'ADN quadruplex *in vitro* et, si c'est possible, en milieu cellulaire. Pour cela, nous nous sommes inspirés du PDC-360A, un ligand sélectif ayant une bonne affinité vis-à-vis des structures d'ADN quadruplexes mais en revanche, non-fluorescent. En s'inspirant de cette molécule et du motif styryle, connu pour ses propriétés spectroscopiques, nous avons conçu et préparé des colorants distyryles, avec une structure qui ressemble à celle du PDC, tout en gardant les propriétés spectroscopiques des styryles. Une deuxième série de sondes, les PDC-coumarines, a été conçue et préparée afin d'introduire le fluorophore coumarine dans le squelette PDC par une liaison covalente. Ces deux séries de sondes fluorescentes sont basées sur les mécanismes d'extinction/exaltation de fluorescence différents : la limitation de rotation intramoléculaire dans le cas des styryles et le transfert de charge photoinduit dans le deuxième cas.

L'interaction des sondes synthétisées avec les différentes structures de l'ADN *in vitro* a été étudiée par spectroscopie d'absorption et fluorescence, soit par des titrations en cuves, soit par le criblage sur les microplaques afin d'évaluer la capacité des sondes de signaler les G-quadruplexes. Certaines sondes synthétisées ayant des bonnes propriétés spectroscopiques ont été également explorées dans l'imagerie cellulaire et bactérienne.

Colorants styryles : Les styryles sont relativement aisés à synthétiser et possèdent une large gamme au niveau de leurs spectre d'absorption (du jaune jusqu'au rouge foncé) et d'émission de fluorescence, en fonction de leurs structures et de leurs groupement fonctionnels (donneur et accepteur d'électrons). Ils possèdent des propriétés optiques non-linéaires (absorption à deux photons) assez importantes, comme c'était démontré dans le cas du **1j**.

Nos résultats indiquent que la géométrie du colorant joue un rôle essentiel sur l'affinité et la sélectivité des colorants vis-à-vis de structure d'ADN et les propriétés spectrales. Les dérivés 2,4-disubstitués sont structuralement plus proches du PDC-360A, et généralement plus sélectifs pour l'ADN quadruplex. Par contre, les dérivés 2,6-disubstitués ont une forme plus étendue et sont plus affins pour l'ADN double-brin. Parmis les colorants 2,4-disubstitués, plusieurs sondes ont une réponse fluorimétrique très élevée pour l'ADN et l'ARN quadruplex (F/F_0 de 100 à 690); néanmoins, cette réponse est difficile à rationaliser et à prédire, car il dépend, à la fois, de l'affinité du colorant pour la structure de l'ADN et du rendement quantique de fluorescence dans son complexe avec l'ADN (par rapport au colorant libre en solution). Le criblage fluorimétrique est donc indispensable pour l'identification de nouvelles sondes.

Le mode de liaison des colorants styryles avec l'ADN quadruplex peut être soit l'empilement sur le G-quartet terminal du G-quadruplex (comme le composé PDC-360A), soit l'insertion dans l'un des sillons du G-quadruplex. Nos résultats ne donnent pas assez d'information pour déduire avec certitude le mode de liaison. Pour connaître exactement leur mode de liaison, des études structurales plus détaillées sont nécessaires (RMN, RX).

Certains colorants styryles sont non seulement sélectifs pour les ADN quadruplexes par rapport à l'ADN double-brin, mais aussi pour l'un ou plusieurs ADN quadruplexes de topologies différentes. Cela nous a permis de faire une analyse multiplexe en utilisant une matrice de plusieurs colorants. Après une « calibration » de cette matrice à l'aide des nombreuses structures d'ADN connues, notre approche permet d'analyser la capacité d'une séquence d'ADN à former la structure d'ADN quadruplex et de prédire sa topologie.

Sondes PDC-coumarine : La conception des colorants de type PDC-coumarine est innovante, car elle est basée sur le phénomène du PET, tandis que les autres sondes de l'ADN quadruplex connues dans la littérature (y compris les colorants styryles) sont basées sur le principe de l'inhibition de la rotation intramoléculaire. Les sondes de ce type possèdent une bonne sélectivité pour les structures d'ADN quadruplexes de forme antiparallèles. Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'établir les origines de cette sélectivité et de confirmer le mécanisme de restauration de la fluorescence.

3.2 Perspectives

Les résultats de notre travail indiquent que les deux concepts moléculaires, c'est-à-dire les colorants styryles et les dérivés PDC-coumarine, sont efficaces et prometteurs pour la construction des sondes fluorescentes de l'ADN quadruplex. Néanmoins, le développement plus en profondeur des sondes et de leurs applications nécessite des données structurales concernent leur mode de fixation sur l'ADN quadruplex. Dans ce contexte, les expériences de la RMN de haute résolution peuvent fournir ces données. Les colorants distyryles avec une chaîne cationique (**1a(2)**, **1a(3)**, **1a(6)**) ont une bonne solubilité dans l'eau et peuvent être utilisés pour ces études.

Grâce aux propriétés optiques non-linéaires des colorants distyryles, des expériences d'imagerie en microscopie biphotonique peuvent être envisagées.

L'analyse multiplexe à l'aide de matrice de colorants mise en œuvre dans le cadre de cette thèse peut être utilisé pour l'analyse topologique des ADN quadruplexes et pour l'identification de séquences formant les G-quadruplexes. Cette technique pourrait

trouver une application pour le criblage de plusieurs échantillons d'ADN avec un haut débit, par exemple, à l'aide de technologie de puces d'ADN.

Des études d'imagerie cellulaire et bactérienne de certains colorants sont envisagées dans le futur dans la tentative de visualiser la présence d'ADN quadruplex *in vivo* avec une meilleure résolution spatiale.

Enfin, les sondes fluorescentes synthétisées dans le cadre de ce travail constituent une « fluorothèque » de sondes biocompatibles et hydrosolubles, qui pourrait potentiellement servir à la détection d'autres analytes (protéines, ARN etc.) que l'ADN quadruplex.

4 PARTIE EXPÉRIMENTALE

4.1 Analyses

4.1.1 Généralités

Les oligonucléotides de l'ADN ou l'ARN synthétiques ou l'ADN natif (ADN de thymus de veau, ct ADN) ont été achetés chez Eurogentec et utilisés sans purification supplémentaire. Les fluorophores synthétisés ont été dissouts dans du DMSO, aux concentrations entre 1 et 4 mM, et conservés à -20 °C. Les dilutions intermédiaires de 100 à 1000 µM dans DMSO ont été réalisées en fonction de l'expérience.

4.1.2 Analyses cristallographiques[1]

Les cristaux de **1a** et **2a** pour l'analyse de diffraction des rayons X ont été obtenus par la recristallisation dans MeCN/H_2O. La température des cristaux a été maintenue à 100 K par un dispositif de refroidissement de Cryostream de série 700 avec une précision de ±1 K. Les données détaillées du cristal, les données de la collection, et le raffinement sont indiquées dans le Tableau 15 (page suivante).

[1] Effectuées en collaboration avec Régis Guillot (université Paris – Sud)

Tableau 15. Données cristallographiques et les détails de la structure de raffinement de **1a** et **2a**.

	1a	2a
Empirical formula	C26H30N3I	C26H30N3I
Formula weight	511.43	511.43
Temperature (K)	100(1)	100(1)
Wavelength (Å)	0.71069	0.71069
Crystal size (mm^3)	0.33 × 0.05 × 0.03	0.29 × 0.22 × 0.19
Space group	C2/c	P21/c
Unit cell dimensions		
a (Å)	33.521(5)	10.8426(2)
b (Å)	7.6222(9)	15.3225(4)
c (Å)	20.258(3)	14.4300(3)
α (°)	90	90
β (°)	115.762(3)	103.6990(10)
γ (°)	90	90
V ($Å^3$)	4661.7(10)	2329.14(9)
Z	8	4
Dcalc. (g cm^{-3})	1.457	1.458
Absorption coefficient (mm^{-1})	1.391	1.392
F(000)	2080	1040
Measured θ range	2.05 to 30.61°	1.96 to 36.42°
Reflection collected	24077	48746
Independent reflections (Rint)	6046 (0.0628)	11074 (0.0196)
Observed reflections [I > 2σ(I)]	3 321	9856
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1=0.0645, wR2=0.1536	R1= 0.0192, wR2= 0.0463
S	0.989	1.09
(Δρ)max; min [e $Å^{-3}$]	1.678; -2.096	0.800; -0.414

4.1.3 Titrations spectrophotométriques et spectrofluorimétriques

Les titrations des colorants synthétisés par les ADN ont été réalisées dans un tampon aqueux (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mM KCl, pH 7.2) en utilisant les cuves en quartz (longueur du trajet optique : 1 cm pour les spectres d'absorption, section transversale :

1 x 0,5 cm pour les spectres d'émission). Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectromètre Agilent 300 Bio à double faisceau avec une largeur de fente de 2 nm et la vitesse de scan entre 200 et 600 nm min^{-1}. Les spectres d'émission ont été enregistrés sur un fluorimètre HORIBA Jobin–Yvon FluoroMax-3 avec une largeur de fente comprise entre 2 et 5 nm et un temps d'intégration se trouvant entre 0,1 et 0,5 s. Les concentrations du colorant et de l'ADN sont respectivement de 2,5 et 5 µM dans chaque cuve.

4.1.4 Criblage fluorimétrique sur le lecteur de plaques

Les mesures de fluorescences de chaque puits ont été effectuées dans un tampon aqueux (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 100 mm KCl, pH 7.2) par un lecteur de plaque Fluostar Omega provenant de BMG Labtech. Une microplaque en quartz à 96 puits de Hellma Analytics a été utilisée pour ces mesures. Les concentrations du colorant et de l'ADN sont de 2,5 et 5 µM respectivement dans chaque puits. Les combinaisons de filtres sont montrées dans le Tableau 11.

4.1.5 Dénaturation thermique de l'ADN

Les profils de dénaturation thermique ont été enregistrés sur un spectromètre Bio Agilent 300 équipé d'un passeur de cuves à l'effet Peltier. Avant les mesures, les échantillons contenant 4 µM d'oligonucléotides dans un tampon aqueux (10 mM $LiAsMe_2O_2$, 90 mM LiCl, 10 mM KCl, pH 7,2) ont été chauffés à 90 °C, maintenues à cette température pendant 5 min, refroidis jusqu'à température ambiante, et les solutions mères des colorants ont été ajoutées pour avoir une concentration finale de colorant de 8 µM. Le cycle de mesure consiste à refroidir de la température ambiante à 10°C, en maintenant à 10 °C pendant 2 minutes, puis chauffé à 95 °C avec une vitesse de 0,2 °C min^{-1}, puis refroidi à 20 °C avec une vitesse de 0,4 °C min^{-1}. Les mesures d'absorbance ont été effectuées à λ = 295 nm (pour l'ADN quadruplex) ou λ = 260 nm (pour l'ADN double-brin) pendant les cycles du chauffage et du refroidissement. Les températures des transitions de l'ADN (T_m) ont été déterminées à partir des graphiques de dérivé de l'absorbance en fonction de la température (dA/dT).

4.2 Synthèse

4.2.1 Généralités

Les réactifs et produits chimiques ont été achetés chez Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Acros, et utilisés sans la purification supplémentaire. Les solvants ont été achetés chez SDD, et pour les manipulations nécessitant des conditions anhydres, purifiés et séchés selon les procédures standards.

Les analyses LC/MS ont été réalisées sur une chaîne HPLC Waters Alliance 2695, colonne Xterra MS C_{18} -5 µm, détection à barrette de photodiodes Waters (éluent A : 0.05% TFA dans H_2O, éluent B : MeCN, gradient de 10 à 100% de MeCN) ; spectrométrie de masse (ESI en mode positive) a été réalisée sur Water ZQ (source voltage 50-75 kV).

Les purifications par chromatographie sur gel de silice ont été effectuées sur un appareil Combiflash d'ISCO.

Les spectres RMN ont été enregistrés sur l'appareil Brucker Avance 300 (^{1}H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz) à 25°C, les déplacements chimiques sont indiqués en ppm (référence interne méthanol, δ_H = 3.34, δ_C = 49.5 ppm, pour D_2O, et TMS pour tous les autres solvants). Les multiplicités sont décrites de la façon suivante : s pour singulet, d pour doublet, t pour triplet, dd pour doublet de doublets, m pour multiplet. Les multiplets sont définis sur une plage de déplacement chimique.

Les microanalyses élémentaires des nouveaux produits ont été réalisées par le service de microanalyse, CNRS-ICSN, Gif-sur-Yvette, France.

Les points de fusion ont été mesurés sur un appareil Stuart melting point SMP 30.

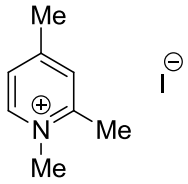
4.2.2 Synthèse des colorants styryles

4.2.2.1 Synthèse des précurseurs hétérocycliques

Protocole générale 1 : alkylation des dérivés de la pyridine

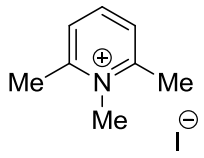
L'hétérocycle (50 mmol) et l'iodométhane (3,13 ml, 50,0 mmol) sont mélangés dans l'acétone (100 ml). Le milieu est porté au reflux pour 18 h, puis refroidi à la température ambiante. Le milieu est filtré, la poudre blanche est lavée à l'acétone, puis séchée sous vide.

Iodure de 1,2,4-triméthylpyridin-1-ium (XX-184, a)



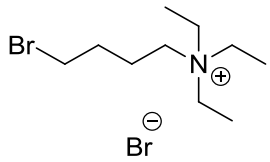
Synthèse selon le protocole 1. Rendement : 99%. Caractérisation en accord avec les données de la littérature [111].

Iodure de 1,2,6-triméthylpyridin-1-ium (b)



Synthétisé par Dr Anton GRANZHAN. Caractérisation en accord avec les données de la littérature [111].

Bromure de 4-bromo-N,N,N-triéthylbutan-1-ammonium (précurseur du bromure de 2,4-diméthyl-1-(4-(triéthylammonio)butyl)pyridin-1-ium XX-141)

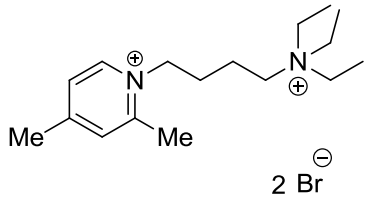


La triéthylamine (2,8 ml, 20,09 mmol) est mélangée avec le 1,4-dibromobutane (10 ml, 84 mmol) et agitée pendant 2 h 30 à 80 °C. Le milieu est refroidi à température

ambiante. La poudre blanche du bromure de 4-bromo-N,N,N-triéthylbutan-1-ammonium (5,8 g, 18,29 mmol, rendement : 91 %) est obtenue par une filtration puis lavée à l'acétate d'éthyle.

Caractérisation en accord avec les données de la littérature [130].

Bromure de 2,4-diméthyl-1-(4-(triéthylammonio)butyl)pyridin-1-ium (XX-142)



Le bromure de 4-bromo-N,N,N-triéthylbutan-1-ammonium (2,74 g, 8,65 mmol) est mis en suspension dans l'acetonitrile (25 ml), le milieu est porté au reflux, la 2,4-diméthylpyridine (1 ml, 8,65 mmol) est ajoutée, chauffée au reflux pendant 22 h, puis refroidie à la température ambiante. Le précipité blanc (0.6 g) est filtré puis lavé 2 fois avec CH_3CN, le filtrat est concentré et mis en suspension dans CH_3CN (10 ml), porté au reflux pendant 15 min en agitant, puis filtré et le précipité blanc est lavé avec peu de CH_3CN. Les deux fractions du bromure de 2,4-diméthyl-1-(4-(triéthylammonio)butyl)pyridin-1-ium (2,2 g, 5,19 mmol, rendement : 60 %) sont réunies.

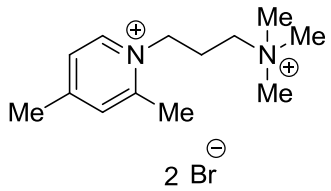
Point de fusion: 208-209 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.98 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.57 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 3.31 – 3.12 (m, 8H), 2.82 (s, 3H), 2.55 (s, 4H), 1.91 – 1.80 (m, 2H), 1.80 – 1.59 (m, 2H), 1.19 (t, *J* = 6.5 Hz, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 7.3 (CH_3), 18.3 (CH_2), 19.5 (CH_3), 21.1 (CH_3), 26.4 (CH_2), 52.2 (CH_2), 55.4 (CH_2), 55.7 (CH_2), 126.1 (CH), 130.1 (CH), 144.4 (CH), 154.0 (C_q), 158.2 ppm (C_q).

MS (ESI+): m/z (%): 132.7 (100) $[M]^{2+}$, 263.3 (47) $[M+H]^+$, 343.4 (60) $[M+Br]^+$.

Bromure de 2,4-diméthyl-1-(3-(triméthylammonio)propyl)pyridin-1-ium (XX-174)

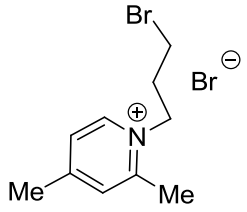


Le bromure de 3-bromo-N,N,N-triméthylpropan-1-ammonium (2,258 g, 8,65 mmol) est mis en suspension dans l'acétonitrile (25 ml), le milieu est porté au reflux, et est devenu homogène. La 2,4-diméthylpyridine (1 ml, 8,65 mmol) est ajoutée, et le milieu est chauffé au reflux 24 h. La suspension est concentrée sous vide jusqu'à 15 ml, puis filtrée, lavée 2 fois avec peu d'acétonitrile, séchée avec l'éther pour obtenir une poudre rose du bromure de 2,4-diméthyl-1-(3-(trimethylammonio)propyl)pyridin-1-ium (1,5 g, 4,07 mmol, rendement : 47 %).

Point de fusion: 221-222 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.97 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.69 – 4.43 (m, 2H), 3.52 (dd, *J* = 9.9, 6.5 Hz, 3H), 3.11 (s, 10H), 2.83 (s, 3H), 2.56 (s, 3H), 2.40 – 2.21 (m, 2H).

Bromure de 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(2,4-diméthylpyridin-1-ium) bromure (précurseur du 1-(3-(2,4-diméthylpyridin-1-ium-1-yl)propyl)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-1-ium, XX-186)

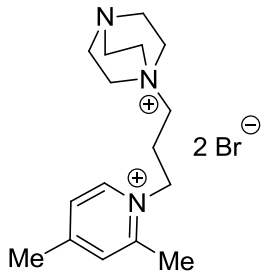


La 2,4-diméthylpyridine (5,39 ml, 46,7 mmol), le 1,3-dibromopropane (9,47 ml, 93 mmol), et le tetrabutylammonium iodure (0,431 g, 1,167 mmol) sont mélangés dans l'acétone (50 ml). Le milieu est porté au reflux 24 h. Le milieu est refroidi à température ambiante, puis filtré, lavé à l'acétone pour obtenir un solide blanc du bromure de 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(2,4-diméthylpyridin-1-ium) (2g, 4,81 mmol, rendement : 10 %).

Point de fusion: 225-226 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.81 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.78 – 4.71 (m, 2H), 3.65 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.66 (s, 4H), 2.60 – 2.43 (m, 2H).

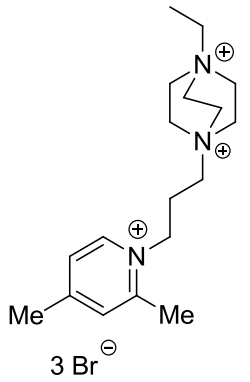
Bromure de 1-(3-(2,4-diméthylpyridin-1-ium-1-yl)propyl)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-1-ium (XX-188)



Le bromure de 1-(3-bromopropyl)-2,4-diméthylpyridin-1-ium (0,535 g, 1,731 mmol), et le 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (0,388 g, 3,46 mmol) sont mélangés dans l'acétonitrile (Volume: 20 ml). Le milieu est porté au reflux 16 h, la solution est versée dans l'éther, le précipité est filtré pour obtenir une poudre blanche très hydroscopique du bromure de 1-(3-(2,4-diméthylpyridin-1-ium-1-yl)propyl)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-1-ium (0,3 g, 0,712 mmol, rendement : 41 %).

^{1}H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.91 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.84 – 3.43 (m, 10H), 3.43 – 3.07 (m, 6H), 2.93 (s, 3H), 2.65 (s, 3H), 2.59 – 2.35 (m, 2H).

Bromure de 1-éthyl-4-(3-(4-méthylpyridin-1-ium-1-yl)propyl)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane-1,4-diium (XX-237)



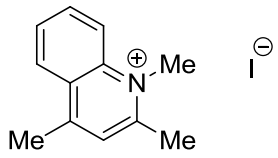
Le bromure de 1-(3-(2,4-diméthylpyridin-1-ium-1-yl)propyl)-1,4-

diazabicyclo[2.2.2]octan-1-ium (2 g, 4.75 mmol) et le bromoéthane (0.35 ml, 4.75 mmol) sont mélangés dans l'acétonitrile (50 ml). Le milieu est chauffé 18 h à 70 °C. Le précipité est filtré et lavé à l'éther pour obtenir le bromure de 1-éthyl-4-(3-(4-méthylpyridin-1-ium-1-yl)propyl)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane-1,4-diium (0.8 g, 1.5 mmol, rendement : 32%).

Point de fusion: 216-217 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.95 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.95 (s, 2H), 7.89 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 4.09 – 3.82 (m, 12H), 3.80 – 3.66 (m, 2H), 3.61 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.84 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.45 – 2.30 (m, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

<u>Iodure de 1,2,4-triméthylquinoléin-1-ium (XX-120)</u>

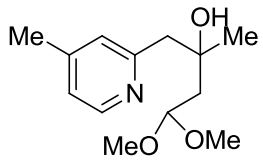


Synthèse selon le protocole 1. Rendement : 77%.

Point de fusion: 265-266 °C (lit. 254-256 °C [131]).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.57 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.45 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 8.20 (ddd, *J* = 8.7, 7.0, 1.3 Hz, 1H), 8.06 (s, 2H), 8.02 – 7.86 (m, 1H), 4.40 (s, 3H), 3.04 (s, 3H), 2.92 (s, 3H).

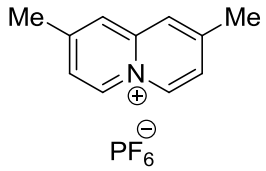
<u>Hexafluorophosphate(V) de 4,4-diméthoxy-2-méthyl-1-(4-méthylpyridin-2-yl)butan-2-ol (précurseur du 2,8-diméthyl-quinolizin-5-ium (XX-152)</u>



La 2,4-diméthylpyridine (3,49 ml, 30,2 mmol) est mise dans l'éther anhydre (18 ml), le phényllithium (15,85 ml, 31,7 mmol) dissous dans l'éther (Volume: 6 ml) est ajouté goutte à goutte dans la solution à 0 °C. Le milieu est agité à 0 °C pendant 10 min, puis la 4,4-diméthoxybutan-2-one (4,19 ml, 31,6 mmol) dissoute dans l'éther (Volume: 6 ml)

est ajoutée goutte à goutte dans la solution à 0 °C. Le milieu est agité pendant 1 h à la température ambiante puis versé dans un mélange d'eau-glace. Les phases sont séparées et la phase aqueuse est extraite à l'éther (3 x 100 ml). Les phases organiques réunies sont séchées par $MgSO_4$, puis concentrées sous vide pour obtenir un liquide rouge le hexafluorophosphate(V) de 4,4-diméthoxy-2-méthyl-1-(4-méthylpyridin-2-yl)butan-2-ol (5,1 g, 21,31 mmol, rendement : 68 %), utilisé pour la prochaine étape sans caractérisation.

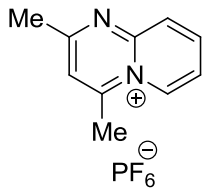
<u>Hexafluorophosphate(V) de 2,8-diméthylquinolizin-5-ium (XX-153, 5)</u>



Le 4,4-diméthoxy-2-méthyl-1-(4-méthylpyridin-2-yl)butan-2-ol (5,1 g, 21,31 mmol) est dissous dans l'anhydride acétique (10 ml). Le milieu est agité à 150 °C pendant 1 h, puis refroidi à température ambiante, et versé dans l'eau (10 ml). La solution est filtrée, l'ammonium hexafluorophosphate(V) (24,32 g, 149 mmol) est ajouté au filtrat, puis le précipité est filtré, lavé à l'eau puis séché à l'éther pour obtenir un solide marron le hexafluorophosphate(V) de 2,8-diméthylquinolizin-5-ium (2,6 g, 8,58 mmol, rendement : 40 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.88 (dd, *J* = 7.0, 1.6 Hz, 1H), 2.62 (s, 6H).

<u>Hexafluorophosphate(V) de 2,4-diméthylpyrido[1,2-a]pyrimidin-5-ium (XX-210, 7)</u>



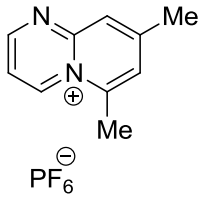
La 2-aminopyridine (1 g, 10,63 mmol) et la pentane-2,4-dione (1,312 ml, 12,75 mmol) sont mélangées dans l'acide phosphorique (10 ml, 10,63 mmol), le milieu est chauffé à 90 °C pendant 3 h, puis versé sur 60 g de glace. L'ammonium hexafluorophosphate(V) (6,93 g, 42,5 mmol) dissous dans un minimum de H_2O est ajouté dans le milieu, le

précipité blanc est filtré, lavé à l'eau puis séché à l'éther pour obtenir le hexafluorophosphate(V) de 2,4-diméthylpyrido[1,2-a]pyrimidin-5-ium (2,9 g, 9,53 mmol, rendement : 90 %).

Point de fusion: 207-208 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.25 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.62 (dd, *J* = 11.6, 4.1 Hz, 1H), 8.44 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.24 – 7.92 (m, 2H), 2.99 (s, 3H), 2.83 (s, 3H).

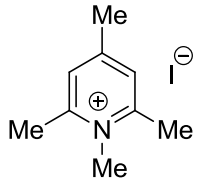
<u>Hexafluorophosphate(V) de 6,8-diméthylpyrido[1,2-a]pyrimidin-5-ium (XX-206, 8)</u>



La 4,6-diméthylpyridin-2-amine (1 g, 8,19 mmol), le 1,1,3,3-tetraéthoxypropane (2,355 ml, 9,82 mmol) et l'acide phosphorique (10 ml, 8,19 mmol) sont mélangés et chauffés à 90 °C pendant 3 h. Le milieu est versé sur 60 g de glace, le précipité brun est filtré, lavé à l'eau, puis séché à l'éther pour obtenir une poudre marron le hexafluorophosphate(V) de 6,8-diméthylpyrido[1,2-a]pyrimidin-5-ium (1.8 g, 5.92 mmol, rendement : 72 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.54 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 9.46 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.16 – 7.98 (m, 2H), 2.96 (s, 3H), 2.71 (s, 3H).

<u>Iodure de 1,2,4,6-tetraméthylpyridin-1-ium (XX-119)</u>

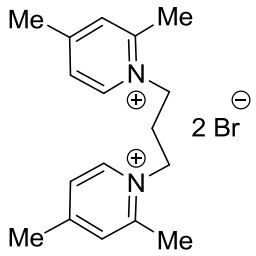


Synthèse selon le protocole 1 à partir de 2,4,6-triméthylpyridine. Rendement : 93%.

Point de fusion: 214-215 °C (lit. 213-215 [132]).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.78 (s, 1H), 4.01 (s, 2H), 3.37 (s, 1H), 2.76 (s, 3H).

Bromure de 1-(3-bromopropyl)-2,4-diméthylpyridin-1-ium (XX-186)

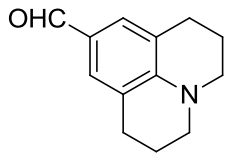


Le 2,4-diméthylpyridine (5,39 ml, 46,7 mmol), le 1,3-dibromopropane (9,47 ml, 93 mmol) et le iodure de tétrabutylammonium (0,431 g, 1,167 mmol) sont mélangés dans l'acétone (Volume: 50 ml). Le milieu est porté au reflux 24 h. Le milieu est refroidi à température ambiante, puis filtré. Le filtrat est concentré puis lavé avec l'éther pour obtenir une huile blanche le bromure de 1-(3-bromopropyl)-2,4-diméthylpyridin-1-ium (7 g, 22,65 mmol, rendement : 49 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.99 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.86 (dd, *J* = 6.5, 1.7 Hz, 1H), 4.78 – 4.57 (m, 2H), 2.84 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.45 – 2.33 (m, 1H).

4.2.2.2 Synthèse des aldéhydes aromatiques

Julolidine-9-carbaldéhyde (XX-133)

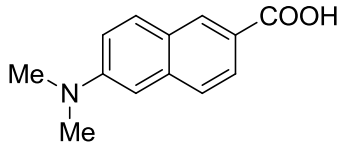


La 1,2,3,5,6,7-hexahydropyrido[3,2,1-ij]quinoléine (julolidine) (5,2 g, 30,0 mmol) est dissoute dans du DMF anhydre (7 ml), le milieu est dégazé sous vide pendant 10 min, le phosphoryl trichlorure (2,80 ml, 30,0 mmol) est ajouté goutte à goutte pendant 1h à 0 °C, puis le milieu est mis au reflux pendant 3 h. Le milieu noir est versé dans 40 ml d'eau-glace, refroidi au réfrigérateur pendant 16 h, filtré. Les cristaux noirs obtenus sont lavés à l'eau puis séchés sous vide pour donner le julolidine-9-carbaldéhyde (5,75 g, 28,6 mmol, rendement : 95 %).

Point de fusion: 81-82 °C (lit. 83 °C [133]).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 9.61 (s, 1H), 7.30 (s, 2H), 3.30 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H), 2.78 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H), 2.11 – 1.81 (m, 4H).

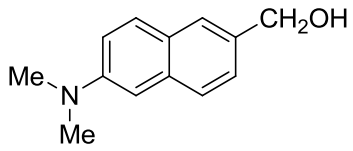
<u>Acide 6-(diméthylamino)-2-naphtoique (XX-105)</u>



L'acide 6-amino-2-naphtoique (6,925 g, 37,0 mmol) et le 37% formaldehyde (14,80 ml, 198 mmol) sont ajoutés dans l'acide acétique (20 ml) et dans le MeOH (200 ml), puis agités jusqu'à la dissolution complète. Le cyanoborohydrure de sodium (7,00 g, 111 mmol) est ajouté en petites portions en agitant dans un bain de glace pendant 2h 30 puis le MeOH a été enlevé sous vide. Le résidu est dissous dans 400 ml d'eau, le pH est ajusté entre 5 et 6 par $NaHCO_3$, et le mélange est extrait avec l'EtOAc (5 x 300 ml). Les phases organiques réunies sont lavées à l'eau, NaCl saturé, séchées avec Na_2SO_4, concentrées sous vide pour obtenir une poudre jaune l'acide 6-(dimethylamino)-2-naphtoique (8,0 g, 37,6 mmol, rendement : 100 %).

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.38 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 8.6, 1.5 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.26 (dd, *J* = 9.1, 2.3 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.05 (s, 6H).

<u>(6-(Diméthylamino)naphtalen-2-yl)méthanol (XX-108)</u>

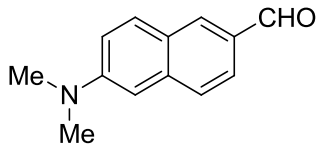


L'acide 6-(diméthylamino)-2-naphthoique (0,538 g, 2,5mmol) est mis en suspension dans le THF anhydre (Volume: 5 ml) sous argon. Le borane dans THF (3,13 ml, 3,13 mmol) est ajouté par une seringue pendant 1 h à 0 °C et le milieu devient homogène. La solution est agitée pendant 6 h puis un excès du borane dans THF (3,13 ml, 3,13 mmol) est rajouté. Après 48 h, le borane dans le THF (1,250 ml, 1,250 mmol) est rajouté. Après 4 h, le milieu réactionnel est traité avec de l'eau (10 ml) et saturé par le K_2CO_3 solide. La phase organique est séparée, la phase aqueuse est extraite avec l'éther (3 x 10 ml) et les phases organiques réunies sont lavées à l'eau et séchées avec Na_2SO_4. Le solvant est enlevé sous vide pour obtenir (6-(diméthylamino)naphtalen-2-

yl)methanol (0,46 g, 2,286 mmol, rendement : 91 %) sous forme d'une huile jaune pale.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.81 – 7.58 (m, 1H), 7.38 (dd, *J* = 8.5, 1.4 Hz, 1H), 7.17 (dd, *J* = 9.0, 2.6 Hz, 1H), 6.93 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 4.77 (s, 2H), 3.05 (s, 6H).

6-(Diméthylamino)-2-naphtaldéhyde (XX-122)

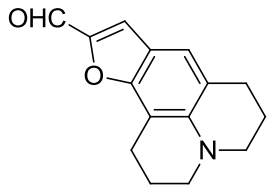


Le manganèse(IV) oxide (30 g, 345 mmol) est ajouté en portions (5 x 6 g) à une solution de (6-(diméthylamino)naphtalen-2-yl)méthanol (4,5 g, 22,36 mmol) dans CH_2Cl_2 pendant 1 h 20. Après une agitation pendant 30 min à température ambiante, le milieu est filtré, le solide est lavé au DCM, puis au MeOH, le filtrat est concentré sous vide, et le résidu (5,3 g) est purifié par chromatographie sur colonne (SiO_2 ; éluent : cyclohexane-DCM 40:60 à 90:10) pour obtenir un solide jaune, le 6-(diméthylamino)-2-naphtaldéhyde (2,2 g, 11,04 mmol, rendement : 49 %).

Point de fusion: 89-90 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 10.01 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.18 (dd, *J* = 9.1, 2.6 Hz, 1H), 6.88 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 3.13 (s, 6H).

1,2,3,5,6,7-Hexahydrofuro[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinoléine-10-carbaldéhyde(XX-244)



Le 8-hydroxy-julolidine-9-carbaldéhyde (2.5 g, 11.51 mmol), K_2CO_3 (6.36 g, 46 mmol), le 2-bromo-1,1-diéthoxyéthane (1.9 ml, 12.66 mmol) et KI (0.1g, 0.05 mol) sont mélangés dans le DMF (12 ml), le milieu est chauffé pendant 3h à 150 °C, puis versé sur la glace, neutralisé avec une solution saturée de NH_4Cl. La solution est extraite par EtOAc, les phrases organiques sont réunies et lavées avec H_2O, une solution saturée de NaCl, séchées par Na_2SO_4, puis filtrées et concentrées. Le solide obtenu est ensuite mis en réaction avec de l'acide sulfurique (4.5 g, 15 mmol) dans le THF (250 ml) pendant 16

h à température ambiante. Le milieu est dilué dans l'eau, et extrait par EtOAc. Les phases organiques sont réunies et concentrées. Le solide brut obtenu est purifié par la chromatographie sur gel de silice pour obtenir le 1,2,3,5,6,7-hexahydrofuro[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinoléine-10-carbaldéhyde (1,0 g, 4.15 mmol, rendement : 39%).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 11.81 (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 6.81 (s, 1H), 3.34 – 3.08 (m, 4H), 2.65 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H), 2.05 – 1.72 (m, 4H).

4.2.2.3 Synthèse des colorants styryles

4.2.2.4 Synthèse des di-styryles

Protocole générale 2 (réaction de Knoevenagel)

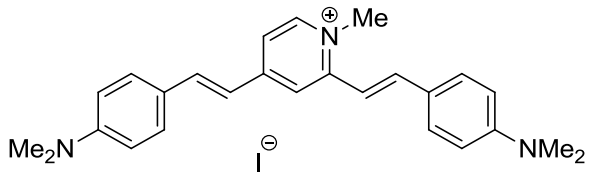
Le dérivé hétérocyclique (2,5 mmol), l'aldéhyde (7,50 mmol) et la pipéridine (0,495 ml, 5,00 mmol) sont mélangés dans l'éthanol (25 ml), le milieu est porté au reflux pendant 2 h 30 puis filtré au froid, le produit précipité est lavé à l'éthanol (2 x 5 ml), séché à l'éther et recristallisé dans de l'EtOH.

Certains iodures ou hexafluorophosphates de distyryles synthétisés ont été transformés en bromures (Br^-) ou chlorures (Cl^-) par un échange d'ions.

Échange d'ion en Br^- : le HBr est ajouté à un mélange d'acétonitrile (25 ml) et MeOH (25ml) contenant l'amberlite IRA-400(OH) (20 g) jusqu'à pH 3, puis mélangé pendant 12 h. Le solvant est enlevé et l'amberlite est lavée 2 fois à l'acétonitrile-MeOH (1-1, 10 ml). Le iodure de di-styryle brut obtenu est dissous dans l'acétonitrile-MeOH (1-1) et est passé par une colonne contenant l'amberlite préalablement préparée, la colonne est lavée avec acétonitrile-MeOH (1-1, 50 ml). Le solvant est enlevé sous vide et le résidu est recristallisé dans le MeOH.

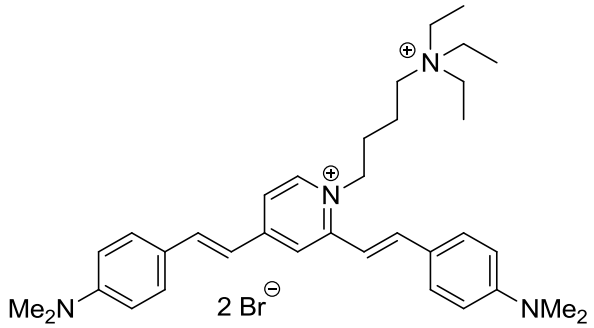
Échange d'ion en Cl^- : le iodure ou hexafluorophosphate de distyryle obtenu par le protocole général de di-styryle est dissous dans l'acétonitrile-MeOH (1-1) et passé par une colonne contenant l'amberlite 402 (Cl), la colonne est lavée avec acétonitrile-MeOH (1-1, 50 ml). Le solvant est enlevé sous vide et le résidu est recristallisé dans EtOAc-MeOH.

<u>iodure de 2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (AG-39, 1a)</u>



Synthétisé par Dr Anton GRANZHAN. Caractérisation en accord avec les données de la littérature [111].

<u>Bromure de 2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)-1-(4-(triéthylammonio)butyl)pyridin-1-ium (XX-144, 1a(2))</u>



Synthèse selon le protocole générale 2. Rendement : 60%.

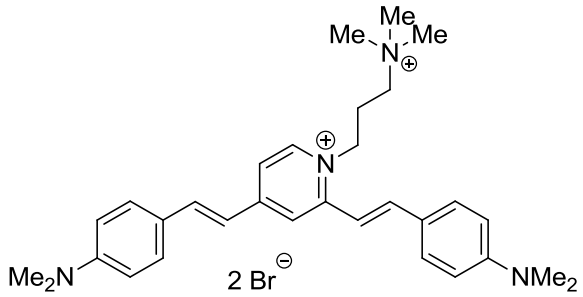
Point de fusion: 236-237 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, [D_6]DMSO):) δ 1.18 (t, J=7 Hz, 9H); 1.77–1.85 (m, 4H), 3.02 (s, 6 H), 3.03 (s, 6H), 3.20– 3.28 (m, 8H), 4.67 (t, J=7 Hz, 2 H), 6.80 (m, 4H), 7.16 (d, J=16 Hz, 1H), 7.23 (d, J=16 Hz, 1H), 7.60 (d, J=9 Hz, 2 H), 7.77 (d, J=9 Hz, 2H), 7.83 (dd, J=7.0, J=2 Hz, 1H), 7.95 (d, J=16 Hz, 1 H), 7.97 (d, J= 16 Hz, 1H), 8.42 (d, J=2 Hz, 1 H), 8.63 ppm (d, J=7 Hz, 1H).

^{13}C NMR (75 MHz, [D_6]DMSO): d=7.4 (CH_3), 18.4 (CH_2), 26.7 (CH_2), 52.5 (CH_2), 55.4 (CH_2), 55.7 (CH_2), 110.9 (CH), 112.0 (CH), 112.2 (CH), 117.8 (CH), 118.8 (CH), 119.7 (CH), 122.7 (C_q), 122.9 (C_q), 130.2 (CH), 130.8 (CH), 141.2 (CH), 143.6 (CH), 143.9 (CH), 151.9 (C_q), 152.0 (C_q), 152.2 (C_q), 152.4 ppm (C_q).

MS (ES+) : m/z 263.3 $[M]^{2+}$.

<u>Bromure de 2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)-1-(3-(triméthylammonio)propyl)pyridin-1-ium (XX-175, 1a(3))</u>



Synthèse selon le protocole générale 2. Rendement : 51%.

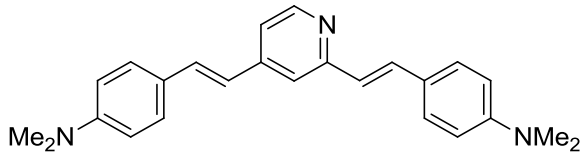
Point de fusion: 241-242 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.63 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.20 – 7.70 (m, 5H), 7.70 – 7.46 (m, 2H), 7.40 – 7.07 (m, 2H), 7.02 – 6.60 (m, 4H), 4.65 (brs, 2H), 3.54 (brs, 2H), 3.10 (s, 9H), 3.04 (s, 6H), 3.02 (s, 6H), 2.30 (brs, 2H).

Analyse calculée pour $C_{31}H_{42}Br_2N_4 \cdot 2H_2O$ (666.5) : C, 55.86 ; H, 6.96 ; N, 8.41 ; trouvée : C, 55.59; H, 6.98 ; N, 8.22 .

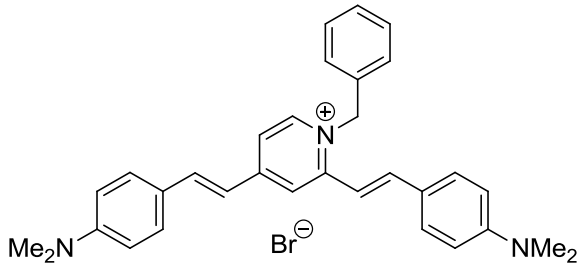
MS (ES+) : m/z 235.2 $[M]^{2+}$.

<u>4,4'-((1E,1'E)-Pyridine-2,4-diylbis(ethene-2,1-diyl))bis(N,N-dimethylaniline)</u>



Synthétisé par Dr Anton GRANZHAN.

<u>Bromure de 1-benzyl-2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)pyridin-1-ium (XX-194, 1a(4))</u>



Le 4,4'-((1E,1'E)-pyridine-2,4-diylbis(éthène-2,1-diyl))bis(N,N-diméthylaniline) (0,28 g, 0,758 mmol) et le (bromométhyl)benzène (0,180 ml, 1,516 mmol) sont mélangés dans

l'acétonitrile (Volume: 7 ml). La suspension jaune-orange est portée au reflux pendant 16 h. Le milieu est refroidi lentement à température ambiante. Les cristaux sont filtrés, puis recristallisés dans EtOH-$CHCl_3$ (3-1) pour obtenir le bromure de 1-benzyl-2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)pyridin-1-ium (0,23 g, 0,426 mmol, rendement : 56 %) sous forme de cristaux rouges foncés.

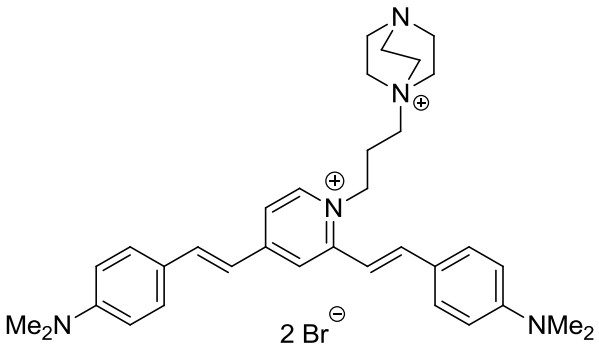
Point de fusion: 243-244 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.76 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.08 – 7.76 (m, 3H), 7.58 (t, *J* = 9.6 Hz, 4H), 7.46 – 7.25 (m, 5H), 7.17 (dd, *J* = 15.9, 8.5 Hz, 2H), 6.79 (dd, *J* = 11.3, 9.0 Hz, 4H), 5.90 (s, 2H), 3.02 (s, 3H), 3.02 (s, 3H).

Analyse calculée pour $C_{32}H_{34}BrN_3 \cdot 0.5H_2O$(549.54) : C, 69.94; H, 6.42 ; N, 7.65; trouvée : C, 69.70; H, 6.34; N, 7.60.

MS (ES+) : m/z 436.3 $[M]^+$.

<u>Bromure de 1-(3-(2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan-1-ium (XX-230, 1a(5))</u>



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 62%.

Point de fusion: 247-248 °C.

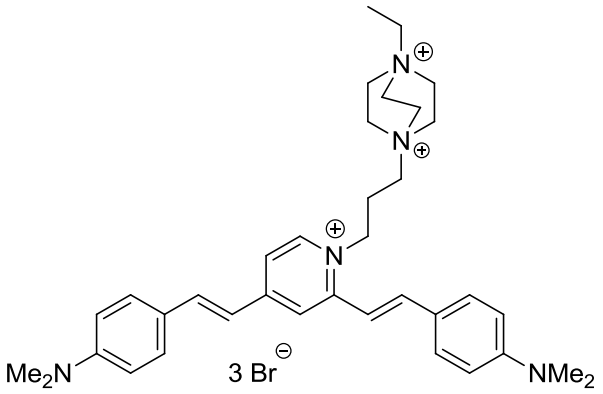
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.63 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.07 – 7.92 (m, 2H), 7.86 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.82 – 7.75 (m, 2H), 7.66 – 7.55 (m, 2H), 7.30 – 7.09 (m, 2H), 6.86 – 6.74 (m, 4H), 4.67 (brs, 2H), 3.55 – 3.39 (m, 3H), 3.32 – 3.25 (m, 6H), 3.14 – 2.84 (m, 18H), 2.28 (brs, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.31 (C_q), 151.98 (C_q), 151.82 (C_q), 151.76 (C_q), 143.77 (CH), 143.67 (CH), 141.07 (CH), 130.76 (CH), 129.86 (CH), 122.72 (C_q), 122.50 (C_q), 119.42 (CH), 118.55 (CH), 117.59 (CH), 112.04 (CH), 111.76 (CH), 110.48 (CH), 59.79 (CH_2), 52.57 (CH_2), 51.75 (CH_2), 44.65 (CH_2), 39.75 (CH_3), 21.67 (CH_2).

Analyse calculée pour $C_{34}H_{45}Br_2N_5 \cdot 2.5H_2O$ (728.56) : C, 56.05 ; H, 6.92 ; N, 9.61 ; trouvée : C, 56.18; H, 6.88 ; N, 9.52;

MS (ES+) : m/z 261.9 $[M]^{2+}$.

<u>Bromure de 1-(3-(2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)pyridin-1-ium-1-yl)propyl)-4-ethyl-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane-1,4-diium (XX-238, 1a(6))</u>



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 13%.

Point de fusion: 248-249 °C.

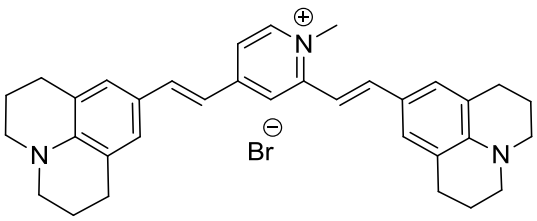
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.67 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.15 – 7.93 (m, 2H), 7.93 – 7.72 (m, 3H), 7.71 – 7.50 (m, 2H), 7.33 – 7.02 (m, 2H), 6.94 – 6.55 (m, 4H), 4.69 (brs, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.26 – 3.72 (m, 14H), 3.72 – 3.51 (m, 2H), 3.04 (s, 6H), 3.02 (s, 6H), 2.36 (brs, 2H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.32 (s), 151.97 (s), 151.87 (s), 151.75 (s), 143.81 (s), 141.10 (s), 130.89 (s), 129.88 (s), 122.75 (s), 122.54 (s), 119.41 (s), 118.54 (s), 117.60 (s), 112.03 (s), 111.74 (s), 110.41 (s), 60.11 (s), 59.24 (s), 52.17 (s), 50.73 (s), 49.89 (s), 22.73 (s), 7.53 (s).

Analyse calculée pour $C_{36}H_{50}Br_3N_5 \cdot H_2O$ (810.53) : C, 53.41 ; H, 6.35 ; N, 8.65 ; trouvée : C, 53.45; H, 6.61 ; N, 8.64.

MS (ES+) : m/z 316.6 $[M+Br]^{2+}$.

Bromure de 2,4-bis((E)-2-(1,2,3,5,6,7-hexahydropyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-136, XX-138,1b)



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ions en Br^-. Rendement : 62%.

Point de fusion: 247-248 °C.

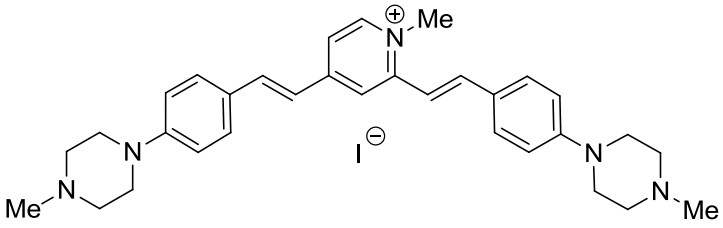
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.43 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.84 – 7.67 (m, 2H), 7.62 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.24 (s, 2H), 7.12 (s, 2H), 7.08 – 6.89 (m, 2H), 4.10 (s, 3H), 3.29 – 3.07 (m, 8H), 2.87 – 2.60 (m, 8H), 2.22 – 1.68 (m, 8H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.10 (C_q), 151.58 (C_q), 145.12 (C_q), 144.77 (C_q), 144.06 (CH), 142.96 (CH), 140.51 (CH), 127.99 (CH), 127.34 (CH), 121.69 (C_q), 121.41 (C_q), 120.73 (C_q), 120.63 (C_q), 117.78 (CH), 117.52 (CH), 116.57 (CH), 109.62 (CH), 49.26 (CH_2), 44.07 (CH_3), 27.14 (CH_2), 21.00 (CH_2).

Analyse calculée pour $C_{34}H_{38}BrN_3O_5 \cdot 0.5H_2O$ (577.6) : C, 70.7 ; H, 6.81 ; N, 7.27 ; trouvée : C, 70.79; H, 6.42 ; N, 7.01.

MS (ES+) : m/z 488.3 $[M]^+$.

Iodure de 1-méthyl-2,4-bis((E)-4-(4-méthylpipérazin-1-yl)styryl)pyridin-1-ium (XX-185 1c)



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 47%.

Point de fusion: 228-229 °C.

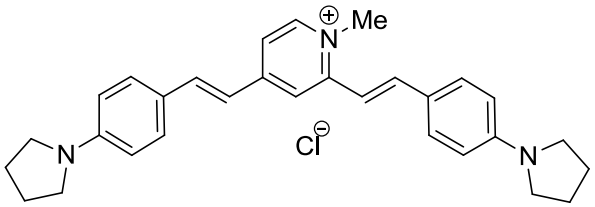
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.60 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.41 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.99 – 7.78 (m, 3H), 7.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.24 (dd, *J* = 21.7, 16.0 Hz, 2H), 7.04 (dd, *J* = 8.9, 1.9 Hz, 4H), 4.19 (s, 3H), 3.33 (s, 8H), 2.45 (s, 8H), 2.23 (s, 3H), 2.23 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.39 (s), 152.16 (s), 152.11 (s), 151.92 (s), 144.69 (s), 142.38 (s), 140.04 (s), 130.17 (s), 129.50 (s), 124.91 (s), 124.63 (s), 119.29 (s), 119.02 (s), 114.48 (s), 114.26 (s), 112.74 (s), 54.36 (s), 46.79 (s), 46.74 (s), 45.74 (s), 44.52 (s).

Analyse calculée pour $C_{32}H_{40}IN_5 \cdot 0.5H_2O$(630.61) : C, 60.95 ; H, 6.55 ; N, 11.11 ; trouvée : C, 60.91 ; H, 6.42 ; N, 11.40.

MS (ES+) : m/z 165.4 $[M+2H]^{3+}$.

<u>Chlorure de 1-méthyl-2,4-bis((E)-4-(pyrrolidin-1-yl)styryl)pyridin-1-ium (XX-197, 1d)</u>



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ions en Cl^-. Rendement : 65%.

Point de fusion: 248-249 °C.

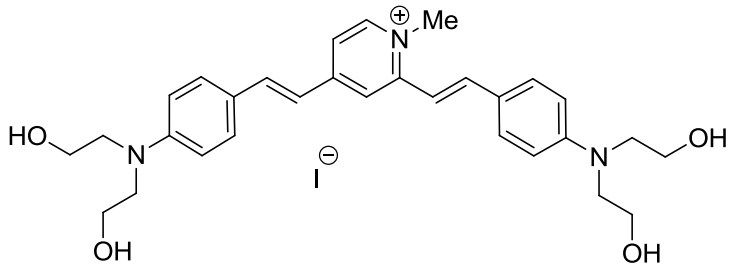
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.49 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.94 – 7.79 (m, 2H), 7.79 – 7.63 (m, 3H), 7.57 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.24 – 6.87 (m, 2H), 6.78 – 6.53 (m, 4H), 4.14 (s, 3H), 3.49 – 3.45 (m, 8H), 2.24 – 1.83 (m, 8H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.19 (C_q), 151.80 (C_q), 149.34 (C_q), 149.07 (C_q), 146.52 (C_q), 144.20 (CH), 142.92 (CH), 140.52 (CH), 130.54 (CH), 129.87 (CH), 122.16 (C_q), 121.92 (C_q), 118.39 (CH), 117.93 (CH), 116.87 (CH), 111.96 (CH), 111.82 (CH), 110.48 (CH), 47.29 (CH_2), 44.17 (CH_3), 24.92 (CH_2).

Analyse calculée pour $C_{30}H_{34}ClN_3 \cdot 0.5H_2O$ (480.06) : C, 72.91; H, 7.84 ; N, 7.97 ; trouvée : C, 73.21; H, 7.50 ; N, 7.61.

MS (ES+) : m/z 436.3 $[M]^+$.

<u>Iodure de 2,4-bis((E)-4-(bis(2-hydroxyéthyl)amino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-202, 1e)</u>



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 53%.

Point de fusion: 150-151 °C.

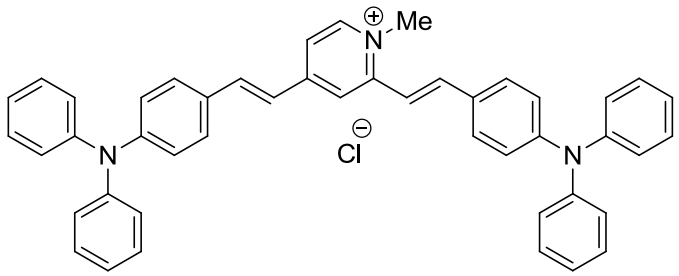
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.50 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.96 – 7.80 (m, 2H), 7.74 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.11 (t, *J* = 15.9 Hz, 2H), 6.80 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 4H), 4.97 – 4.67 (m, 4H), 4.14 (s, 3H), 3.74 – 3.54 (m, 16H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.22 (C_q), 151.88 (C_q), 150.33 (C_q), 149.98 (C_q), 144.30 (CH), 142.69 (CH), 130.54 (CH), 129.88 (CH), 122.24 (C_q), 122.05 (C_q), 118.52 (CH), 118.06 (CH), 117.29 (CH), 111.65 (CH), 111.52 (CH), 110.78 (CH), 58.13 (CH_2), 56.03 (CH_2), 53.11 (CH_2), 44.26 (CH_3), 18.57 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{30}H_{38}IN_3O_4 \cdot H_2O$ (649.56) : C, 55.47 ; H, 6.21 ; N, 6.47 ; trouvée : C, 55.70 ; H, 6.51 ; N, 6.19.

MS (ES+) : m/z 504.4 $[M]^+$.

<u>Chlorure de 2,4-bis((E)-4-(diphénylamino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-232, 1f)</u>



Produit iodure synthétisé par Dr Anton GRANZHAN. Echange d'ion en Cl^- en utilisant le protocole standard. Rendement d'échange d'ion : 10%.

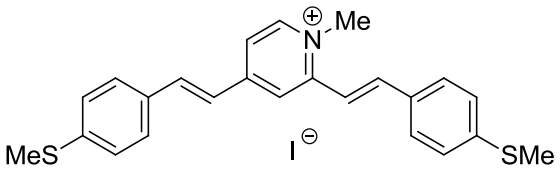
Point de fusion: 293-294 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.67 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.07 – 7.82 (m, 3H), 7.81 – 7.52 (m, 4H), 7.54 – 7.28 (m, 10H), 7.27 – 7.04 (m, 12H), 7.04 – 6.79 (m, 4H), 4.21 (s, 3H).

Analyse calculée pour $C_{46}H_{38}ClN_3 \cdot 0.2H_2O$ (671.87) : C, 82.23 ; H, 5.76 ; N, 6.25 ; trouvée : C, 82.22; H, 5.73 ; N, 6.26.

MS (ES+) : m/z 632.4 $[M]^+$.

<u>Iodure de 1-méthyl-2,4-bis((E)-4-(méthylthio)styryl)pyridin-1-ium (XX-204, 1g)</u>



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement 20%.

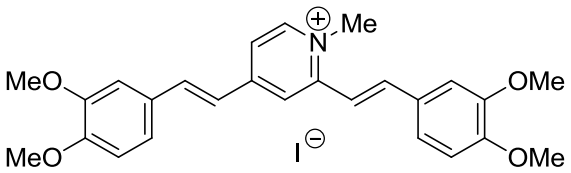
Point de fusion: 292-293 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.76 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.07 – 7.88 (m, 3H), 7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.47 – 7.31 (m, 5H), 4.26 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.54 (s, 4H).

Analyse calculée pour $C_{24}H_{24}INS_2$(517.49) : C, 55.70 ; H, 4.67 ; N, 2.71 ; trouvée : C, 55.74 ; H, 4.70 ; N, 2.76 .

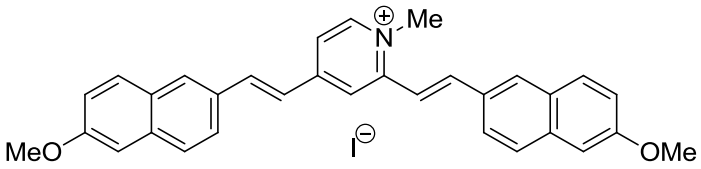
MS (ES+) : m/z 390.2 $[M]^+$.

<u>Iodure de 2,4-bis((E)-3,4-diméthoxystyryl)-1-méthylpyridin-1-ium (AG-12-93, 1h)</u>



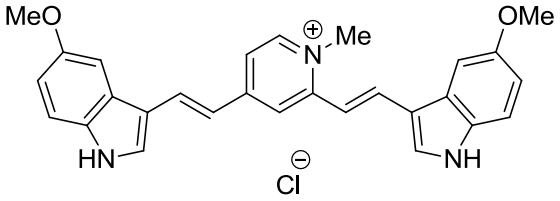
Synthétisé par Dr Anton GRANZHAN.

<u>iodure de 2,4-bis((E)-2-(6-méthoxynaphtalèn-2-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (AG-12-42, 1i)</u>



Synthétisé par Dr Anton GRANZHAN.

<u>Chlorure de 2,4-bis((E)-2-(5-méthoxy-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-240, 1j)</u>



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement : 28%.

Point de fusion: 230-231 °C.

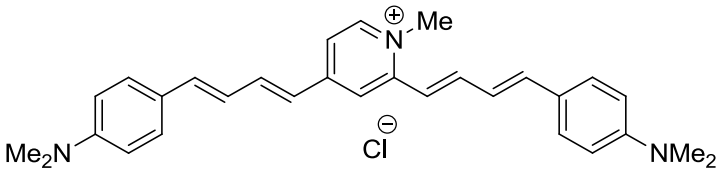
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.76 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.10 – 7.88 (m, 3H), 7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.60 – 7.44 (m, 2H), 7.43 – 7.33 (m, 4H), 4.27 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.54 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 153.80 (C_q), 153.76 (C_q), 151.45 (C_q), 151.41 (C_q), 142.75 (CH), 135.35 (CH), 133.66 (CH), 131.25 (C_q), 131.00 (C_q), 130.32 (CH), 124.78 (C_q), 124.57 (C_q), 116.67 (CH), 116.00 (CH), 115.69 (CH), 112.15 (C_q), 112.10 (CH), 111.99 (CH), 111.09 (CH), 110.86 (CH), 109.12 (CH), 101.94 (CH), 101.25 (CH), 54.62 (CH_3), 54.40 (CH_3), 42.82 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{28}H_{28}ClN_3O_3 \cdot H_2O$ (487.98) : C, 68.63; H, 5.76 ; N, 8.58; trouvée : C, 68.89; H, 6.02; N, 8.76.

MS (ES+) : m/z 436.0 $[M]^+$.

Chlorure de 2,4-bis((1E,3E)-4-(4-(diméthylamino)phényl)buta-1,3-dièn-1-yl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-231, 1k)



Produit iodure synthétisé par Dr Anton GRANZHAN. Rendement d'échange d'ion : 42%.

Point de fusion: 233-234 °C.

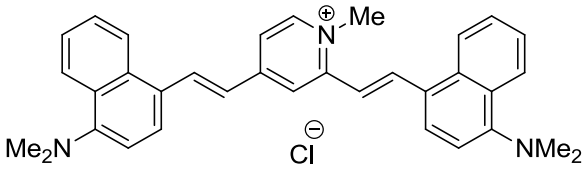
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.39 – 8.25 (m, 1H), 8.20 – 8.12 (m, 2H), 8.04 (s, 2H), 7.97 – 7.89 (m, 2H), 7.85 – 7.67 (m, 6H), 7.59 – 7.47 (m, 2H), 7.31 – 7.17 (m, 2H), 7.01 – 6.91 (m, 2H), 4.21 (s, 3H), 3.03 (s, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 153.23 (C_q), 149.45 (C_q), 142.78 (CH), 142.07 (CH), 135.85 (C_q), 130.30 (CH), 129.59 (CH), 128.36 (C_q), 126.53 (CH), 125.37 (C_q), 124.44 (C_q), 122.53 (CH), 116.44 (CH), 116.24 (CH), 105.36 (CH), 41.33 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{30}H_{34}ClN_3 \cdot 0.5H_2O$ (480.06) : C, 74.90 ; H, 7.33 ; N, 8.73 ; trouvée : C, 75.20; H, 7.31 ; N, 8.65.

MS (ES+) : m/z 436.3 $[M]^+$.

Chlorure de 2,4-bis((E)-2-(4-(diméthylamino)naphtalèn-1-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-215, 1l)



Synthèse selon le protocol général 2 puis échange d'ion en Cl^- . Rendement : 50%.

Point de fusion: 224-225 °C.

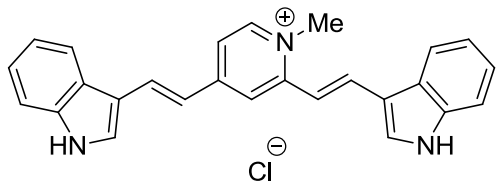
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.97 – 8.69 (m, 4H), 8.61 (t, *J* = 8.3 Hz, 2H), 8.35 – 8.26 (m, 1H), 8.25 – 8.14 (m, 3H), 8.05 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.77 – 7.59 (m, 4H), 7.56 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H), 7.21 (dd, *J* = 8.1, 2.3 Hz, 2H), 4.32 (s, 3H), 2.94 (s, 6H), 2.92 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 153.22 (C_q), 152.83 (C_q), 151.92 (C_q), 151.86 (C_q), 145.04 (CH), 138.70 (CH), 136.34 (CH), 132.51 (C_q), 127.51 (C_q), 127.38 (C_q), 126.87 (CH), 126.72 (CH), 126.38 (CH), 126.11 (C_q), 125.72 (C_q), 125.37 (CH), 124.86 (CH), 124.77 (CH), 124.34 (CH), 124.20 (CH), 123.66 (CH), 121.77 (CH), 120.20 (CH), 117.55 (CH), 113.66 (CH), 113.47 (CH), 44.77 (CH_3), 44.54 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{34}H_{24}ClN_3 \cdot 2H_2O$ (556.11) : C, 73.43; H, 6.89 ; N, 7.56; trouvée : C, 73.30; H, 6.49; N, 7.29.

MS (ES+) : m/z 484.3 $[M]^+$.

<u>Chlorure de 2,4-bis((E)-2-(1H-indol-3-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-234, 1m)</u>



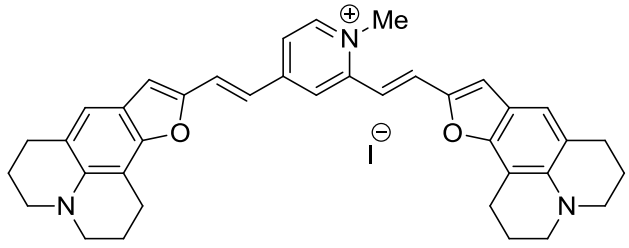
Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement : 11%.

Point de fusion: 310-311 °C.

Analyse calculée pour $C_{26}H_{22}ClN_3 \cdot 1.2H_2O$ (433.54) : C, 72.03; H, 5.67 ; N, 9.69; trouvée : C, 71.99; H, 5.70; N, 9.60.

MS (ES+) : m/z 376.2 $[M]^+$.

<u>Iodure de 2,4-bis((E)-2-(1,2,3,5,6,7-hexahydrofuro[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinolin-10-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-245,1o)</u>



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 54%.

Point de fusion: 237-238 °C.

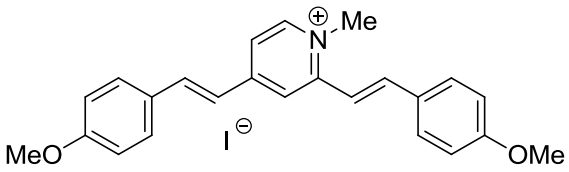
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.54 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.02 – 7.66 (m, 3H), 7.16 (s, 1H), 7.10 – 6.88 (m, 5H), 4.14 (s, 3H), 3.21 (brs, 8H), 2.88 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H), 2.76 (s, 4H), 1.96 (s, 4H), 1.89 (s, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 154.13 (C_q), 153.94 (C_q), 150.88 (C_q), 150.58 (C_q), 150.34 (C_q), 150.00 (C_q), 144.53 (s), 142.94 (C_q), 142.70 (C_q), 128.56 (s), 126.74 (s), 119.79 (C_q), 119.57 (s), 119.46 (s), 118.88 (s), 118.72 (s), 118.62 (m), 117.08 (C_q), 116.98 (C_q), 114.34 (s), 113.25 (s), 112.29 (s), 102.09 (C_q), 101.99 (C_q), 49.54 (CH_2), 49.15 (CH_2), 44.24 (CH_3), 27.69 (CH_2), 21.49 (CH_2), 21.43 (CH_2), 20.31 (CH_2).

Analyse calculée pour $C_{38}H_{39}IN_3O_{2.5}\cdot 0.5H_2O$(704.63) : C, 64.77 ; H, 5.58 ; N, 5.96 ; trouvée : C, 64.68 ; H, 5.48 ; N, 5.72.

MS (ES+) : m/z 568.3 $[M]^+$.

<u>Iodure de 2,4-bis((E)-4-méthoxystyryl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-246,1p)</u>



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 77%.

Point de fusion: 278-279 °C.

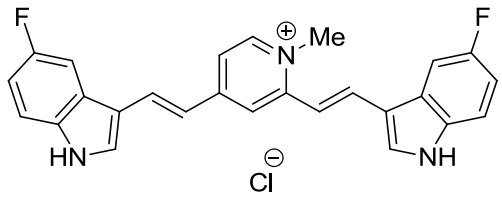
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.72 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.09 – 7.88 (m, 4H), 7.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.51 – 7.24 (m, 2H), 7.17 – 6.98 (m, 4H), 4.25 (s, 4H), 3.85 (s, 3H), 3.83 (s, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 161.35 (C_q), 161.07 (C_q), 152.15 (C_q), 152.07 (C_q), 145.28 (CH), 142.05 (CH), 139.76 (CH), 130.36 (CH), 129.73 (CH), 127.94 (C_q), 127.70 (C_q), 120.99 (CH), 120.23 (CH), 115.18 (CH), 114.72 (CH), 114.61 (CH), 55.48 (CH_3), 55.43 (CH_3), 44.86 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{24}H_{24}INO_2$(485.36) : C, 59.39 ; H, 4.98 ; N, 2.89 ; trouvée : C, 59.41; H, 4.97 ; N, 2.93.

MS (ES+) : m/z 358.3 [M] .

Chlorure de 2,4-bis((E)-2-(5-fluoro-3a,7a-dihydro-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-254, 1q)



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement : 42%.

Point de fusion: > 310 °C.

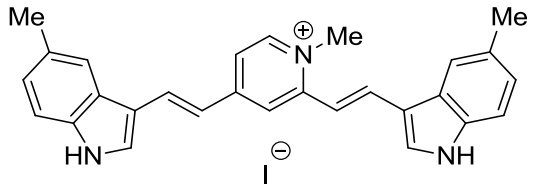
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.17 (s, 2H), 8.58 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.54 – 8.43 (m, 1H), 8.32 – 8.10 (m, 3H), 8.10 – 7.91 (m, 3H), 7.86 (dd, *J* = 6.8, 1.4 Hz, 1H), 7.61 – 7.42 (m, 2H), 7.35 – 7.20 (m, 2H), 7.20 – 7.00 (m, 3H), 4.22 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.75 (C_q), 156.65 (C_q), 152.68 (C_q), 144.20 (CH), 136.06 (CH), 134.30 (CH), 134.12 (C_q), 133.92 (C_q), 132.95 (CH), 132.87 (CH), 125.60 (C_q), 125.46 (C_q), 125.31 (C_q), 125.18 (C_q), 118.41 (CH), 117.67 (CH), 117.59 (CH), 113.63 (CH), 111.20 (CH), 105.35 (CH), 44.22 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{26}H_{20}ClF_2N_3$ (447.91) : C, 69.72; H, 4.50; N, 9.38; trouvée : C, 69.46; H, 4.65; N, 9.34.

MS (ES+) : m/z 412.3 $[M]^+$.

Iodure de méthyl-2,4-bis((E)-2-(6-méthyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium (XX-257, 1r)



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 54%.

Point de fusion: >310 °C.

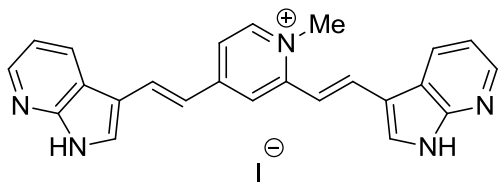
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.73 (brs, 2H), 8.50 – 8.35 (m, 2H), 8.30 – 8.12 (m, 2H), 8.12 – 7.94 (m, 3H), 7.85 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.39 – 7.18 (m, 3H), 7.16 – 7.00 (m, 3H), 4.14 (s, 3H), 2.43 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.51 (C_q), 143.78 (CH), 138.01 (C_q), 137.87 (C_q), 136.71 (CH), 134.83 (CH), 132.21 (C_q), 132.11 (C_q), 131.58 (CH), 131.38 (CH), 122.81 (CH), 122.66 (C_q), 122.60 (CH), 120.28 (CH), 119.96 (CH), 118.08 (C_q), 117.90 (CH), 117.25 (CH), 116.97 (CH), 113.59 (C_q), 113.50 (C_q), 112.37 (CH), 110.33 (CH), 44.05 (CH_3), 21.31 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{28}H_{30}IN_3 \cdot 0.3CH_3CN \cdot 0.3H_2O$ (549.15) : C, 62.55 ; H, 5.05 ; N, 8.42 ; trouvée : C, 62.50; H, 4.97 ; N, 8.63.

MS (ES+) : m/z 404.4 $[M]^+$.

<u>Iodure de 2,4-bis((E)-2-(1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-258,1s)</u>



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 40%.

Point de fusion: 294-295 °C.

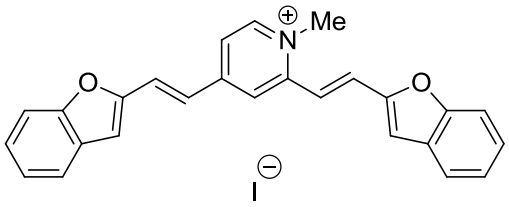
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.42 (s, 2H), 8.72 – 8.44 (m, 4H), 8.37 (s, 2H), 8.29 – 8.10 (m, 3H), 8.05 (s, 1H), 7.87 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 7.46 – 7.15 (m, 4H), 4.24 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.53 (C_q), 149.74 (C_q), 144.42 (CH), 144.16 (CH), 144.09 (CH), 136.09 (CH), 134.26 (CH), 132.11 (CH), 131.70 (C_q), 128.85 (CH), 128.73 (CH), 118.61 (CH), 117.97 (CH), 117.33 (C_q), 117.17 (CH), 117.05 (CH), 112.24 (C_q), 112.09 (C_q), 111.98 (CH), 44.37 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{24}H_{20}IN_5 \cdot 0.5H_2O$ (514.36) : C, 56.04 ; H, 4.12 ; N, 13.62 ; trouvée : C, 56.28; H, 4.12 ; N, 13.98.

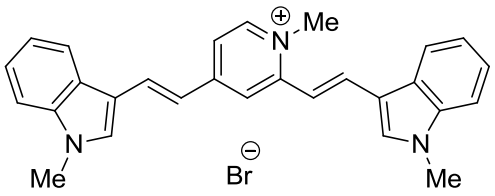
MS (ES+) : m/z 378.2 $[M]^+$.

<u>iodure de 2,4-bis((E)-2-(benzofuran-2-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (AG-13-09, 1t)</u>



Synthétisé par Dr Anton GRANZHAN.

<u>Bromure de 1-méthyl-2,4-bis((E)-2-(1-méthyl-1H-indol-3-yl)vinyl)pyridin-1-ium (XX-282, 1u)</u>



Produit iodure synthétisé par Dr Anton GRANZHAN. Echange d'ion en Br^- en utilisant le protocole standard. Rendement d'échange d'ion : 74%.

Point de fusion: 290-291 °C.

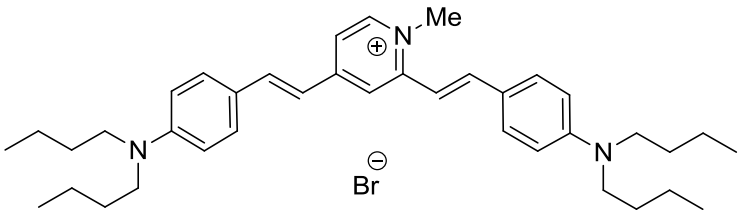
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.49 (s, 2H), 8.32 – 8.00 (m, 5H), 7.98 – 7.74 (m, 2H), 7.73 – 7.45 (m, 2H), 7.43 – 7.04 (m, 6H), 4.19 (s, 3H), 3.37 (s, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.48 (C_q), 144.03 (CH), 138.02 (C_q), 137.82 (C_q), 135.95 (CH), 135.03 (CH), 134.17 (CH), 125.51 (C_q), 125.23 (C_q), 122.98 (CH), 122.76 (CH), 121.45 (C_q), 121.23 (CH), 120.62 (CH), 120.31 (CH), 118.16 (CH), 117.59 (C_q), 117.19 (CH), 112.62 (C_q), 112.31 (C_q), 111.01 (CH), 110.78 (CH), 44.12 (CH_3), 33.14 (CH_3), 18.59 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{28}H_{26}BrN_3 \cdot H_2O$ (502.45) : C, 66.93 ; H, 5.62 ; N, 8.36 ; trouvée : C, 67.28; H, 6.00 ; N, 8.12.

MS (ES+) : m/z 404 $[M]^+$.

Bromure de 2,4-bis((E)-4-(dibutylamino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-283, 1v)



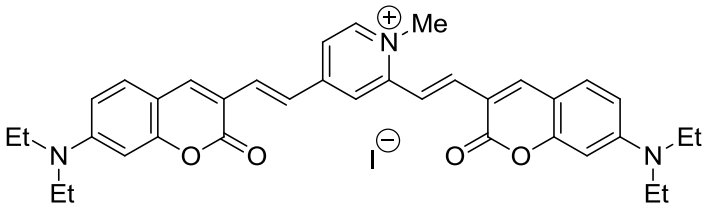
Produit iodure synthétisé par Dr Anton GRANZHAN. Echange d'ion en Br^- en utilisant le protocole standard. Rendement d'échange d'ion : 16%.

Point de fusion: 246-247 °C.

Analyse calculée pour $C_{38}H_{54}BrN_3 \cdot H_2O$ (668.77) : C, 70.13 ; H, 8.67 ; N, 6.46 ; trouvée : C, 69.62; H, 8.56 ; N, 6.36.

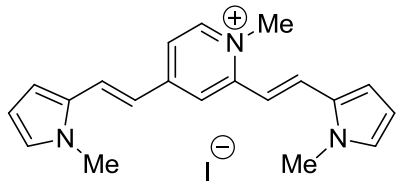
MS (ES+) : m/z 552 $[M]^+$.

Iodure de 2,4-bis((E)-2-(7-(diéthylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (AG-13-08, 1w)



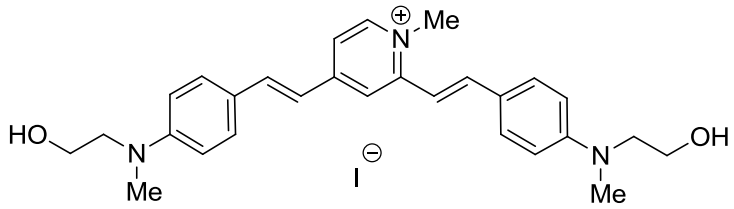
Synthétisé par Dr Anton GRANZHAN.

Iodure de 1-méthyl-2,4-bis((E)-2-(1-méthyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyridin-1-ium (AG-12-30,1x)



Synthétisé par Dr Anton GRANZHAN.

Iodure de 2,4-bis((E)-4-((2-hydroxyéthyl)(methyl)amino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-241, 1y)



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 14%.

Point de fusion: 239-240 °C.

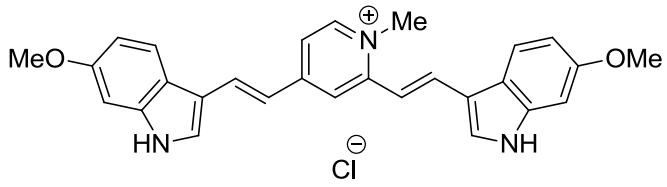
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.50 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 7.88 (d, *J* = 15.9 Hz, 2H), 7.71 (dd, *J* = 18.0, 7.3 Hz, 3H), 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.12 (dd, *J* = 15.6, 11.8 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 7.8 Hz, 4H), 4.75 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 4.15 (s, 3H), 3.54 (d, *J* = 22.1 Hz, 8H), 3.04 (s, 3H), 3.03 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.20 (C_q), 151.87 (C_q), 151.13 (C_q), 150.81 (C_q), 144.28 (CH), 142.75 (CH), 140.41 (CH), 130.50 (CH), 129.82 (CH), 122.39 (C_q), 122.18 (C_q), 118.58 (CH), 118.11 (CH), 117.39 (CH), 111.75 (CH), 111.59 (CH), 110.84 (CH), 58.18 (CH_2), 53.89 (CH_2), 44.30 (CH_3), 38.77 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{28}H_{28}IN_3O_3 \cdot H_2O$ (571.49) : C, 58.85; H, 6.00 ; N, 7.35; trouvée : C, 58.53; H, 5.98; N, 7.55 ;

MS (ES+) : m/z 222.7 $[M]^{2+}$, 444.2 $[M]^{+}$.

Chlorure de 2,4-bis((E)-2-(6-méthoxy-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-259,1&)



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement : 51%.

Point de fusion: 305-306 °C.

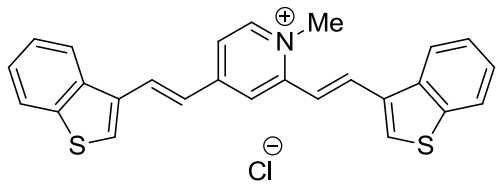
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.87 (brs, 2H), 8.77 – 8.38 (m, 2H), 8.16 (dd, *J* = 15.7, 4.5 Hz, 2H), 8.10 – 7.90 (m, 3H), 7.80 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 7.19 (dd, *J* = 27.8, 16.0 Hz, 2H), 7.03 (s, 2H), 6.88 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.19 (s, 3H), 3.82 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.47 (Cq), 156.41 (Cq), 152.67 (Cq), 152.61 (Cq), 144.00 (CH), 138.62 (Cq), 138.48 (Cq), 136.70 (CH), 134.85 (CH), 131.15 (CH), 130.91 (CH), 121.14 (CH), 120.94 (CH), 118.92 (Cq), 118.83 (Cq), 118.01 (CH), 117.23 (CH), 117.09 (CH), 113.70 (Cq), 113.61 (Cq), 111.00 (CH), 110.80 (CH), 110.45 (CH), 95.57 (CH), 55.26 (CH_3), 44.03 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{28}H_{26}ClN_3O_2 \cdot 0.3H_2O$(477.38) : C, 70.45; H, 5.62 ; N, 8.80; trouvée : C, 70.70; H, 5.48; N, 8.92.

MS (ES+) : m/z 436.4 $[M]^+$.

Chlorure de 2,4-bis((E)-2-(3a,7a-dihydrobenzo[b]thiophen-3-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-255, 1£)



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement : 20%.

Point de fusion: 243-244 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.00 – 8.75 (m, 2H), 8.68 (s, 1H), 8.55 – 8.29 (m, 5H), 8.26 – 8.15 (m, 1H), 8.15 – 8.01 (m, 2H), 7.88 – 7.24 (m, 6H), 4.33 (s, 3H).

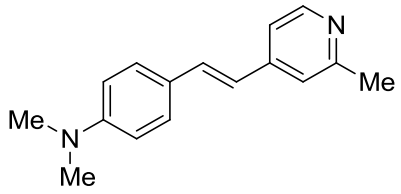
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.09 (Cq), 151.89 (Cq), 145.53 (CH), 139.99 (Cq), 139.79 (Cq), 137.18 (Cq), 137.07 (Cq), 133.60 (CH), 132.42 (Cq), 132.11 (Cq), 132.00 (CH), 129.59 (CH), 129.15 (CH), 125.36 (CH), 125.16 (CH), 125.09 (CH), 124.18 (CH), 123.40 (CH), 122.70 (CH), 122.48 (CH), 121.35 (CH), 120.89 (CH), 118.58 (CH), 45.12 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{26}H_{20}ClNS_2 \cdot 0.5H_2O$(455.03) : C, 68.63; H, 4.65 ; N, 3.08; trou vée : C, 68.69; H, 4.58; N, 3.27.

MS (ES+) : m/z 410.3 $[M]^+$.

4.2.2.5 Synthèse de l'hétéro-distyryle (1ai)

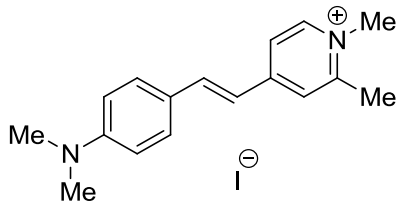
(E)-N,N-diméthyl-4-(2-(2-méthylpyridin-4-yl)vinyl)aniline(XX-104)



Le 4-(diméthylamino)benzaldéhyde (1,492 g, 10 mmol) et le tBuOK (1.1 eq., 1.234 g, 11.00 mmol) sont mélangés dans le DMF (20 ml) à température ambiante, la solution est dégazée pendant 15 min, puis mise sous argon. Le 2,4-diméthylpyridine (1,734 ml, 15,00 mmol) est ajouté et agité pendant une nuit à température ambiante. Le tBuOK (1 eq., 1.122 g, 10.00 mmol) est rajouté. Le milieu est agité un jour à température ambiante, versé dans l'eau (200 ml) et le produit est extrait au toluène (3 x 50 ml). Les phases organiques sont réunies, lavées à l'eau puis à NaCl saturé, séchées avec Na_2SO_4. Le solvant est enlevé sous vide et le résidu est dissout dans la mésitylène (4 x) et mis en co-évaporation pour enlever la lutidine non réagie. Le produit brut (1,9 g) est purifié par chromatographie (SiO_2; éluent: cyclohexane-MTBE de 60:40 à 30:70) pour obtenir un solide jaune, le (E)-N,N-diméthyl-4-(2-(2-méthylpyridin-4-yl)vinyl)aniline (0,816 g, 3,42 mmol, rendement : 34 %).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.40 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 7.51 – 7.32 (m, 2H), 7.23 – 7.17 (m, 2H), 7.15 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 6.83 – 6.65 (m, 3H), 3.01 (s, 6H), 2.56 (s, 3H).

Iodure de (E)-4-(4-(diméthylamino)styryl)-1,2-diméthylpyridin-1-ium (XX-107, 12a)



Le (E)-N,N-diméthyl-4-(2-(2-méthylpyridin-4-yl)vinyl)aniline (0,65 g, 2,73 mmol) et l'iodométhane (0,256 ml, 4,09 mmol) sont mélangés dans l'acétone anydre. Après agitation pendant 48 h à température ambiante, le milieu est filtré et lavé avec un peu d'acétone pour obtenir une poudre rouge iodure de (E)-4-(4-(diméthylamino)styryl)-1,2-diméthylpyridin-1-ium (0,816 g, 2,146 mmol, rendement : 79 %).

Point de fusion: 149-150 °C.

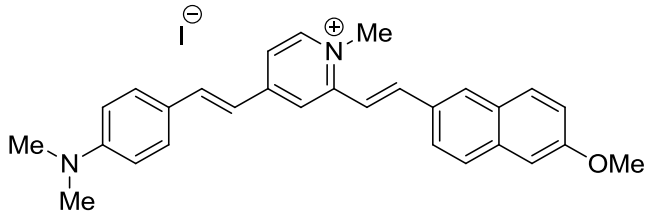
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.68 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.93 – 7.77 (m, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 4.08 (s, 3H), 3.01 (s, 6H), 2.69 (s, 3 H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 154.11 (s), 153.33 (s), 151.79 (s), 145.00 (s), 141.39 (s), 129.97 (s), 123.37 (s), 122.49 (s), 120.11 (s), 117.04 (s), 111.98 (s), 44.00 (s), 19.81 (s), 18.57 (s).

Analyse calculée pour $C_{17}H_{21}IN_2 \cdot 0.33H_2O$(386.2) : C, 52.87; H, 5.65 ; N, 7.25; trouvée : C, 52.93; H, 5.63; N, 7.28.

MS (ES+) : m/z 253.1 $[M]^+$.

Iodure de 4-((E)-4-(diméthylamino)styryl)-2-((E)-2-(6-méthoxynaphthalen-2-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-109, 1aj)



Le iodure de (E)-4-(4-(diméthylamino)styryl)-1,2-diméthylpyridin-1-ium (0,5 g, 1,315 mmol), le 6-methoxy-2-naphthaldehyde (0,367 g, 1,972 mmol) et la pipéridine (0,065

ml, 0,657 mmol) sont mélangés dans le MeOH (é 10 ml), le milieu est porté au reflux pendant 2 h 30, puis refroidi à température ambiante. Le précipité rouge (0.4 g brut) est filtré, lavé avec peu de méthanol, et séché à l'éther, puis recristallisé dans MeOH-$MeNO_2$ pour donner un solide rouge du iodure de 4-((E)-4-(diméthylamino)styryl)-2-((E)-2-(6-méthoxynaphtalen-2-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (0,20 g, 0,365 mmol, rendement : 28 %).

Point de fusion: 268-269 °C.

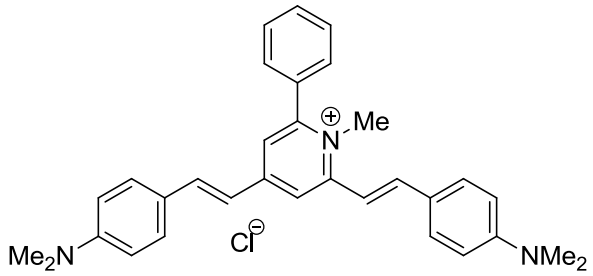
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.65 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.15 – 7.84 (m, 6H), 7.72 – 7.50 (m, 3H), 7.42 (s, 1H), 7.33 – 7.03 (m, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.25 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.03 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 158.65 (C_q), 152.81 (C_q), 151.80 (C_q), 151.49 (C_q), 145.01 (CH), 141.93 (CH), 141.21 (CH), 135.47 (C_q), 130.55 (C_q), 130.23 (CH), 129.92 (CH), 129.88 (CH), 128.24 (C_q), 127.60 (CH), 124.64 (CH), 122.64 (C_q), 119.86 (CH), 119.58 (CH), 119.49 (CH), 117.46 (CH), 117.02 (CH), 112.06 (CH), 106.40 (CH), 55.43 (CH_3), 44.63 (CH_3)), 39.75 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{29}H_{29}IN_2O{\cdot}0.5H_2O$ (557.47) : C, 62.48; H, 5.42 ; N, 5.03; trouvée : C, 62.19; H, 5.35; N, 5.21.

MS (ES+) : m/z 421.2 $[M]^+$.

<u>Iodure de 2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)-1-phénylpyridin-1-ium (XX-181, 3a)</u>



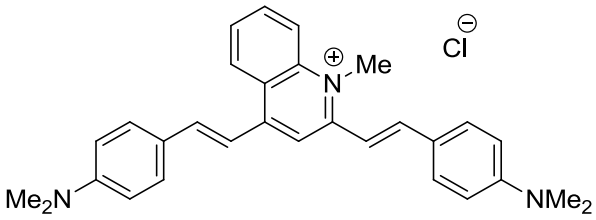
Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement : 31%.

Point de fusion: 192-193 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.39 (s, 1H), 8.09 – 7.81 (m, 2H), 7.81 – 7.62 (m, 8H), 7.62 – 7.52 (m, 2H), 7.37 – 7.07 (m, 2H), 6.80 (dd, *J* = 8.7, 4.2 Hz, 4H), 3.87 (s, 3H), 3.04 (s, 6H), 3.01 (s, 6H).

Analyse calculée pour $C_{27}H_{25}ClN_4O_2 \cdot 0.5H_2O$ (514,10) : C, 74.76; H, 7.06; Cl, 6.90; N, 8.17; O, 3.11; trouvée : C, 74.46; H, 6.91; N, 8.10.

<u>Chlorure de 2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)-1-méthylquinolin-1-ium (XX-126, XX-220, 4a)</u>



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement : 43%.

Point de fusion: 223-224 °C.

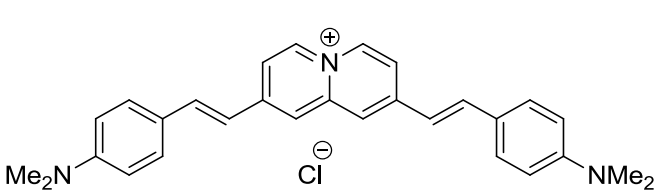
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.44 – 8.12 (m, 3H), 8.12 – 7.97 (m, 1H), 7.95 – 7.66 (m, 6H), 7.45 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.96 – 6.57 (m, 4H), 4.31 (s, 3H), 3.03 (s, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 154.15 (C_q), 152.21 (C_q), 151.71 (C_q), 148.98 (C_q), 146.40 (CH), 142.39 (CH), 139.57 (C_q), 133.67 (CH), 131.24 (CH), 130.62 (CH), 127.16 (CH), 125.87 (CH), 124.45 (C_q), 123.48 (C_q), 122.75 (C_q), 118.94 (CH), 113.71 (CH), 112.93 (CH), 112.80 (CH), 111.79 (CH), 111.66 (CH), 39.73 (CH_3), 39.68 (CH_3), 38.63 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{30}H_{32}ClN_3 \cdot 0.5H_2O$ (478.05) : C, 75.21; H, 6.94 ; N, 8.77 ; trouvée : C, 75.00; H, 6.89 ; N, 8.75.

MS (ES+) : m/z 434.3 $[M]^+$.

<u>Chlorure de 2,8-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)quinolizin-5-ium (XX-219, 5a)</u>



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement : 38%.

Point de fusion: >310 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.94 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 8.18 – 7.97 (m, 4H), 7.73 (d, *J* = 16.1 Hz, 2H), 7.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.16 (d, *J* = 16.1 Hz, 2H), 6.75 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 3.00 (s, 12H).

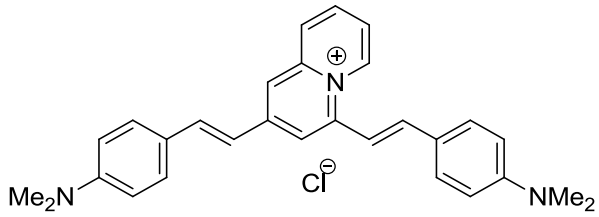
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 151.38 (C_q), 145.56 (C_q), 142.94 (C_q), 138.83 (CH), 135.51 (CH), 129.46 (CH), 122.95 (C_q), 120.74 (CH), 118.25 (CH), 117.88 (CH), 111.95 (CH), 39.73 (CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 138.83 (s), 135.51 (s), 129.47 (s), 120.74 (s), 118.25 (s), 117.87 (s), 111.95 (s), 39.73 (s).

Analyse calculée pour $C_{29}H_{30}ClN_3 \cdot H_2O$ (474.04) : C, 73.48; H, 6.80 ; N, 8.86; trouvée : C, 73.38; H,7.13 ; N, 8.63.

MS (ES+) : m/z 420.3 $[M]^+$.

<u>Chlorure de 2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)quinolizin-5-ium (XX-209, 6a)</u>



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^- . Rendement : 18%.

Point de fusion: 208-209 °C.

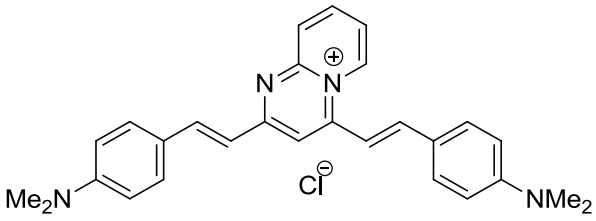
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.40 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.31 (s, 2H), 8.24 – 8.07 (m, 1H), 7.94 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 7.87 – 7.46 (m, 7H), 7.21 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.93 – 6.66 (m, 4H), 3.02 (s, 6H), 3.01 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 151.43 (C_q), 145.52 (C_q), 145.10 (C_q), 143.17 (C_q), 141.43 (CH), 139.15 (CH), 135.03 (CH), 132.44 (CH), 129.87 (CH), 129.43 (CH), 127.37 (CH), 123.04 (C_q), 121.42 (CH), 119.34 (CH), 118.15 (CH), 112.03 (CH), 111.77 (CH), 39.77 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{29}H_{30}ClN_3 \cdot 1.3H_2O$ (479.42) : C, 72.65; H, 6.85 ; N, 8.76; trouvée : C, 72.69; H, 6.86; N, 8.81.

MS (ES+) : m/z 420.3 $[M]^+$.

<u>Chlorure de 2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)pyrido[1,2-a]pyrimidin-5-ium (XX-214,7a)</u>



Synthèse selon le protocole générale 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement : 14%.

Point de fusion: 261-262 °C.

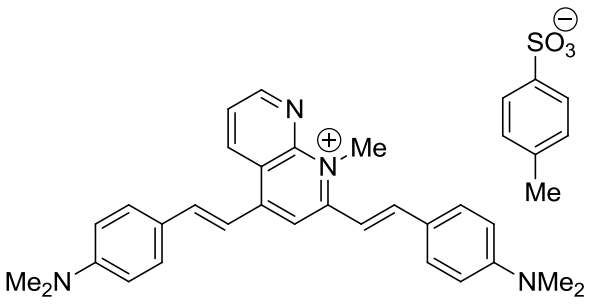
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.47 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.41 – 8.18 (m, 2H), 8.18 – 8.00 (m, 2H), 7.93 – 7.48 (m, 6H), 7.19 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.92 – 6.59 (m, 4H), 3.05 (s, 6H), 3.04 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 162.13 (C_q), 152.14 (C_q), 150.49 (C_q), 149.40 (C_q), 144.85 (CH), 144.06 (CH), 139.86 (CH), 132.25 (CH), 131.03 (CH), 130.67 (CH), 127.11 (CH), 122.68 (C_q), 122.36 (C_q), 120.28 (s), 118.67 (CH), 112.01 (CH), 111.78 (CH), 111.33 (CH), 109.14 (CH), 39.73 (CH3).

Analyse calculée pour $C_{28}H_{29}ClN_4 \cdot 0.5H_2O$ (465.01) : C, 72.16; H, 6.49 ; N, 12.02; trouvée : C, 71.76; H, 6.57; N, 11.83.

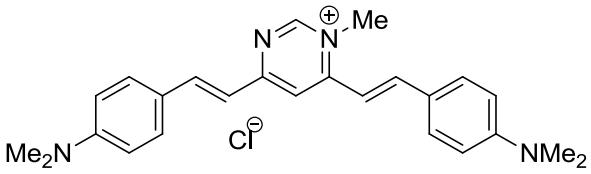
MS (ES+) : m/z 421.2 $[M]^+$.

<u>2,4-Bis((E)-4-(dimethylamino)styryl)-1-méthyl-1,8-naphthyridin-1-ium 4-méthylbenzènesulfonate (AG-12-99, 9a)</u>



Synthétisé par Dr Anton GRANZHAN.

Chlorure de 4,6-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)-1-méthylpyrimidin-1-ium (XX-268, 15a)



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement: 41%.

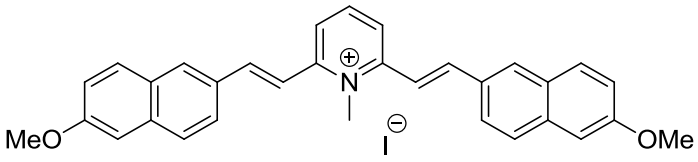
Point de fusion: 258-259 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 9.07 (s, 1H), 8.36 – 8.02 (m, 3H), 7.89 – 7.53 (m, 4H), 7.19 – 7.01 (m, 2H), 6.96 – 6.75 (m, 4H), 4.03 (s, 3H), 3.08 (s, 6H), 3.04 (s, 6H).

Analyse calculée pour $C_{25}H_{29}ClN_4 \cdot HCl \cdot 0.5H_2O$ (466.5) : C, 64.37; H, 6.70 ; N, 12.01; trouvée : C, 64.32; H, 6.87; N, 12.29.

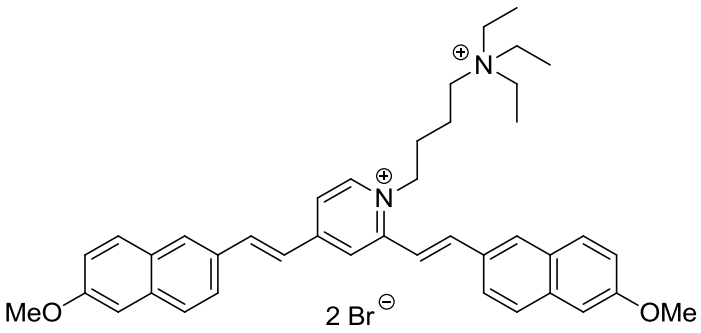
MS (ES+) : m/z 385.4 $[M]^+$.

Iodure de 2,6-bis((E)-2-(6-méthoxynaphtalen-2-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (AG-46, 2i)



Synthétisé par Dr GRANZHAN Anton.

Bromure de 2,4-bis((E)-2-(6-méthoxynaphtalen-2-yl)vinyl)-1-(4-(triéthylammonio)butyl)pyridin-1-ium (XX-143, 1i(2))



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 37%.

Point de fusion: 227-228 °C.

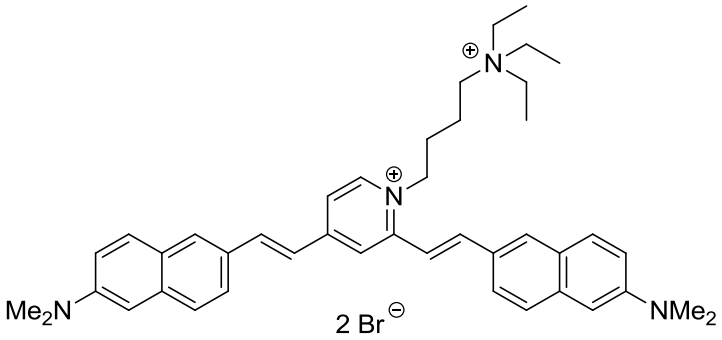
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.40 – 8.05 (m, 6H), 8.06 – 7.83 (m, 5H), 7.67 (dd, *J* = 30.4, 16.0 Hz, 2H), 7.43 (dd, *J* = 5.8, 2.3 Hz, 2H), 7.32 – 7.20 (m, 2H), 4.84 (s, 2H), 3.92 (d, *J* = 2.4 Hz, 6H), 3.30 – 3.09 (m, 8H), 2.00 – 1.59 (m, 4H), 1.18 (t, *J* = 6.9 Hz, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 158.72 (C_q), 158.63 (C_q), 152.27 (C_q), 151.56 (C_q), 145.16 (C_q), 145.01 (CH), 143.17 (CH), 140.72 (CH), 135.58 (C_q), 135.41 (C_q), 130.76 (C_q), 130.47 (C_q), 130.27 (CH), 130.20 (CH), 130.08 (CH), 129.67 (CH), 128.31 (C_q), 128.23 (C_q), 127.77 (CH), 127.55 (CH), 125.00 (CH), 124.14 (CH), 122.67 (CH), 121.51 (CH), 121.17 (CH), 119.49 (CH), 116.45 (CH), 106.40 (CH), 55.93 (CH_2), 55.43 (CH_3), 52.19 (CH_2), 26.73 (CH_2), 18.24 (CH_2), 7.26 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{41}H_{48}Br_2N_2 \cdot 0.5H_2O$ (768.64) : C, 63.98 ; H, 6.42 ; N, 3.64; trouvée : C, 63.74; H, 6.54 ; N, 3.92.

MS (ES+) : m/z 300.3 $[M]^{2+}$.

<u>Bromure de 2,4-bis((E)-2-(6-(diméthylamino)naphtalen-2-yl)vinyl)-1-(4-(triéthylammonio)butyl)pyridin-1-ium (XX-148,1n(2))</u>



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 54%.

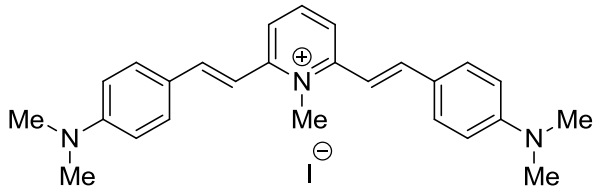
Point de fusion: 251-252 °C

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.84 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.33 – 8.09 (m, 3H), 8.08 – 7.94 (m, 3H), 7.94 – 7.69 (m, 6H), 7.65 – 7.43 (m, 2H), 7.38 – 7.22 (m, 2H), 6.99 (s, 2H), 4.80 (brs, 2H), 3.29 – 3.19 (m, 8H), 3.07 (s, 9H), 2.07 – 1.55 (m, 4H), 1.19 (t, *J* = 6.3 Hz, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.14 (C_q), 151.50 (C_q), 149.57 (C_q), 149.50 (C_q), 144.57 (C_q), 144.54 (CH), 143.45 (CH), 141.00 (CH), 136.00 (C_q), 135.82 (C_q), 130.53 (CH), 130.02 (CH), 129.67 (CH), 129.58 (CH), 128.60 (C_q), 128.32 (C_q), 126.82 (CH), 126.58 (CH), 125.49 (C_q), 125.39 (C_q), 124.66 (CH), 123.76 (CH), 121.00 (CH), 120.75 (CH), 120.20 (CH), 116.49 (CH), 114.50 (CH), 105.41 (CH), 105.34 (CH), 55.52 (CH_2), 55.42 (CH_2), 52.16 (CH_2), 40.01 (CH_3), 26.64 (CH_2), 18.20 (CH_2), 7.24 (CH_3).

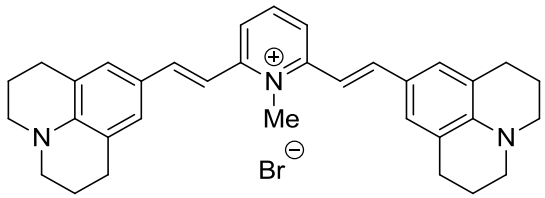
MS (ES+) : m/z 313.5 $[M]^{2+}$.

<u>Iodure de 2,6-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (2a)</u>



Synthétisé par Dr GRANZHAN Anton.

<u>Bromure de 2,6-bis((E)-2-(1,2,3,5,6,7-hexahydropyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-135, XX-137, 2b)</u>



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Br^-. Rendement : 66%.

Point de fusion: >310 °C.

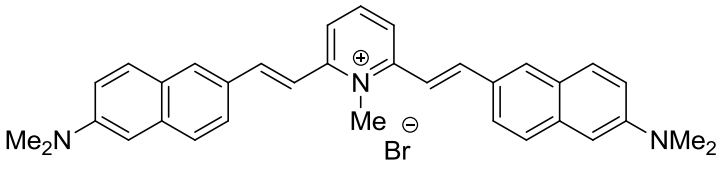
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.09 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.04 – 7.87 (m, 2H), 7.66 – 7.41 (m, 2H), 7.37 – 6.92 (m, 7H), 4.12 (s, 4H), 3.29 – 3.15 (m, 10H), 2.87 – 2.63 (m, 9H), 1.99 – 1.72 (m, 9H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 153.61 (C_q), 144.91 (C_q), 143.81 (C_q), 143.00 (CH), 140.84 (CH), 127.91 (CH), 121.52 (C_q), 120.58 (C_q), 120.09 (CH), 111.38 (CH), 49.26 (CH_2), 40.70 (CH_3), 27.14 (CH_2), 21.04 (CH_2).

Analyse calculée pour $C_{34}H_{38}BrN_3 \cdot H_2O$ (586.60) : C, 69.61 ; H, 6.87 ; N, 7.16 ; trouvée : C, 69.69; H, 6.20 ; N, 6.91.

MS (ES+) : m/z 488.3 $[M]^+$.

Bromure de 2,6-bis((E)-2-(6-(diméthylamino)naphtalen-2-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-129, XX-131, 2n)



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Br^-. Rendement : 54%.

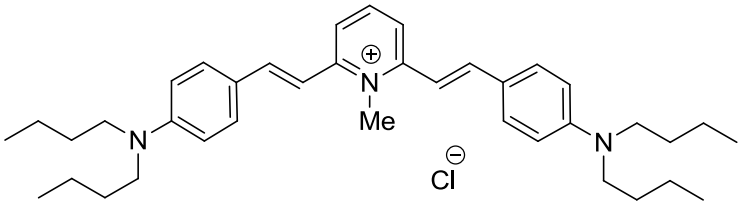
Point de fusion: 278-279 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.44 – 8.32 (m, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 8.08 (s, 2H), 8.01 – 7.92 (m, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 10.5 Hz, 3H), 7.75 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.62 (d, *J* = 15.8 Hz, 2H), 7.27 (dd, *J* = 9.2, 2.4 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H), 4.31 (s, 3H), 3.07 (s, 12H).

Analyse calculée pour $C_{34}H_{34}BrN_3 \cdot 0.5H_2O$ (573.6) : C, 71.20 ; H, 6.15 ; N, 7.33 ; trouvée : C, 71.18; H, 6.21 ; N, 7.08.

MS (ES+) : m/z 484.2 $[M]^+$.

Chlorure de 2,6-bis((E)-4-(dibutylamino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-260, 2v)



Produit iodure synthétisé par Dr Anton GRANZHAN. Echange d'ion selon le protocole standard. Rendement d'échange d'ion: 51%.

Point de fusion: 184-185 °C.

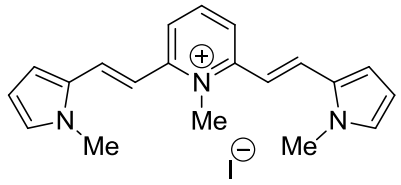
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.23 – 8.11 (m, 1H), 8.11 – 7.98 (m, 2H), 7.78 – 7.55 (m, 6H), 7.25 (d, *J* = 15.7 Hz, 2H), 6.71 (d, *J* = 8.8 Hz, 4H), 4.16 (s, 3H), 1.70 – 1.43 (m, 8H), 1.43 – 1.19 (m, 8H), 0.93 (t, *J* = 7.2 Hz, 12H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 153.62 (Cq), 149.69 (Cq), 142.68 (s), 141.17 (s), 130.61 (s), 121.83 (Cq), 120.80 (s), 112.23 (s), 111.27 (s), 49.83 (CH_2), 40.90 (CH_3), 29.04 (CH_2), 19.63 (CH_2), 13.88 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{38}H_{54}ClN_3 \cdot 1.5H_2O$(615.33) : C, 74.17; H, 9.34 ; N, 6.83; trouvée : C, 74.22; H, 9.42; N, 6.81.

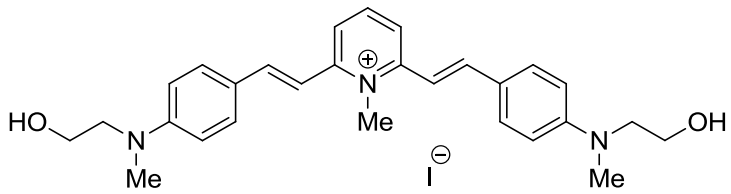
MS (ES+) : m/z 552.7 $[M]^+$.

<u>Iodure de 1-méthyl-2,6-bis((E)-2-(1-méthyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyridin-1-ium (AG-13-25, 2x)</u>



Synthétisé par Dr GRANZHAN Anton.

<u>Iodure de 2,6-bis((E)-4-((2-hydroxyéthyl)(méthyl)amino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-242,2y)</u>



Synthèse selon le protocole général 2. Rendement : 39%.

Point de fusion: 244-245 °C.

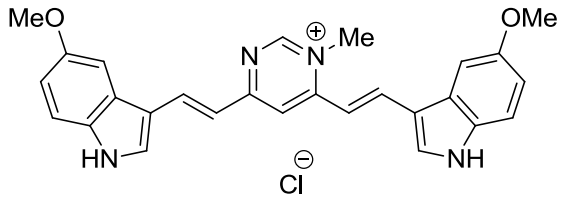
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.32 – 8.13 (m, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.67 (dd, *J* = 12.0, 3.2 Hz, 6H), 7.28 (d, *J* = 15.7 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 4.75 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 4.18 (s, 3H), 3.70 – 3.44 (m, 8H), 3.03 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 153.65 (C_q), 150.98 (C_q), 142.77 (CH), 141.29 (CH), 130.42 (CH), 122.26 (C_q), 120.98 (CH), 112.50 (CH), 111.53 (CH), 58.17 (CH_2), 53.89 (CH_2), 40.97 (CH_3), 38.77 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{28}H_{34}IN_3O_2$ (571.49) : C, 58.85; H, 6.00 ; N, 7.35; trouvée : C, 58.68; H, 5.95; N, 7.34.

MS (ES+) : m/z 222.7 $[M]^{2+}$, 444.2 $[M]^+$.

<u>Chlorure de 4,6-bis((E)-2-(5-méthoxy-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-méthylpyrimidin-1-ium (XX-267, 15j)</u>



Synthèse selon le protocole général 2 puis échange d'ion en Cl^-. Rendement : 57%.

Point de fusion: 295-296 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.35 (s, 1H), 12.06 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.58 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 8.51 – 8.39 (m, 2H), 8.30 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.72 – 7.53 (m, 2H), 7.53 – 7.35 (m, 2H), 7.22 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.97 – 6.82 (m, 2H), 4.07 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.89 (s, 3H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 158.12 (s), 145.88 (s), 142.89 (s), 139.56 (s), 139.23 (s), 122.00 (s), 118.82 (s), 118.61 (s), 117.83 (s), 117.30 (s), 116.40 (s), 112.92 (s), 108.70 (s), 107.98 (s), 61.08 (s), 60.84 (s), 45.42 (s).

Analyse calculée pour $C_{27}H_{25}ClN_4O_2 \cdot 0.5H_2O$(481.97) : C, 67.28; H, 5.44 ; N, 11.62; trouvée : C, 67.50; H, 5.29; N, 11.72.

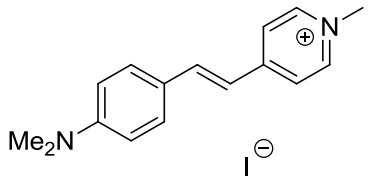
MS (ES+) : m/z 437.4 $[M]^+$

4.2.2.6 Synthèse des mono-styryles

Protocole général 3

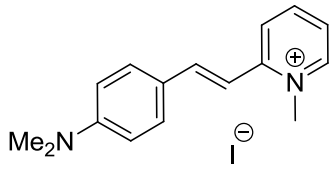
Le précurseur hétérocyclique (1 mmol), l'aldéhyde (1.5 mmol) et la pipéridine (0,5 mmol) sont mélangés dans le MeOH (5 ml). Le milieu est porté au reflux pendant 2h, puis refroidi à la température ambiante et agité pendant 16 h. Le précipité est filtré, lavé avec peu de méthanol, séché à l'éther et recristallisé dans le MeOH.

Iodure de (E)-4-(4-(diméthylamino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (AG-49,10a)



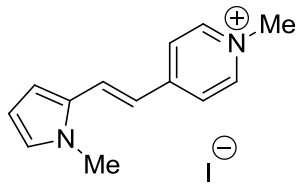
Synthétisé par Dr GRANZHAN Anton.

Iodure de (E)-2-(4-(diméthylamino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (AG-37, 11a)



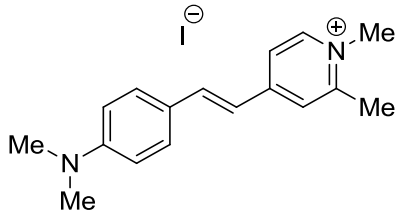
Synthétisé par Dr GRANZHAN Anton.

Iodure de (E)-1-méthyl-4-(2-(1-méthyl-1H-pyrrol-2-yl)vinyl)pyridin-1-ium (AG-13-36,10x)



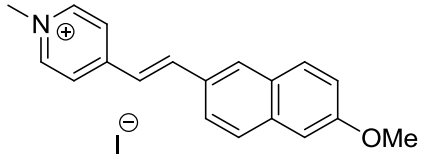
Synthétisé par Dr GRANZHAN Anton.

Iodure de (E)-4-(4-(diméthylamino)styryl)-1,2-diméthylpyridin-1-ium (XX-107, 12a)



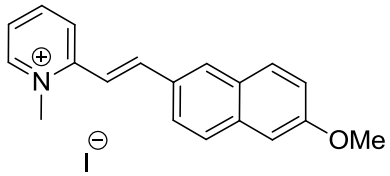
Protocole de synthèse et caractérisation précisés dans la synthèse de l'hétéro-distyryle 1ai.

Iodure de (E)-4-(2-(6-méthoxynaphtalen-2-yl)vinyl)-1-methylpyridin-1-ium (AG-50, 10i)



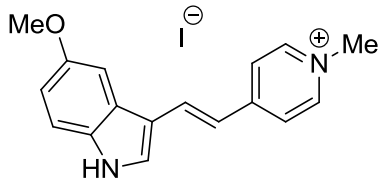
Synthétisé par Dr GRANZHAN Anton.

Iodure de (E)-2-(2-(6-méthoxynaphtalen-2-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (AG-47, 11i)



Synthétisé par Dr GRANZHAN Anton.

Iodure de (E)-4-(2-(5-méthoxy-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-270, 10j)



Synthèse selon le protocole général 3. Rendement : 58%.

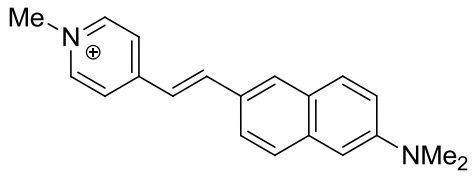
Point de fusion: 220-221 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.82 (brs, 1H), 8.67 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.24 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.59 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.40 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.90 (dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 1H), 4.16 (s, 3H), 3.87 (s, 3H).

Analyse calculée pour $C_{17}H_{17}IN_2O{\cdot}H_2O$(397.64) : C, 51.35 ; H, 4.46 ; N, 7.04 ; trouvée : C, 51.30 ; H, 4.58 ; N, 7.06.

MS (ES+) : m/z 265.3 $[M]^+$.

<u>Iodure de (E)-4-(2-(6-(diméthylamino)naphtalen-2-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-117, 10n)</u>



Synthèse selon le protocole général 3. Rendement : 24%.

Point de fusion: 275-276 °C.

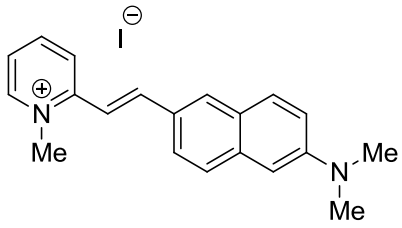
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.79 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.31 – 7.93 (m, 4H), 7.92 – 7.59 (m, 3H), 7.47 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.26 (dd, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 4.23 (s, 3H), 3.06 (s, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.87 (C_q), 149.58 (C_q), 144.81 (CH), 141.55 (CH), 135.93 (C_q), 130.24 (CH), 129.67 (CH), 128.38 (C_q), 126.80 (CH), 125.49 (C_q), 123.92 (CH), 122.93 (CH), 120.74 (CH), 116.53 (CH), 105.42 (CH), 46.70 (CH_3) , 40.05 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{20}H_{21}IN_2$ (416.3) : C, 57.70 ; H, 5.08 ; N, 6.73 ; trouvée : C, 58.02 ; H, 5.13 ; N, 6.43.

MS (ES+) : m/z 289.2 $[M]^+$.

<u>Iodure de (E)-2-(2-(6-(diméthylamino)naphtalen-2-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-118, 11n)</u>



Rendement : 38%.

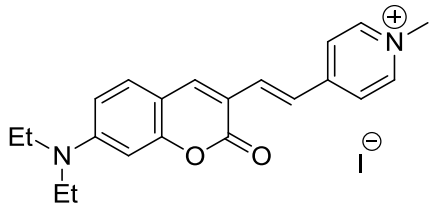
Point de fusion: 233-234 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.87 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 8.61 – 8.33 (m, 2H), 8.19 – 8.01 (m, 2H), 7.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.90 – 7.80 (m, 2H), 7.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 9.1, 2.1 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 4.38 (s, 3H), 3.08 (s, 6H).

Analyse calculée pour $C_{20}H_{21}IN_2 \cdot H_2O$(434.3) : C, 55.31; H, 5.34 ; N, 6.45; trouvée : C, 54.92; H, 5.04; N, 6.26.

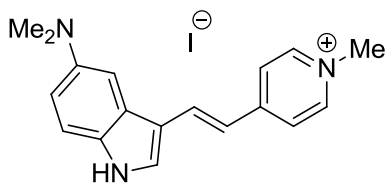
MS (ES+) : m/z 289.2 $[M]^+$.

<u>Iodure de (E)-4-(2-(7-(diéthylamino)-2-oxo-2H-chromen-3-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (AG-13-45, 10w)</u>



Synthétisé par Dr GRANZHAN Anton.

<u>Iodure de (E)-4-(2-(5-(diméthylamino)-1H-indol-3-yl)vinyl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-280, 10z)</u>



Synthèse selon le protocole général 3. Rendement : 82%.

Point de fusion: 245-246 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.70 (brs, 1H), 8.63 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.24 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 8.09 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 7.88 (s, 1H), 7.46 – 7.22 (m, 2H), 7.11 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.96 – 6.76 (m, 1H), 4.16 (s, 3H), 2.96 (s, 6H).

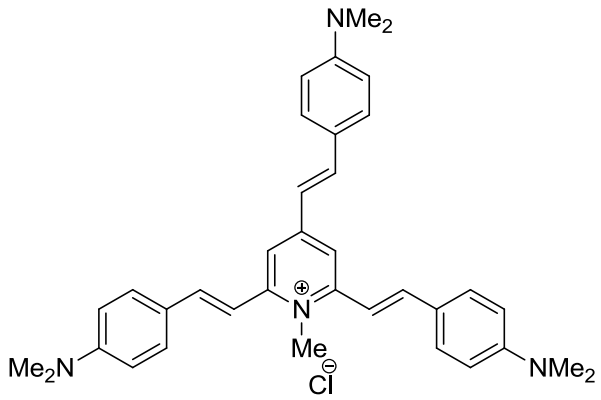
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 154.22 (C_q), 147.00 (C_q), 143.92 (CH), 136.71 (CH), 131.65 (CH), 130.82 (C_q), 126.23 (C_q), 121.33 (CH), 115.47 (CH), 113.13 (C_q), 112.77 (CH), 111.94 (CH), 103.07 (CH), 46.06 (CH_3), 41.77 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{18}H_{20}IN_3$ (405.28) : C, 53.34 ; H, 4.97 ; N, 10.37 ; trouvée : C, 53.29 ; H, 5.09 ; N, 10.34.

MS (ES+) : m/z 278 $[M]^+$.

4.2.2.7 Synthèse des colorants tri-styryle et tétra-styryles

<u>Chlorure de 2,4,6-tris((E)-4-(diméthylamino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (XX-176, 13a)</u>



Le iodure de 1,2,4,6-tétraméthylpyridin-1-ium (2 g, 7,60 mmol), le 4-(diméthylamino)benzaldéhyde (6,80 g, 45,6 mmol) et la pipéridine (4,52 ml, 45,6 mmol) sont mélangés dans une solution de $CHCl_3$-EtOH (1/3, 120 ml). Le milieu est porté au reflux pendant 20 h puis refroidi à température ambiante. Le précipité rouge (4.6 g) est filtré, lavé à l'éthanol et l'éther. Le précipité (0.5 g) est dissous dans le MeOH et passé par une colonne contenant l'amberlite IRA402 (Cl), la colonne est lavée au MeOH. Le solvant est enlevé sous vide puis recristallisé dans le MeOH pour obtenir un solide noir le chlorure de 2,4,6-tris((E)-4-(diméthylamino)styryl)-1-méthylpyridin-1-ium (0,07 g,

0,124 mmol, rendement : 2 %).

Point de fusion: 218-219 °C.

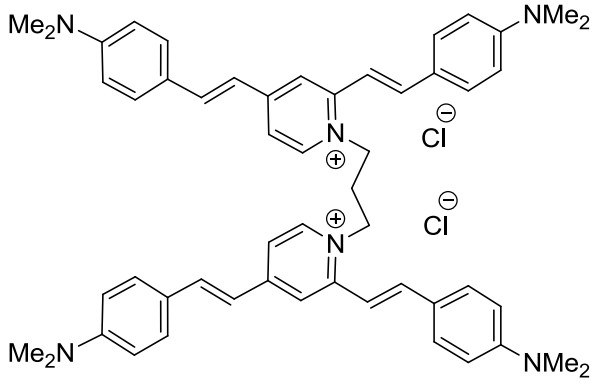
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.09 (s, 2H), 7.96 (d, *J* = 16.1 Hz, 2H), 7.74 – 7.61 (m, 6H), 7.58 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.34 – 7.19 (m, 2H), 7.11 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 6.84 – 6.72 (m, 6H), 4.08 (s, 3H), 3.02 (s, 18H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.67 (Cq), 151.56 (Cq), 151.47 (Cq), 150.32 (Cq), 141.72 (CH), 139.75 (CH), 130.05 (CH), 129.50 (CH), 122.98 (Cq), 122.79 (CH), 118.10 (CH), 116.83 (CH), 113.34 (CH), 112.03 (CH), 111.77 (CH), 39.74 (CH_3).

Analyse calculée pour $C_{36}H_{41}ClN_4 \cdot 1.7H_2O$(595.82) : C, 72.57; H, 7.51 ; N, 9.40; trouvée : C, 672.52; H, 7.25; N, 9.39.

MS (ES+) : m/z 529.4 $[M]^+$.

<u>Chlorure de 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)pyridin-1-ium) (XX-223, 14a)</u>



Le 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(2,4-diméthylpyridin-1-ium) bromure (0,25 g, 0,601 mmol), le 4-(diméthylamino)benzaldéhyde (0,538 g, 3,60 mmol) et la pipéridine (0,238 ml, 2,403 mmol) sont mélangés dans l'éthanol (é 10 ml). Le milieu est porté au reflux pendant 18 h, puis filtré. Le précipité rouge est filtré, lavé à l'éthanol et l'éther, puis dissous dans le MeOH et passé par une colonne contenant l'amberlite IRA-402 (Cl), la colonne est lavée au MeOH. Le solvant est enlevé sous vide et le produit est recristallisé dans le MeOH pour obtenir un solide rouge le chlorure de 1,1'-(propane-1,3-diyl)bis(2,4-bis((E)-4-(diméthylamino)styryl)pyridin-1-ium) (0.2 g, 0.26 mmol, rendement : 43%).

Point de fusion: 236-237 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.52 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.29 (s, 2H), 7.93 – 7.75 (m, 5H), 7.75 – 7.48 (m, 10H), 7.24 – 6.93 (m, 4H), 6.90 – 6.63 (m, 8H), 5.04 – 4.44 (m, 4H), 3.03 (s, 12H), 2.98 (s, 12H), 2.82 – 2.67 (m, 2H).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 152.17 (Cq), 151.88 (Cq), 151.73 (Cq), 143.78 (CH), 143.47 (CH), 140.95 (CH), 130.63 (CH), 129.83 (CH), 122.71 (Cq), 122.41 (Cq), 119.42 (CH), 118.62 (CH), 117.65 (CH), 112.02 (CH), 111.72 (CH), 110.47 (CH), 39.67 (CH_2).

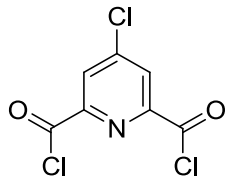
Analyse calculée pour $C_{54}H_{62}Cl_2N_6 \cdot 2H_2O$(902.05) : C, 71.90; H, 7.37 ; N, 9.32; trouvée : C, 72.30; H, 7.39; N, 9.20.

MS (ES+) : m/z 390.5 $[M]^{2+}$.

4.2.3 Synthèse des PDC-coumarines

4.2.3.1 Synthèse du PDC-Cl

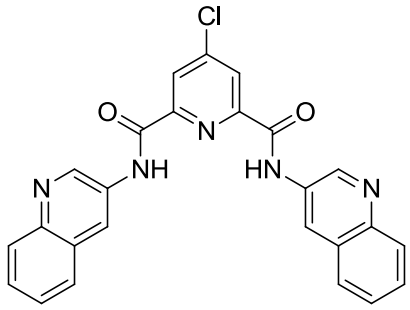
Dichlorure de 4-chloropyridine-2,6-dicarbonyl



Le chlorure de thionyle (25 mL, 344.6 mmol, 35 eq) et le dimethylformamide (0.35 mL, 9 mmol, 0.9 eq) sont ajoutés à l'acide chelidamique (2 g, 9.94 mmol, 1 eq) séché préalablement sous vide pendant 24 heures à 100 °C. Le mélange est chauffé à reflux (100 °C) sous agitation pendant 24 heures pour donner un liquide jaune clair. L'excès de chlorure de thionyle est évaporé sous vide en utilisant une trappe froide. Le résidu est utilisé directement dans l'étape suivante.

^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.34 (s, 2H).

4-Chloro-N2,N6-di(quinolin-3-yl)pyridine-2,6-dicarboxamide (PDC-Cl)



Un mélange de triéthylamine (3.05 mL, 21.9 mmol, 2.2 eq) et de 3-aminoquinoline (3.157 g, 21.9 mmol, 2.2 eq) dans 20 mL de DMF est refroidi dans un bain de glace. A ce mélange est ajouté en 45 minutes environ la 4-chloropyridine-2,6-dicarbonyl dichlorure (9.94 mmol) dissoute dans 10 mL de DMF. Le mélange est laissé sous agitation et à température ambiante pendant environ 4 heures. Un précipité blanc apparaît après ajout d'eau (200 mL). Le précipité est récupéré par filtration et lavé à l'eau (3 x 20 mL), séché à l'air puis sous vide pour donner un solide blanc (3.58 g, 7.88 mmol, 79%).

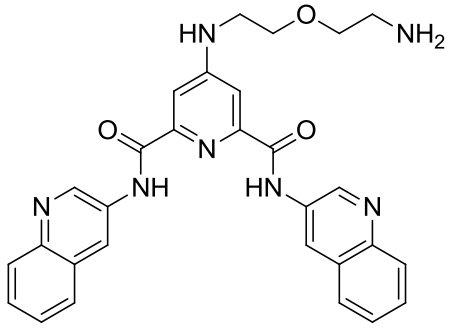
^{1}H RMN (300 MHz, DMSO), δ (ppm): 11.36 (s, 2H), 9.36 (s, 2H), 8.99 (s, 2H), 8.48 (s, 2H), 8.09-7.65 (m, 8H).

MS (ESI^{+}): m/z = 453.9 $[M+H]^{+}$.

4.2.3.2 Synthèse de dérivés PDC amino-substitués (protocole général 4)

Un mélange du PDC-Cl (0.91 g, 2 mmol, 1 eq), N-ethyl-N-isopropylpropan-2-amine (0.70 mL, 4 mmol, 2 eq) et de la diamine (20 mmol, 10 eq) dans 4 mL de la pyridine est chauffé sous agitation à 90 °C pendant 24 heures puis refroidi jusqu'à température ambiante. 50 mL d'eau sont ensuite ajoutés au mélange. Le précipité blanc est récupéré par filtration ou centrifugation, puis lavé à l'eau (2 x 20 mL). Le solide blanc est séché à l'air puis sous vide.

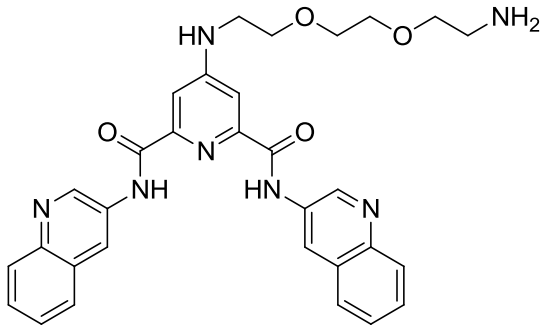
<u>4-((2-(2-Aminoethoxy)ethyl)amino)-N2,N6-di(quinolin-3-yl)pyridine-2,6-dicarboxamide</u>



Rendement : 50%.

^{1}H RMN (300 MHz, DMSO) δ 11.29 (s, 2H), 9.36 (d, *J* = 1.9 Hz, 2H), 8.96 (s, 2H), 8.05 (s, 1H), 8.02 (s, 2H), 7.82 – 7.40 (m, 7H), 3.62 (t, *J* = 4.7 Hz, 2H), 3.54 – 3.36 (m, 7H), 2.67 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H).

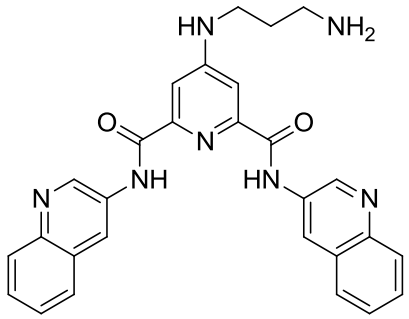
<u>4-((2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethyl)amino)-N2,N6-di(quinolin-3-yl)pyridine-2,6-dicarboxamide</u>



Rendement : 57%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ (ppm): 11.32 (s, 2H), 9.37 (s, 2H), 8.96 (s, 2H), 8.04 (d, *J* = 7.5 Hz, 4H), 7.88 – 7.65 (m, 2H), 7.62 (d, *J* = 6.2 Hz, 6H), 3.57 (dd, *J* = 28.5, 18.0 Hz, 12H).

<u>4-((3-Aminopropyl)amino)-N2,N6-di(quinolin-3-yl)pyridine-2,6-dicarboxamide</u>



Rendement : 61%.

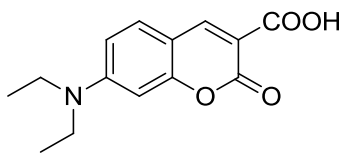
^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ (ppm) : 11.30 (s, 2H), 9.36 (s, 2H), 8.97 (s, 2H), 8.10-8.00 (m, 4H), 7.90 – 7.30 (m, 8H), 2.69 (s, 2H), 2.09 (s, 2H), 1.69 (s, 2H).

4.2.3.3 Synthèse des esters activés des acides coumarine-3-carboxyliques

Synthèse des acides coumarine-3-carboxyliques (protocole général 5)

Un mélange de hydroxybenzaldehyde substitué (40 mmol, 1 eq), de diethylmalonate (12.20 mL, 80 mmol, 2 eq), de pipéridine (3.95 mL, 40 mmol, 1 eq) et d'éthanol (60 mL) est chauffé à reflux (100 °C) et sous agitation pendant 6 heures. De l'hydroxyde de sodium est ensuite ajouté (10%, 120 mL), un précipité jaune apparaît, le mélange est agité vigoureusement sous reflux jusqu'à dissolution totale du solide puis est refroidi à température ambiante. Le mélange est ensuite placé dans un bain de glace et acidifié avec de l'acide chlorhydrique concentré (30 mL). Après une heure dans le bain de glace, le solide orange est récupéré par filtration, lavé à l'eau (3 x 20 mL), séché à l'air puis sous vide.

<u>Acide 7-(diethylamino)coumarin-3-carboxylique</u>

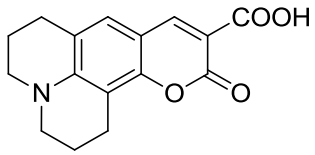


Rendement : 70%.

Point de fusion: 210-215 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ (ppm): 12.52 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 7.65 (d, 1H), 6.80 (d, 1H), 6.57 (d, 1H), 3.55-3.30 (m, 4H), 1.14 (t, 6H).

Acide 11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahydro-1H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinoline-10-carboxylique

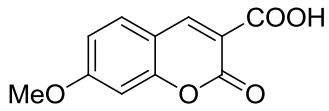


Rendement : 8%.

Point de fusion: 235-236 °C

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.68 (brs, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 3.66 – 3.30 (m, 4H), 2.89 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.22 – 1.74 (m, 4H).

Acide 7-(méthoxy)coumarin-3-carboxylique



Rendement : 95%.

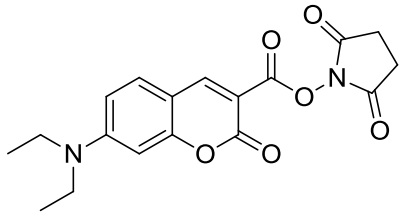
Point de fusion: 194-195 °C (lit. 195 [134]).

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.21 (brs, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.03 (dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H).

Synthèse des esters activés (protocole général 6)

Une solution d'acide coumarine-3-carboxylique (7.5 mmol, 1 eq), N-hydroxysuccinimide (1.38 g, 12 mmol, 1.6 eq), chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDCI) (1.51 g, 9.75 mmol, 1.3 eq) et de N,N-diisopropyléthylamine (DIEA) (1.7 mL, 9.75 mmol, 1.3 eq) dans du DMF (37.5 mL) est agitée à température ambiante pendant 18 heures puis versée sur de l'eau glacée (environ 250 mL). Le précipité est récupéré par filtration et lavé à l'eau froide (3x50 mL) puis séché à l'air et sous vide pour donner un solide jaune.

N-Hydroxysuccinimidyl-7-(diéthylamino)coumarin-3-carboxylate

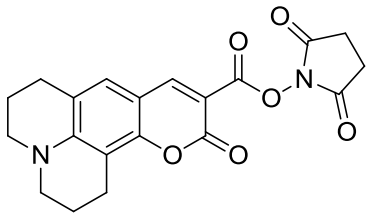


Rendement : 63%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ (ppm): 8.60 (s, 1H), 7.36 (d, 1H), 6.66 (d, 1H), 6.48 (s, 1H), 3.54-3.44 (m, 4H), 2.90 (s, 4H), 1.28 (t, 6H).

Point de fusion: 220-225 °C.

N-Hydroxysuccinimidyl-11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahydro-1H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinoline-10-carboxylate

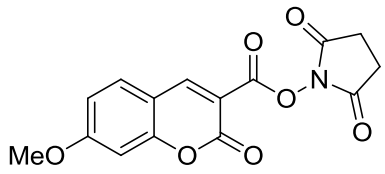


Rendement : 78%.

Point de fusion: 238-239 °C

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 8.60 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 3.52 – 3.37 (m, 4H), 2.96 – 2.79 (m, 4H), 2.78 – 2.63 (m, 4H), 2.03 – 1.78 (m, 4H).

N-Hydroxysuccinimidyl-7-(méthoxy)coumarin-3-carboxylate



Rendement : 64%.

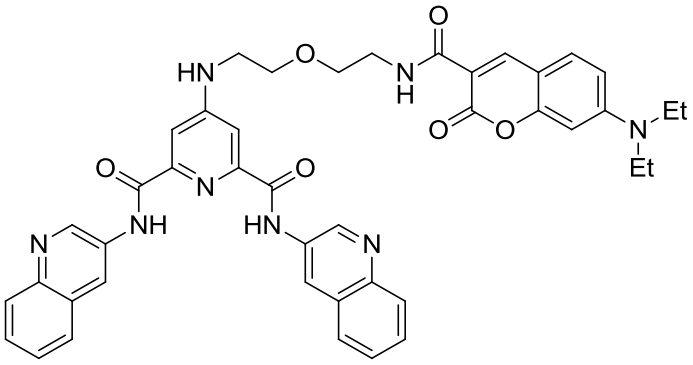
Point de fusion: 227-228 °C

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 9.07 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.09 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.08 – 2.71 (m, 4H).

4.2.3.4 Synthèse des PDC-Coumarines (protocole général 7)

Un mélange de dérivé PDC N-amino-substitué (0.5 mmol, 1 eq) et de coumarine (0.5 mmol, 1 eq) dans de la pyridine (5 mL) est agité sous argon pendant 24 heures. De l'acétone est ensuite ajoutée (20 mL) , le précipité qui app%araît est récupéré par filtration, lavé à l'acétone (2 x 10 mL) puis à l'éther (2 x 10 mL), séché à l'air puis sous vide pour donner un solide jaune.

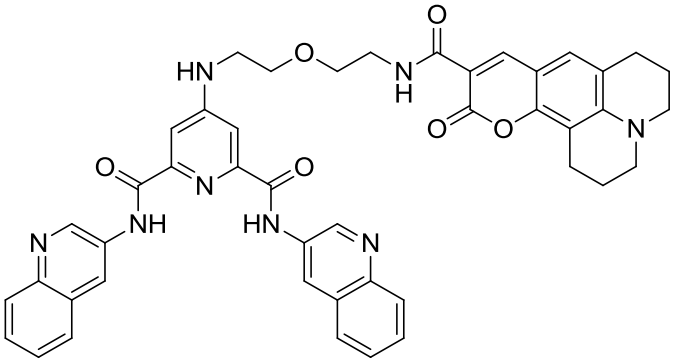
4-((2-(2-(7-(Diéthylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)éthoxy)éthyl)amino)-N2,N6-di(quinolin-3-yl)pyridine-2,6-dicarboxamide



Rendement : 72%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.23 (s, 2H), 9.34 (s, 2H), 8.96 (s, 2H), 8.79 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.03 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H), 7.84 – 7.38 (m, 8H), 6.66 (dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz, 1H), 6.49 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 3.85 – 3.56 (m, 4H), 3.56 – 3.41 (m, 4H), 3.41 – 3.29 (m, 4H), 1.06 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H).

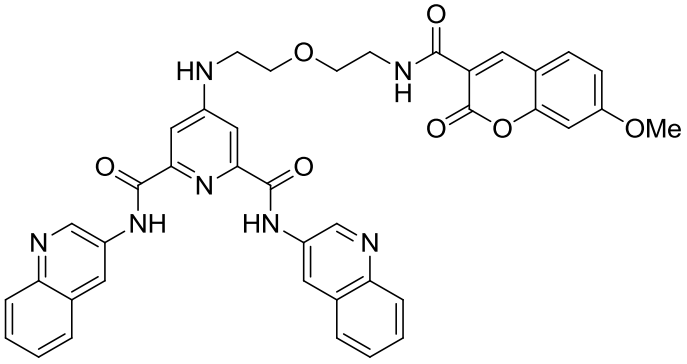
<u>4-((2-(2-(11-Oxo-2,3,5,6,7,11-hexahydro-1H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinoline-10-carboxamido)éthoxy)éthyl)amino)-N2,N6-di(quinolin-3-yl)pyridine-2,6-dicarboxamide</u>



Rendement : 66%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.18 (s, 2H), 9.33 (s, 2H), 8.96 (s, 2H), 8.77 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.03 (t, *J* = 7.9 Hz, 4H), 7.81 – 7.53 (m, 7H), 7.49 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 3.79 – 3.57 (m, 6H), 3.22 – 3.07 (m, 6H), 2.82 – 2.53 (m, 6H), 1.91 – 1.57 (m, 4H).

<u>4-((2-(2-(7-Méthoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)éthoxy)éthyl)amino)-N2,N6-di(quinolin-3-yl)pyridine-2,6-dicarboxamide</u>

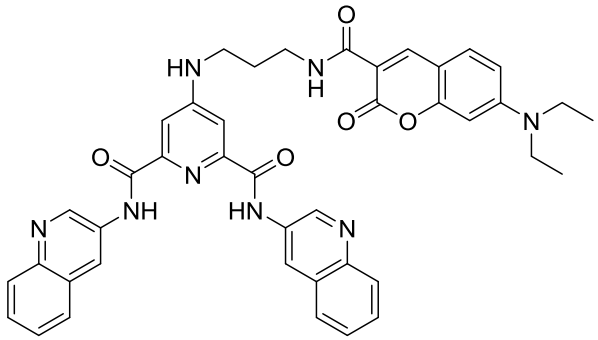


Rendement : 29%.

Point de fusion: 175-176 °C

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ(ppm): 11.21 (s, 2H), 9.33 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H), 8.93 (s, 2H), 8.78 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H), 8.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 7.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.77 – 7.41 (m, 9H), 6.97 (s, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 3.77 (s, 7H), 3.74 – 3.59 (m, 5H), 3.52 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 3.17 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H).

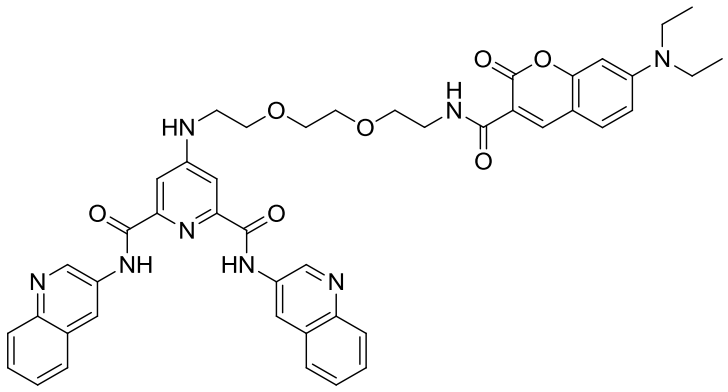
<u>4-((3-(7-(Diéthylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)propyl)amino)-N2,N6-di(quinolin-3-yl)pyridine-2,6-dicarboxamide</u>



Rendement : 68%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ (ppm): 11.26 (s, 2H), 9.34 (s, 2H), 8.94 (s, 2H), 8.77 (bs, 1H),8.64 (s, 1H), 8.08-7.96 (m, 4H), 7.76-7.49 (m, 7H), 6.74 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 3.51-3.38 (m, 8H), 1.95-1.84 (m, 2H), 1.15-1.05 (m, 6H).

<u>4-((2-(2-(2-(7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)éthoxy)éthoxy)ethyl)amino)-N2,N6-di(quinolin-3-yl)pyridine-2,6-dicarboxamide :</u>



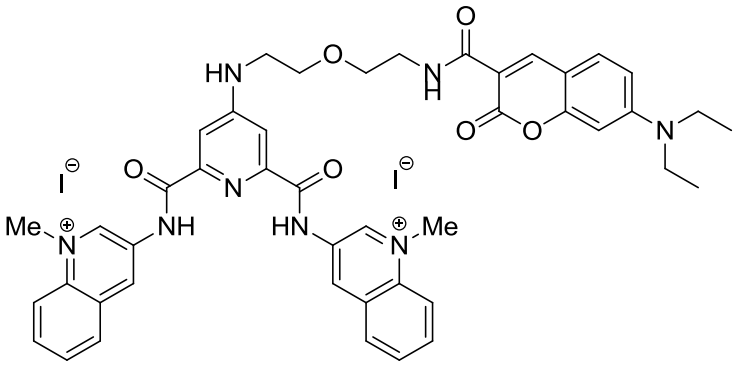
Rendement : 48%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ (ppm): 11.24 (s, 2H), 9.33 (s, 2H), 8.95 (s, 2H), 8.77 (bs, 1H), 8.62 (s,1H), 8.08-7.96 (m, 4H), 7.76-7.50 (m, 7H), 6.70 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 3.73-3.37 (m, 16H), 1.08 (t, *J* = 6.6 Hz, 6H).

4.2.3.5 Méthylation des PDC-Coumarines (protocole général 8)

Un mélange de conjugué PDC-coumarine (0.1 g, 0.136 mmol, 1 eq) et d'iodométhane (0.846 mL, 13.6 mmol, 100 eq) dans du DMF (9.2 mL) est chauffé à 40 °C, sous agitation, pendant 24 heures. Le solide obtenu est recristallisé dans un mélange d'acétonitrile et eau. Le solide obtenu est séché sous vide.

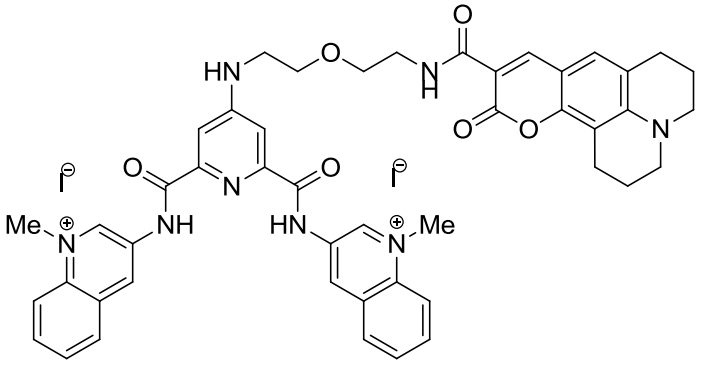
Iodure de 3,3'-((4-((2-(2-(7-(diéthylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)ethoxy)éthyl)amino)pyridine-2,6-dicarbonyl)bis(azanediyl))bis(1-méthylquinolin-1-ium)



Rendement : 85%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.68 (s, 2H), 10.12 (s, 2H), 9.61 (s, 2H), 8.88 – 8.44 (m, 6H), 8.31 – 7.95 (m, 4H), 7.83 – 7.47 (m, 4H), 6.69 (dd, *J* = 9.0, 2.2 Hz, 2H), 6.50 (s, 2H), 4.78 (s, 6H), 3.83 – 3.54 (m, 4H), 3.55 – 3.42 (m, 4H), 3.44 – 3.24 (m, 16H), 1.08 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H).

Iodure de 3,3'-((4-((2-(2-(11-oxo-2,3,5,6,7,11-hexahydro-1H-pyrano[2,3-f]pyrido[3,2,1-ij]quinoline-10-carboxamido)éthoxy)éthyl)amino)pyridine-2,6-dicarbonyl)bis(azanediyl))bis(1-méthylquinolin-1-ium) (PC1-b)



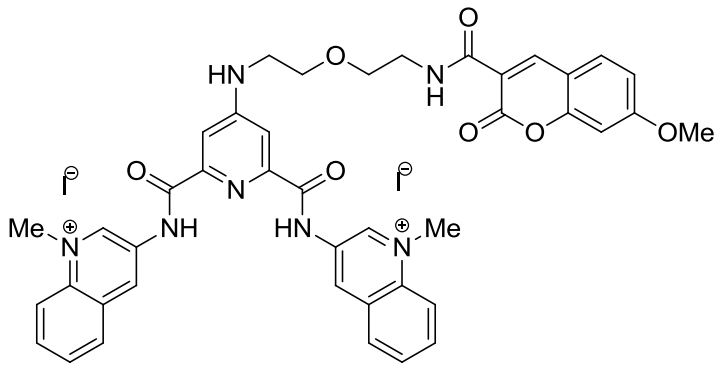
Rendement : 88%.

Point de fusion: 239-240 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ (ppm): 11.69 (s, 2H), 10.12 (s, 2H), 9.61 (s, 2H), 8.80 (s, 1H), 8.77 – 8.36 (m, 4H), 8.34 – 7.94 (m, 3H), 7.82 – 7.50 (m, 3H), 7.22 (s, 1H), 4.78 (s, 6H), 3.82 – 3.56 (m, 4H), 3.57 – 3.41 (m, 4H), 3.31 – 3.08 (m, 4H), 2.77 – 2.58 (m, 4H), 1.89 – 1.66 (m, 4H).

MS (ES+) : m/z 409 $[M]^{2+}$.

<u>Iodure de 3,3'-((4-((2-(2-(7-méthoxy-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)ethoxy)éthyl)amino)-pyridine-2,6-dicarbonyl)bis(azanediyl))bis(1-méthylquinolin-1-ium) (PC1-c)</u>



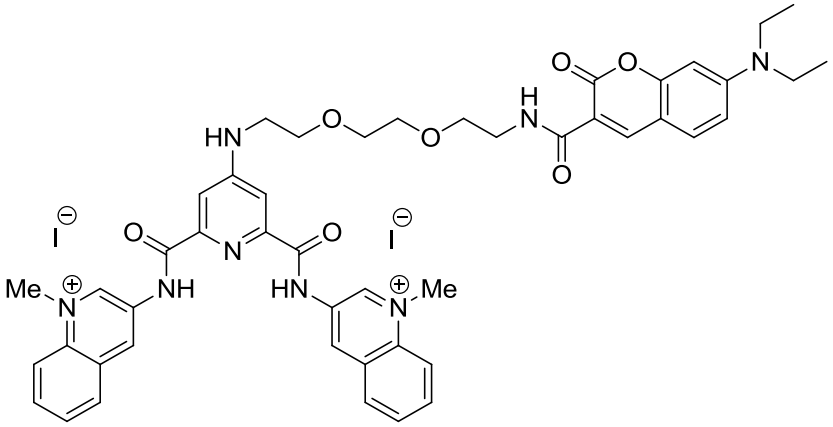
Rendement : 29%.

Point de fusion: 255-256 °C.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$-DMSO: 50-50) δ (ppm): 10.58 (s, 2H), 9.96 (s, 2H), 8.87 (s, 1H), 8.61 – 7.91 (m, 8H), 7.89 – 7.62 (m, 3H), 6.94 (s, 2H), 4.84 (s, 6H), 4.04 – 3.50 (m, 12H).

MS (ES+) : m/z 377 $[M]^{2+}$.

<u>Iodure de 3,3'-((4-((2-(2-(2-(7-(diéthylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)ethoxy)éthoxy)éthyl)amino)pyridine-2,6-dicarbonyl)bis(azanediyl))bis(1-méthylquinolin-1-ium) (PC2-a)</u>

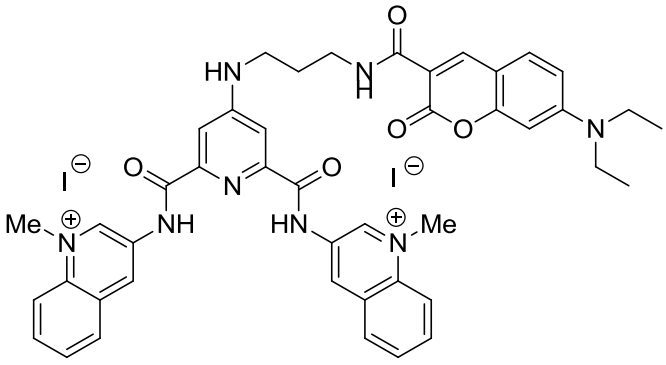


Rendement : 27%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ (ppm): 11.68 (s, 2H), 10.10 (s, 2H), 9.61 (s, 2H), 8.74 (bs, 1H), 8.61 (s,1H), 8.59-8.50 (m, 4H), 8.27-8.03 (m, 4H),7.80-7.50 (m,3H), 6.72 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H),4.78 (s, 6H), 3.72-3.32 (m, 16H), 1.10 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H).

Point de fusion: 185-189 °C.

<u>Iodure de 3,3'-((4-((3-(7-(diéthylamino)-2-oxo-2H-chromene-3-carboxamido)propyl)amino)-pyridine-2,6-dicarbonyl)bis(azanediyl))bis(1-méthylquinolin-1-ium) (PC3-a)</u>



Rendement : 70%.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO), δ (ppm): 11.70 (s, 2H), 10.10 (s, 2H), 9.61 (s, 2H), 8.77 (bs, 1H), 8.63 (s, 1H), 8.60-8.50 (m, 4H), 8.30-8.00 (m, 4H), 7.80-7.50 (m, 3H), 6.75 (d, *J* =

8.7 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.78 (s, 6H), 3.47-3.25 (m, 8H), 1.96-1.83 (m, 2H), 1.11 (t, *J* = 6.9 Hz, 6H).

Point de fusion: 195-200 °C.

BIBLIOGRAPHIE

[1] J. Pellicer, M. F. Fay, and I. J. Leitch, “The largest eukaryotic genome of them all?,” *Bot. J. Linn. Soc.*, vol. 164, pp. 10–15, 2010.

[2] W. Klein and S. J. Thannhauser, “Experimentelle Studien über den Nucleinstoffwechsel. XXXII. Mitteilung: Über die Ribodesose-Guanylsäure.,” *Hoppe-Seyler´s Zeitschrift für Physiol. Chemie*, vol. 218, no. 3–4, pp. 173–180, Jan. 1933.

[3] J. D. Watson and F. H. C. Crick, “Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid (Reprinted from Nature, April 25, 1953),” *Nature*, vol. 224, no. 4356. pp. 470–471, 25-Apr-1969.

[4] S. Neidle, *Nucleic acid structure and recognition*. Oxford University Press, 2002, p. 33.

[5] “DNA.” [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/DNA.

[6] A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel, and A. Rich, “Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution,” *Nature*, vol. 282, no. 5740, pp. 680–686, Dec. 1979.

[7] A. Jain, G. Wang, and K. M. Vasquez, “DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential.,” *Biochimie*, vol. 90, no. 8, pp. 1117–30, Aug. 2008.

[8] H. Manor, B. S. Rao, and R. G. Martin, “Abundance and degree of dispersion of genomic d(GA)n.d(TC)n sequences.,” *J. Mol. Evol.*, vol. 27, no. 2, pp. 96–101, Jan. 1988.

[9] X. Wang and J. E. Haber, “Role of Saccharomyces single-stranded DNA-binding protein RPA in the strand invasion step of double-strand break repair.,” *PLoS Biol.*, vol. 2, no. 1, p. E21, Jan. 2004.

[10] G. Song and J. Ren, “Recognition and regulation of unique nucleic acid structures by small molecules.,” *Chem. Commun. (Camb).*, vol. 46, no. 39, pp. 7283–94, Oct. 2010.

[11] E. Palecek, “Local supercoil-stabilized DNA structures.,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 26, no. 2, pp. 151–226, Jan. 1991.

[12] C. E. Pearson, H. Zorbas, G. B. Price, and M. Zannis-Hadjopoulos, “Inverted repeats, stem-loops, and cruciforms: significance for initiation of DNA replication.,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 63, no. 1, pp. 1–22, Oct. 1996.

[13] M. L. Bochman, K. Paeschke, and V. A. Zakian, “DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures.,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 13, no. 11, pp. 770–80, Nov. 2012.

[14] J. Zhao, A. Bacolla, G. Wang, and K. M. Vasquez, “Non-B DNA structure-induced genetic instability and evolution.,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 67, no. 1, pp. 43–62, Jan. 2010.

[15] D. N. Gopaul, F. Guo, and G. D. Van Duyne, “Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination.,” *EMBO J.*, vol. 17, no. 14, pp. 4175–87, Jul. 1998.

[16] E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin, “UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.,” *J. Comput. Chem.*, vol. 25, no. 13, pp. 1605–12, Oct. 2004.

[17] T. E. Malliavin, J. Gau, K. Snoussi, and J. Leroy, “Stability of the I-motif structure is related to the interactions between phosphodiester backbones.,” *Biophys. J.*, vol. 84, no. 6, pp. 3838–47, Jun. 2003.

[18] Y. Yang, C. Zhou, T. Zhang, E. Cheng, Z. Yang, and D. Liu, “DNA pillars constructed from an i-motif stem and duplex branches.,” *Small*, vol. 8, no. 4, pp. 552–6, Feb. 2012.

[19] M. Gellert, M. N. Lipsett, and D. R. Davies, “Helix formation by guanylic acid,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 48, no. 12, pp. 2013–2018, 1962.

[20] N. V. Hud and J. Plavec, *In: Quadruplex Nucleic Acids.* Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge, 2006, p. 100.

[21] G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, and S. Neidle, “Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA.,” *Nature*, vol. 417, no. 6891, pp. 876–80, Jun. 2002.

[22] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, and S. Neidle, “Quadruplex DNA: sequence, topology and structure.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 19, pp. 5402–15, Jan. 2006.

[23] D. Mohanty and M. Bansal, “Conformational polymorphism in G-tetraplex structures: strand reversal by base flipover or sugar flipover.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 21, no. 8, pp. 1767–74, Apr. 1993.

[24] M. Webba da Silva, “Geometric formalism for DNA quadruplex folding.,” *Chemistry*, vol. 13, no. 35, pp. 9738–45, Jan. 2007.

[25] A. T. Phan, V. Kuryavyi, K. N. Luu, and D. J. Patel, “Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K+ solution.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 19, pp. 6517–25, Jan. 2007.

[26] Y. Wang and D. J. Patel, “Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex.,” *Structure*, vol. 1, pp. 263–282, 1993.

[27] K. N. Luu, A. T. Phan, V. Kuryavyi, L. Lacroix, and D. J. Patel, “Structure of the human telomere in K+ solution: an intramolecular (3 + 1) G-quadruplex scaffold.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 30, pp. 9963–70, Aug. 2006.

[28] A. T. Phan, K. N. Luu, and D. J. Patel, “Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3+1) G-quadruplexes in K+ solution.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 19, pp. 5715–9, Jan. 2006.

[29] J. Dai, M. Carver, L. H. Hurley, and D. Yang, “Solution structure of a 2:1 quindoline-c-MYC G-quadruplex: insights into G-quadruplex-interactive small molecule drug design.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 44, pp. 17673–80, Nov. 2011.

[30] R. I. Mathad, E. Hatzakis, J. Dai, and D. Yang, “c-MYC promoter G-quadruplex formed at the 5’-end of NHE III1 element: insights into biological relevance and parallel-stranded G-quadruplex stability.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 20, pp. 9023–33, Nov. 2011.

[31] S. Rankin, A. P. Reszka, J. Huppert, M. Zloh, G. N. Parkinson, A. K. Todd, S. Ladame, S. Balasubramanian, and S. Neidle, “Putative DNA quadruplex formation within the human c-kit oncogene.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 30, pp. 10584–9, Aug. 2005.

[32] A. T. Phan, V. Kuryavyi, S. Burge, S. Neidle, and D. J. Patel, “Structure of an unprecedented G-quadruplex scaffold in the human c-kit promoter.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 14, pp. 4386–92, Apr. 2007.

[33] V. Kuryavyi, A. T. Phan, and D. J. Patel, “Solution structures of all parallel-stranded monomeric and dimeric G-quadruplex scaffolds of the human c-kit2 promoter.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 19, pp. 6757–73, Oct. 2010.

[34] G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, and S. Balasubramanian, “Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells.,” *Nat. Chem.*, vol. 5, no. 3, pp. 182–6, Mar. 2013.

[35] J. L. Huppert and S. Balasubramanian, “G-quadruplexes in promoters throughout the human genome.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 2, pp. 406–13, Jan. 2007.

[36] H. J. Lipps and D. Rhodes, “G-quadruplex structures: in vivo evidence and function.,” *Trends Cell Biol.*, vol. 19, no. 8, pp. 414–22, Aug. 2009.

[37] M. Düchler, “G-quadruplexes: targets and tools in anticancer drug design.,” *J. Drug Target.*, vol. 20, no. 5, pp. 389–400, Jun. 2012.

[38] E. W. Choi, L. V Nayak, and P. J. Bates, “Cancer-selective antiproliferative activity is a general property of some G-rich oligodeoxynucleotides.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 5, pp. 1623–35, Mar. 2010.

[39] T. R. Schwartz, C. a Vasta, T. L. Bauer, H. Parekh-Olmedo, and E. B. Kmiec, “G-rich oligonucleotides alter cell cycle progression and induce apoptosis

specifically in OE19 esophageal tumor cells.," *Oligonucleotides*, vol. 18, no. 1, pp. 51–63, Jan. 2008.

[40] A. T. Phan, "Human telomeric G-quadruplex: structures of DNA and RNA sequences.," *FEBS J.*, vol. 277, no. 5, pp. 1107–17, Mar. 2010.

[41] D. L. Aisner, W. E. Wright, and J. W. Shay, "Telomerase regulation: not just flipping the switch.," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 12, no. 1, pp. 80–5, Feb. 2002.

[42] W. C. Hahn and R. A. Weinberg, "Rules for making human tumor cells.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 347, no. 20, pp. 1593–603, Nov. 2002.

[43] G. W. Collie, S. M. Haider, S. Neidle, and G. N. Parkinson, "A crystallographic and modelling study of a human telomeric RNA (TERRA) quadruplex.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 16, pp. 5569–80, Sep. 2010.

[44] G. Pennarun, C. Granotier, L. R. Gauthier, D. Gomez, F. Hoffschir, E. Mandine, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, P. Mailliet, and F. D. Boussin, "Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands.," *Oncogene*, vol. 24, no. 18, pp. 2917–28, Apr. 2005.

[45] S. Neidle, "Human telomeric G-quadruplex: the current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer.," *FEBS J.*, vol. 277, no. 5, pp. 1118–25, Mar. 2010.

[46] S. Neidle and G. Parkinson, "Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. 5, pp. 383–93, May 2002.

[47] E. M. Rezler, D. J. Bearss, and L. H. Hurley, "Telomere inhibition and telomere disruption as processes for drug targeting.," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 43, no. 4, pp. 359–79, Jan. 2003.

[48] J. Cuesta, M. a Read, and S. Neidle, "The design of G-quadruplex ligands as telomerase inhibitors.," *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 3, no. 1, pp. 11–21, Feb. 2003.

[49] H. Yaku, T. Fujimoto, T. Murashima, D. Miyoshi, and N. Sugimoto, “Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications.,” *Chem. Commun. (Camb).*, vol. 48, no. 50, pp. 6203–16, Jun. 2012.

[50] S. Balasubramanian, L. H. Hurley, and S. Neidle, “Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 10, no. 4, pp. 261–75, Apr. 2011.

[51] R. K. Thakur, P. Kumar, K. Halder, A. Verma, A. Kar, J.-L. Parent, R. Basundra, A. Kumar, and S. Chowdhury, “Metastases suppressor NM23-H2 interaction with G-quadruplex DNA within c-MYC promoter nuclease hypersensitive element induces c-MYC expression.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. 1, pp. 172–83, Jan. 2009.

[52] Y. Qin and L. H. Hurley, “Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions.,” *Biochimie*, vol. 90, no. 8, pp. 1149–71, Aug. 2008.

[53] S. Kumari, A. Bugaut, J. L. Huppert, and S. Balasubramanian, “An RNA G-quadruplex in the 5’ UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation.,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 4, pp. 218–21, Apr. 2007.

[54] S. Kumari, A. Bugaut, and S. Balasubramanian, “Position and stability are determining factors for translation repression by an RNA G-quadruplex-forming sequence within the 5’ UTR of the NRAS proto-oncogene.,” *Biochemistry*, vol. 47, no. 48, pp. 12664–9, Dec. 2008.

[55] A. Arora, M. Dutkiewicz, V. Scaria, M. Hariharan, S. Maiti, and J. Kurreck, “Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif.,” *RNA*, vol. 14, no. 7, pp. 1290–6, Jul. 2008.

[56] M. J. Morris and S. Basu, “An unusually stable G-quadruplex within the 5’-UTR of the MT3 matrix metalloproteinase mRNA represses translation in eukaryotic cells.,” *Biochemistry*, vol. 48, no. 23, pp. 5313–9, Jun. 2009.

[57] A. Bugaut, R. Rodriguez, S. Kumari, S.-T. D. Hsu, and S. Balasubramanian, “Small molecule-mediated inhibition of translation by targeting a native RNA G-quadruplex.,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 8, no. 12, pp. 2771–6, Jun. 2010.

[58] G. D. Balkwill, K. Derecka, T. P. Garner, C. Hodgman, A. P. F. Flint, and M. S. Searle, “Repression of translation of human estrogen receptor alpha by G-quadruplex formation.,” *Biochemistry*, vol. 48, no. 48, pp. 11487–95, Dec. 2009.

[59] D. Gilley, H. Tanaka, and B.-S. Herbert, “Telomere dysfunction in aging and cancer.,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 37, no. 5, pp. 1000–13, May 2005.

[60] K. Paeschke, T. Simonsson, J. Postberg, D. Rhodes, and H. J. Lipps, “Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo.,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 10, pp. 847–54, Oct. 2005.

[61] G. Song and J. Ren, “Recognition and regulation of unique nucleic acid structures by small molecules.,” *Chem. Commun. (Camb).*, vol. 46, no. 39, pp. 7283–94, Oct. 2010.

[62] C. Shan, J.-H. Tan, T.-M. Ou, and Z.-S. Huang, “Natural products and their derivatives as G-quadruplex binding ligands,” *Sci. China Chem.*, vol. 56, no. 10, pp. 1351–1363, Aug. 2013.

[63] M. Read, R. J. Harrison, B. Romagnoli, F. a Tanious, S. H. Gowan, a P. Reszka, W. D. Wilson, L. R. Kelland, and S. Neidle, “Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 9, pp. 4844–9, Apr. 2001.

[64] F. Cuenca, O. Greciano, M. Gunaratnam, S. Haider, D. Munnur, R. Nanjunda, W. D. Wilson, and S. Neidle, “Tri- and tetra-substituted naphthalene diimides as potent G-quadruplex ligands.,” *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 5, pp. 1668–73, Mar. 2008.

[65] G. N. Parkinson, F. Cuenca, and S. Neidle, “Topology conservation and loop flexibility in quadruplex-drug recognition: crystal structures of inter- and intramolecular telomeric DNA quadruplex-drug complexes.,” *J. Mol. Biol.*, vol. 381, no. 5, pp. 1145–56, Sep. 2008.

[66] T. Lemarteleur, D. Gomez, R. Paterski, E. Mandine, P. Mailliet, and J.-F. Riou, “Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands’ inhibitors of telomerase.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 323, no. 3, pp. 802–8, Oct. 2004.

[67] W. J. Chung, B. Heddi, F. Hamon, M.-P. Teulade-Fichou, and A. T. Phan, “Solution Structure of a G-quadruplex Bound to the Bisquinolinium Compound Phen-DC 3,” *Angew. Chemie*, vol. 126, no. 4, pp. 1017–1020, Jan. 2014.

[68] D. F. Shi, R. T. Wheelhouse, D. Sun, and L. H. Hurley, “Quadruplex-interactive agents as telomerase inhibitors: synthesis of porphyrins and structure-activity relationship for the inhibition of telomerase.,” *J. Med. Chem.*, vol. 44, no. 26, pp. 4509–23, Dec. 2001.

[69] E. Izbicka, R. T. Wheelhouse, E. Raymond, K. K. Davidson, R. A. Lawrence, D. Sun, B. E. Windle, L. H. Hurley, and D. D. Von Hoff, “Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells.,” *Cancer Res.*, vol. 59, no. 3, pp. 639–44, Feb. 1999.

[70] G. Biffi, M. Di Antonio, D. Tannahill, and S. Balasubramanian, “Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells.,” *Nat. Chem.*, vol. 6, no. 1, pp. 75–80, Jan. 2014.

[71] A. De Cian, L. Guittat, K. Shin-ya, J.-F. Riou, and J.-L. Mergny, “Affinity and selectivity of G4 ligands measured by FRET.,” *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf).*, no. 49, pp. 235–6, Jan. 2005.

[72] L. Martino, A. Virno, B. Pagano, A. Virgilio, S. Di Micco, A. Galeone, C. Giancola, G. Bifulco, L. Mayol, and A. Randazzo, “Structural and thermodynamic studies of the interaction of distamycin A with the parallel quadruplex structure [d(TGGGGT)]4.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 51, pp. 16048–56, Dec. 2007.

[73] “Stokes shift.” [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Stokes_shift.

[74] B. Valeur, M. N. Berberan-Santo, and M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, 2002.

[75] J. Nygren, N. Svanvik, and M. Kubista, “The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA.,” *Biopolymers*, vol. 46, no. 1, pp. 39–51, Jul. 1998.

[76] V. Karunakaran, J. L. Pérez Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, and O. Seitz, “Large dynamic Stokes shift of DNA intercalation dye Thiazole Orange has contribution

from a high-frequency mode.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 9, pp. 2954–62, Mar. 2006.

[77] S. A. De Silva, M. L. Kasner, M. a. Whitener, and S. L. Pathirana, "A computational study of a fluorescent photoinduced electron transfer (PET) sensor for cations," *Int. J. Quantum Chem.*, vol. 100, no. 5, pp. 753–757, 2004.

[78] E. Largy, A. Granzhan, F. Hamon, D. Verga, and M.-P. Teulade-Fichou, "Visualizing the quadruplex: from fluorescent ligands to light-up probes.," *Top. Curr. Chem.*, vol. 330, no. August 2012, pp. 111–77, Jan. 2013.

[79] T. L. Netzel, K. Nafisi, M. Zhao, J. R. Lenhard, and I. Johnson, "Base-Content Dependence of Emission Enhancements, Quantum Yields, and Lifetimes for Cyanine Dyes Bound to Double-Strand DNA: Photophysical Properties of Monomeric and Bichromomphoric DNA Stains," *J. Phys. Chem.*, vol. 99, no. 51, pp. 17936–17947, Dec. 1995.

[80] E. Largy, F. Hamon, and M.-P. Teulade-Fichou, "Development of a high-throughput G4-FID assay for screening and evaluation of small molecules binding quadruplex nucleic acid structures.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 400, no. 10, pp. 3419–27, Jul. 2011.

[81] D. Monchaud, C. Allain, and M.-P. Teulade-Fichou, "Thiazole orange: a useful probe for fluorescence sensing of G-quadruplex-ligand interactions.," *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids*, vol. 26, no. 10–12, pp. 1585–8, Jan. 2007.

[82] D. Monchaud, C. Allain, H. Bertrand, N. Smargiasso, F. Rosu, V. Gabelica, A. De Cian, J.-L. Mergny, and M.-P. Teulade-Fichou, "Ligands playing musical chairs with G-quadruplex DNA: a rapid and simple displacement assay for identifying selective G-quadruplex binders.," *Biochimie*, vol. 90, no. 8, pp. 1207–23, Aug. 2008.

[83] C. Granotier, G. Pennarun, L. Riou, F. Hoffschir, L. R. Gauthier, A. De Cian, D. Gomez, E. Mandine, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, P. Mailliet, B. Dutrillaux, and F. D. Boussin, "Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 13, pp. 4182–90, Jan. 2005.

[84] P. Yang, A. De Cian, M.-P. Teulade-Fichou, J.-L. Mergny, and D. Monchaud, “Engineering bisquinolinium/thiazole orange conjugates for fluorescent sensing of G-quadruplex DNA.,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 48, no. 12, pp. 2188–91, Jan. 2009.

[85] Y.-J. Lu, T.-M. Ou, J.-H. Tan, J.-Q. Hou, W.-Y. Shao, D. Peng, N. Sun, X.-D. Wang, W.-B. Wu, X.-Z. Bu, Z.-S. Huang, D.-L. Ma, K.-Y. Wong, and L.-Q. Gu, “5-N-methylated quindoline derivatives as telomeric g-quadruplex stabilizing ligands: effects of 5-N positive charge on quadruplex binding affinity and cell proliferation.,” *J. Med. Chem.*, vol. 51, no. 20, pp. 6381–92, Oct. 2008.

[86] C.-C. Chang, J.-Y. Wu, C.-W. Chien, W.-S. Wu, H. Liu, C.-C. Kang, L.-J. Yu, and T.-C. Chang, “A fluorescent carbazole derivative: high sensitivity for quadruplex DNA.,” *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 22, pp. 6177–83, Nov. 2003.

[87] C. Chang, J. Wu, and T. Chang, “A carbazole derivative synthesis for stabilizing the quadruplex structure,” *J. Chinese …*, pp. 185–188, 2003.

[88] C.-C. Chang, C.-W. Chien, Y.-H. Lin, C.-C. Kang, and T.-C. Chang, “Investigation of spectral conversion of d(TTAGGG)4 and d(TTAGGG)13 upon potassium titration by a G-quadruplex recognizer BMVC molecule.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 9, pp. 2846–60, Jan. 2007.

[89] C. Wei, G. Jia, J. Yuan, Z. Feng, and C. Li, “A spectroscopic study on the interactions of porphyrin with G-quadruplex DNAs.,” *Biochemistry*, vol. 45, no. 21, pp. 6681–91, May 2006.

[90] H.-J. Zhang, X.-F. Wang, P. Wang, X.-C. Ai, and J.-P. Zhang, “Spectroscopic study on the binding of a cationic porphyrin to DNA G-quadruplex under different K+ concentrations.,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 7, no. 8, pp. 948–55, Aug. 2008.

[91] N. V Anantha, M. Azam, and R. D. Sheardy, “Porphyrin binding to quadrupled T4G4.,” *Biochemistry*, vol. 37, no. 9, pp. 2709–14, Mar. 1998.

[92] M. M. Sanders, a a Liu, T. K. Li, H. Y. Wu, S. D. Desai, Y. Mao, E. H. Rubin, E. J. LaVoie, D. Makhey, and L. F. Liu, “Selective cytotoxicity of topoisomerase-

directed protoberberines against glioblastoma cells.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 56, no. 9, pp. 1157–66, Nov. 1998.

[93] M. S. Díaz, M. L. Freile, and M. I. Gutiérrez, "Solvent effect on the UV/Vis absorption and fluorescence spectroscopic properties of berberine.," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 8, no. 7, pp. 970–4, Jul. 2009.

[94] A. Renaud de la Faverie, A. Guédin, A. Bedrat, L. a Yatsunyk, and J.-L. Mergny, "Thioflavin T as a fluorescence light-up probe for G4 formation.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 8, p. e65, Apr. 2014.

[95] S. Maiti, N. . Chaudhury, and S. Chowdhury, "Hoechst 33258 binds to G-quadruplex in the promoter region of human c-myc," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 310, no. 2, pp. 505–512, Oct. 2003.

[96] X. SUN, E. CAO, Y. HE, and J. QIN, "Fluorescence studies on the interaction of ethidium bromide with duplex , triplex and quadruplex DNA structures *," *Sci. China Ser. B Chem.*, vol. 42, no. I, p. 62, 1999.

[97] M. Tera, K. Iida, K. Ikebukuro, H. Seimiya, K. Shin-Ya, and K. Nagasawa, "Visualization of G-quadruplexes by using a BODIPY-labeled macrocyclic heptaoxazole.," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 8, no. 12, pp. 2749–55, Jun. 2010.

[98] M. Göppert-Mayer, "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen," *Ann. Phys.*, vol. 401, no. 3, pp. 273–294, 1931.

[99] W. Kaiser and C. Garrett, "Two-Photon Excitation in CaF_{2}: Eu^{2+}," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 7, no. 6, pp. 229–231, Sep. 1961.

[100] S. P. McIlroy, E. Cló, L. Nikolajsen, P. K. Frederiksen, C. B. Nielsen, K. V Mikkelsen, K. V Gothelf, and P. R. Ogilby, "Two-photon photosensitized production of singlet oxygen: sensitizers with phenylene-ethynylene-based chromophores.," *J. Org. Chem.*, vol. 70, no. 4, pp. 1134–46, Feb. 2005.

[101] W. R. Dichtel, J. M. Serin, C. Edder, J. M. J. Fréchet, M. Matuszewski, L.-S. Tan, T. Y. Ohulchanskyy, and P. N. Prasad, "Singlet oxygen generation via two-photon excited FRET.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 17, pp. 5380–1, May 2004.

[102] F. Helmchen and W. Denk, “New developments in multiphoton microscopy,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 12, no. 5, pp. 593–601, Oct. 2002.

[103] P. T. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, and K. M. Berland, “Two-photon excitation fluorescence microscopy.,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 2, pp. 399–429, Jan. 2000.

[104] W.-H. Lee, M. Cho, S.-J. Jeon, and B. R. Cho, “Two-Photon Absorption and Second Hyperpolarizability of the Linear Quadrupolar Molecule,” *J. Phys. Chem. A*, vol. 104, no. 47, pp. 11033–11040, Nov. 2000.

[105] B. Dumat, G. Bordeau, E. Faurel-Paul, F. Mahuteau-Betzer, N. Saettel, G. Metge, C. Fiorini-Debuisschert, F. Charra, and M.-P. Teulade-Fichou, “DNA switches on the two-photon efficiency of an ultrabright triphenylamine fluorescent probe specific of AT regions.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 34, pp. 12697–706, Aug. 2013.

[106] T. Deligeorgiev, A. Vasilev, S. Kaloyanova, and J. J. Vaquero, “Styryl dyes - synthesis and applications during the last 15 years,” *Color. Technol.*, vol. 126, no. 2, pp. 55–80, Mar. 2010.

[107] S. Feng, Y. K. Kim, S. Yang, and Y.-T. Chang, “Discovery of a green DNA probe for live-cell imaging.,” *Chem. Commun. (Camb).*, vol. 46, no. 3, pp. 436–8, Jan. 2010.

[108] C. Chang, J. Chu, F. Kao, Y. Chiu, P. Lou, H. Chen, and T.-C. Chang, “Verification of antiparallel G-quadruplex structure in human telomeres by using two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy of the 3,6-Bis(1-methyl-4-vinylpyridinium)carbazole diiodide molecule.,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 8, pp. 2810–5, Apr. 2006.

[109] D. Monchaud, P. Yang, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, and J.-L. Mergny, “A Metal-Mediated Conformational Switch Controls G-Quadruplex Binding Affinity,” *Angew. Chemie*, vol. 120, no. 26, pp. 4936–4939, Jun. 2008.

[110] A. De Cian, E. Delemos, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou, and D. Monchaud, “Highly efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 7, pp. 1856–7, Feb. 2007.

[111] H. M. M. Matsui, S. Kawamura, K. Shibata, “Bull. Chem. Soc. Jpn.,” in *65*, 1992, pp. 71–74.

[112] T. Yanai, D. P. Tew, and N. C. Handy, “A new hybrid exchange–correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP),” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 393, no. 1–3, pp. 51–57, Jul. 2004.

[113] F. H. Stootman, D. M. Fisher, A. Rodger, and J. R. Aldrich-Wright, “Improved curve fitting procedures to determine equilibrium binding constants.,” *Analyst*, vol. 131, no. 10, pp. 1145–51, Oct. 2006.

[114] F. Koeppel, J. F. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, P. B. Arimondo, D. Labit, O. Petitgenet, C. Hélène, and J. L. Mergny, “Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 1087–96, Mar. 2001.

[115] Z. Kan, Y. Lin, F. Wang, X. Zhuang, Y. Zhao, D. Pang, Y. Hao, and Z. Tan, “G-quadruplex formation in human telomeric (TTAGGG)4 sequence with complementary strand in close vicinity under molecularly crowded condition.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. 11, pp. 3646–53, Jan. 2007.

[116] G. W. Collie, G. N. Parkinson, S. Neidle, F. Rosu, E. De Pauw, and V. Gabelica, “Electrospray mass spectrometry of telomeric RNA (TERRA) reveals the formation of stable multimeric G-quadruplex structures.,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 27, pp. 9328–34, Jul. 2010.

[117] K. C. Hannah and B. A. Armitage, “DNA-templated assembly of helical cyanine dye aggregates: a supramolecular chain polymerization.,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 37, no. 11, pp. 845–53, Nov. 2004.

[118] M. Wang, G. L. Silva, and B. A. Armitage, “DNA-Templated Formation of a Helical Cyanine Dye J-Aggregate,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 122, no. 41, pp. 9977–9986, Oct. 2000.

[119] K. Sato, S. Okazaki, T. Yamagishi, and S. Arai, “The synthesis of azoniadithia[6]helicenes,” *J. Heterocycl. Chem.*, vol. 41, no. 3, pp. 443–447, May 2004.

[120] A. Richards and T. S. Stevens, “623. Synthesis and properties of dehydropyridocolinium salts,” *J. Chem. Soc.*, p. 3067, 1958.

[121] V. A. Khmaruk, A. M. Volovenko, Y. M. Chuiguk, “Reaction of 2-aminopyridine salts with symmetrical β-diketones,” *Ukr. Khim. Zh*, vol. 38(3), p. 262, 1972.

[122] C. Allain, F. Schmidt, R. Lartia, G. Bordeau, C. Fiorini-Debuisschert, F. Charra, P. Tauc, and M.-P. Teulade-Fichou, “Vinyl-pyridinium triphenylamines: novel far-red emitters with high photostability and two-photon absorption properties for staining DNA.,” *Chembiochem*, vol. 8, no. 4, pp. 424–33, Mar. 2007.

[123] G. Laloux and C. Jacobs-Wagner, “How do bacteria localize proteins to the cell pole?,” *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. Pt 1, pp. 11–9, Jan. 2014.

[124] A. Janakiraman and M. B. Goldberg, “Recent advances on the development of bacterial poles.,” *Trends Microbiol.*, vol. 12, no. 11, pp. 518–25, Nov. 2004.

[125] M. Wenhui and S. Bo, “Coumarin - Based Fluorescent Sensors,” *Prog. Chem.*, vol. 19, no. 9, pp. 1258–1266, 2007.

[126] A. de Silva, D. B. Fox, A. J. M. Huxley, and T. S. Moody, “Combining luminescence, coordination and electron transfer for signalling purposes,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 205, no. 1, pp. 41–57, Aug. 2000.

[127] C. P. Kulatilleke, S. a. de Silva, and Y. Eliav, “A coumarin based fluorescent photoinduced electron transfer cation sensor,” *Polyhedron*, vol. 25, no. 13, pp. 2593–2596, Sep. 2006.

[128] G. Jones, S. F. Griffin, C. Y. Choi, and W. R. Bergmark, “Electron donor-acceptor quenching and photoinduced electron transfer for coumarin dyes,” *J. Org. Chem.*, vol. 49, no. 15, pp. 2705–2708, Jul. 1984.

[129] D. Rehm and A. Weller, “Kinetics of Fluorescence Quenching by Electron and H-Atom Transfer,” *Isr. J. Chem.*, vol. 8, no. 2, pp. 259–271, Nov. 1970.

[130] M. Lombardo, M. Chiarucci, and C. Trombini, “The first enantioselective addition of diethylzinc to aldehydes in ionic liquids catalysed by a recyclable ion-tagged diphenylprolinol.,” *Chemistry*, vol. 14, no. 36, pp. 11288–91, Jan. 2008.

[131] K. N. Campbell and I. J. Schaffner, “The Preparation of 4-Methylquinolines,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 67, no. 1, pp. 86–89, Jan. 1945.

[132] F. Yang, X.-L. Xu, Y.-H. Gong, W.-W. Qiu, Z.-R. Sun, J.-W. Zhou, P. Audebert, and J. Tang, “Synthesis and nonlinear optical absorption properties of two new conjugated ferrocene-bridge-pyridinium compounds,” *Tetrahedron*, vol. 63, no. 37, pp. 9188–9194, Sep. 2007.

[133] P. A. S. Smith and T. Yu, “Preparation and Properties of some Substituted Julolidines,” *J. Org. Chem.*, vol. 17, no. 9, pp. 1281–1290, Sep. 1952.

[134] W. Baker and C. B. Collis, “S 2. Fluorescent acylating agents derived from 7-hydroxycoumarin,” *J. Chem. Soc.*, p. S12, 1949.

Annexes

Tableau A1. Acides nucléiques utilisés dans ce travail.

Acronym	Séquence	PDB	Length	Structure
26CEB	AAGGGTGGGTGTAAGTGTGGGTGGGT	2LPW	26	Parallèle
c-kit2-T12T21	CGGGCGGGCGCTAGGGAGGGT	2KYO	21	Parallèle
c-myc	TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA	1XAV	22	Parallèle
N-myc	TAGGGCGGGAGGGAGGGAA	2LEE	19	Parallèle
c-kit2	GGGCGGGCGCGAGGGAGGGG		20	Parallèle
c-kit2-T21	CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGT	2KYP	21	Dimère parallèle
93del	GGGGTGGGAGGAGGGT	1Y8D	16	Dimère parallèle
CEB1	AGGGGGGAGGGAGGGTGG	2MB4	18	Dimère parallèle
Pu24T	TGAGGGTGGTGAGGGTGGGGAAGG	2MGN	24	Parallèle avec retournement
c-kit87up	AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG	2O3M	22	Parallèle avec retournement
hras-1	TCGGGTTGCGGGCGCAGGGCACGGGCG		27	Anti-parallèle
TBA	GGTTGGTGTGGTTGG		15	Anti-parallèle
HIV-PRO-1	TGGCCTGGGCGGGACTGGG		19	Anti-parallèle
22CTA	AGGGCTAGGGCTAGGGCTAGGG	2KM3	22	Anti-parallèle
Bm-U16	TAGGTTAGGTTAGGTUAGG		19	Anti-parallèle
22AG	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG		22	hybride
46AG	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGT TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG		46	hybride
Bcl2Mid	GGGCGCGGGAGGAATTGGGCGGG	2F8U	23	hybride
TET4	TTGGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG	186D	24	hybride
ctADN	highly polymerized		∞	Double-brin
ds-lac	$(GAATTGTGAGCGCTCACAATTC)_2$		22	Double-brin
DrewAT	$(CGCGAAATTTCGCG)_2$		14	Double-brin
ds24	$(GACGTGTCGAAAGAGCTCCGATTA)_2$		24	Double-brin
ds26	$(CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG)_2$		26	Double-brin
ds22	$(GGAGAGAGAGTGTGTGTGTGGG)_2$		22	Double-brin
ss-telo	GGATGTGAGTGTGAGTGTGAGG		22	Simple-brin
ss24-1	GACGTGTCGAAAGAGCTCCGATTA		24	Simple-brin
ss24-2	TAATCGGAGCTCTTTCGACACGTC		24	Simple-brin
ss22-1	GGAGAGAGAGTGTGTGTGTGGG		22	Simple-brin
ss22-2	CCCACACACACACTCTCTCTCC		22	Simple-brin
22Agmut4	ATGGTTAGTGTTAGGTTTAGTG		22	Simple-brin
dT26	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT		26	Simple-brin