



HAL
open science

Synthèse et utilisation de mimes de quadruplexes pour l'évaluation de ligands

Romaric Bonnet

► **To cite this version:**

Romaric Bonnet. Synthèse et utilisation de mimes de quadruplexes pour l'évaluation de ligands. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV069 . tel-00824972

HAL Id: tel-00824972

<https://theses.hal.science/tel-00824972>

Submitted on 22 May 2013

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Romarc Bonnet

Thèse dirigée par **Eric DEFRANCQ**

Co-encadrée par **Nicolas SPINELLI**

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

Synthèse et utilisation de mimes de quadruplexe contraint pour l'évaluation de ligands

Thèse soutenue publiquement le **17 Décembre 2012**,
devant le jury composé de :

Mr. Jean-Marc ESCUDIER

Directeur de recherche, Université Paul Sabatier Toulouse III (Rapporteur)

Mr. François MORVAN

Directeur de recherche, Université Montpellier II (Rapporteur)

Mme. Marie-Paule TEULADE-FICHO

Directeur de recherche, Institut Curie d'Orsay (Examineur)

Mr. Fabrice THOMAS

Professeur, Université Joseph FOURIER, Grenoble (Examineur)

Mr. Eric DEFRANCQ

Professeur, Université Joseph FOURIER, Grenoble (Membre)

Mr. Nicolas SPINELLI

Maître de conférences, Université Joseph FOURIER, Grenoble (Membre)



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Pascal Dumy et le Dr. Serge Cosnier, directeurs du Département de Chimie Moléculaire pour m'avoir accueilli dans le laboratoire ainsi que le Dr. Didier Boturyn en tant que responsable de l'équipe I2BM

Je remercie également mes deux chefs, le Pr. Eric Defrancq et le Dr. Nicolas Spinelli pour leur encadrement pendant ces quatre années d'encadrement, de conseil et au temps qu'ils m'ont accordé.

Je remercie aussi les membres du jury qui ont évalué cette thèse, en particulier pour la pertinence de leurs questions et la discussion sur le sujet qui en a résulté :

Le Dr. Marie-Paule Teulade-Fichou, directeur de recherche à l'institut Curie à Orsay
Le Dr. François Morvan, directeur de recherche à l'université Montpellier II (et également pour les efforts effectués pour les analyses des produits)
Le Dr. Jean-Marc Escudier, directeur de recherche à l'université de Toulouse
Le Pr. Fabrice Thomas, Professeur à l'université Joseph Fourier à Grenoble

Je remercie également pour ces années de thèse toute l'équipe I2BM pour avoir passé pendant ces années des moments très agréables. Je remercie le Pr. Pierre Labbé et le Dr. Angéline Van der Heyden pour leurs conseils lors des sessions de SPR. Je pense aussi à Remy, pour son aide sur la plate-forme et ses conseils, à Nathalie pour les discussions et les thés partagés dans son bureau ainsi qu'à Régine pour sa gentillesse et les nombreux services rendus notamment en cas de panne de voiture pour aller à certains mariages...

Je remercie bien évidemment les collègues thésards et post-doc de l'I2BM mais également des autres équipes avec lesquels j'ai pu créer de vrais liens. Je pense aux anciens comme Pierre et ses conseils, Julien pour sa bonne humeur et Mathieu pour les vacances remarquables ! Mais également Hajra pour ses conseils au premier étage puis enfin Isa pour son soutien constant et ses conseils « directs »... Parmi les anciens je pense aussi à Corinne, et Christopher et leur souhaite bon courage !

Je pense également à Emilie, ma collègue depuis la L2 qui a réussi à me supporter presque quotidiennement ces dernières années et qui aura été de très bons conseils pendant toute cette période.

Je souhaite également tout plein de réussite pour les générations « next », en pensant particulièrement à Michael (que je remercie en plus pour le Recob et la soutenance de thèse) et à Morgane (on ne pourra pas commenter la fin de Naruto ensemble...). Je souhaite également bon courage à Marie et Adrien pour la suite ! Restez comme vous êtes et continuez aussi à être de

Remerciements

bonne humeur tout le temps ! Merci aussi à Baptiste pour les RMN de dernières minutes (même s'il a fallu beaucoup insister et le rappeler plein de fois !) et les « pauses sandwich » qui se sont avérés utiles...

Je tiens aussi à remercier les différents post-docs rencontrés lors de cette expérience de trois ans : Lisa et Michele, en particulier pour les spécialités italiennes (dont le panettone !), Nabil pour sa bonne humeur constante et enfin Thomas dont l'arrivée ne s'est fait que trop tard mais qui m'a bien aidé sur la fin avec ses multiples questions ! Bonne chance également pour la suite aussi à chacun.

Je remercie bien entendu tout le personnel du DCM pour leur gentillesse en pensant en particulier au pauses café partagées avec les personnes du CIRE...

Je pense en écrivant ces remerciements à mes non amis « hors équipe » qui ont beaucoup compté, même si malheureusement je n'ai pas forcément eu le temps que j'aurai voulu leur consacrer. Ça va être trop long de tous les citer ou en tout cas les principaux: Sophie, Perrine, Mylène, Arnaud, Michael, Alex, Sandrine, Amélie et Kévin, la « bande à PG » (désolé mais je vous cite pas sinon je vais en zapper), la « bande des M2 » (dont Aurélie), la bande du lycée et la « bande des joueurs ».

Je tiens enfin à remercier ma famille qui m'a soutenu tout au long de cette thèse mais également au cours de ces 27 années, qui a toujours apporté des conseils et qui m'a permis de me construire. Je pense en particulier à mes parents, ma sœur, ma belle-sœur mon frère, mon neveu et ma belle-belle sœur mais également ma tante et mes grand-parents qui ont toujours répondu présent. Je tiens compte aussi des amis de la famille comme les Seigle ou les Fargeix !

J'espère n'avoir oublié personne et si c'est le cas, j'en suis complètement navré ! Je voudrais en tout cas que chacune de ces personnes citées ait conscience qu'elle a vraiment compté, à sa façon. Je sais qu'un nouveau chapitre est en train de débiter et je ne sais pas ce que réserve forcément la suite mais j'espère arriver à garder contact avec un maximum d'entre vous. De mon côté, même si je ne le fais pas assez, je ferai mon possible pour toujours répondre présent (non pas « préjent !). J'espère qu'il en sera de même pour vous tous !

A très bientôt !

PS : Sachez tout de même qu'en cas de besoin, suffit de dire trois fois mon nom et j'apparaîtrai et dans le cas surprenant où ça ne marcherait j'ai toujours une adresse mail et un numéro de portable !

Ce travail a été réalisé sous la direction du Pr. Eric Defrancq et du Dr. Nicolas Spinelli au sein du laboratoire « Ingénierie et Interactions Biomoléculaires », CNRS UMR 5250, Département de Chimie Moléculaire, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Les différentes études effectuées ont donné lieu aux publications suivantes :

Murat, P.; Bonnet, R.; Van der Heyden, A.; Spinelli, N.; Labbé, P.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P.; Dumy, P.; Defrancq, E., Template-Assembled Synthetic G-Quadruplex (TASQ): A Useful System for Investigating the Interactions of Ligands with Constrained Quadruplex Topologies. *Chem Eur J* **2010**, *16* (20), 6106-6114.

Romera, C.; Bombarde, O.; Bonnet, R.; Gomez, D.; Dumy, P.; Calsou, P.; Gwan, J.-F.; Lin, J.-H.; Defrancq, E.; Pratviel, G., Improvement of porphyrins for G-quadruplex DNA targeting. *Biochimie* **2011**, *93* (8), 1310-1317.

Bonnet, R.; Murat, P.; Spinelli, N.; Defrancq, E., Click-click chemistry on a peptidic scaffold for easy access to tetrameric DNA structures. *Chem Commun* **2012**, *48* (48), 5992-5994.

Communications orales à des congrès :

Bonnet, R.; Murat, P.; Spinelli, N.; Van Der Hayden, A.; Labbé, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., Template Assisted Synthesis of Quadruplexes (TASQ) : Développement de mimes de G-Quadruplexes Antiparallèles, *RECOB 14*, **19-28 March 2012**, Aussois, France.

Communications par posters à des congrès :

R. Bonnet, P. Murat, N. Spinelli, A. Van der Heyden, P. Labbé, P. Dumy, E. Defrancq, Template Assisted Synthesis of G-quadruplex (TASQ): Concept useful system for investigating G-quadruplex/ligands interactions, *Fundamentals of Guanosine Self-assembly and Quadruplex Formation*, , Ischia (Italie), **27-29 Octobre 2009**.

R. Bonnet, P. Murat, N. Spinelli, A. Van Der Hayden, P. Labbé, P. Dumy and E. Defrancq "Journée Rhône-Alpes des biomolécules 2010, Grenoble (France), **3 Juin 2010**

P. Murat, R. Bonnet, N. Spinelli, A. Van Der Hayden, P. Labbé, P. Dumy and E. Defrancq IRT 2010 - XIX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids Lyon (France), **29 Aout-3 Septembre 2010**

R. Bonnet, O. Jarjayes, F. Thomas, G. Pratviel, P. Murat, N. Spinelli, A Van der Heyden, P. Labbé, P. Dumy, E. Defrancq, Evaluation de complexes métalliques en tant que ligands de G-quadruplexes par étude SPR, Journée l'Institut des métaux de Grenoble, Autrans (France), **30-31 Mai 2011**.

R. Bonnet, P. Murat, N. Spinelli, P. Dumy, and E. Defrancq, Synthesis of Quadruplex Mimics Using Click Chemistry Concept, COST ACTION MP0802 , Naples (Italie), **28 juin- 1^{er} Juillet 2011**

R. Bonnet, P. Murat, N. Spinelli, A. Van Der Hayden, P. Labbé, P. Dumy and E. Defrancq, Journée Rhône-Alpes des biomolécules 2012, Grenoble (France), **13 Juin 2012**

Sommaire

ABREVIATIONS	
PREFACE	1
INTRODUCTION	3
I. DIVERSITE STRUCTURALE DES OLIGONUCLEOTIDES	5
I.1. Structure des oligonucléotides.....	5
I.2. Les liaisons de type Watson et Crick et les structures en résultant	7
I.3. Les autres types d'appariement de l'ADN.....	10
II. STRUCTURES DE TYPE QUADRUPLEXE.....	12
II.1. Notion de G-quadruplexe.....	12
II.2. Notion de i-motif.....	23
III. QUADRUPLEXES EN TANT QUE CIBLES BIOLOGIQUES	27
III.1. G-quadruplexes et Régulation de l'activité télomérique	28
III.2. G-quadruplexes au niveau des promoteurs d'oncogènes	32
III.3. Régulation de la traduction sur les régions 5'UTR et 3'UTR	34
III.4. Autres implications biologiques potentielles des G-quadruplexes.....	37
III.5. Implication du i-motif en tant que cible thérapeutique.....	39
IV. DEVELOPPEMENT DE LIGANDS VISANT LES QUADRUPLEXES	40
IV.1. Ligands non macrocycliques interagissant sur la tétrade.....	41
IV.2. Macrocycles ligands de G-quadruplexes.....	45
IV.3. Ligands des sillons et des boucles	48
IV.4. Ligands de G-quadruplexes d'ARN.....	51
IV.5. Ligands ciblant le i-motif.....	52
V. PRESENTATION DU PROJET	53
V.1. Chimie supramoléculaire et concept de TASQ	53
V.2. Utilisation d'un gabarit peptidique dérivé du TASP pour contraindre des G-quartets et des G-quadruplexes.....	55
V.3. Objectifs des travaux de thèse.....	57
CHAPITRE 1 : ETUDES SPR DE LIGANDS DE G-QUADRUPLEXE	59
I. INTRODUCTION	61
I.1. Utilisation de complexes métalliques en tant que ligands de G-quadruplexe	61
I.2. Résonance plasmonique de surface.....	70
I.3. Utilisation de mime de G-quadruplexe parallèle dans le cadre d'un test de screening par SPR.....	72
II. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	76
II.1. Influence des métaux lors de l'interaction de porphyrines dérivées de la TmpyP4	76
II.2. Etude préliminaire sur des complexes de type SALPHEN.....	84
III. BILAN	88
IV. ARTICLE SUR LES ETUDES EFFECTUEES SUR LES PORPHYRINES.....	89
V. PARTIE EXPERIMENTALE.....	109
V.1. Porphyrins SPR measurements (complementary informations)	109
V.2. Salphen SPR Measurements	111

CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE DE MIMES ANTIPARALLELES DE QUADRUPLEXES	115
I. INTRODUCTION	117
I.1. <i>Rappels bibliographiques</i>	117
I.2. <i>Stratégie envisagée</i>	118
II. SYNTHÈSE ET CARACTERISATION D'UN MIME DE I-MOTIF	122
II.1. <i>Synthèse du gabarit peptidique</i>	122
II.2. <i>Synthèse oligonucléotidique</i>	127
II.3. <i>Assemblages du mime de i-motif par ligations chimiosélectives</i>	128
II.4. <i>Caractérisation de la structuration en i-motif au sein du mime synthétisé</i>	135
II.5. <i>Bilan intermédiaire</i>	141
III. SYNTHÈSE DES G-QUADRUPLEXES ANTIPARALLELES	142
III.1. <i>Stratégie 1: ligation oxime puis CuAAC</i>	143
III.2. <i>Stratégie 2: CuAAC puis ligation oxime</i>	147
III.3. <i>Etudes préliminaires des gabarits par dichroïsme circulaire</i>	152
III.4. <i>Bilan intermédiaire</i>	156
IV. SYNTHÈSE D'ÉDIFICES À BOUCLES	157
IV.1. <i>Méthodologie de synthèse</i>	157
IV.2. <i>Synthèse d'édifices simplement couplés par lien triazole</i>	163
IV.3. <i>Caractérisation des édifices à boucles par dichroïsme circulaire</i>	164
IV.4. <i>Bilan intermédiaire</i>	169
V. BILAN	170
VI. ARTICLE ILLUSTRANT LA SYNTHÈSE DU MIME DE I-MOTIF 5	171
VII. PARTIE EXPERIMENTALE.....	174
VII.1. <i>Materials and equipment</i>	174
VII.2. <i>General procedure for peptide synthesis:</i>	174
VII.3. <i>General procedure for Oligonucleotides synthesis:</i>	187
VII.4. <i>General procedure for Conjugate synthesis</i>	191
VII.5. <i>Circular Dichroism studies:</i>	197
CONCLUSION GENERALE.....	201
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	207

Abréviations

Acm	1-Ethoxyéthylidène	PEG	Polyéthylène Glycol
AcOEt	acétate d'éthyle	PBS	Phosphate Buffer Saline
AcOH	Acide acétique	PyBOP [®]	(Benzotriazol-1-yloxy)tris(pyrrolidino)phosphonium hexafluorophosphate
AcONH ₄	Acétate d'ammonium	RAFT	Regioselectively Addressable Functionalized Template
ADN	Acide Désoxyribonucléique	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Alloc	Allyloxy-carbonyle	RP-HPLC	Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography
ARN	Acide Ribonucléique	RX	Cristallographie par diffraction des rayons X
Boc	<i>Tertio</i> -butyloxy-carbonyl	RT	Room temperature
CD	Dichroïsme circulaire	RU	Resonance Unit
CuAAC	Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions	SASRIN [®]	Super Acid Sensitive Resin
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide	SAX	Strong Anion Exchange
DIEA	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine	SEC	Chromatographie d'exclusion de taille
DMF	<i>N,N</i> -Diméthylformamide	SDS	dodécylsulfate de sodium
EDTA	Acide éthylène diamine <i>tétra</i> acétique	siRNA	Small interfering RNA
eq	Équivalent molaire	SPPS	Synthèse peptidique sur phase solide
ESI-MS	Masse Spectrométrie par Ionisation Electrospray	SPR	Résonance plasmonique de surface
Et ₂ O	Éther diéthylique	Su	Succinimide ester
EtOH	Éthanol	t.a.	Température ambiante
Fmoc	9-Fluorénylméthoxy-carbonyl	TASP	Template Assembled Synthetic Protein
G4	G-quadruplexe	TASQ	Template Assembled Synthetic G-Quartet
G4-BMI	G4 Binding Mode Index	TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique	tBu	Tertio-butyl
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance	TFA	Acide trifluoroacétique
IE-HPLC	Ionic Exchange High-Performance Liquid Chromatography	THPTA	<i>Tris</i> -(hydroxypropyltriazolyl)-methylamine
IC ₅₀	Concentration inhibant de 50% un paramètre	TIS	Triisopropylsilane
k _a	Constante cinétique d'association	T _m	Température de dénaturation ou température de semi-dénaturation
K _a	Constante d'association	t _R	Temps de rétention
k _d	Constante cinétique de dissociation	TRAP	Telomere Repeat Amplification Protocol
K _d	Constante de dissociation	Tris	trihydroxyméthylaminométhane
MALDI-MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry	Tr	Triphénylméthyle (ou trityle)
MeOH	Méthanol	UV	Ultraviolet
MMtr	Monométhoxytrityle		
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide		
ODN	Oligodéoxyribonucléotide		

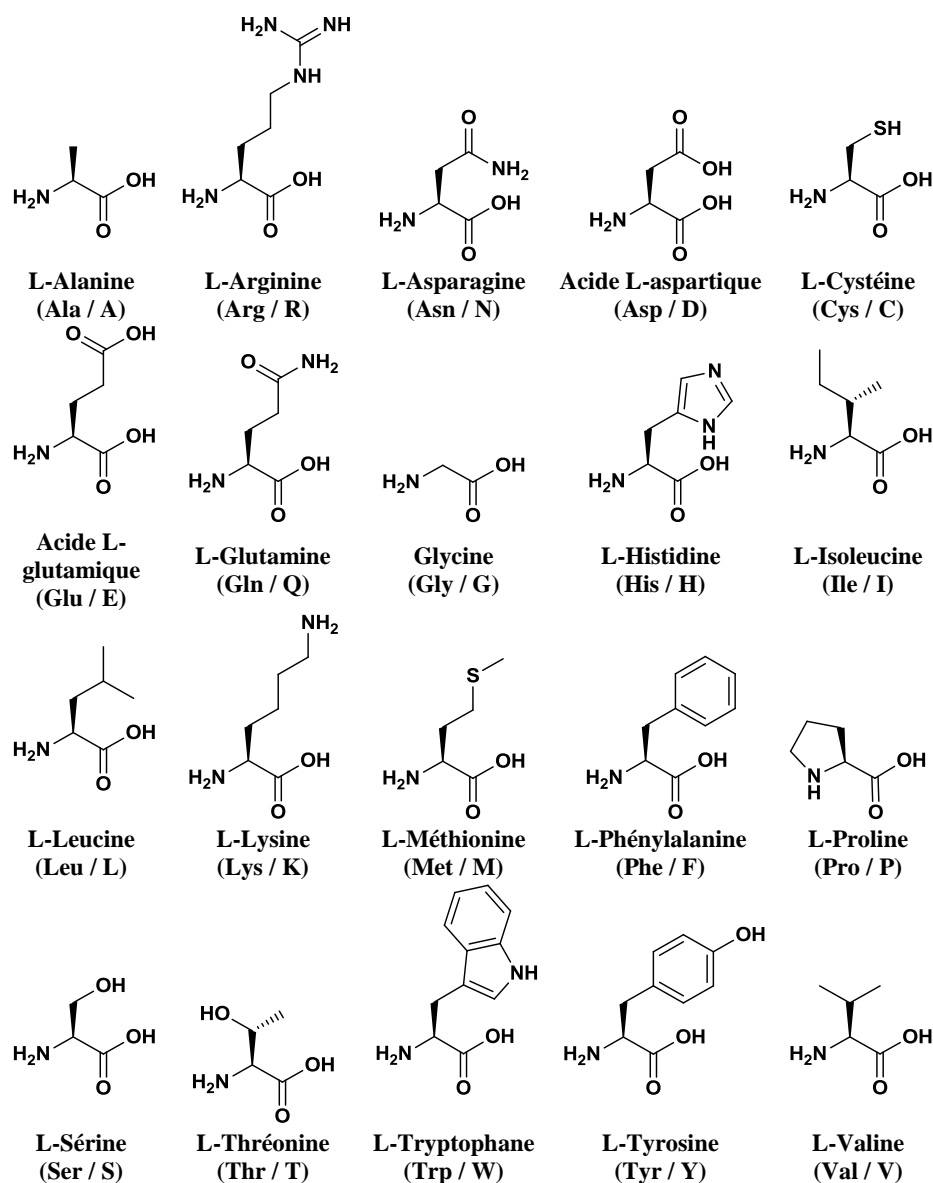


Figure 1 Liste des acides aminés (code à 3 puis à 1 lettres)

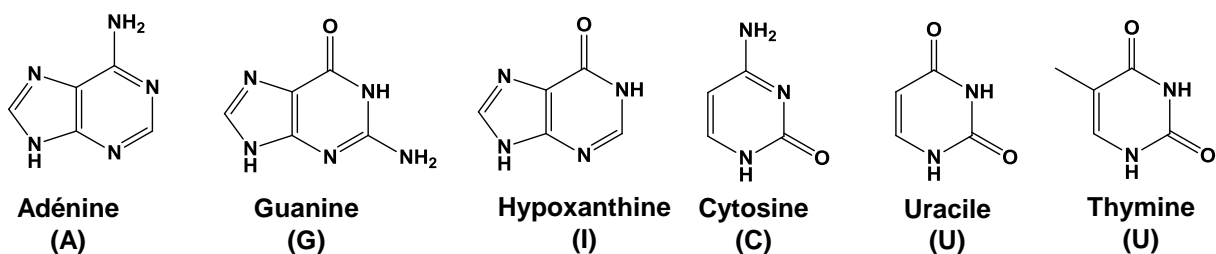


Figure 2 Liste des bases nucléiques (Code à une lettre)

Préface

L'histoire raconte que fin février 1953 à l'heure du dîner, dans un pub nommé « The Eagle », Jim Watson et Francis Crick ont résolu la structure de la double hélice d'ADN. Cette découverte aurait pu clore des années de recherche et de travail commencées en 1868 par F. Meischer. Toutefois, ceci ne se révéla n'être en réalité que le commencement d'une période où les molécules d'ADN et d'ARN n'ont cessé de surprendre par leur capacité à adopter différentes structures tant au niveau des biotechnologies que dans le monde du vivant.

Si ces deux molécules ont suscité tant d'engouement et ont tant imprégné les esprits, c'est sans doute pour leur rôle majeur de la transmission de l'hérédité, ceci en tant que support de l'information génétique chez tous les êtres vivants et les virus. Servant de matrice pour la synthèse des protéines, ils sont indispensables pour que chaque cellule puisse assurer ses fonctions. Ainsi toute modification de sa structure peut avoir d'importantes conséquences allant de la maladie jusqu'à tous les phénomènes d'évolution.

Toutefois, de par leur flexibilité et leur capacité à s'associer selon différents modes, il est montré aujourd'hui que ces molécules assurent beaucoup plus que ce rôle principal de support d'information. Ceci est connu depuis longtemps dans le cas de l'ARN dont beaucoup de sous-structures ont pu être résolues aux cours des décennies. Les découvertes de ces vingt dernières années, dont notamment la résolution du génome humain, indiquent que l'ADN possède également d'autres capacités intrinsèques. Celles-ci sont corrélées avec les différentes structures secondaires qui ont été élucidées depuis la double hélice d'ADN. Cette thèse porte sur certaines d'entre-elles, qui résultent de l'association de quatre brins appelées quadruplexes.

Introduction

I. Diversité structurale des oligonucléotides

I.1. Structure des oligonucléotides

Les molécules d'ADN et l'ARN résultent de l'enchaînement de nucléotides¹. Ces derniers sont composés d'une base hétérocyclique azotée, d'un dérivé saccharidique (ribose) et enfin d'un squelette phosphate. De ce fait, ils possèdent une architecture similaire qui ne varie que par leur base azotée. Ces dernières sont classées en deux familles selon le type de cycle azoté dont les bases sont dérivées (Figure 3). Elles peuvent être issues soit de la pyrimidine (bases pyrimidiniques) soit de la purine (bases puriques). On retrouve dans la première catégorie l'uracile, la thymine, la cytosine. La première, l'uracile, est caractéristique des ARN et ne se retrouve pas dans l'ADN eucaryote. Son homologue dans l'ADN, la thymine présente en plus un groupement méthyle sur sa position 5. Le second groupe est celui des bases puriques où l'on classe l'adénine et la guanine. Comme les bases précédentes, elles varient selon les groupements fonctionnels qui composent le cycle de base. Une autre base purique, l'hypoxanthine, plus rare, (dont le nucléotide est appelé inosine) est retrouvée dans plusieurs organismes, notamment au niveau des ARN de transfert (ARN_t).

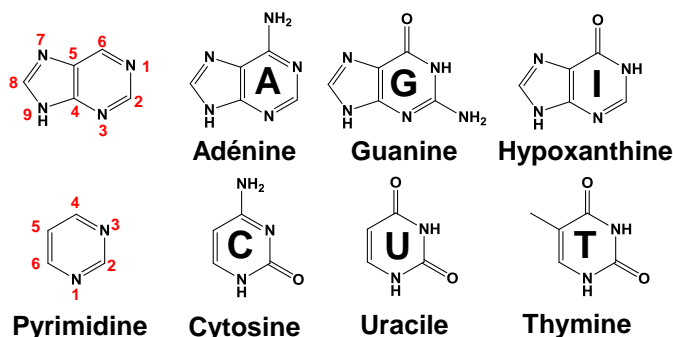


Figure 3 Les bases principales des acides nucléiques.

Chaque base azotée est reliée à la partie saccharidique par une liaison glycosidique de type β sur le carbone C1' du dérivé saccharidique (un D-ribose dans le cas de l'ARN et un 2'-désoxy-D-ribose dans le cas de l'ADN, Figure 4). Les pyrimidines sont reliées au ribose sur leur N1 quant aux purines, elles le sont sur leur N9. De la perte d'une fonction hydroxyle sur le sucre résultent de nombreuses propriétés différentes entre les deux types de structures. Ainsi par exemple il s'avère que les ADN sont plus sensibles aux milieux acides que les ARN. Finalement, sur les hydroxyles en 5' et en 3' de la partie saccharidique, on retrouve le squelette phosphate de la

1 Blackburn, G. M.; Gait, M. J., *Nucleic acids in chemistry and biology*. second Ed ed.; Oxford University Press: 1996.

structure qui relie deux nucléotides respectivement par ces deux extrémités. Un enchaînement de plusieurs nucléotides est appelé oligonucléotide.

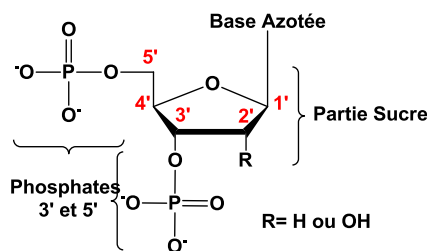


Figure 4 Structure d'un nucléotide

Afin de décrire la géométrie d'un oligonucléotide, différents angles sont utilisés usuellement (Figure 5A). Ainsi l'angle formé par la liaison glycosidique (χ) est généralement caractéristique de topologies. Deux conformations sont généralement décrites à savoir les conformations *syn* et *anti* (Figure 5B). De même, les sucres peuvent adopter deux types de conformations (régies par les angles θ_0 à θ_4 , Figure 5C), soit de type Nord ($C3'$ -endo) soit de type Sud ($C2'$ -endo). Ces deux conformations existent à cause de la torsion du cycle pentose, ceci afin de minimiser les interactions entre ses différents substituants. D'autres angles formés par le squelette sucre-phosphate sont également importants et décrivent la conformation locale de l'oligonucléotide. Deux éléments contribuent à l'architecture de l'oligonucléotide : l'orientation de la liaison $C4'$ - $C5'$ et l'orientation de la liaison phosphodiester en 3' et en 5'

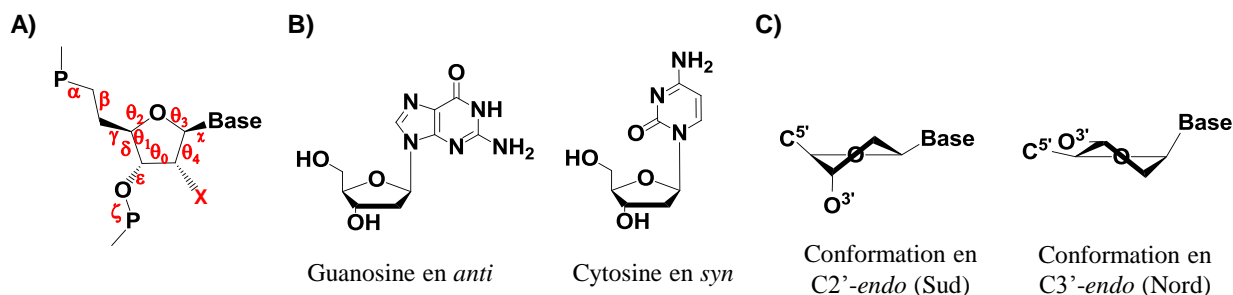


Figure 5 Conformation des nucléotides : Angle de torsion glycosidique (A), exemple de base en conformation *syn* ou *anti*(B) et conformations des sucres en $C3'$ -endo et $C2'$ -endo(C).

Il faut noter que les conformations des nucléotides dépendent en partie des structures secondaires adoptées par les molécules d'ARN et d'ADN. La formation de ces dernières résulte essentiellement de l'interaction des nucléobases entre elles par des liaisons hydrogènes mais également par des phénomènes d'empilement (ou « π -stacking »). Différentes liaisons peuvent se faire leur permettant ainsi d'adopter différentes structures de un à quatre brins avec ou non des renflements, des épingles à cheveux et différents types de jonctions variables. Les paragraphes

suivants vont consister à décrire les différents types de liaisons hydrogènes ainsi que les principales structures secondaires qui en résultent.

1.2. Les liaisons de type Watson et Crick et les structures en résultant

La structure la plus connue de l'ADN est la double hélice dont la structure a été élucidée en 1953 par F. Crick et J. Watson² leur valant neuf ans plus tard, en 1962 le prix Nobel de Médecine. En se basant sur différents travaux dont ceux de R. Franklin³, ils proposent que deux molécules d'ADN antiparallèle s'apparient formant ainsi une hélice droite. L'intérêt de leurs travaux vient du fait que l'édifice qu'ils proposent se forme grâce à l'association des bases entre elles. Ceci se fait *via* des liaisons hydrogène entre les couples A:T et C:G (Figure 6). Cette structure au diamètre de 20Å se forme de façon privilégiée en milieu humide (95% d'humidité)⁴ et est caractérisée par une conformation des sucres en C2'-*endo* quand chacun des angles glycosidiques est en *anti*⁵. Une rotation de 36° se fait par tour de l'hélice nécessitant ainsi dix paires de bases pour effectuer un tour complet. Lors de cette rotation, deux sillons aux largeurs différentes mais avec la même profondeur se forment, un petit et un grand. Ce modèle, qui est maintenant connu sous le nom d'ADN-B, n'est pas la seule des structures pouvant être adoptée par l'ADN et résultant de liaisons de type Watson-Crick.

2 Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737-738.

3 Franklin, R. E.; Gosling, R. G., Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature* **1953**, *171* (4356), 740-741.

4 Wing, R.; Drew, H.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson, R. E., Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature* **1980**, *287* (5784), 755-758.

5 Dickerson, R. E.; Drew, H. R.; Conner, B. N.; Wing, R. M.; Fratini, A. V.; Kopka, M. L., The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* **1982**, *216* (4545), 475-485.

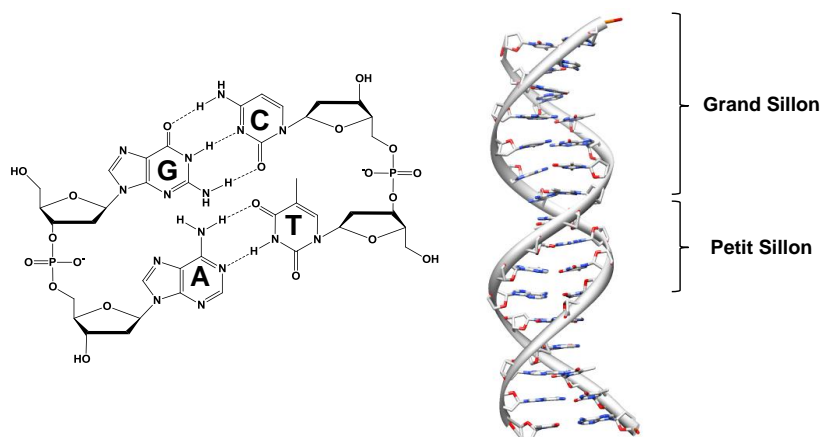


Figure 6 Liaisons de type Watson-Crick et structure de la double hélice d'ADN (code PDB :3BSE)

D'autres hélices ont depuis été caractérisées, qui dans la plupart des cas résultent d'altérations mineures entre la première forme présentée, l'ADN-B, et une seconde, l'ADN-A⁶. Cette dernière, obtenue de façon privilégiée en milieu déshydraté, est caractérisée par une conformation de sucre C3'-endo (Figure 7A). Elle a été cristallisée près de 10 ans avant la forme B et se différencie essentiellement par la profondeur de ses sillons. Ainsi le grand sillon est plus profond tandis que le petit ne l'est quasiment plus. Il est intéressant de noter également que l'ARN peut adopter cette structure quand il est seul ou apparié avec un brin d'ADN. L'ADN-Z est une autre forme de l'ADN, découverte par A. Rich en 1979 (Figure 7B)⁷. Contrairement aux autres formes, il a la particularité de former une hélice gauche et est retrouvée dans des séquences riches en purines, sous de fortes conditions salines. D'autres caractéristiques sont également différentes. Notamment, la formation de cette hélice requiert le passage des purines en conformation *syn*. Ici les sillons sont quasiment équivalents.

6 Macgregor Jr, R. B.; Poon, G. M. K., The DNA double helix fifty years on. *Comput Biol Chem* **2003**, 27 (4-5), 461-467.

7 Wang, A. H.; Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J. L.; van Boom, J. H.; van der Marel, G.; Rich, A., Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* **1979**, 282 (5740), 680-686.

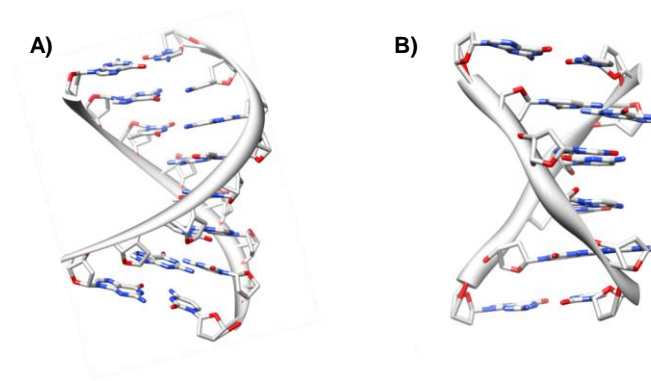


Figure 7 Exemple d'autres structures doubles hélice : ADN-A (A, code PDB : 1VJ4) et ADN-Z (B, code PDB : 2DCG)

Les phénomènes d'empilement et la formation de liaisons hydrogène de type Watson et Crick permettent aux oligonucléotides d'adopter une grande diversité structurale. Dans la plupart des cas, ces structures sont impliquées dans des processus biologiques dans lesquels la topologie adoptée par l'oligonucléotide joue un rôle important. Un des exemples les plus connus est le repliement d'un simple brin d'ARN en trois structures tige-boucle pour former un ARN de transfert (ARN_t, Figure 8A)⁸. Ainsi lorsque le brin se replie sur lui-même et s'apparie selon les liaisons de type Watson et Crick, une topologie spécifique de la structure lui permet de présenter la partie anticodon intervenant lors des phénomènes de traduction. Cette boucle permet de le présenter de façon adéquate dans le motif sur le ribosome. Une autre application dans laquelle la structure secondaire joue un rôle se situe par exemple au niveau des ribozymes dont les plus étudiés sont de type « hammerhead » (tête de marteau, Figure 8C)⁹ ou « hairpin » (en épingle à cheveux, Figure 8B)¹⁰. Ces structures permettent *via* leur repliement de présenter des activités catalytiques, notamment sur l'ADN. Ce dernier, tout comme l'ARN, peut adopter des structures secondaires particulières. Par exemple les jonctions Holliday (Figure 8D), faisant intervenir quatre brins d'ADN, interviennent dans les phénomènes de recombinaison génétique homologue. Ces structures se retrouvent depuis les procaryotes jusqu'aux mammifères.¹¹

8 Hudec, P. P.; Sonnenfeld, P., Hot Brines on Los Roques, Venezuela. *Science* **1974**, *185* (4149), 440-442.

9 Hammann, C.; Luptak, A.; Perreault, J.; de la Peña, M., The ubiquitous hammerhead ribozyme. *RNA* **2012**, *18* (5), 871-885.

10 Müller, S.; Appel, B.; Krellenberg, T.; Petkovic, S., The many faces of the hairpin ribozyme: Structural and functional variants of a small catalytic RNA. *IUBMB Life* **2012**, *64* (1), 36-47.

11 Fu, T.-J.; Tse-Dinh, Y.-C.; Seeman, N. C., Holliday Junction Crossover Topology. *J Mol Biol* **1994**, *236* (1), 91-105.

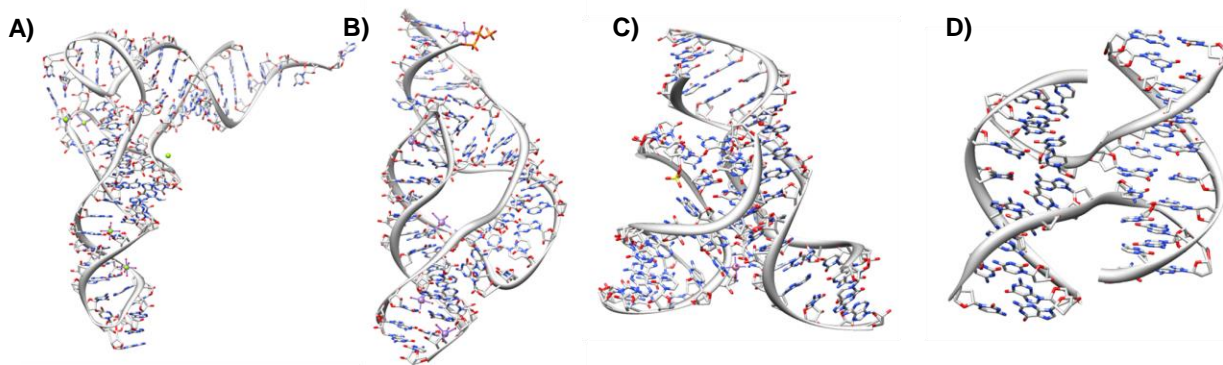


Figure 8 Différentes structures d'oligonucléotide A) ARNt de la phénylalanine (code PDB :1TRA) B) Ribozyme « hammerhead » (code PDB :2OEU) C) ribozyme « hairpin » (code PDB :4G6S) D) jonction Holliday (Code PDB :3GNK)

1.3. Les autres types d'appariement de l'ADN

D'autres liaisons hydrogènes peuvent se produire entre les différentes bases de l'ADN aboutissant ainsi à d'autres structures secondaires. Deux grandes autres familles de liaisons existent à savoir les liaisons de type Hoogsteen et les liaisons de type Wooble. Les premières liaisons impliquent la face des purines qui n'intervient pas dans les liaisons hydrogène de type Watson-Crick, dans le grand sillon de la double hélice¹². Elles résultent souvent de l'interaction d'une troisième base et conduisent à la formation d'une triple hélice¹³ (Figure 9). Deux type de liaisons Hoogsteen existent : les premières, dites « directes », dans lequel les riboses de chacune des bases sont situés du même côté par rapport aux liaisons hydrogène : ce sont les liaisons de type T:A:T et C:G:C⁺ (C⁺ correspond à une cytosine protonée sur son N₃). Dans ce cas les brins riche en pyrimidines sont en antiparallèle ; le second type, correspond aux liaisons Hoogsteen dites « inverses », où dans ce cas, les riboses sont de part et d'autre des liaisons hydrogène. On y retrouve les liaisons T:A:A et C:G:G. Dans ce cas ce sont les brins riches en purines qui sont en antiparallèle. Il est important de noter que la formation d'une triple hélice nécessite la succession de plusieurs purines sur un même brin.

¹² Hoogsteen, K., The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallogr* **1963**, 16 (9), 907-916.

¹³ Frank-Kamenetskii, M. D.; Mirkin, S. M., Triplex DNA Structures. *Annu Rev Biochem* **1995**, 64 (1), 65-95.

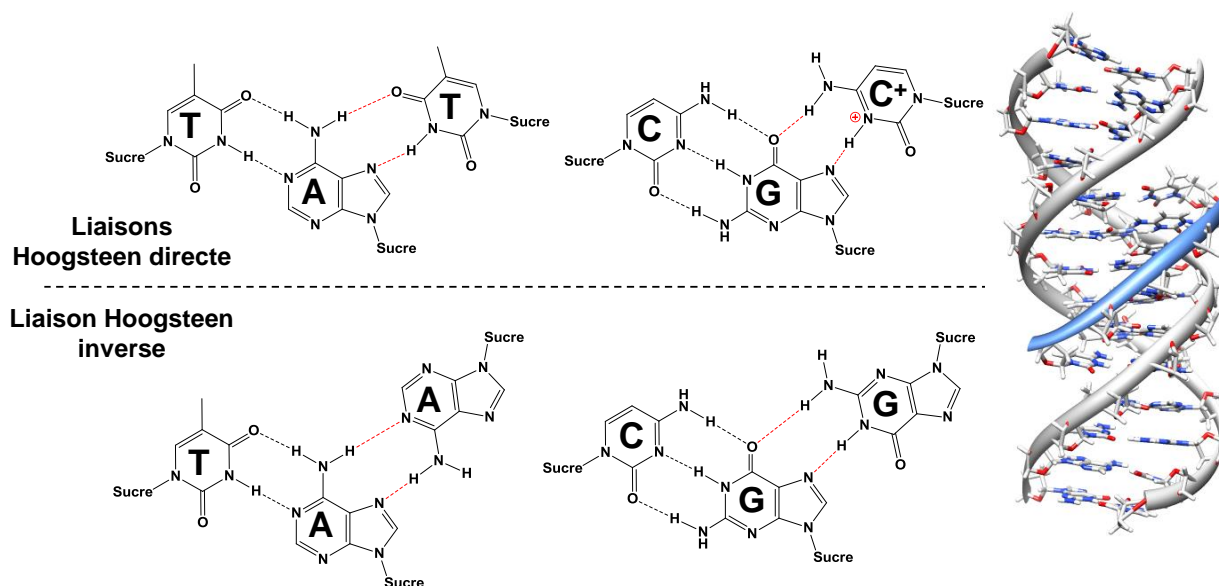


Figure 9 Liaisons de type Hoogsteen et formation d'une triple hélice (code PDB : 1BWG)

Un autre type de liaison, dite « wobble » ou bancale, a été défini par F. Crick (Figure 10)¹⁴. Elles se retrouvent surtout dans l'ARN où elles jouent un rôle dans les structures secondaires que ces derniers peuvent adopter. Certaines se forment par exemple dans l'ARNt leur permettant lors de la traduction de reconnaître plusieurs codons soit par formation de liaisons Watson-Crick ou de liaisons Wobble¹⁵. Ceci se fait souvent par l'utilisation d'un autre nucléoside, l'inosine. Les quatre principaux appariements sont les appariements de type G:U, I:U, I:A et I:C.

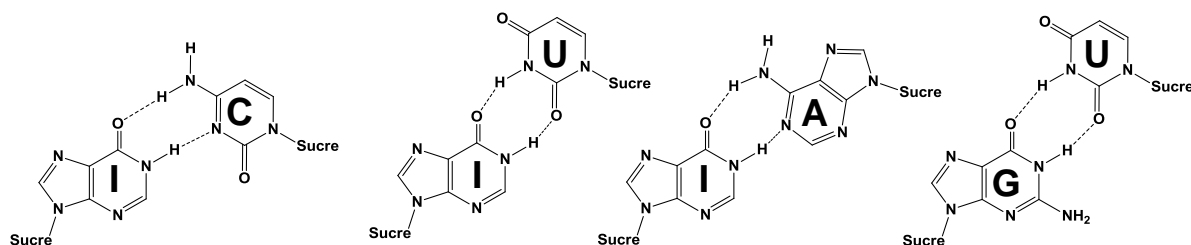


Figure 10 Exemples de liaisons de type « Wobble ».

14 Crick, F. H. C., Codon—anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J Mol Biol* **1966**, *19* (2), 548-555.

15 Agris, P. F.; Vendex, F. A. P.; Graham, W. D., tRNA's Wobble Decoding of the Genome: 40 Years of Modification. *J Mol Biol* **2007**, *366* (1), 1-13.

II. Structures de type quadruplexe

Il a été montré précédemment que les structures adoptées par l'ADN faisant intervenir un, deux ou trois brins jouaient des rôles importants au sein de la cellule. Ceci se vérifie également pour les structures impliquant l'interaction de quatre brins oligonucléotidiques, appelées quadruplexes. Celles-ci ont pris une importance non-négligeable ces dernières années. On en recense aujourd'hui deux types connus, à savoir les quadruplexes de guanine ou G-quadruplexe et ceux de cytosine appelé i-motif. Ces structures comme leurs homologues présentés précédemment ont des topologies très variables qui vont être présentées dans la partie suivante.

II.1. Notion de G-quadruplexe

1a. De la tétrade de guanines au G-quadruplexe

La guanine est une base particulière par rapport aux autres, car elle est la seule à pouvoir former au moins deux liaisons hydrogènes sur chacune de ses faces lui conférant ainsi la possibilité de s'auto-assembler. Cette propriété a été observée pour la première fois en 1962 par M. Gellert lors de l'étude de gel d'acide guanylique¹⁶. En étudiant la viscosité de gels de guanosines disodiques concentrée par rayons X, lui et son équipe sont arrivés à la conclusion que des structures de type hélicoïdale se formaient avec pour motif de base quatre guanines reliées entre elles par huit liaisons de type Hoogsteen. Ces structures sont appelées tétrades de guanines ou G-quartets. Par la suite d'autres travaux de recherche ont été effectués permettant de comprendre plus en détail la formation de ces structures. L'équipe de Pinnavaia a étudié la formation d'édifices hélicoïdale de solutions concentrées de guanosine 5'-monophosphate¹⁷ et observé leur stabilisation en présence de cations tels que le sodium ou le potassium. Les dimensions de ces hélices n'ont été obtenues que plus tard en 1992 par RMN DOSY¹⁸ en tant que cylindre de 26Å de diamètre qui pour des concentrations massiques de 18 à 34% sont d'une longueur de 8 à 30nm correspondant à la formation de 24 à 87 tétrades de guanines. La longueur de ces structures est dépendante de la concentration.

16 Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R., Helix formation by guanilic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1962**, *48* (12), 2013-2018.

17 Pinnavaia, T. J.; Marshall, C. L.; Mettler, C. M.; Fisk, C. L.; Miles, H. T.; Becker, E. D., Alkali metal ion specificity in the solution ordering of a nucleotide, 5'-guanosine monophosphate. *J Am Chem Soc* **1978**, *100* (11), 3625-3627.

18 Eimer, W.; Dorfmueller, T., Self-aggregation of guanosine 5'-monophosphate, studied by dynamic light scattering techniques. *The Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96* (16), 6790-6800.

Dans une tétrade, les liaisons hydrogène se font entre la face donatrice de type Watson-Crick d'une guanine avec la face acceptrice de type Hoogsteen d'une autre guanine (Figure 11). Selon ce mode d'appariement, les guanines forment un motif plan constituant la tétrade. Cette structure est généralement stabilisée par un cation qui se coordine au centre de la structure avec les oxygènes O6 afin de diminuer les forces de répulsion entre ces derniers¹⁹.

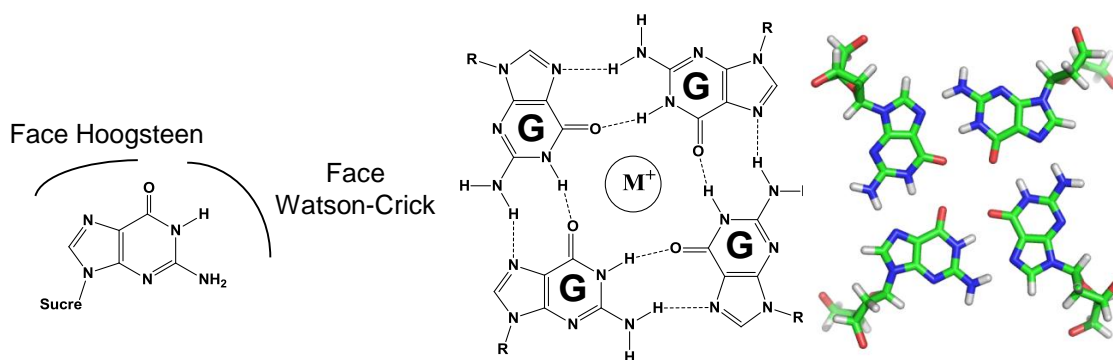


Figure 11 Représentation schématique d'une tétrade de guanines

Il a été montré par la suite que les acides nucléiques riches en guanine étaient capables de former des structures secondaires reposant sur l'empilement (« π -stacking ») de plusieurs tétrades de guanines. Ces structures sont appelées G-quadruplexes (G4, Figure 12) et nécessitent la succession de plusieurs guanines au sein de leur séquence. Les séquences permettant de former ces différents édifices se présentent sous la forme $(X_n G_p X_n)_z$ où X représente les différentes bases nucléiques dont le nombre (n) est variable ; G représente les guanines dont le nombre (p) varie généralement de 2 à 4. Un seul brin peut composer un G-quadruplexe (quadruplexe intramoléculaire) ou plusieurs, jusqu'à quatre (quadruplexes intermoléculaire). Ceci dépend de la succession de répétition du motif sur la séquence oligonucléotidique (caractérisé par z)

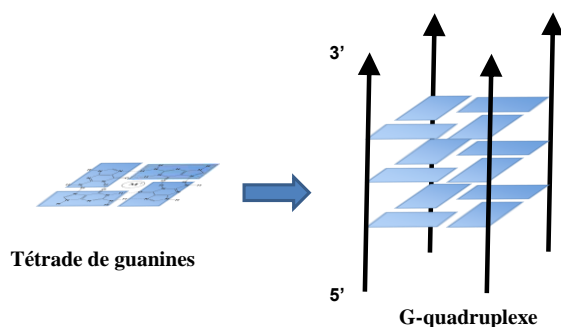


Figure 12 Représentation schématique d'un G-quadruplexe

¹⁹ Niedle, S.; Balasubramanian, S., *Quadruplex Nucleic Acids*. Royal Society of Chemistry: 2006.

1b. Caractérisation des G-quadruplexes et utilisation de formalisme

Un grand nombre de G-quadruplexe sont aujourd'hui caractérisés révélant ainsi un polymorphisme important entre les différentes structures²⁰. Les édifices sont classés selon plusieurs critères, à savoir le nombre de tétrades, le nombre de brins les composant, leur orientation et le nombre et le type de boucles présentes. La taille des sillons est également un élément qui diffère selon les topologies adoptées. Les parties suivantes vont permettre de définir ces différentes caractéristiques dans le but de mieux comprendre la formation des édifices. Il sera également décrit un formalisme pour expliciter leur structure²¹.

i) Orientation des brins d'un G-quadruplexe

La première façon de qualifier un G-quadruplexe, se fait selon l'orientation de ses brins qui peut varier selon les topologies adoptées. La structure la plus simple sera composée de quatre brins parallèles (Figure 13A et E). C'est généralement la structure qu'adoptent les G-quadruplexes tétramoléculaires (composé de quatre brins indépendants) ne possédant qu'une seule succession de guanine. D'autres structures plus complexes peuvent se former impliquant la présence de brins antiparallèles. Ceci se fait dans le cas de G-quadruplexe dont la formation nécessite la présence de boucles. Lorsqu'un seul brin est en antiparallèle des trois autres, la structure est dite « hydride » (Figure 13B) tandis que dans le cas où ce sont deux brins qui sont orientés dans le sens opposé des deux autres, la structure est qualifiée d'antiparallèle (Figure 13C et D). L'angle glycosidique adopté par les bases dépend de l'orientation des brins. Ainsi lorsque les brins sont parallèles entre eux ils sont classiquement dans la même conformation soit en *syn* soit en *anti*²². Par contre les angles sont différents entre deux brins antiparallèles : l'un est en *syn* tandis que l'autre est en *anti*.

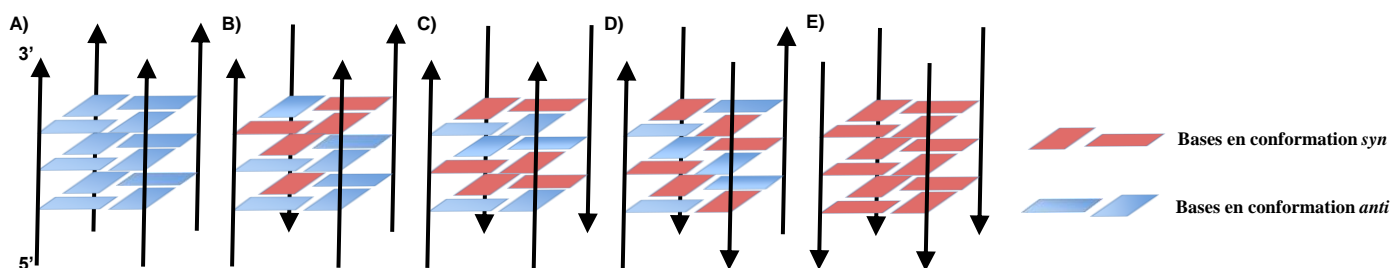


Figure 13 Représentation des différentes possibilités d'orientation des brins dans un G-quadruplexe.

20 Collie, G. W.; Parkinson, G. N., The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (12), 5867-5892.

21 Webba da Silva, M., Geometric Formalism for DNA Quadruplex Folding. *Chem Eur J* **2007**, *13* (35), 9738-9745.

22 Karsisiotis, A. I.; Hessari, N. M. a.; Novellino, E.; Spada, G. P.; Randazzo, A.; Webba da Silva, M., Topological Characterization of Nucleic Acid G-Quadruplexes by UV Absorption and Circular Dichroism. *Angew Chem* **2011**, *123* (45), 10833-10836.

Une des conséquences directes se retrouve lors de l'observation de spectres de G-quadruplexe par dichroïsme circulaire (Figure 14)²³. Lorsque les guanines sont toutes en conformation *syn* ou toutes en *anti*, toutes les tétrades sont orientées de la même façon. Ainsi le signal observé en dichroïsme circulaire (CD) possède un maximum vers 260nm et un minimum vers 240nm. Ce mode d'appariement est caractéristique d'un G-quadruplexe parallèle. Dans le cas où il n'y a que des alternances dans l'orientation des tétrades, le signal obtenu par la CD possède deux maxima à 295nm et 240nm environ et un minimum à 260nm. Ceci est généralement caractéristique de G-quadruplexes antiparallèles. Enfin le mixte de tétrades orientées de façon opposée entre elles et d'autres tétrades orientées dans le même sens conduit à l'obtention d'un signal intermédiaire, présentant deux maximum à 260nm et 295nm et un minimum à 240nm. Ce signal est quant à lui attribué à des structure hybrides.

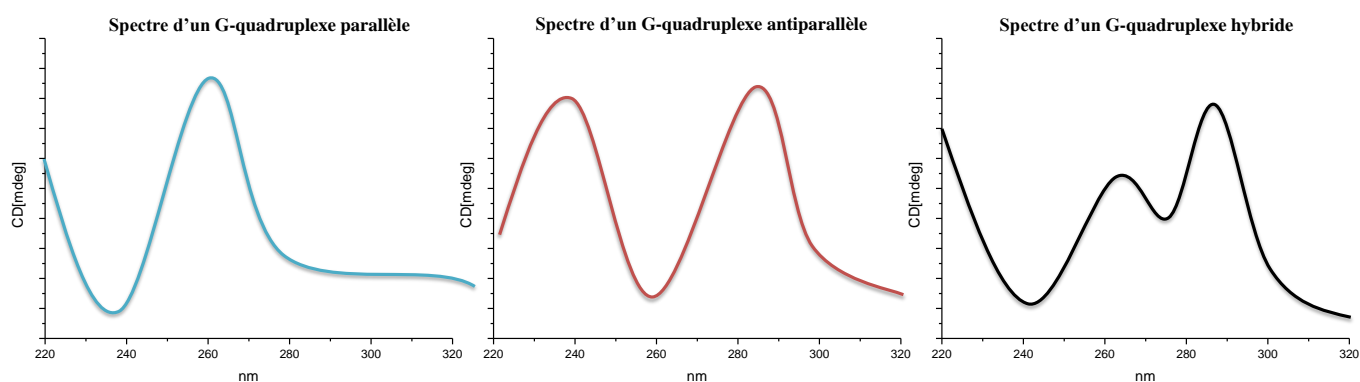


Figure 14 Présentation des différents spectres en dichroïsme selon l'orientation du G-quadruplexe.

L'obtention de tel signal vient de l'orientation des tétrades qui varient selon les angles glycosidiques. Ainsi lorsqu'il y a passage d'une conformation *syn* à une *anti* entre deux guanines successives, l'orientation de la tétrade va s'inverser. Leurs mêmes faces interagissent alors par « π -stacking » et elles se retrouvent soit face à face ou soit dos à dos. A l'inverse une même configuration d'angle glycosidique entre deux guanines successives va conduire à une topologie où les tétrades ont la même orientation (Figure 15).

23 Masiero, S.; Trotta, R.; Pieraccini, S.; De Tito, S.; Perone, R.; Randazzo, A.; Spada, G. P., A non-empirical chromophoric interpretation of CD spectra of DNA G-quadruplex structures. *Org Biomol Chem* **2010**, 8 (12), 2683-2692.

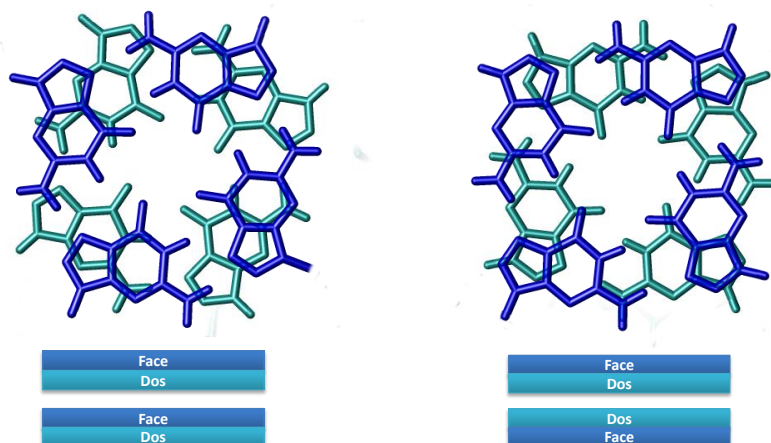


Figure 15 Tétrades face à face et face à dos

ii) Les différents sillons d'un G-quadruplexe

La taille et la position de chacun des quatre sillons d'un G-quadruplexe dépend également de la conformation de chacune des quatre guanines dans la tétrade et donc de l'orientation des brins. On recense trois types de sillons qui peuvent être large, moyen ou étroit. Cette différence de taille vient de la position de la base par rapport à la chaîne sucre-phosphate de l'édifice (Figure 16). Ainsi il existe seize combinaisons d'arrangement théoriques selon la disposition des guanines dans la tétrade. Il est intéressant de noter qu'entre deux tétrades successives, les tailles des sillons sont respectées. Ainsi il faut que deux combinaisons théoriques similaires se superposent pour que la structure puisse se former.

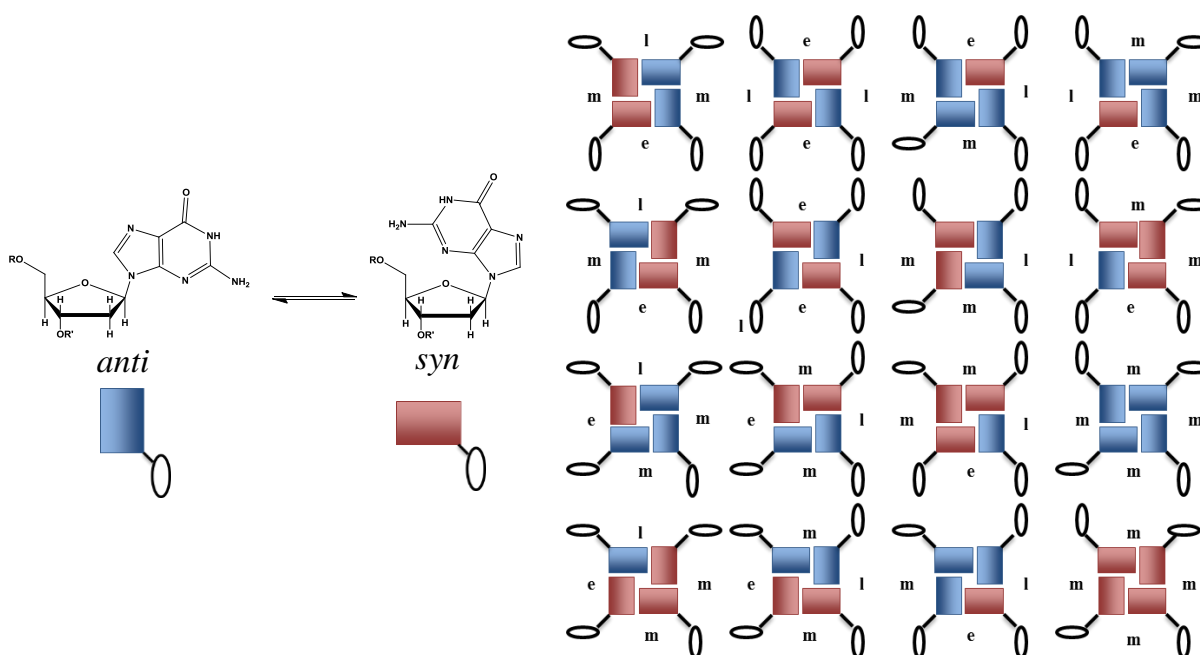


Figure 16 Présentation des différentes tétrades de guanines possibles dans un G-quadruplexe avec leur sillon (m : sillon moyen, l : sillon large, e : sillon étroit).

iii) Les différents types de boucle composant l'édifice

A part dans le cas d'un G-quadruplexe tétramoléculaire, la formation de l'édifice nécessite le repliement de brins impliquant la présence de boucles dans le G-quadruplexe (Figure 17)²⁴. Selon l'orientation des brins reliés et leur position, trois types de boucles peuvent se former. Ainsi, lorsqu'une boucle relie deux brins adjacents parallèle, elle est appelée boucle externe. A l'inverse, si elle relie deux brins adjacents antiparallèles, elle est qualifiée de boucle latérale. Lorsque deux brins antiparallèles opposés sur la structure sont reliés, on parle d'une boucle diagonale. Il est possible qu'un G-quadruplexe soit composé de plusieurs types de boucles que ce soit dans le cas d'un G-quadruplexe bimoléculaire (à deux brins indépendants) ou intramoléculaire.

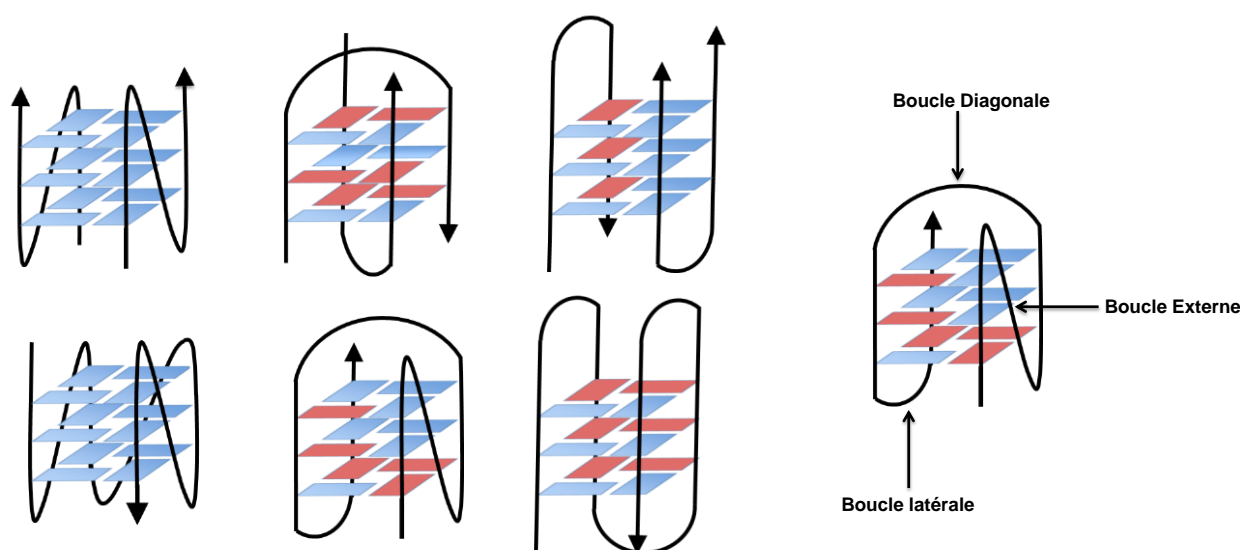


Figure 17 Présentation des différents types de boucles

Il faut également noter que la longueur de la séquence d'une boucle peut également influencer la topologie adoptée par le G-quadruplexe²⁵. Ainsi il a été observé qu'une boucle externe est obtenue de façon préférentielle lorsque le nombre de résidu est inférieur à deux bases. Dans ce cas, il semble que la première base en 5' soit toujours en *syn*. De même, les boucles latérales d'un ou deux résidus se placent entre deux brins antiparallèles séparés par des sillons étroits. Il apparait également que la formation d'une boucle diagonale nécessite une longueur de

24 Webba da Silva, M.; Trajkovski, M.; Sannohe, Y.; Ma'ani Hessari, N.; Sugiyama, H.; Plavec, J., Design of a G-Quadruplex Topology through Glycosidic Bond Angles. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48* (48), 9167-9170.

25 (a) Guédin, A.; De Cian, A.; Gros, J.; Lacroix, L.; Mergny, J.-L., Sequence effects in single-base loops for quadruplexes. *Biochimie* **2008**, *90* (5), 686-696; (b) Risitano, A.; Fox, K. R., Influence of loop size on the stability of intramolecular DNA quadruplexes. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32* (8), 2598-2606.

séquence d'au moins trois résidus. La longueur des boucles est également très variable. Le G-quadruplexe *hTert* possède par exemple une boucle latérale constituée de 26 bases nucléiques²⁶.

iv) Développement d'un formalisme d'écriture des G-quadruplexes

Dans le but de pouvoir accéder rapidement à des informations précises sur un G-quadruplexe, M. Webba Da Silva a développé un formalisme d'écriture. Ce dernier utilise l'ordre d'agencement des boucles sur les structures intramoléculaire. En effet, la topologie des boucles est corrélée à l'orientation des brins et donc à la taille des sillons. Ainsi toutes les données importantes sur la topologie d'un quadruplexe peuvent être rapidement déterminées. Le code est composé d'un signe indiquant le sens de succession des boucles en partant de l'extrémité 5'. Le signe + correspond au sens indirect (sens des aiguilles d'une montre) tandis que le signe - représente l'autre sens. Le G-quadruplexe est disposé de façon à avoir son extrémité 5' dans l'angle en bas, à droite et au premier plan. Les lettres p, l et d correspondent respectivement aux différentes boucles externe (pour « propeler »), latérale et diagonale. Elles s'ajoutent dans l'ordre dans lequel les boucles se forment. Il faut remarquer que la présence d'une boucle diagonale inverse le sens de rotation de l'édifice.

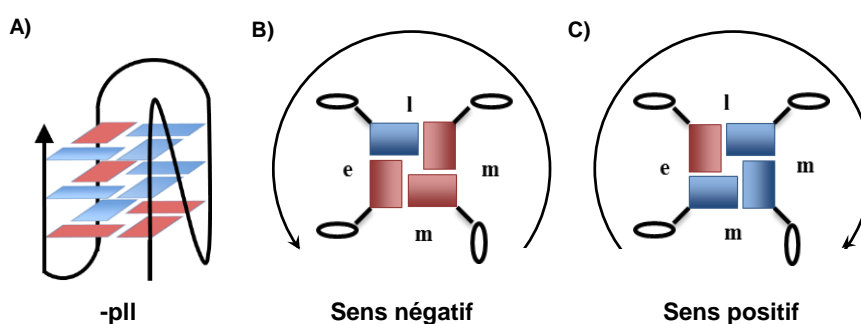


Figure 18 Exemple d'utilisation d'un formalisme pour caractériser un G-quadruplexe

Ainsi on aura par exemple sur le G-quadruplexe télomérique humain hybride-1 dans le potassium (Figure 18A) une écriture de type $-pll$. A partir de ceci, il est aisé de déterminer les caractéristiques du quadruplexe : quatre brins dont l'orientation alterne qui forment un sillon moyen puis un large, un étroit et un moyen (Figure 18B). Il faut toutefois noter que ce formalisme décrit ci-dessus n'est pas applicable à tous les G-quadruplexes. Des exceptions peuvent être rencontrées comme dans le cas de la séquence *c-Kit1*²⁷ dont la structure est particulière : seules

26 Palumbo, S. L.; Ebbinghaus, S. W.; Hurley, L. H., Formation of a Unique End-to-End Stacked Pair of G-Quadruplexes in the hTERT Core Promoter with Implications for Inhibition of Telomerase by G-Quadruplex-Interactive Ligands. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (31), 10878-10891.

27 Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Burge, S.; Neidle, S.; Patel, D. J., Structure of an Unprecedented G-Quadruplex Scaffold in the Human *c-kit* Promoter. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (14), 4386-4392.

deux guanines du dernier enchaînement participent au quadruplexe tandis qu'une autre, issue d'une boucle, vient compléter la troisième tétrade (Figure 19).

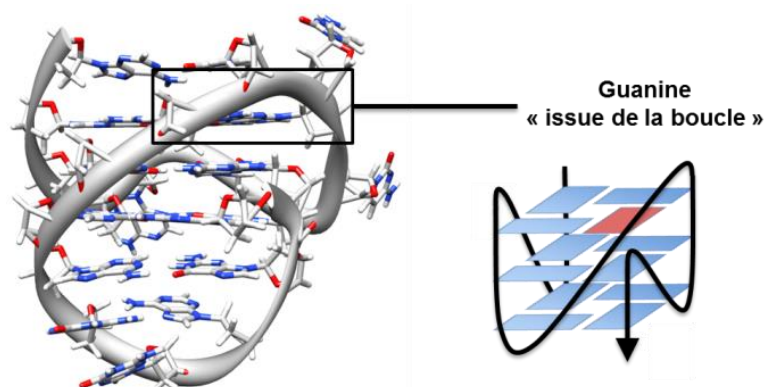


Figure 19 Structure de G-quadruplexe c-Kit1 (Code PDB :2O3M)

1c. Polymorphisme des G-quadruplexes

Prédire la topologie que peut adopter un G-quadruplexe est complexe. En effet, si connaître la longueur des boucles peut permettre de prévoir la conformation de certaines boucles et l'orientation des brins, d'autres paramètres sont également à prendre en compte. Il s'agit essentiellement de la nature du milieu et de certaines caractéristiques de la séquence.

i) Selon le milieu

Un élément principal qui va influencer la structuration du G-quadruplexe est la nature du cation présent en sein des tétrades de guanine. Ainsi l'équipe de C. Bailey a montré en 1993 que la stabilisation de la structure croit dans l'ordre de cation suivant : $K^+ > Rb^+ = Na^+ > Cs^+ > Li^{+28}$. L'origine de ce phénomène est le rayon atomique des ions : selon le cas, il est soit trop important (Cs^+) ou trop petit (Li^+) pour interagir au sein des tétrades et les stabiliser. De même, sa position dans la cavité du G-quadruplexe joue un rôle important. Dans le cas du Na^+ où les cations viendront se placer au centre de la tétrade, il y a une perte de stabilité par rapport aux ions potassium, où chaque ion interagit avec deux tétrades (Figure 20). Cette disposition des cations influence la topologie adoptée par le G-quadruplexe et il arrive que deux édifices différents selon le cation présent en solution.

28 Hardin, C. C.; Watson, T.; Corregan, M.; Bailey, C., Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG₃GCG). *Biochemistry (Mosc)* **1992**, *31* (3), 833-841.

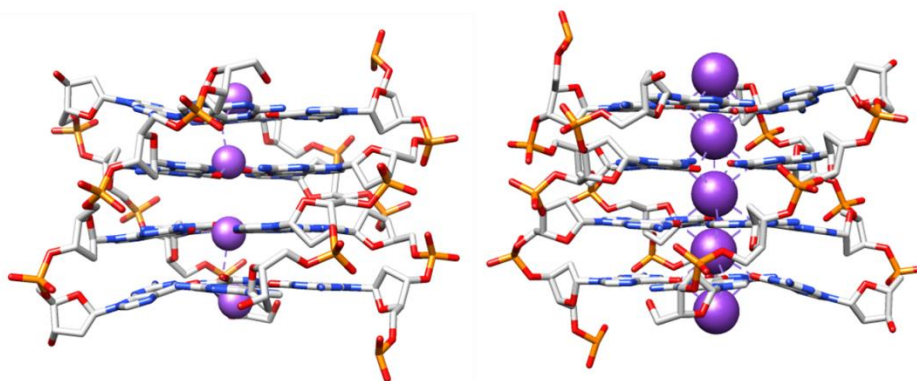


Figure 20 Dispositions des cations Na^+ (à gauche) et K^+ (à droite) au sein des tétrades de guanines

L'exemple le plus connu et le plus étudié est le cas de la séquence télomérique humaine dont la résolution de la structure a été établie par RMN et cristallographie aux rayons X (Figure 21). C'est l'équipe de D. Patel qui a résolu la première structure de la séquence wtTel 22 en présence de Na^{+29} . Il apparaît que la structure obtenue correspond à une structure de type « panier de basket » en présentant la formation de deux boucles latérales et d'une boucle diagonale (-ld+l). Pourtant les mêmes études par RMN effectuées en présence le potassium n'ont pu être résolues à cause de la présence d'un mélange en solution. Seule une structure cristallographique de cette séquence a pu être obtenue en présence de K^+ , indiquant la formation d'un G-quadruplexe à la topologie différente. Celle-ci indique que la structure obtenue est parallèle avec la présence de trois boucles externes (-ppp)³⁰. Cependant il a été montré que cette structure n'existait pas en solution par l'équipe de J.B. Chaires³¹ et il est plus probable que la séquence adopte des conformations de type hybrides en présence de potassium. Cette variation de topologie selon le cation se vérifie également dans une autre étude effectuée par dichroïsme circulaire³². Il a été observé que l'ajout de K^+ sur un G-quadruplexe initialement antiparallèle (en présence de Na^+) conduit à la formation d'un édifice de type hybride. Par contre, le phénomène inverse (ajout de Na^+ sur un G-quadruplexe stabilisé par du K^+) ne se réalise pas.

29 Wang, Y.; Patel, D. J., Solution structure of a parallel-stranded G-quadruplex DNA. *J Mol Biol* **1993**, *234* (4), 1171-1183.

30 Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S., Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* **2002**, *417* (6891), 876-880.

31 Li, J.; Correia, J. J.; Wang, L.; Trent, J. O.; Chaires, J. B., Not so crystal clear: the structure of the human telomere G-quadruplex in solution differs from that present in a crystal. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33* (14), 4649-4659.

32 Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Bialis, T.; Jones, R. A.; Yang, D., Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34* (9), 2723-2735.

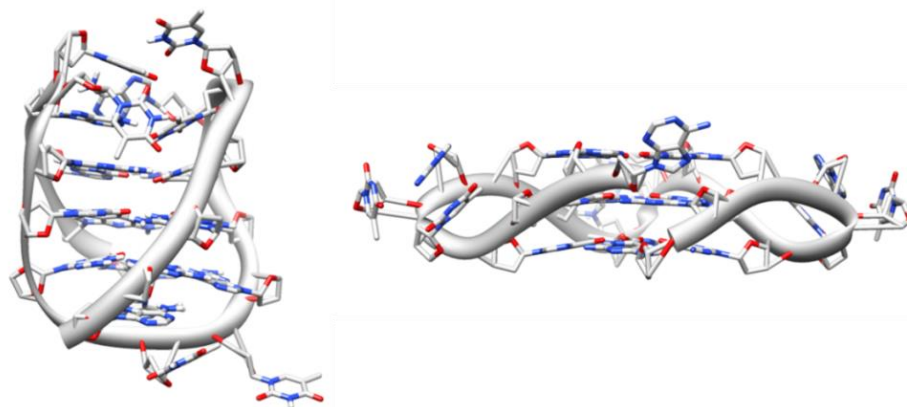


Figure 21 Structure de wtTel22 issue de la séquence télomérique humaine : Structure RMN dans NaCl (à droite, Code PDB :143D) et structure cristallographique analysée par RX (à gauche, Code PDB : 1KF1)

Il est intéressant de noter que la structure cristallographique en présence de K^+ obtenue n'est pourtant pas si dépourvue de sens. En effet, il a été également montré que les conditions d'encombrement influençaient la topologie adoptée par un G-quadruplexe³³. Ainsi lors de l'ajout de polyéthylène glycol (PEG) dans le milieu, la topologie adoptée peut changer en présence de K^+ ³⁴. Cette étude a été également suivie par dichroïsme circulaire. Il apparaît que l'ajout de PEG dans le milieu déplace l'équilibre depuis une topologie hybride vers une autre de type parallèle. Cette conversion ne semble par contre pas totale et le phénomène ne se produit pas non plus en présence de sodium.

ii) Selon la séquence

Il est également intéressant de constater que les G-quadruplexes peuvent adopter des topologies différentes selon leur séquence. Bien évidemment deux séquences très différentes n'auront vraisemblablement pas la même topologie mais ceci peut également s'observer sur des variations mineures de séquence. Il peut par exemple s'agir de l'ajout d'une base supplémentaire sur une séquence ou bien tout simplement par l'échange de l'une d'elle. C'est sur la séquence télomérique humaine que le plus grand nombre d'études a été effectué illustrant bien ce phénomène (Figure 22)³⁵. Une étude a été effectuée par RMN sur la séquence télomérique wtTel26 (5'-(TTAGGG)₄TT-3')³⁶. Elle indique que l'édifice adopte une topologie majoritaire (75%) de type hybride en présence de K^+ présentant ainsi deux boucles latérales suivies d'une

33 Petraccone, L.; Malafroate, A.; Amato, J.; Giancola, C., G-Quadruplexes from Human Telomeric DNA: How Many Conformations in PEG Containing Solutions? *J Phys Chem B* **2012**, *116* (7), 2294-2305.

34 Xue, Y.; Kan, Z.-y.; Wang, Q.; Yao, Y.; Liu, J.; Hao, Y.-h.; Tan, Z., Human Telomeric DNA Forms Parallel-Stranded Intramolecular G-Quadruplex in K^+ Solution under Molecular Crowding Condition. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (36), 11185-11191.

35 Dai, J.; Carver, M.; Yang, D., Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1172-1183.

36 Dai, J.; Carver, M.; Punchihewa, C.; Jones, R. A.; Yang, D., Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K^+ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35* (15), 4927-4940.

boucle externe (-llp dite hybride 2). Par contre, dans le cas de la séquence Tel26 (5'-AAA(GGGTTA)₃GGGAA-3') qui varie de la précédente par le remplacement des thymines T1,T2 et T26, une autre structure hybride a été trouvée présentant une boucle externe, puis deux boucles latérales (-pll) dite Hybride-1³⁷. L'origine de ce changement de conformation du G-quadruplexe vient de la stabilité apportée à l'édifice par les bases présentes en 5' ou en 3'. Par exemple sous forme d'hybride-2, il existe une interaction entre les T8, A9 et T25 en 3' de la molécule, ce qui n'est pas possible dans le cas de l'hybride-1. Ainsi selon la possibilité ou non de la séquence à former l'interaction présentée ci-dessus, les structures vont varier entre la forme hybride-2 à hybride-1

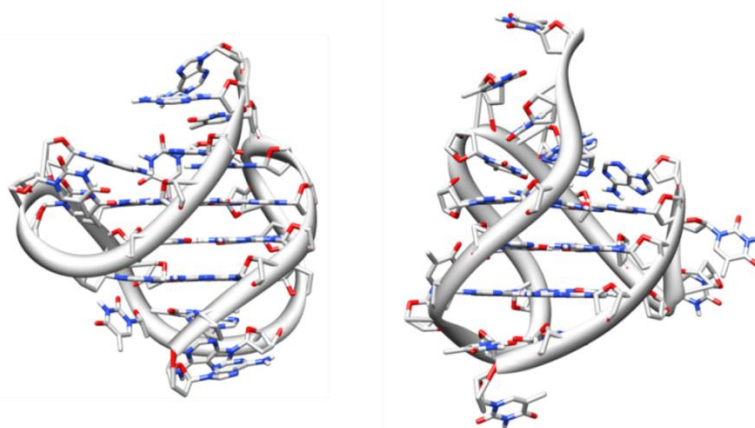


Figure 22 Séquence Hybride-1 (Tel26 à droite code PDB :2YH9) et Hybride-2 (wtTel26 à gauche, code PDB :2JPZ) de la séquence télomérique humaine

Dans le cas où un grand nombre de succession de guanines sont présentes sur la séquence, plusieurs G-quadruplexes peuvent se succéder sous forme de tandem. C'est pourquoi il apparait que de plus en plus d'équipes étudient la façon dont s'apparient plusieurs G-quadruplexes dans une même séquence³⁸. En effet, il est important de déterminer si plusieurs G-quadruplexes dans de telles séquences interagissent et de savoir également si ce phénomène influence leur topologie. Il est également intéressant de savoir si les G-quadruplexes se font face par interaction 3'-3', 5'-3', 3'-5', 5'-5' (Figure 23).

37 Dai, J.; Punchihewa, C.; Ambrus, A.; Chen, D.; Jones, R. A.; Yang, D., Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35* (7), 2440-2450.

38 (a) Schonhoft, J. D.; Bajracharya, R.; Dhakal, S.; Yu, Z.; Mao, H.; Basu, S., Direct experimental evidence for quadruplex-quadruplex interaction within the human ILPR. *Nucleic Acids Res* **2009**, *37* (10), 3310-3320; (b) Collie, G. W.; Parkinson, G. N.; Neidle, S.; Rosu, F. d. r.; De Pauw, E.; Gabelica, V., Electrospray Mass Spectrometry of Telomeric RNA (TERRA) Reveals the Formation of Stable Multimeric G-Quadruplex Structures. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (27), 9328-9334; (c) Smargiasso, N.; Rosu, F. d. r.; Hsia, W.; Colson, P.; Baker, E. S.; Bowers, M. T.; De Pauw, E.; Gabelica, V., G-Quadruplex DNA Assemblies: Loop Length, Cation Identity, and Multimer Formation†. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (31), 10208-10216; (d) Pedroso, I. M.; Duarte, L. F.; Yanez, G.; Burkewitz, K.; Fletcher, T. M., Sequence specificity of inter- and intramolecular G-quadruplex formation by human telomeric DNA. *Biopolymers* **2007**, *87* (1), 74-84; (e) Bauer, L.; Tlučková, K.; Tóthová, P.; Víglašký, V., G-Quadruplex Motifs Arranged in Tandem Occurring in Telomeric Repeats and the Insulin-Linked Polymorphic Region. *Biochemistry (Mosc)* **2011**, *50* (35), 7484-7492; (f) Yu, H.-Q.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N., Characterization of Structure and Stability of Long Telomeric DNA G-Quadruplexes. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (48), 15461-15468.

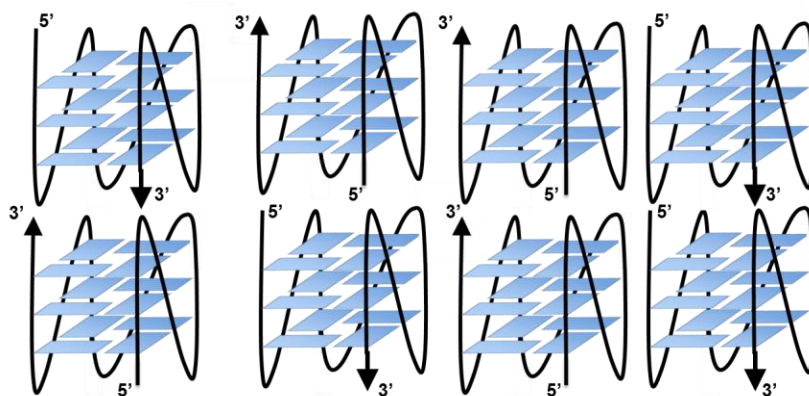


Figure 23 Associations possibles entre les G-quadruplexes « en tandem »

iii) G-quadruplexes d'ARN

Contrairement à toutes les séquences étudiées sur les G-quadruplexes composés d'ADN, il apparaît que les G-quadruplexes d'ARN adoptent préférentiellement une structure parallèle. Différentes études ont montré ceci : les structures adoptées par la séquence $ag_3(t_2ag_3)_3$ en présence de KCl tout comme en présence de NaCl ont cette topologie parallèle³⁹. D'autres études, effectuées par G-H Zhi et *al.* indiquent que, les séquences, comme celle issue télomérique d'*Oxytricha nova* $5'-(g_4u_4g_4)_3g_4-3'$ ou encore du promoteur de l'oncogène *b1c2*, gardent une topologie parallèle quelles que soient les conditions salines et de « crowding » alors qu'elles sont pourtant polymorphes sous forme d'ADN⁴⁰. De plus, il faut remarquer que la stabilité d'un G-quadruplexe d'ARN est supérieure à celle d'un G-quadruplexe d'ADN. En effet, cela est dû à la présence des fonctions hydroxyles en C2' qui forment des liaisons hydrogène avec les phosphates, les O4' ainsi qu'avec les N2 des guanines participant aux tétrades.

II.2. Notion de i-motif

Les G-quadruplexes sont des structures qui se forment sur les séquences riches en guanines. Leur séquence complémentaire au sein d'une double hélice est également capable de former une autre structure complémentaire appelée i-motif ou quadruplexes de cytosines. Le i-motif est actuellement beaucoup moins étudié que les G-quadruplexes, cependant les deux édifices présentent un nombre de caractéristiques qui est similaire⁴¹.

39 (a) Zhang, D.-H.; Fujimoto, T.; Saxena, S.; Yu, H.-Q.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N., Monomorphic RNA G-Quadruplex and Polymorphic DNA G-Quadruplex Structures Responding to Cellular Environmental Factors. *Biochemistry (Mosc)* **2010**, *49* (21), 4554-4563; (b) Martadinata, H.; Phan, A. T. n., Structure of Propeller-Type Parallel-Stranded RNA G-Quadruplexes, Formed by Human Telomeric RNA Sequences in K⁺ Solution. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (7), 2570-2578.

40 Zhang, D.-H.; Zhi, G.-Y., Structure monomorphism of RNA G-quadruplex that is independent of surrounding condition. *J Biotechnol* **2010**, *150* (1), 6-10.

41 Guéron, M.; Leroy, J.-L., The i-motif in nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol* **2000**, *10* (3), 326-331.

2a. Concept de i-motif

Les i-motifs ont été découverts en 1993 par l'équipe de M. Guéron⁴². Cette structure est composée de quatre brins chacun antiparallèle avec leur voisins. L'appariement dans la structure se fait entre les brins orientés dans le même sens *via* l'interaction des différentes cytosines (Figure 24). Trois liaisons hydrogène se forment systématiquement entre les structures dont deux se font entre les oxygènes en position 2 et un hydrogène de la fonction amine en position 4. La troisième liaison hydrogène nécessite la protonation d'un azote en position 3. La conséquence directe de ceci est que la structure est pH-dépendante. Dans celle-ci, il y a alternance des plateaux formés par les couples de cytosines entre ceux appartenant à un couple de brin apparié et ceux du second couple. On obtient ainsi un édifice « zippé ».

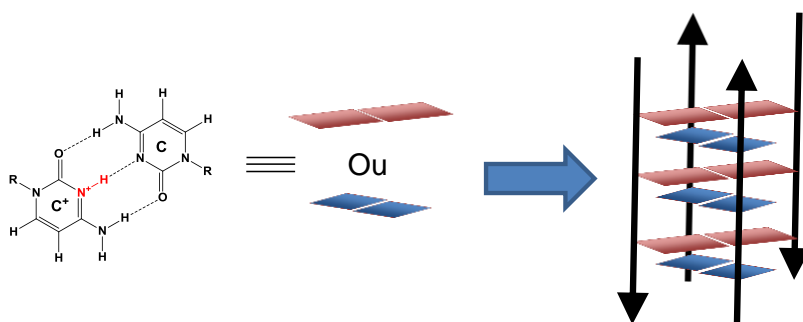


Figure 24 Représentation schématique d'un i-motif

2b. Caractérisation du i-motif

Tout comme le G-quadruplexe, le i-motif peut être intermoléculaire ou intramoléculaire. Généralement les structures sont composées de deux types de sillons, deux larges et deux étroits. L'hélicité de la molécule est de 3,1Å ce qui est légèrement plus faible que la double hélice. Néanmoins seules deux catégories de boucles peuvent exister sur la structure, des boucles latérales ou des boucles diagonales. En effet, les boucles externes impliquent d'avoir deux brins adjacents parallèles, ce qui n'est pas possible dans cette structure. La longueur des boucles est également importante. Ainsi une boucle d'un seul résidu peut être suffisante pour former une boucle latérale par-dessus un sillon étroit, cependant au moins deux résidus sont nécessaires pour former des boucles diagonales sur la structure.

Bien que les topologies retrouvées sur le i-motif soient beaucoup moins complexes et variées que pour le G-quadruplexe, des études tendent à montrer que différentes formes peuvent

42 Gehring, K.; Leroy, J.-L.; Gueron, M., A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature* **1993**, 363 (6429), 561-565.

exister en solution. Ces topologies dépendent de la façon dont s'intercalent les cytosines entre elles. Ainsi lorsque la dernière paire de cytosine est placée en 3' des brins, le i-motif est qualifié de 3'E. A l'inverse lorsque c'est la paire en 5' qui est à l'extrémité du i-motif, l'édifice est dit 5'E (Figure 25). Ces deux topologies semblent coexister dans de nombreuses structures. Ainsi les i-motifs composés des séquences 5'-(TAACCC)₄-3' ou 5'-(CCCTAA)₄-3' adoptent ces deux topologies. Dans une étude récente de l'équipe de H. Schwable⁴³, il semble apparaître que la forme 3'E de la séquence 5'-(C₃TA₂)₃CCC-3', séquence complémentaire de la séquence télomérique humaine soit la forme privilégiée cinétiquement. Cependant la forme 5'E semble être la plus stable.

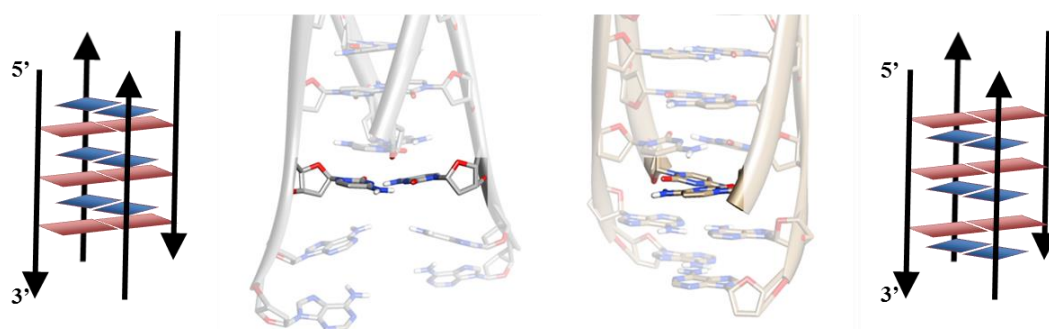


Figure 25 Représentation des topologies 3'E (à droite) et 5'E (à gauche) d'un i-motif. (Code PDB :1YBN et1YBR)

2c. Dépendance du pH du i-motif.

La formation du i-motif implique la protonation d'une des deux cytosines impliquées dans la structuration de l'édifice. C'est pourquoi la formation de la structure est pH-dépendante⁴⁴. Le pK_a du N3 de la cytosine se situant autour de 4.5 selon les conditions expérimentales, il apparaît clairement que c'est à pH acide que la formation du i-motif est favorisée. Toutefois plusieurs études tendent à indiquer qu'à pH neutre il peut subsister partiellement. De façon curieuse, mettre un i-motif dans des conditions d'encombrement fort (« crowding ») tout comme un G-quadruplexe va également avoir un impact sur la structure. En effet, l'équipe de N. Sugimoto a montré que l'ajout de PEG sur la séquence (CCT)₈ peut stabiliser la structure et permettre sa formation jusqu'à un pH légèrement alcalin (Figure 26)⁴⁵.

43 Lieblein, A. L.; Buck, J.; Schlepckow, K.; Fürtig, B.; Schwabe, H., Time-Resolved NMR Spectroscopic Studies of DNA i-Motif Folding Reveal Kinetic Partitioning. *Angew Chem Int Ed* **2012**, *51* (1), 250-253.

44 (a) Jin, K. S.; Shin, S. R.; Ahn, B.; Rho, Y.; Kim, S. J.; Ree, M., pH-Dependent Structures of an i-Motif DNA in Solution. *J Phys Chem B* **2009**, *113* (7), 1852-1856; (b) Leroy, J.-L.; Guéron, M.; Mergny, J.-L.; Hélène, C., Intramolecular folding of a fragment of the cytosine-rich strand of telomeric DNA into an i-motif. *Nucleic Acids Res* **1994**, *22* (9), 1600-1606.

45 Rajendran, A.; Nakano, S.-i.; Sugimoto, N., Molecular crowding of the cosolutes induces an intramolecular i-motif structure of triplet repeat DNA oligomers at neutral pH. *Chem Commun* **2010**, *46* (8), 1299-1301.

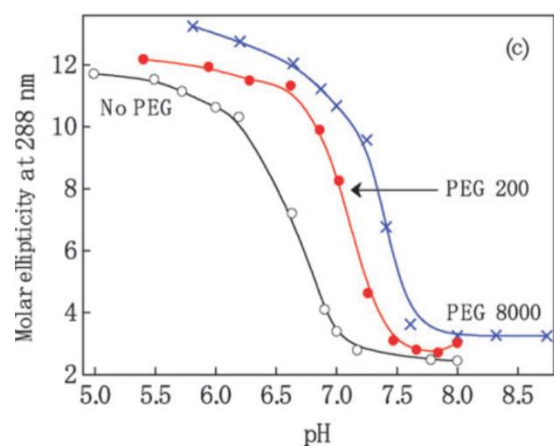


Figure 26 Stabilité de la séquence $(CTT)_8$ selon le pH

III. Quadruplexes en tant que cibles biologiques

Des études génomiques fondées sur l'algorithme « Quadparser »⁴⁶ capable d'identifier les séquences aptes à former des G-quadruplexes indiquent qu'il en existerait 376 000, non chevauchantes, dans le génome humain. Ces séquences ne sont pas distribuées de façon aléatoire dans le génome, laissant entrevoir des rôles bien précis à ces structures. Ainsi des séquences capables de former des G-quadruplexes ont été identifiées *in vitro* qu'elles soient issues de séquences répétées, au niveau des télomères, de l'ADN ribosomal, des minisatellites, des régions « switch » des chaînes lourdes des immunoglobulines, des promoteurs de gènes et sur différents ARN⁴⁷. Le rôle le plus probable des quadruplexes serait celui « d'interrupteurs stériques » lors de mécanismes cellulaires. En effet, il apparaît que de nombreuses protéines sont capables de reconnaître ces structures secondaires de l'ADN et que leur activité soit déclenchée ou inhibée par leur présence. De nombreux exemples sont régulièrement découverts : ainsi on peut recenser des protéines capables de déstructurer ces motifs, d'autres capables de les former et d'autres qui peuvent les utiliser en tant que substrat⁴⁸.

Toutefois si de plus en plus de preuves tendent à laisser croire que les G-quadruplexes voire les i-motif peuvent se former *in vivo*, les preuves directes sont rares. L'une d'elles a été mise en place par l'équipe de A. Plückthun en 2001 par la détection des motifs G-quadruplexes dans la cellule *via* l'utilisation d'anticorps dirigés contre les G-quadruplexes télomériques⁴⁹. Plus récemment, R. Rodriguez et *al.* ont utilisé un ligand spécifique des G-quadruplexes, la pyridostatine, en tant que sonde pour détecter des G-quadruplexes⁵⁰. Les dommages qu'il induit sur les ADN ont été séquencés. Il s'avère que les séquences endommagées sont capables de former des G-quadruplexes. Cette étude a été complétée par la détection de la pyridostatine avec une hélicase (HpiF), couplée à la GFP, capable de désapparier les G-quadruplexes. Le recouvrement partiel des signaux de la pyridostatine et de l'hélicase laisse supposer la présence de structures de type G-quadruplexes dans le génome.

46 Huppert, J. L.; Balasubramanian, S., Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33* (9), 2908-2916.

47 (a) Dunnick, W.; Hertz, G. Z.; Scappino, L.; Gritzmacher, C., DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res* **1993**, *21* (3), 365-372; (b) Sen, D.; Gilbert, W., Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* **1988**, *334* (6180), 364-366; (c) Ou, T.-M.; Lu, Y.-J.; Tan, J.-H.; Huang, Z.-S.; Wong, K.-Y.; Gu, L.-Q., G-Quadruplexes: Targets in Anticancer Drug Design. *ChemMedChem* **2008**, *3* (5), 690-713.

48 Wu, Y.; Brosh, R. M., G-quadruplex nucleic acids and human disease. *FEBS J* **2010**, *277* (17), 3470-3488.

49 (a) Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Plückthun, A., In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (15), 8572-8577; (b) Lipps, H. J.; Rhodes, D., G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol* **2009**, *19* (8), 414-422.

50 (a) Mergny, J.-L., Alternative DNA structures: G4 DNA in cells: itae missa est? *Nat Chem Biol* **2012**, *8* (3), 225-226; (b) Rodriguez, R.; Miller, K. M.; Forment, J. V.; Bradshaw, C. R.; Nikan, M.; Britton, S.; Oelschlaegel, T.; Xhemalce, B.; Balasubramanian, S.; Jackson, S. P., Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. *Nat Chem Biol* **2012**, *8* (3), 301-310.

De par cette capacité à être impliqués dans de nombreux processus biologiques, les G-quadruplexes (et les i-motifs voir section 5) apparaissent comme des cibles thérapeutiques potentielles. En effet, si leur stabilisation permet de bloquer ou d'activer des fonctions cellulaires, il apparait comme logique de chercher des molécules capables d'arriver à les stabiliser. Les sections suivantes vont décrire les principales stratégies utilisant les G-quadruplexes dans un but thérapeutique.

III.1. G-quadruplexes et Régulation de l'activité télomérique

1a. Télomères

Mis en évidence par B. McClintock les télomères sont des séquences d'ADN répétées et non-codantes de l'extrémité des chromosomes associées à différents protéines⁵¹. Leur fonction est de protéger le matériel génétique en empêchant la fusion des chromosomes et ainsi empêcher d'éventuelles cassures ou recombinaisons chromosomiques⁵². Ils préviennent également toute dégradation par les exonucléases. Il s'agit fréquemment de séquences riches en guanines, conservées chez la plupart des êtres vivants. Par exemple chez l'homme les télomères sont la répétition de la séquence 5'-TTAGGG-3' associée à sa séquence complémentaire 3'-AATCCC-5'. Ils mesurent en moyenne 10 à 15 kBs dans les cellules somatiques et l'extrémité 3' est légèrement plus longue que la 5' de 100 à 200 bases (Figure 27)⁵³. La contribution à cette découverte a permis à E. Blackburn, C. Greider et J. Szostak d'obtenir le prix Nobel de médecine en 2009.

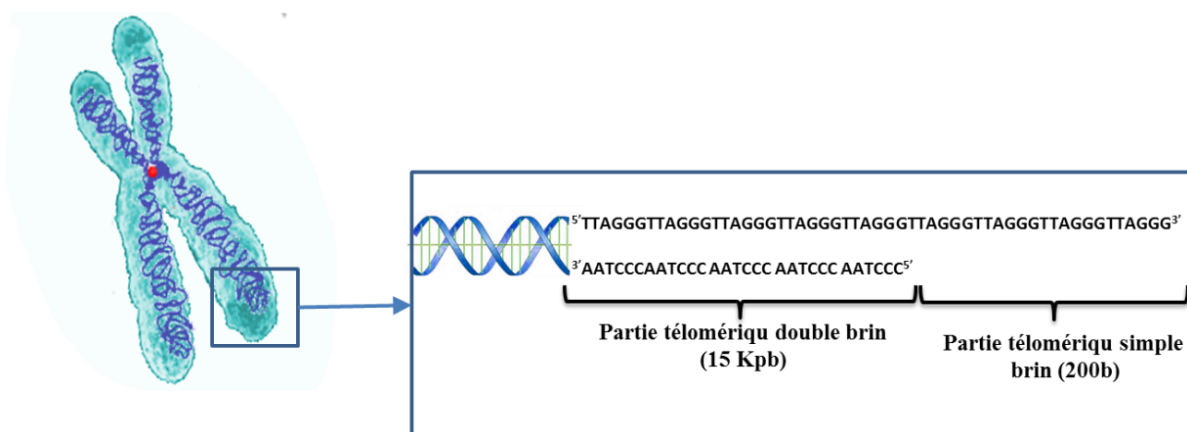


Figure 27 Présentation des télomères humains

51 McClintock, B., The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1939**, 25 (8), 405-416.

52 Hahn, W. C., Role of Telomeres and Telomerase in the Pathogenesis of Human Cancer. *J Clin Oncol* **2003**, 21 (10), 2034-2043.

53 Blackburn, E. H., Switching and Signaling at the Telomere. *Cell* **2001**, 106 (6), 661-673.

Cet ADN est associé à différents complexes protéiques (appelé « shelterin » ou télosome) qui lui permettent d'assurer ses fonctions. Des protéines complexées à l'ADN forment un réarrangement sous forme de boucles (T-loop et D-loop) pour protéger les télomères et réguler leur longueur (Figure 28). La boucle se forme *via* un complexe protéique formé par les protéines POT1 et TPP1. La première reconnaît la partie simple brin du télomère tandis que la deuxième la partie double brin. La régulation de la longueur des télomères fait également intervenir différentes protéines appartenant au télosome. Ainsi deux autres protéines interviennent : TRF1 permet un contrôle négatif sur l'activité de la télomérase et TRF2 permet de protéger les télomères en les empêchant de se déplier. D'autres protéines telles que RAP-1 ou TIN-2 interviennent dans le télosome sans interagir directement avec l'ADN mais contribuent aux mécanismes de régulation.

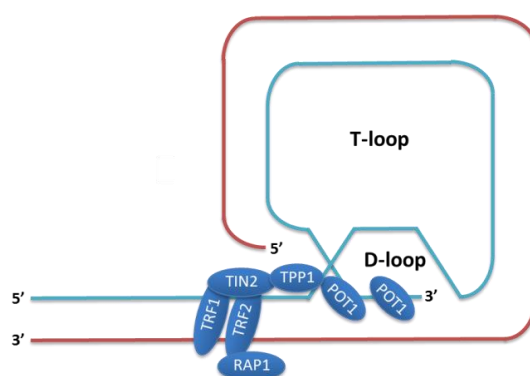


Figure 28 Réarrangement des télomères complexés au télosome

Dans une cellule somatique, la longueur des télomères diminue progressivement à chaque division cellulaire. Ceci est dû à l'activité de l'ADN-polymérase qui est incapable de dupliquer complètement l'extrémité terminale de l'ADN lors de la réplication : ce phénomène provient de la réplication du brin indirect qui nécessite la présence d'une amorce ARN pour effectuer son action depuis l'extrémité 5' jusqu'à celle en 3'. Ce processus, connu sous le nom de « end-replication effect » conduit vers un autre mécanisme, appelé sénescence répllicative : après 20 à 30 divisions, les télomères atteignent une longueur critique, dite « barrière de Hayflick », à partir de laquelle des mécanismes d'apoptose sont déclenchés dans la cellule conduisant à sa mort. C'est pourquoi, les télomères sont considérés comme des marqueurs de « l'horloge biologique ».

1b. Télomérase et cancer

Il existe toutefois des mécanismes cellulaires qui permettent de conserver la longueur des télomères. Parmi ceux-ci, on retrouve une enzyme, la télomérase qui est une transcriptase inverse

composée de deux sous-unités⁵⁴. La première est la partie catalytique de la protéine, hTERT (1131 acide-aminés chez l'homme), tandis que la seconde est un ARN, hTR (451 nucléotides) qui sert de matrice. Cette enzyme est capable de répliquer la séquence télomérique à l'extrémité 3' des chromosomes empêchant ainsi leur diminution en longueur (Figure 29). La sous-unité hTERT n'est pas exprimée dans toutes les cellules mais seulement celles des lignées germinales et des cellules souches. Il arrive toutefois qu'elle soit exprimée dans certaines lignées cancéreuses.

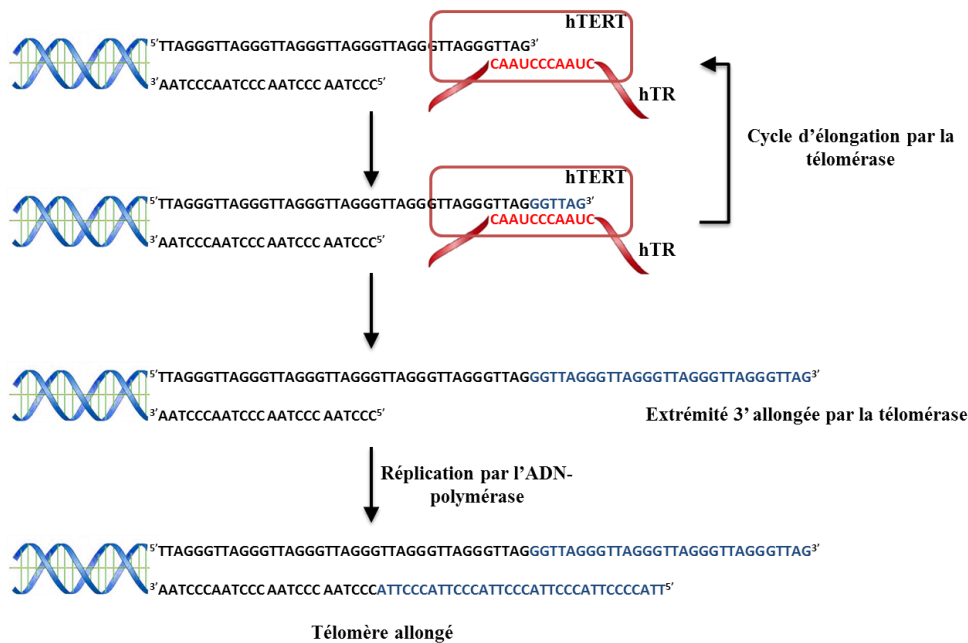


Figure 29 Mécanisme de la télomérase

En effet, la surexpression de la télomérase dans 85% des cellules cancéreuses est l'une des raisons de leur immortalisation : la longueur des télomères ne diminuant plus, la limite de Hayflick n'est plus atteinte et il n'y a ainsi plus aucune limite aux divisions anarchiques. Inhiber l'action de cette enzyme peut donc être un moyen de lutter contre le cancer en induisant le raccourcissement des télomères. Différentes voies ont été explorées dans ce but (Figure 30)⁵⁵. Par exemple, la stratégie antisens a été envisagée dans le but de bloquer la partie nucléique hTR de la télomérase. Un conjugué oligonucléotido-lipidique GRN163L a été synthétisé dans ce but et est en phase II d'essai clinique. Une autre stratégie vise la sous partie protéique de la télomérase hTERT. Une molécule, la BIBR1532, est l'une des molécules les plus prometteuses pour inhiber l'activité télomérique de façon non compétitive. Elle permet de diminuer de façon significative le nombre de répétitions TTAGGG et pourrait induire la dissociation de l'enzyme avec son substrat. Des

54 Cifuentes-Rojas, C.; Shippen, D. E., Telomerase regulation. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mugag* **2012**, 730 (1–2), 20-27.

55 Ruden, M.; Puri, N., Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev* **2012**.

vaccins ciblés contre la sous partie hTERT sont également en phase clinique avancée tels que GV1001 et GRNAC1 qui ciblent tous les deux des parties différentes de hTERT.

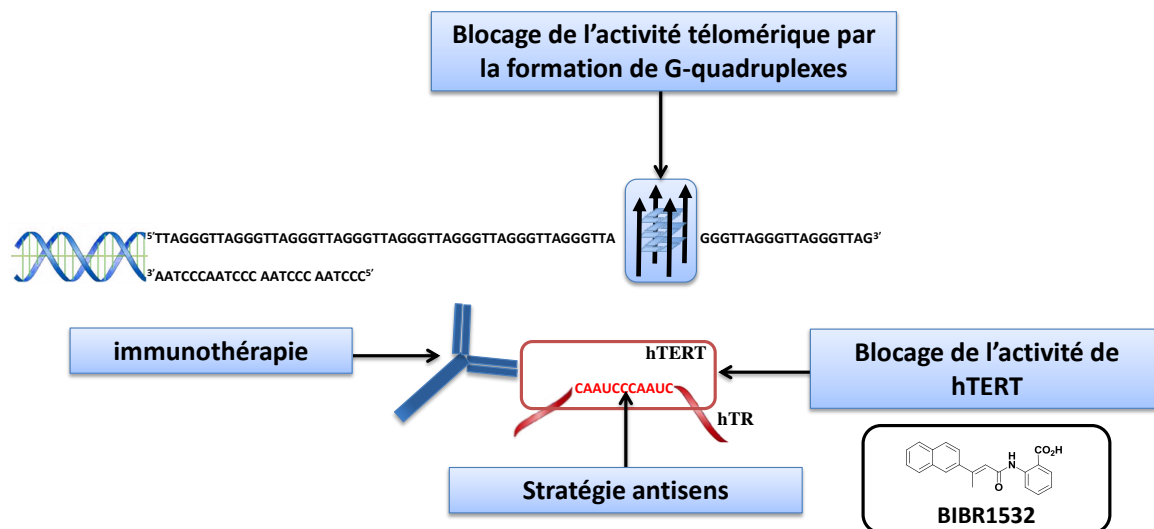


Figure 30 Principales stratégies d'inhibition de la télomérase

Une autre stratégie peut être envisagée visant la cible de l'enzyme, les télomères. En effet, en 1991 il a été montré par d'A. Zahler que la formation de G-quadruplexe sur la séquence télomérique pouvait bloquer l'activité de la télomérase⁵⁶. Ainsi l'objectif est de stabiliser ces structures *via* des ligands et ainsi inhiber la télomérase.⁵⁷. De nombreux ligands ont été synthétisés et testés. Toutefois, il s'avère que les effets de ces derniers sont plus complexes et que leurs effets ne se limitent pas à faire entrer les cellules cancéreuses en sénescence. En effet, la mort des cellules cancéreuses est obtenue de façon prématurée lorsqu'un ligand spécifique des G-quadruplexes stabilise leur formation sur les télomères. Souvent il y a déstabilisation du télosome et de la T-loop conduisant à une instabilité du télomère. Certains ligands peuvent également induire la fusion des chromosomes entre eux par leurs extrémités. D'autres stratégies thérapeutiques, développés au cours des paragraphes suivants, utilisant les G-quadruplexes sont également envisagées.

56 Zahler, A. M.; Williamson, J. R.; Cech, T. R.; Prescott, D. M., Inhibition of telomerase by G-quartet DMA structures. *Nature* **1991**, 350 (6320), 718-720.

57 Neidle, S., Human telomeric G-quadruplex: The current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *FEBS J* **2010**, 277 (5), 1118-1125.

III.2. G-quadruplexes au niveau des promoteurs d'oncogènes

Des séquences capables de former des G-quadruplexes (PQS) ont été identifiées dans plus de 40% des promoteurs de gènes⁵⁸ et de plus en plus de preuves laissent penser que ces structures secondaires de l'ADN permettent de réguler l'activité d'un gène. Il n'existe cependant pas de preuve directe de l'existence de telles structures au niveau des promoteurs. Cependant de nombreuses séquences promotrices d'oncogènes ont été identifiées comme étant capables de former des G-quadruplexes *in vitro*. Les principales identifiées chez l'humain sont sur les gènes *c-Myc*, *c-Kit*, *KRAS*, *Bcl-2*, *VEGF*, *Hif-1 α* , *C-MYB*, *PDGF-A*, *PDGFRB*, *RBI*, *hTerT*, *RET*. Elles correspondent à des séquences surexprimées lors de cancer ou bien qui sont mutées. La formation de G-quadruplexes au sein de ces structures a pour conséquence d'inactiver dans la plupart des cas la traduction du gène et c'est pourquoi, de la même façon qu'avec les télomères, ils peuvent être considérés comme des cibles thérapeutiques.

De nombreuses études ont été entreprises sur la séquence promotrice *c-myc*⁵⁹. Ce gène code pour un facteur de transcription dont la surexpression est présente dans 80% des cancers. De nombreux résultats convergent vers le fait que la régulation de ce gène peut faire intervenir des G-quadruplexes (et des i-motifs, *vide infra*, Figure 31). Ainsi deux motifs parallèles de G-quadruplexe et un i-motif ont été identifiés dans la région NHE III₁ (pour « nuclease hypersensitivity element III₁ ») du gène *c-myc*⁶⁰. De plus, deux protéines aux rôles antagonistes ont également été identifiées pour cibler les G-quadruplexes. La protéine NM23H2 semble être une protéine capable de désassembler le motif pour permettre à d'autres complexes protéiques (dont le facteur de transcription Sp1) de stabiliser la partie promotrice du gène sous forme duplexe. Ceci permet alors la traduction du gène par d'autres complexes protéiques (CNBP et HNRNPK) A l'inverse, une autre protéine, la nucléoline stabiliserait le motif G-quadruplexe et faciliterait sa formation. Enfin il a également été montré qu'en présence de ligands stabilisant le G-quadruplexe, l'expression du gène est inhibée⁶¹. D'autres études indiquent que la stabilisation

58 Balasubramanian, S.; Hurley, L. H.; Neidle, S., Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10* (4), 261-275.

59 Brooks, T. A.; Hurley, L. H., Targeting MYC Expression through G-Quadruplexes. *Genes Cancer* **2010**, *1* (6), 641-649.

60 (a) Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Jones, R. A.; Yang, D., Solution Structure of the Biologically Relevant G-Quadruplex Element in the Human c-MYC Promoter. Implications for G-Quadruplex Stabilization†. *Biochemistry (Mosc)* **2005**, *44* (6), 2048-2058; (b) Phan, A. T.; Modi, Y. S.; Patel, D. J., Propeller-Type Parallel-Stranded G-Quadruplexes in the Human c-myc Promoter. *J Am Chem Soc* **2004**, *126* (28), 8710-8716.

61 Siddiqui-Jain, A.; Grand, C. L.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H., Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (18), 11593-11598.

de motif G-quadruplexes permet de réguler l'expression d'oncogène comme avec *K-RAS*⁶² par exemple.

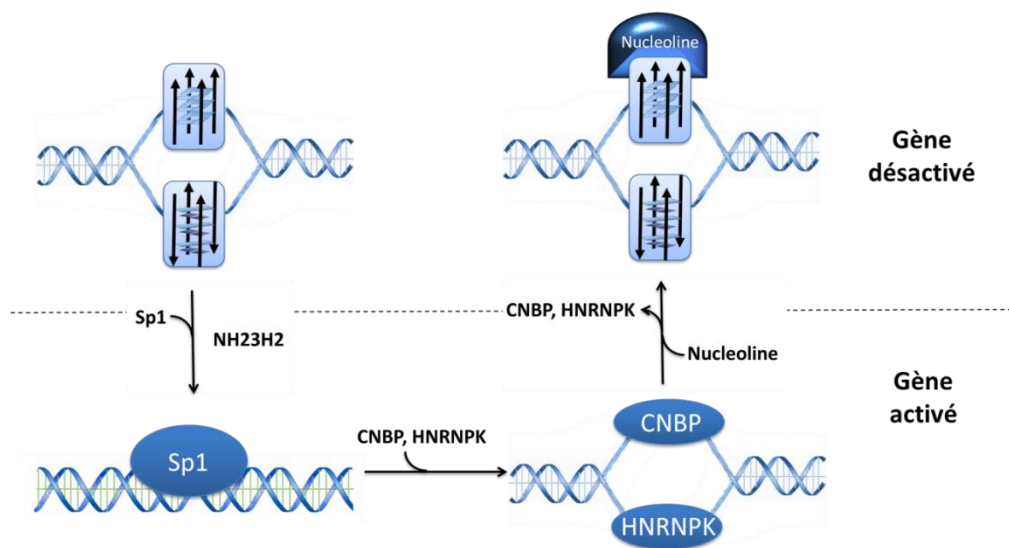


Figure 31 Mode de régulation proposé sur le gène *C-myc* (la présence de *i*-motifs est également suggérée).

Il existe donc un intérêt certain à développer une stratégie anticancéreuse visant à stabiliser ces G-quadruplexes issus des séquences promotrices des oncogènes. De plus, les cibles ici sont beaucoup plus spécifiques car chaque séquence de G-quadruplexe semble unique avec sa propre topologie permettant ainsi d'effectuer un ciblage plus sélectif lors de traitements éventuels (Tableau 1). De plus, dans le cas où les structures ont des topologies similaires, ce sont les boucles qui peuvent induire des différences entre les G-quadruplexes.

62 Cogoi, S.; Paramasivam, M.; Filichev, V.; Géci, I.; Pedersen, E. B.; Xodo, L. E., Identification of a New G-Quadruplex Motif in the KRAS Promoter and Design of Pyrene-Modified G4-Decoys with Antiproliferative Activity in Pancreatic Cancer Cells. *J Med Chem* **2008**, 52 (2), 564-568.

oncogène	Structure	Particularité
<i>C-myc</i>	-ppp	/
<i>C-kit1</i>	-pp	Une guanine présente dans la boucle participe au motif G-quadruplexe
<i>C-kit2</i>	-ppp	Peut également adopter une structure de dimère
<i>KRAS</i>	+pll	/
<i>pRb</i>	-ldl	/
<i>Bcl-2</i>	-pll	/
<i>VEGF-A</i>	-ppp	
<i>hTert</i>	-pll et -ppp	Deux G-quadruplexes en tandem et une boucle de 26 résidus
<i>PDGF-A</i>	-ppp	Présence de quatre tétrades
<i>C-Myc-b</i>	-ppp x2	Uniquement deux tétrades boucles composées d'une seule adénine Trois G-quadruplexes en tandem dont au moins toujours 2 Présence d'heptade avec 3 adénines supplémentaires
<i>Hif-1α</i>	-ppp	
<i>RET</i>	-ppp	Boucles composées uniquement d'un seul résidu T

Tableau 1 Présentation des structures et de certaines particularités de promoteurs d'oncogènes.

III.3. Régulation de la traduction sur les régions 5'UTR et 3'UTR

Ce sont sur les ARN messagers (ARN_m) que les études concernant les G-quadruplexes d'ARN ont été plus approfondies⁶³. Ces structures ont d'ailleurs été principalement recensées au niveau des régions 5'UTR (pour untranslated) et 3'UTR. Plusieurs raisons laissent à penser que des G-quadruplexes peuvent se former de façon préférentielle sur ces ARN. Il a été par exemple remarqué une fréquence plus importante de séquences capables de former des G-quadruplexes à environ 50 paires de bases en amont du codon initiateur d'un gène (Figure 32). Ceci correspond à la position analogue des sites de régulation de transcription des gènes.

63 Huppert, J. L.; Bugaut, A.; Kumari, S.; Balasubramanian, S., G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (19), 6260-6268.

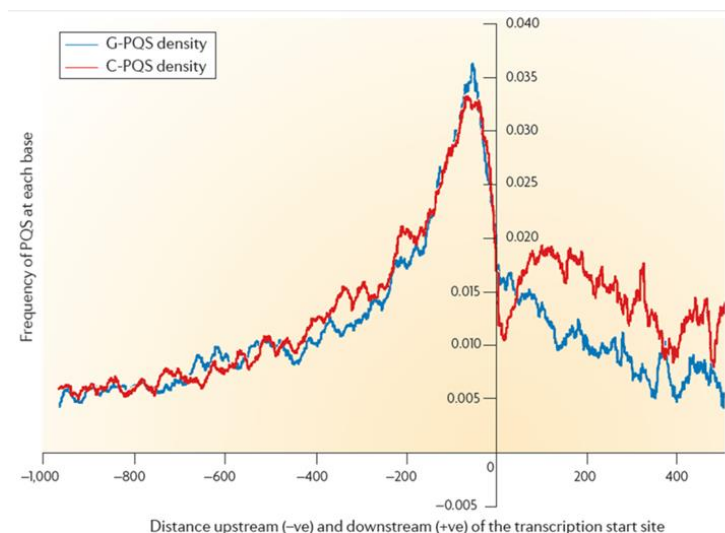


Figure 32 Fréquence des séquences capables de former des G-quadruplexes (G-PQS) ou des i-motifs (C-PQS) selon la position par rapport au codon initiateur d'un gène (figure issue de la référence 63)

De nombreuses études ont également confirmé que la formation de telles structures avait pour effet soit d'inhiber la traduction de l'oligonucléotide, soit de l'enclencher (Figure 33). Il a été montré *in vitro* par l'équipe de Hurley que la stabilisation de la partie 5'UTR en conformation de G-quadruplexe du proto-oncogène *NRAS* inhibe 80% de sa traduction⁶⁴. D'autres études similaires ont été ensuite réalisées en 2008 où l'inhibition du gène *Zic-1* a été effectuée dans une cellule eucaryote avec une réduction de 80% de l'ARN_m formé⁶⁵. Dans les deux cas, il apparaît que la formation du G-quadruplexe empêcherait l'initiation de la traduction en modifiant la structure de des ARN en 5'. Par contre, dans le cas où l'initiation de la traduction se fait par reconnaissance d'une séquence différente de la coiffe (IRES pour « internal ribosomes entry site »), il semblerait que les G4 déclenchent la traduction. Ceci a été observé sur les ARN_m du gène *FGF2*⁶⁶ puis plus récemment sur ceux de *hVEGF*⁶⁷. D'autres ARN_m (dont certains issus de proto-oncogènes) ont été étudiés et recensés et ceci a été répertorié dans le Tableau 2.

64 Kumari, S.; Bugaut, A.; Huppert, J. L.; Balasubramanian, S., An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat Chem Biol* **2007**, *3* (4), 218-221.

65 Arora, A.; Dutkiewicz, M.; Scaria, V.; Hariharan, M.; Maiti, S.; Kurreck, J., Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif. *RNA* **2008**, *14* (7), 1290-1296.

66 Bonnal, S.; Schaeffer, C.; Créancier, L.; Clamens, S.; Moine, H.; Prats, A.-C.; Vagner, S., A Single Internal Ribosome Entry Site Containing a G Quartet RNA Structure Drives Fibroblast Growth Factor 2 Gene Expression at Four Alternative Translation Initiation Codons. *J Biol Chem* **2003**, *278* (41), 39330-39336.

67 Morris, M. J.; Negishi, Y.; Pazsint, C.; Schonhoft, J. D.; Basu, S., An RNA G-Quadruplex Is Essential for Cap-Independent Translation Initiation in Human VEGF IRES. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (50), 17831-17839.

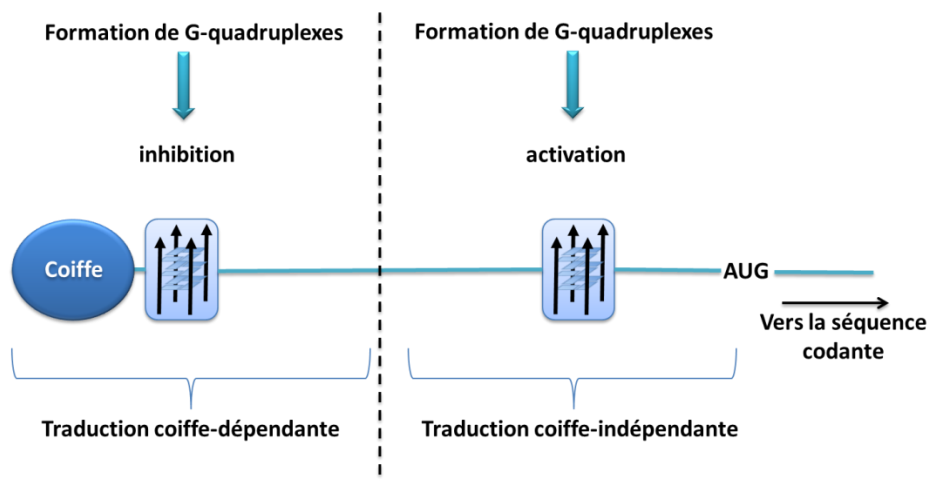


Figure 33 Régulation de la traduction par les G-quadruplexes d'ARN

Type de traduction	Gène	Activité sur l'expression de la protéine
Traduction Coiffe-dépendante	<i>NRAS</i>	Inhibition de 70%
	<i>ZIC1</i>	Inhibition de 80%
	<i>MT3-MMP</i>	Inhibition de 55%
	<i>ERS1</i>	Inhibition de 85%
	<i>EBAG9</i>	Inhibition de 45%
	<i>FZD2</i>	Inhibition de 60%
	<i>BARHL1</i>	Inhibition de 50%
	<i>NCAM2</i>	Inhibition de 35%
	<i>THRA</i>	Inhibition de 35%
	<i>AASDHPPT</i>	Inhibition de 55%
	<i>BCL2</i>	Inhibition de 50%
	<i>TRF2</i>	Inhibition de 65%
<i>ADAM10</i>	Inhibition de 70%	
Traduction Coiffe-indépendantes	<i>FGF-2</i>	Activation de 60%
	<i>VEGF</i>	Activation de 80%

Tableau 2 Expression de protéines suite à la formation de G-quadruplexe sur la partie 5'UTR de leur ARN_m

D'autres études indiquent également qu'il existe de nombreuses protéines capables d'interagir avec les G4 d'ARN. La protéine la plus étudiée parmi celles-ci est vraisemblablement FMRP dont les dérèglements de l'expression sont à l'origine du syndrome de retard mental de l'X fragile⁶⁸. Cette protéine a entre autre pour fonction de conduire l'ARN_m depuis le noyau jusqu'au cytoplasme dans les neurones. La fixation de cette protéine sur les oligonucléotides se ferait par la reconnaissance de motif G-quadruplexes sur les séquences en 5'UTR des oligonucléotides. Des études ont conduit à l'hypothèse qu'elle servirait également, *via* ce mécanisme, de répresseur dans l'expression de certains gènes dont *PP2AC* ou *MAP1B*. Une trop forte expression de ces gènes serait en partie une des causes d'un mauvais développement des synapses pendant la période néonatale⁶⁹.

68 Melko, M.; Bardoni, B., The role of G-quadruplex in RNA metabolism: Involvement of FMRP and FMR2P. *Biochimie* **2010**, 92 (8), 919-926.

69 Wang, T.; Bray, S. M.; Warren, S. T., New perspectives on the biology of fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev* **2012**, 22 (3), 256-263.

Des régions 3'UTR de l'ARN_m sont également capables de former des G-quadruplexes. Des séquences ont ainsi été identifiées sur les ARN_m tels que celui de STAT3⁷⁰. Il est proposé que, positionnées à cet endroit, les G4 contribuent à induire la fin de la traduction. Par exemple, dans une étude sur l'ARN_m de KiSS1, une protéine qui intervient dans la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus, L. Huijbregts et *al.* ont étudié l'influence du polymorphisme d'une séquence située à 65 nucléotides en aval du codon stop du gène⁷¹. Il apparaît que selon la séquence du G-quadruplexe et la topologie qu'il adopte, l'expression du gène varie. Une autre étude récente a montré que le motif G-quadruplexe en 3'UTR d'ARN_m est impliqué dans le déplacement de ce dernier au niveau du neurone⁷².

III.4. Autres implications biologiques potentielles des G-quadruplexes

Cette section va présenter d'autres implications des G-quadruplexes et leur rôle potentiel en tant que cible thérapeutique. Toutefois, les recherches concernant ces stratégies étant moins avancées, elles ne seront présentées que brièvement.

4a. Minisatellites

Les minisatellites sont la répétition en tandem d'un motif long d'une dizaine à une centaine de paires de bases. Leur longueur peut varier de 500 à 15000 paires de bases et il est de plus en plus envisagé qu'ils posséderaient des fonctions biologiques. Ils sont présents chez les procaryotes et chez les eucaryotes et représentent à eux seuls près de 10% du génome humain. Certaines de ces séquences sont capables de former *in vitro* des G-quadruplexes⁷³. C'est sur le minisatellite de la région ILPR (Insulin-Linked Polymorphic Region) que les études sont les plus avancées⁷⁴. Il est situé 363 bases en amont de gène de l'insuline. Quatorze séquences différentes ont été identifiées sur cette région (de a jusqu'à n). Ces séquences sont répétées de 40 à 160 fois chez un individu sain. Par contre un nombre de répétition moins important de ces séquences semble corrélé avec le développement d'un diabète de type I. Du fait que certaines séquences aient été identifiées comme étant capables de former des G-quadruplexes et qu'il apparaît que l'insuline possède une affinité

70 Lin, S.; Li, S.; Chen, Z.; He, X.; Zhang, Y.; Xu, X.; Xu, M.; Yuan, G., Formation, recognition and bioactivities of a novel G-quadruplex in the STAT3 gene. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21* (19), 5987-5991.

71 Huijbregts, L.; Roze, C.; Bonafe, G.; Houang, M.; Le Bouc, Y.; Carel, J.-C.; Leger, J.; Alberti, P.; de Roux, N., DNA polymorphisms of the KiSS1 3' Untranslated region interfere with the folding of a G-rich sequence into G-quadruplex. *Mol Cell Endocrinol* **2012**, *351* (2), 239-248.

72 Subramanian, M.; Rage, F.; Tabet, R.; Flatter, E.; Mandel, J.-L.; Moine, H., G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Rep* **2011**, *12* (7), 697-704.

73 (a) Amrane, S.; Adrian, M.; Heddi, B.; Serero, A.; Nicolas, A.; Mergny, J.-L.; Phan, A. T., Formation of Pearl-Necklace Monomeric G-Quadruplexes in the Human CEB25 Minisatellite. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (13), 5807-5816; (b) Ribeyre, C.; Lopes, J.; Boulé, J.-B.; Piazza, A.; Guédin, A.; Zakian, V. A.; Mergny, J.-L.; Nicolas, A., The Yeast Pif1 Helicase Prevents Genomic Instability Caused by G-Quadruplex-Forming CEB1 Sequences In Vivo. *PLoS Genet* **2009**, *5* (5), e1000475.

74 Schonhoft, J. D.; Das, A.; Achamyelah, F.; Samdani, S.; Sewell, A.; Mao, H.; Basu, S., ILPR repeats adopt diverse G-quadruplex conformations that determine insulin binding. *Biopolymers* **2010**, *93* (1), 21-31.

pour les G-quadruplexes, il se peut qu'il existe un contrôle de l'activité du gène par cette dernière *via* la formation de G-quadruplexes.

4b. *TERRA*

Récemment des expériences ont permis de détecter dans les cellules humaines, des brins d'ARN d'environ 100 à 9000 nucléotides⁷⁵. Ces derniers ont pour séquence (UAAGGG) et résulteraient de la transcription par l'ARN polymérase II de la partie riche en cytosine des télomères. Il semblerait que ces structures contribuent à réguler l'activité de la télomérase et soient impliquées dans le réarrangement de la chromatine⁷⁶. Il a été montré *in vitro* que ces séquences étaient capables de former des G-quadruplexes parallèles arrangés entre eux sous forme de tandem. Toutefois le rôle précis de cet ARN simple brin reste encore à élucider. Néanmoins il semblerait que cet ARN soit capable de former des structures hybrides avec l'ADN télomérique et de ce fait, il est proposé qu'il puisse servir de protection des séquences simples brins télomériques en les prolongeant (Figure 34).

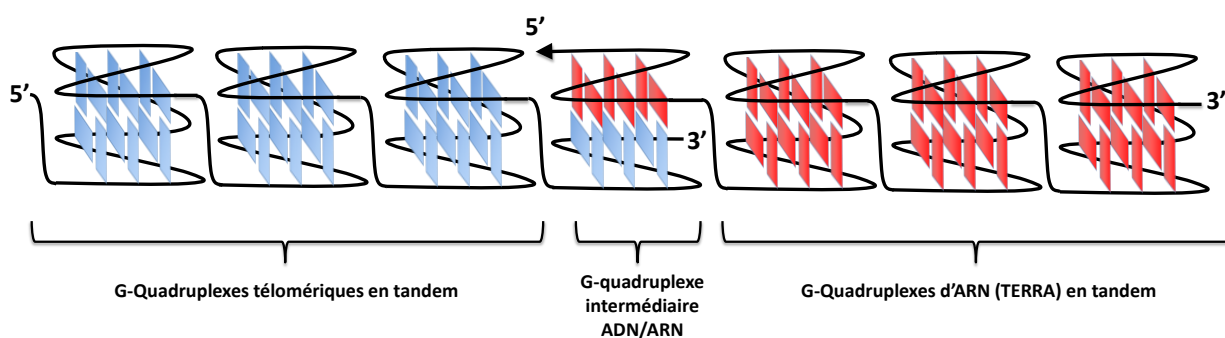


Figure 34 Prolongation des télomères par une séquence *TERRA*

4c. Protéines reconnaissant les G-quadruplexes

L'ADN sous forme de quadruplexe semble avoir un rôle dans différentes maladies génétiques telles que l'anémie Fanconi de groupe J, le syndrome de Werner ou bien encore le syndrome de Bloom⁷⁷. Chacune de ces maladies résulte de mutations des gènes *FANC-J*, *RecQ WRN* ou *RecQ BLM* qui codent les séquences d'hélicases capables de déstructurer les G-quadruplexes. Dans le cas de l'anémie Fanconie de type J, il a par exemple été observé que 75% des délétions sur le génome, formées à cause de la maladie, se font au niveau de régions du

75 Azzalin, C. M.; Reichenbach, P.; Khoraiuli, L.; Giulotto, E.; Lingner, J., Telomeric Repeat-Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science* **2007**, *318* (5851), 798-801.

76 Xu, Y.; Komiyama, M., Structure, function and targeting of human telomere RNA. *Methods* **2012**, *57* (1), 100-105.

77 (a) Li, J.-L.; Harrison, R. J.; Reszka, A. P.; Brosh, R. M.; Bohr, V. A.; Neidle, S.; Hickson, I. D., Inhibition of the Bloom's and Werner's Syndrome Helicases by G-Quadruplex Interacting Ligands†. *Biochemistry (Mosc)* **2001**, *40* (50), 15194-15202; (b) Sissi, C.; Gatto, B.; Palumbo, M., The evolving world of protein-G-quadruplex recognition: A medicinal chemist's perspective. *Biochimie* **2011**, *93* (8), 1219-1230.

génomique capables de former des G-quadruplexes. De même, dans le cas des autres maladies, il a été observé que la protéine RecQ, issue de l'expression des deux autres gènes mutés, est incapable de déstructurer les G-quadruplexes alors que la version non mutée l'est.

III.5. Implication du i-motif en tant que cible thérapeutique.

Bien que l'existence *in vivo* du i-motif soit encore controversée, il apparaît que des séquences d'ADN issues des différentes régions du génome sont également capables de former de telles structures *in vitro*. Ainsi des séquences capables de former un i-motif ont été identifiées dans différents emplacements cellulaires. Au niveau des télomères, il a par exemple été montré que le télomère sous forme de double hélice était capable de former sous haute température ou en milieu acide un i-motif⁷⁸. Il se retrouve également dans d'autres régions répétées comme sur les séquences ILPR⁷⁹ ou bien encore au niveau du centrosome⁸⁰. C'est en revanche au niveau des promoteurs de gène que les études ont été le plus avancées⁸¹. Plus de 40% de ces séquences seraient capables de former un i-motif. Des séquences aptes à former de telles structures ont par exemple été retrouvées sur les séquences promotrices des oncogènes *C-Myc*, *Bcl-2*, *VEGF*, *RET*, *Rb* avec des séquences présentant soit de longues boucles de 6 à 8 nucléotides (pour les deux premiers) soit plus courtes, de 2 à 4 (pour les trois derniers).

Il a été montré que les G-quadruplexes, voire les i-motifs, étaient impliqués dans différents mécanismes cellulaires et que leur formation peut être utilisée dans un but thérapeutique, notamment dans le cadre de la lutte contre le cancer. C'est pourquoi de nombreuses équipes développent des ligands capables de stabiliser ces structures ou même d'induire leur formation.

78 Phan, A. T.; Mergny, J. L., Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30* (21), 4618-4625.

79 Dhakal, S.; Schonhoft, J. D.; Koirala, D.; Yu, Z.; Basu, S.; Mao, H., Coexistence of an ILPR i-Motif and a Partially Folded Structure with Comparable Mechanical Stability Revealed at the Single-Molecule Level. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (26), 8991-8997.

80 Gallego, J.; Chou, S.-H.; Reid, B. R., Centromeric pyrimidine strands fold into an intercalated motif by forming a double hairpin with a Novel T:G:G:T tetrad: solution structure of the d(TCCCGTTTCCA) dimer. *J Mol Biol* **1997**, *273* (4), 840-856.

81 Brooks, T. A.; Kendrick, S.; Hurley, L., Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters. *FEBS J* **2010**, *277* (17), 3459-3469.

IV. Développement de ligands visant les quadruplexes

Obtenir un ligands de G-quadruplexes nécessite de répondre à plusieurs conditions. La première est bien évidemment la spécificité du ligand pour la structure G-quadruplexe. Actuellement de nombreux ligands ont été développés et l'affinité de certains peut atteindre le nanomolaire. Une autre condition absolument nécessaire pour obtenir un bon ligands de G-quadruplexes est la nécessité d'obtenir une très forte sélectivité pour le G-quadruplexe par rapport aux autres structures secondaires de l'ADN et notamment les duplexes. En effet la proportion de séquences capable de former des G4 étant minoritaire dans l'ensemble du génome, un ligand ne possédant que peu de sélectivité ne présenterait que peu d'intérêt. Enfin face au nombre de fonctions potentielles assurées par ces structures, il est préférable de rechercher des ligands spécifiques d'une seule topologie de G-quadruplexe afin d'être le plus sélectif possible. Ceci s'illustre particulièrement dans le cas des promoteurs de gènes.

Parce que la télomérase a été impliquée dans les premières stratégies utilisant les G-quadruplexes, il est encore aujourd'hui classique d'évaluer un ligand par sa capacité à inhiber cette dernière. Ceci peut être effectué par des tests de TRAP assay⁸² ou plus récemment de TRAP-LIG assay⁸³. Ces deux tests permettent d'évaluer la longueur du brin télomérique après plusieurs cycles d'amplification par PCR en présence de l'enzyme. Ainsi une valeur, appelée TRAP IC₅₀, est obtenue qui représente la concentration nécessaire en ligand pour obtenir une diminution de 50% de l'activité de la télomérase.

Il est également important de connaître le mode d'interaction d'un ligand avec le G-quadruplexe. De façon générale, il en existe trois types, à savoir par empilement direct sur la tétrade (« π -stacking »), avec les sillons ou bien encore avec les boucles présentes sur la structure (Figure 35). Cependant de plus en plus de ligands sont conçus pour interagir avec plusieurs de ces éléments afin d'accroître la spécificité pour une seule topologie de G-quadruplexe. Les paragraphes suivants sont une présentation non-exhaustive des différentes familles de ligands et des principales molécules ayant montré un certain intérêt⁸⁴.

82 Fajkus, J., Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clin Chim Acta* **2006**, 371 (1–2), 25-31.

83 Reed, J.; Gunaratnam, M.; Beltran, M.; Reszka, A. P.; Vilar, R.; Neidle, S., TRAP-LIG, a modified telomere repeat amplification protocol assay to quantitate telomerase inhibition by small molecules. *Anal Biochem* **2008**, 380 (1), 99-105.

(c) Ou, T.-M.; Lu, Y.-J.; Tan, J.-H.; Huang, Z.-S.; Wong, K.-Y.; Gu, L.-Q., G-Quadruplexes: Targets in Anticancer Drug Design. *ChemMedChem* **2008**, 3 (5), 690-713; 84 Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P., A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org Biomol Chem* **2008**, 6 (4), 627-636.

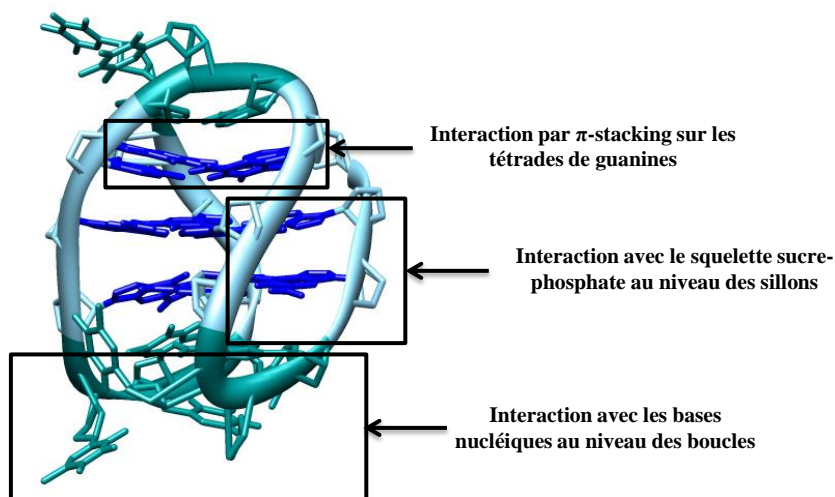


Figure 35 Modes d'interactions de ligands sur un G-quadruplexe.

IV.1. Ligands non macrocycliques interagissant sur la tétrade

Un grand nombre de ligands synthétisés pour cibler le G-quadruplexe possèdent une architecture commune formée d'un corps aromatique capable d'interagir par « π -stacking » sur les tétrades de guanines, fonctionnalisé ou non par des bras chargés positivement pour d'interagir avec les sillons du quadruplexe. La présence de ces fonctions hydrophiles sur les bras du corps aromatique permet également d'augmenter la solubilité des molécules dans l'eau. Sur ce principe, les premiers ligands de G-quadruplexe, de type anthraquinones, ont été développées par l'équipe de S. Neidle (Figure 36). Cependant, du fait de la toxicité de cette famille de molécule, d'autres familles ont été étudiées. Plus récemment, d'autres anthraquinones ont tout de même été développées par l'équipe de F.-C. Huang dont certaines ont été identifiées comme inhibant la télomérase ou l'activité de *h-Tert*⁸⁵.

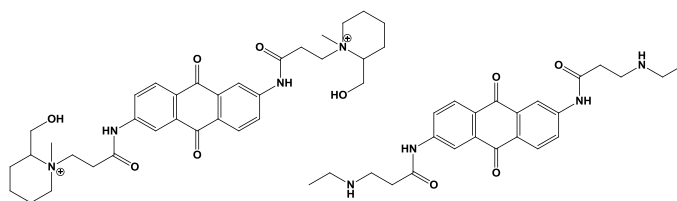


Figure 36 Structures d'anthraquinones ligands de G-quadruplexes.

Par la suite, l'équipe de S. Neidle a orienté ses recherches vers des molécules possédant un corps aromatique de type acridine telle que BSU6039⁸⁶(Figure 37A). Ces molécules présentent

85 Huang, H.-S.; Huang, K.-F.; Li, C.-L.; Huang, Y.-Y.; Chiang, Y.-H.; Huang, F.-C.; Lin, J.-J., Synthesis, human telomerase inhibition and anti-proliferative studies of a series of 2,7-bis-substituted amido-anthraquinone derivatives. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16* (14), 6976-6986.

86 Read, M. A.; Wood, A. A.; Harrison, J. R.; Gowan, S. M.; Kelland, L. R.; Dosanjh, H. S.; Neidle, S., Molecular Modeling Studies on G-Quadruplex Complexes of Telomerase Inhibitors: Structure-Activity Relationships. *J Med Chem* **1999**, *42* (22), 4538-4546.

une affinité de l'ordre du micromolaire pour le G-quadruplexe. Une autre molécule BRACO-19 (Figure 37B)⁸⁷ a été identifiée comme ligands de G-quadruplexes. Celle-ci sert aujourd'hui classiquement de référence lors d'études d'interaction. Sa particularité est de posséder trois fonctions amines reliées sur un corps aromatique pour interagir avec les sillons du G-quadruplexe. BRACO-19 possède une TRAP IC₅₀ de 115nM. De plus cette molécule est sélective des G-quadruplexes (31 fois) par rapport au duplexe. Son action a notamment permis d'inhiber l'expression de *hTert*⁸⁸ ou d'induire la sénescence chez des cellules⁸⁹. Un autre dérivé d'acridine, la RHPS4 (Figure 37C), est souvent cité comme ligand type de G-quadruplexe⁹⁰. Cette molécule, développée par l'équipe de S. Stevens, possède une TRAP IC₅₀ de 330nm. Elle a également été testée *in vivo*⁹¹.

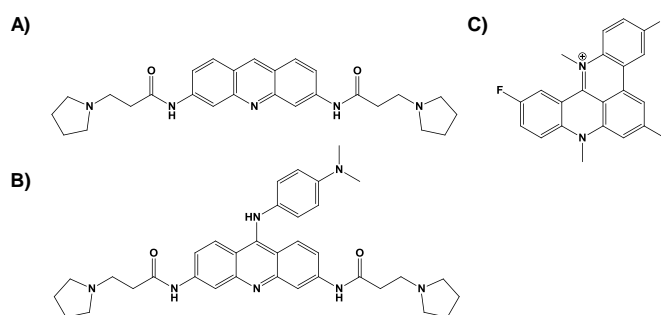


Figure 37 Structures chimiques de BSU 6039 (A), de Braco-19 (B) et de RHPS4 (C)

Sur le modèle d'une molécule tricyclique présentant des bras chargés, d'autres molécules ont été développées tels que des isoalloxazines trisubstituées (Figure 38A) qui ont été identifiées comme inhibiteur de l'expression de *c-kit*⁹². De même, des anthracènes (Figure 38B), sur ce même modèle de structure, sont capables d'induire des disfonctionnements des télomères. Des phénanthrolines ont également été développée telles que le Phen-DC₃ (Figure 38C) qui montre

87 Harrison, R. J.; Cuesta, J.; Chessari, G.; Read, M. A.; Basra, S. K.; Reszka, A. P.; Morrell, J.; Gowan, S. M.; Incles, C. M.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S., Trisubstituted Acridine Derivatives as Potent and Selective Telomerase Inhibitors. *J Med Chem* **2003**, *46* (21), 4463-4476.

88 Burger, A. M.; Dai, F.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J.; Double, J. A.; Neidle, S., The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function. *Cancer Res* **2005**, *65* (4), 1489-1496.

89 Collie, G.; Reszka, A. P.; Haider, S. M.; Gabelica, V.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Selectivity in small molecule binding to human telomeric RNA and DNA quadruplexes. *Chem Commun* **2009**, (48), 7482-7484.

90 Stanslas, J.; Hagan, D. J.; Ellis, M. J.; Turner, C.; Carmichael, J.; Ward, W.; Hammonds, T. R.; Stevens, M. F. G., Antitumor Polycyclic Acridines. 7.1 Synthesis and Biological Properties of DNA Affinic Tetra- and Pentacyclic Acridines. *J Med Chem* **2000**, *43* (8), 1563-1572.

91 (a) Phatak, P.; Cookson, J. C.; Dai, F.; Smith, V.; Gartenhaus, R. B.; Stevens, M. F. G.; Burger, A. M., Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth in vitro and in vivo consistent with a cancer stem cell targeting mechanism. *Br J Cancer* **2007**, *96* (8), 1223-1233; (b) Salvati, E.; Scarsella, M.; Porru, M.; Rizzo, A.; Iachettini, S.; Tentori, L.; Graziani, G.; D'Incalci, M.; Stevens, M. F. G.; Orlandi, A.; Passeri, D.; Gilson, E.; Zupi, G.; Leonetti, C.; Biroccio, A., PARP1 is activated at telomeres upon G4 stabilization: possible target for telomere-based therapy. *Oncogene* **2010**, *29* (47), 6280-6293.

92 Bejugam, M.; Sewitz, S.; Shirude, P. S.; Rodriguez, R.; Shahid, R.; Balasubramanian, S., Trisubstituted Isoalloxazines as a New Class of G-Quadruplex Binding Ligands: Small Molecule Regulation of c-kit Oncogene Expression. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (43), 12926-12927.

une TRAP-IC₅₀ de l'ordre du nanomolaire et une très bonne sélectivité pour le G-quadruplexe, cette activité pouvant être due à la présence des bras quinolinium sur le cycle central⁹³.

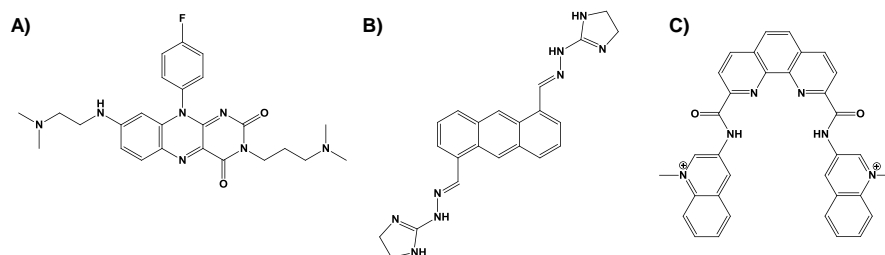


Figure 38 Structures chimiques de ligands de type isoalloxaline (A,) anthracènes(B) et de la phénanthroline Phen-DC₃ (C)

L'utilisation de fonctions bisquinoliniums se retrouve dans une autre famille de ligands qui présente cette fois-ci un corps aromatique de type pyridocarboxamide. Le ligand le plus connu de cette famille est le ligand 360A (Figure 39A). Ce ligand possède une TRAP IC₅₀ de 300nM et reste très sélectif pour les G-quadruplexes (150 fois par rapport au duplexe). Un autre dérivé de cette famille, la pyridostatine⁹⁴ (Figure 39B) présentée précédemment, est capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses et d'induire des dommages sur les télomères. Ce ligand, quoique très sélectif du motif G-quadruplexe, ne présente par contre que peu de sélectivité par rapport aux différentes topologies des G-quadruplexes. Dans d'autres cas, un corps mono ou bicyclique avec des bras aromatiques plus importants peut également être utilisé. Par exemple le ligand 12459 (Figure 39C) est composé de deux bras quinolinium mais reliés cette fois-ci à une triazine⁹⁵. Il possède une TRAP IC₅₀ intéressante de 130nM et il est capable d'induire la sénescence chez certaines lignées de cellules cancéreuses. Il faut noter que ce type d'architecture est caractéristique de complexes métalliques et certains ont été testés en tant que ligands de G-quadruplexes. Ceci sera développé lors du chapitre 1.

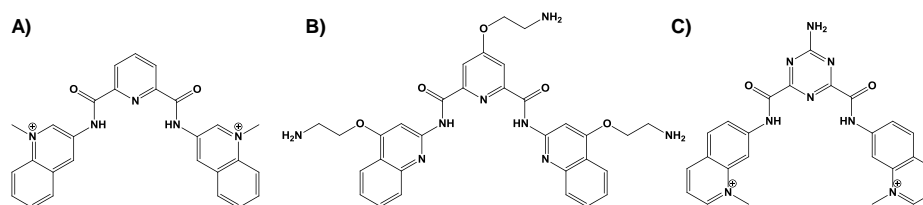


Figure 39 Structures chimiques des ligands 360A (A), de la pyridostatine (B) et 12459 (C)

93 (a) De Cian, A.; DeLemos, E.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Monchaud, D., Highly Efficient G-Quadruplex Recognition by Bisquinolinium Compounds. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (7), 1856-1857; (b) De Cian, A.; Cristofari, G.; Reichenbach, P.; De Lemos, E.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P.; Shin-ya, K.; Lacroix, L.; Lingner, J.; Mergny, J.-L., Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (44), 17347-17352.

94 Rodriguez, R. I.; Müller, S.; Yeoman, J. A.; Trentesaux, C.; Riou, J.-F. o.; Balasubramanian, S., A Novel Small Molecule That Alters Shelterin Integrity and Triggers a DNA-Damage Response at Telomeres. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (47), 15758-15759.

95 Riou, J. F.; Guittat, L.; Mailliet, P.; Laoui, A.; Renou, E.; Petitgenet, O.; Mégnin-Chanet, F.; Hélène, C.; Mergny, J. L., Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (5), 2672-2677.

A l'opposé des molécules précédentes, des plates-formes polycycliques ont également été testées. En effet, l'enrichissement en électron délocalisable sur la structure devrait faciliter les interactions par empilement. Néanmoins cela réduit également leur solubilité. Ceci peut s'illustrer à travers l'exemple de dérivés perylènes, peu solubles dans l'eau. Le PIPER et le DAPER (Figure 40A et B) montrent une bonne sélectivité pour le G-quadruplexe (jusqu'à 42 fois sous forme agrégée à pH légèrement basique)⁹⁶. Toutefois leur TRAP IC₅₀ est moyenne, de l'ordre de 20µM. D'autres travaux ont été réalisés sur des ligands avec un noyau de type coronène (Figure 40C) et ont permis d'obtenir des résultats similaires⁹⁷.

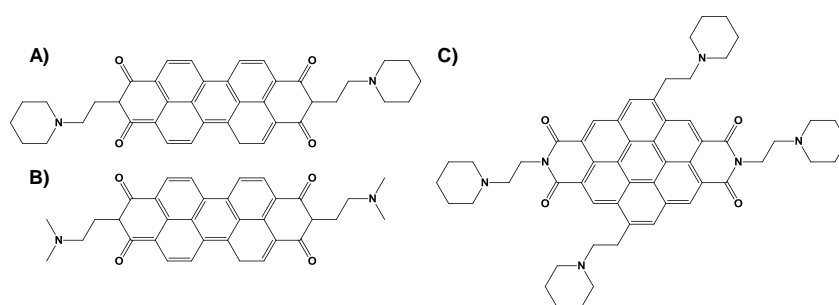


Figure 40 Structure chimiques des molécules DAPER (A), PIPER (B) et CORON (C)

Une molécule dérivée d'une famille de fluoroquinolones, la quarfloxine ou CX-3543 (Figure 41B) a été récemment optimisée pour interagir avec les G-quadruplexes⁹⁸. Il s'agit actuellement du seul ligand à être passé en phase clinique II pour le traitement de tumeurs neuroendocrines ou carcinoïdes. Son action consiste à empêcher l'interaction de la nucléoline sur le G-quadruplexe. Cette molécule a également été identifiée comme étant spécifique des motifs parallèles. D'autres dérivés de la famille des quindolines se sont avérés posséder de bonnes affinité pour les G-quadruplexes pouvant aller jusqu'à 440nM. Par exemple le ligand SYUIQ-5 (Figure 41A) a été identifié comme capable inhiber l'activité de *c-myc* dans des lignées issue de leucémie⁹⁹.

96 (a) Franceschin, M.; Pascucci, E.; Alvino, A.; D'Ambrosio, D.; Bianco, A.; Ortaggi, G.; Savino, M., New highly hydrosoluble and not self-aggregated perylene derivatives with three and four polar side-chains as G-quadruplex telomere targeting agents and telomerase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17* (9), 2515-2522; (b) Han, H.; Cliff, C. L.; Hurley, L. H., Accelerated Assembly of G-Quadruplex Structures by a Small Molecule†. *Biochemistry (Mosc)* **1999**, *38* (22), 6981-6986.

97 Franceschin, M.; Alvino, A.; Casagrande, V.; Mauriello, C.; Pascucci, E.; Savino, M.; Ortaggi, G.; Bianco, A., Specific interactions with intra- and intermolecular G-quadruplex DNA structures by hydrosoluble coronene derivatives: A new class of telomerase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15* (4), 1848-1858.

98 Drygin, D.; Siddiqui-Jain, A.; O'Brien, S.; Schwaebe, M.; Lin, A.; Bliesath, J.; Ho, C. B.; Proffitt, C.; Trent, K.; Whitten, J. P.; Lim, J. K. C.; Von Hoff, D.; Anderes, K.; Rice, W. G., Anticancer Activity of CX-3543: A Direct Inhibitor of rRNA Biogenesis. *Cancer Res* **2009**, *69* (19), 7653-7661.

99 (a) Liu, J. N.; Deng, R.; Guo, J. F.; Zhou, J. M.; Feng, G. K.; Huang, Z. S.; Gu, L. Q.; Zeng, Y. X.; Zhu, X. F., Inhibition of myc promoter and telomerase activity and induction of delayed apoptosis by SYUIQ-5, a novel G-quadruplex interactive agent in leukemia cells. *Leukemia* **2007**, *21* (6), 1300-1302; (b) Zhou, J. M.; Zhu, X. F.; Lu, Y. J.; Deng, R.; Huang, Z. S.; Mei, Y. P.; Wang, Y.; Huang, W. L.; Liu, Z. C.; Gu, L. Q.; Zeng, Y. X., Senescence and telomere shortening induced by novel potent G-quadruplex interactive agents, quindoline derivatives, in human cancer cell lines. *Oncogene* **2005**, *25* (4), 503-511.

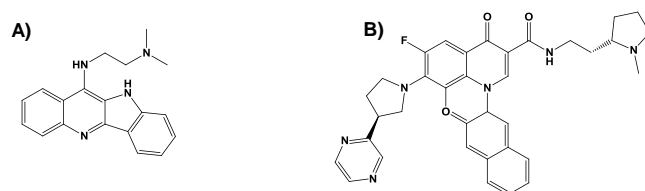


Figure 41 Structures chimiques des molécules SYUIQ-5 (A) et quarfloxine (B)

Comme les quindolines, la famille des quinacridines a également été développée dans le cadre de la stratégie de stabilisation des G-quadruplexes¹⁰⁰. Par exemple la molécule MMQ₃ (Figure 42A) a été recensée comme pouvant inhiber l'activité de la télomérase avec une TRAP IC₅₀ de 28nM. Ces molécules semblent capables d'interagir directement sur la tétrade par « end-stacking » avec ses chaînes latérales qui se positionnent dans les sillons. Dans le but d'améliorer ces affinités, une molécule plus complexe, macrocyclique, composée de deux quinacridines reliées entre elles, a été synthétisée¹⁰¹. Cette molécule, la BOQ₁ (Figure 42B), présente une TRAP IC₅₀ de 130nM. Ce ligand, tout comme son homologue acridine dont l'affinité est moins importante, est très sélectif des G-quadruplexes par rapport aux composés ne possédant qu'une seule unité polycyclique. D'autres composés macrocycliques ont été développés et vont être présentés dans la partie suivante.

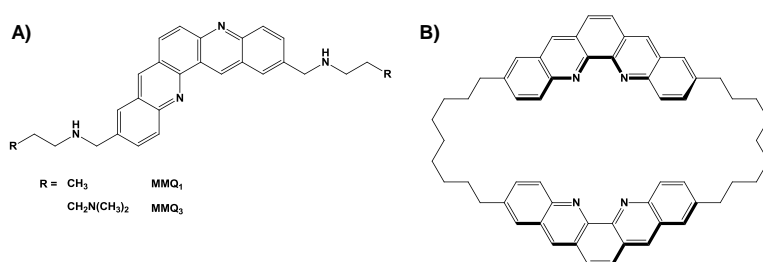


Figure 42 Structures chimiques des molécules MMQ (A) et BOQ₁(B)

IV.2. Macrocyclus ligands de G-quadruplexes

Dans le but d'interagir avec les tétrades de guanines, de nombreux ligands de type macrocyclique ont été développés. Deux familles de ligands peuvent être répertoriées, dérivées des deux ligands de référence utilisés, à savoir la TMPyP4 et la télomestatine¹⁰². Ces ligands

100 (a) Hounsou, C.; Guittat, L.; Monchaud, D.; Jourdan, M.; Saettel, N.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P., G-Quadruplex Recognition by Quinacridines: a SAR, NMR, and Biological Study. *ChemMedChem* **2007**, *2* (5), 655-666; (b) Mergny, J.-L.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Hounsou, C.; Guittat, L.; Hoarau, M.; Arimondo, P. B.; Vigneron, J.-P.; Lehn, J.-M.; Riou, J.-F.; Garestier, T.; Hélène, C., Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (6), 3062-3067.

101 Teulade-Fichou, M.-P.; Carrasco, C.; Guittat, L.; Bailly, C.; Alberti, P.; Mergny, J.-L.; David, A.; Lehn, J.-M.; Wilson, W. D., Selective Recognition of G-Quadruplex Telomeric DNA by a Bis(quinacridine) Macrocyclic. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (16), 4732-4740.

102 Monchaud, D.; Granzhan, A.; Saettel, N.; Gu; #233; din, A.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P., "One Ring to Bind Them All" Part I: The Efficiency of the Macrocyclic Scaffold for G-Quadruplex DNA Recognition. *J Nucleic Acids* **2010**, *2010*.

interagissent classiquement par empilement sur l'une des tétrades externe du G-quadruplexe (« end-stacking »).

La première famille est dérivée de la *meso*-tetrakis(4-N-méthylpyridiniumyl)-porphyrine ou TMPyP4 (Figure 43A). C'est l'une des premières molécules à avoir été testée en tant que ligands de G-quadruplexes sur la séquence télomérique humaine. Ses propriétés ont été mises en évidence par l'équipe de L. Hurley en 1998¹⁰³. Toutefois beaucoup d'interrogations subsistent sur son mode d'interaction avec les quadruplexes¹⁰⁴. Il semblerait que la principale interaction se fasse par empilement et qu'ensuite la molécule reconnaîtrait les sillons du G-quadruplexe. Les différentes études effectuées s'accordent sur le fait que cette porphyrine possède une affinité pour les G-quadruplexe de l'ordre du μM . Cependant, ce ligand n'est pas sélectif par rapport au duplexe.

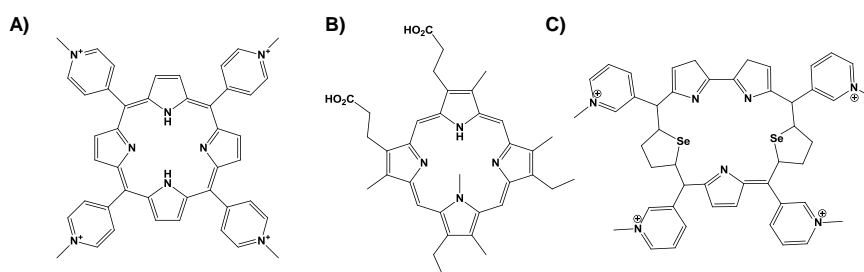


Figure 43 Structures chimiques de la TMPyP4(A) de la NMM (B) et de la Se2SAP(C).

Suite aux travaux de Hurley, d'autres macrocycles aux structures proches de la TMPyP4 ont été testées telles que la NMM (Figure 43B)¹⁰⁵ et la Se2SAP (Figure 43C)¹⁰⁶. La première est une porphyrine dont la particularité est de ne présenter aucune charge positive. Si ceci lui permet d'être beaucoup plus sélectif pour le G-quadruplexe, il en résulte par contre une perte d'affinité importante. A l'inverse, la Se2SAP conserve les groupes 4-méthyl-pyridinium de la TMPyP4 (chargés positivement) mais sa structure varie sur la partie aromatique avec l'ajout d'un cycle supplémentaire et de sélénium sur la structure. Cette molécule est beaucoup plus sélective pour la structure G-quadruplexe que pour l'ADN duplex (50 fois). Il semblerait qu'elle soit également capable d'être sélective pour certains types de G-quadruplexe comme *c-myc*. D'autres structures de type porphyrazine, phtalocyanine ou corole ont également été développés mais ces molécules

103 Wheelhouse, R. T.; Sun, D.; Han, H.; Han, F. X.; Hurley, L. H., Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine with Quadruplex DNA. *J Am Chem Soc* **1998**, *120* (13), 3261-3262.

104 Martino, L.; Pagano, B.; Fotticchia, I.; Neidle, S.; Giancola, C., Shedding Light on the Interaction between TMPyP4 and Human Telomeric Quadruplexes. *J Phys Chem B* **2009**, *113* (44), 14779-14786.

105 Ren, J.; Chaires, J. B., Sequence and Structural Selectivity of Nucleic Acid Binding Ligands†. *Biochemistry (Mosc)* **1999**, *38* (49), 16067-16075.

106 Seenisamy, J.; Bashyam, S.; Gokhale, V.; Vankayalapati, H.; Sun, D.; Siddiqui-Jain, A.; Streiner, N.; Shin-ya, K.; White, E.; Wilson, W. D.; Hurley, L. H., Design and Synthesis of an Expanded Porphyrin That Has Selectivity for the *c-MYC* G-Quadruplex Structure. *J Am Chem Soc* **2005**, *127* (9), 2944-2959.

étant fréquemment fonctionnalisées par des métaux, leurs propriétés seront décrites ultérieurement (chapitre 1).

La seconde famille de macrocycle tend à se rapprocher de la structure de la télomestatine (Figure 44A)¹⁰⁷. Ce ligand naturel est issu du champignon *Streptomyces anulatus* 3533-SV4. Ligand sélectif pour les G-quadruplexes (70 fois par rapport au duplexe), il possède une IC₅₀ de 58nM et est capable d'inhiber l'activité de la télomérase *in vitro* à une concentration de 5nM. C'est pourquoi il sert de référence en tant que ligands de G-quadruplexes. Cependant sa structure et sa synthèse sont complexes, rendant son exploitation thérapeutique difficile. De ce fait des structures dérivées ont été synthétisées. Ce sont principalement des macrocycles comportant deux motifs trioxazoles symétriques associés entre eux par des acides aminés tel que la valine pour le ligand HXDV (Figure 44B)¹⁰⁸ ou bien la serine pour S2T1-6OTD (Figure 44C)¹⁰⁹. HXDV possède une forme similaire à celle de la télomestatine ce qui lui confère des propriétés assez similaires bien que l'affinité de cette molécule soit plus faible. Elle a une IC₅₀ de l'ordre du micromolaire, obtenue lors de l'étude sur la prolifération de nombreux cancer. Dans le cas de S2T1-6OTD, il faut remarquer qu'une des sérines est protégée par un groupement *tert*-butyldimethylsilyle. Sa sélectivité est supérieure à celle de la télomestatine et il a par exemple été observé qu'elle pouvait réguler l'expression de *c-myc* et *h-Tert* dans des médulloblastome chez l'enfant.

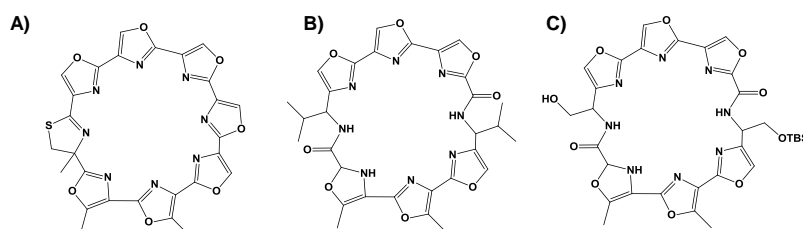


Figure 44 Structures chimiques de la Télomestatine (A) de HXDV (B) et de S2T1-6OTD (C)

On retrouve également d'autres dérivés macrocycliques aux structures plus éloignées qui se sont avérés être des ligands intéressants, tels que des trisoxazoles¹¹⁰, des trisfuranes¹¹¹ ou des

107 (a) Kim, M.-Y.; Vankayalapati, H.; Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Hurley, L. H., Telomestatin, a Potent Telomerase Inhibitor That Interacts Quite Specifically with the Human Telomeric Intramolecular G-Quadruplex. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (10), 2098-2099; (b) Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Matsuo, K.-i.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H., Telomestatin, a Novel Telomerase Inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J Am Chem Soc* **2001**, *123* (6), 1262-1263.

108 Minhas, G. S.; Pilch, D. S.; Kerrigan, J. E.; LaVoie, E. J.; Rice, J. E., Synthesis and G-quadruplex stabilizing properties of a series of oxazole-containing macrocycles. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16* (15), 3891-3895.

109 Tera, M.; Iida, K.; Ishizuka, H.; Takagi, M.; Suganuma, M.; Doi, T.; Shin-ya, K.; Nagasawa, K., Synthesis of a Potent G-Quadruplex-Binding Macrocyclic Hepta-oxazole. *ChemBioChem* **2009**, *10* (3), 431-435.

110 Jantos, K.; Rodriguez, R.; Ladame, S.; Shirude, P. S.; Balasubramanian, S., Oxazole-Based Peptide Macrocycles: A New Class of G-Quadruplex Binding Ligands. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (42), 13662-13663.

111 Chakraborty, T. K.; Arora, A.; Roy, S.; Kumar, N.; Maiti, S., Furan Based Cyclic Oligopeptides Selectively Target G-Quadruplex. *J Med Chem* **2007**, *50* (23), 5539-5542.

oligoamides cycliques¹¹² (Figure 45). Les derniers quoique moins stabilisants que la télomestatine, sont sélectifs du motif G-quadruplexe. Des trisfuranes homooligopeptidiques, ont quant à eux été utilisés pour arriver à diminuer l'expression de *C-Myc*. Ils sont également capables de différencier certains types de G-quadruplexes par rapport à d'autres (*c-kit* vs séquence télomérique humaine).

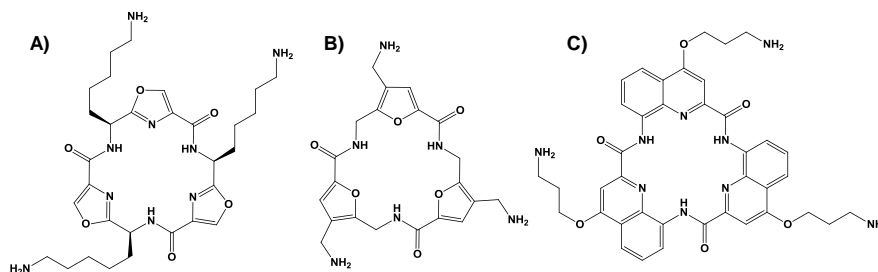


Figure 45 Structures chimiques des dérivés macrocycliques de type polyoxazole (A) Trisfurane (B) oligoamides cycliques (C)

IV.3. Ligands des sillons et des boucles

Les sillons du G-quadruplexe peuvent également être ciblés en utilisant de nouvelles molécules ou des ligands connus pour interagir avec les duplexes¹¹³. Chaque conformation de G-quadruplexe, présentant une organisation différente de sillon, il peut être intéressant de trouver des ligands spécifiques à ces sous-parties. De même, les boucles d'un G-quadruplexe représentent un élément spécifique à chaque G-quadruplexe. En effet, leur disposition est propre à chaque topologie et entre deux topologies similaires, leur séquence peut également varier. C'est pourquoi trouver des ligands propres à cette sous-partie du G-quadruplexe peut être intéressant. Si certains ligands interagissent avec ces dernières, ceci se fait par une interaction secondaire et souvent non prévue. Des exemples de ligands visant à interagir avec ces structures vont être présentés dans cette partie.

L'une des structures les plus étudiées est Hoechst 33258 (Figure 46A), identifié comme ayant une bonne affinité de l'ordre du μM sur le G-quadruplexe issu de la séquence *C-myc*¹¹⁴. D'autres études ont également démontré son affinité pour la séquence télomérique humaine en présence de sodium mais pas de potassium, ceci que ce soit en solution ou en milieu condensé¹¹⁵. C'est pourquoi il est proposé que son mode d'interaction se fasse sur les bases présentes au niveau

112 Shirude, P. S.; Gillies, E. R.; Ladame, S.; Godde, F.; Shin-ya, K.; Huc, I.; Balasubramanian, S., Macrocyclic and Helical Oligoamides as a New Class of G-Quadruplex Ligands. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (39), 11890-11891.

113 Jain, A. K.; Bhattacharya, S., Interaction of G-Quadruplexes with Nonintercalating Duplex-DNA Minor Groove Binding Ligands. *Bioconjugate Chem* **2011**, *22* (12), 2355-2368.

114 Maiti, S.; Chaudhury, N. K.; Chowdhury, S., Hoechst 33258 binds to G-quadruplex in the promoter region of human *c-myc*. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *310* (2), 505-512.

115 Chen, Z.; Zheng, K.-w.; Hao, Y.-h.; Tan, Z., Reduced or Diminished Stabilization of the Telomere G-Quadruplex and Inhibition of Telomerase by Small Chemical Ligands under Molecular Crowding Condition. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (30), 10430-10438.

des boucles de la structure¹¹⁶. D'autres dérivés de cette famille ont été par la suite synthétisés. Certains possèdent une bonne sélectivité pour le G-quadruplexe par rapport au duplexe et il apparaît que ce sont surtout les molécules en forme de V qui semblent plus spécifiques des structures (Figure 46B)¹¹⁷. Il semblerait cependant que leur mode d'interaction puisse se faire également par empilement (π -stacking).

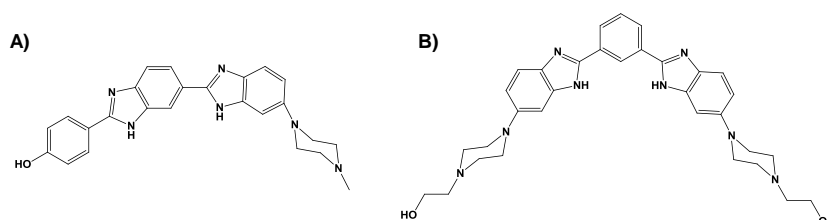


Figure 46 Structure chimique de Hoechst 33258(A) et de la « Vshaped » bisbenzimidazole (B)

La nétropsine, la distamicyne et ses dérivées (Figure 47) peuvent également interagir avec les sillons des G-quadruplexes¹¹⁸. Bien que possédant dans la plupart des cas une meilleure sélectivité pour le duplexe que pour le G-quadruplexe, leur rôle en tant que ligand a toutefois montré des activités lors de l'inhibition de la télomérase (TRAP IC₅₀ à 25 μ M) ou par compétition avec la nucléoline. D'autres dérivés de la distamicyne ont été testés. Par exemple, le composé MEN 10716, a une IC₅₀ de 24mM lors de son action sur des cellules issues d'un sarcome osseux humain¹¹⁹. Connus comme ligands du duplexe, le DODC et ses dérivés de type dicarbocyanine ont également été testés¹²⁰. Toutefois si leur affinité semble meilleure que la distamicyne, elle semble plus affine pour les structures en triplexes¹²¹.

116 Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Gaw, H. Y.; Patel, D. J., Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter. *Nat Chem Biol* **2005**, *1* (3), 167-173.

117 Li, G.; Huang, J.; Zhang, M.; Zhou, Y.; Zhang, D.; Wu, Z.; Wang, S.; Weng, X.; Zhou, X.; Yang, G., Bis(benzimidazole)pyridine derivative as a new class of G-quadruplex inducing and stabilizing ligand. *Chem Commun* **2008**, (38), 4564-4566.

118 (a) Randazzo, A.; Galeone, A.; Esposito, V.; Varra, M.; Mayol, L., Interaction of distamycin A and netropsin with quadruplex and duplex structures: a comparative 1H-NMR study. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2002**, *21* (8-9), 535-545; (b) Randazzo, A.; Galeone, A.; Mayol, L., H-NMR study of the interaction of distamycin A and netropsin with the parallel stranded tetraplex [d(TGGGGT)]. *Chem Commun* **2001**, (11), 1030-1031.

119 Zaffaroni, N.; Lualdi, S.; Villa, R.; Bellarosa, D.; Cermele, C.; Felicetti, P.; Rossi, C.; Orlandi, L.; Daidone, M. G., Inhibition of telomerase activity by a distamycin derivative: effects on cell proliferation and induction of apoptosis in human cancer cells. *Eur J Cancer* **2002**, *38* (13), 1792-1801.

120 (a) Chen, Q.; Kuntz, I. D.; Shafer, R. H., Spectroscopic recognition of guanine dimeric hairpin quadruplexes by a carbocyanine dye. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (7), 2635-2639; (b) Paramasivan, S.; Bolton, P. H., Mix and measure fluorescence screening for selective quadruplex binders. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (17), e106; (c) Yang, Q.; Xiang, J.; Yang, S.; Zhou, Q.; Li, Q.; Tang, Y.; Xu, G., Verification of specific G-quadruplex structure by using a novel cyanine dye supramolecular assembly: I. Recognizing mixed G-quadruplex in human telomeres. *Chem Commun* **2009**, (9), 1103-1105.

121 Ren, J.; Chaires, J. B., Preferential Binding of 3,3'-Diethyloxadicarbocyanine to Triplex DNA. *J Am Chem Soc* **1999**, *122* (2), 424-425.

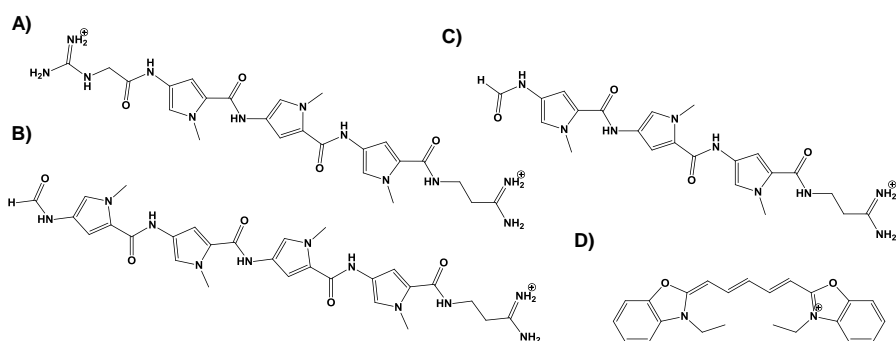


Figure 47 Structure chimique de la nétropsine (A), de la distamicyne (B), de MEN 1071 (C) et du DODC (D)

En 2006, l'équipe de M.-P. Teulade-Fichou a utilisé la néomycine pour fonctionnaliser différentes plates-formes aromatiques dans le but d'obtenir une interaction avec les boucles. Ceci a été effectué sur une acridine, une phénanthroline et une quinacridine¹²². Cette approche visant les boucles *via* la néomycine et la tétrade *via* la plate-forme aromatique est l'une des rares approches de ce genre. Le ligand NCQ (Figure 48), dérivé de la quinacridine s'est avéré même être un inhibiteur de la télomérase *in vitro* avec une IC_{50} de l'ordre du *submicromolaire* et il a été constaté que l'affinité du ligand pour un G-quadruplexe présentant des boucles était meilleure que sur un motif sans boucle.

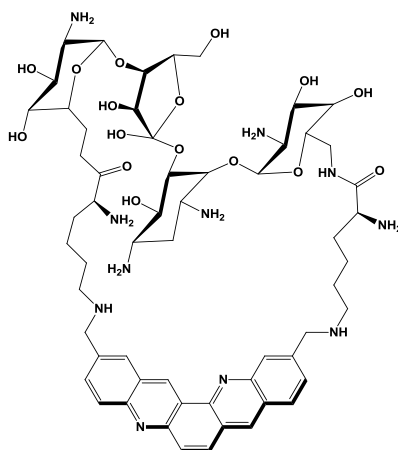


Figure 48 Utilisation de la néomycine sur des ligands planaires de type quinacridine

Plus récemment, un dérivé de la télomestatine, le TOxaPy (Figure 49) a été identifié comme étant un ligand de sillon du G-quadruplexe¹²³. Ce dernier semble stabiliser préférentiellement les G-quadruplexes antiparallèles. Ce ligand, présentant une bonne stabilisation

122 Kaiser, M.; De Cian, A.; Sainlos, M.; Renner, C.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P., Neomycin-capped aromatic platforms: quadruplex DNA recognition and telomerase inhibition. *Org Biomol Chem* **2006**, 4 (6), 1049-1057.

123 Hamon, F.; Largy, E.; Guédin-Beaupaire, A.; Rouchon-Dagois, M.; Sidibe, A.; Monchaud, D.; Mergny, J.-L.; Riou, J.-F.; Nguyen, C.-H.; Teulade-Fichou, M.-P., An Acyclic Oligoheteroaryle That Discriminates Strongly between Diverse G-Quadruplex Topologies. *Angew Chem* **2011**, 123 (37), 8904-8908.

et sélectivité pour le G-quadruplexe, a récemment été testé sur des lignées cancéreuses et a montré une IC_{50} inférieure au nanomolaire.

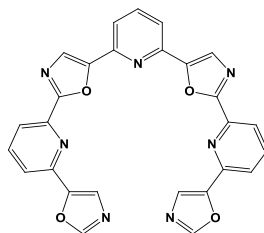


Figure 49 Structure de la TOxaPy

IV.4. Ligands de G-quadruplexes d'ARN

Il a été montré que l'ARN sous forme de G-quadruplexes peut également servir de cible, notamment dans le cadre des stratégies visant les parties 3'UTR et 5'UTR de l'ARN_m et dans le cadre des stratégies TERRA. Les boucles de ces structures présentant des conformations particulières à cause de la présence des hydroxyles en 2' sur le sucre, elles peuvent s'avérer être un élément caractéristique de reconnaissance des ARN. C'est ainsi que par exemple, G. Collie et *al.* ont identifié un ligand naphthalène (Figure 50A) dont l'affinité est plus importante pour les structures ARN que d'autres ligands tels que BRACO-19⁸⁹. Des structures RX ont également été obtenue avec un ligand de type acridine (Figure 50B) sur un ARN G-quadruplexe semblant indiquer que deux ligands interagissant sur la structure par « end-stacking » étaient pris en sandwich entre deux G-quadruplexe lors de l'interaction, laissant entrevoir des résultats prometteurs pour une stratégie visant des G-quadruplexes « en tandem »¹²⁴.

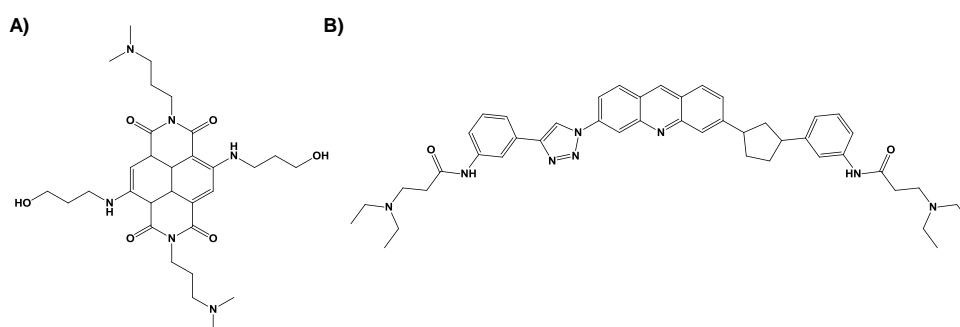


Figure 50 Exemple de molécules présentant un intérêt pour les G-quadruplexes d'ARN A) naphthalène testé par l'équipe de G. Collie B) Acridine spécifique des G-quadruplexes d'ARN

124 Collie, G. W.; Sparapani, S.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Structural Basis of Telomeric RNA Quadruplex–Acridine Ligand Recognition. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (8), 2721-2728.

IV.5. Ligands ciblant le i-motif.

Peu de ligands spécifiques du i-motif sont connus car peu de fonctions biologiques lui sont attribuées limitant ainsi les recherches. Toutefois quelques études ont été entreprises avec des molécules telles que le TMPyP4 par l'équipe de L. Hurley¹²⁵ puis plus récemment par l'équipe de R. Gargallo¹²⁶. Le mode d'interaction de cette molécule a été résolu en partie par RMN laissant supposer que la porphyrine se lie aux extrémités de la structure de façon non-intercalante (Figure 51A). Une étude sur les boucles présentées par l'édifice semble également indiquer que ces dernières jouent un rôle dans la reconnaissance avec le ligand. Les constantes d'affinité trouvées pour le i-motif sur le brin complémentaire de la séquence télomérique humaine 5'-C₃A₂T(CCCTAA)₄-3' sont similaires à celles retrouvées sur la séquence riche en guanine (de l'ordre du micromolaire). Une autre étude compare l'affinité d'un complexe de ruthénium avec les G-quadruplexe et les i-motifs (Figure 51B). Toutefois, il apparaît que le complexe se lie de façon préférentielle au G-quadruplexe, le complexe n'ayant qu'une faible affinité pour le i-motif. Les nanotubes de carbones monofeuillets s'avèrent par contre être de fort stabilisants des i-motifs, même en condition de « crowding »¹²⁷. Ils interagissent sur l'extrémité 5' des sillons larges de la structure. La présence de ces structures défavorise de plus la formation de double hélice.

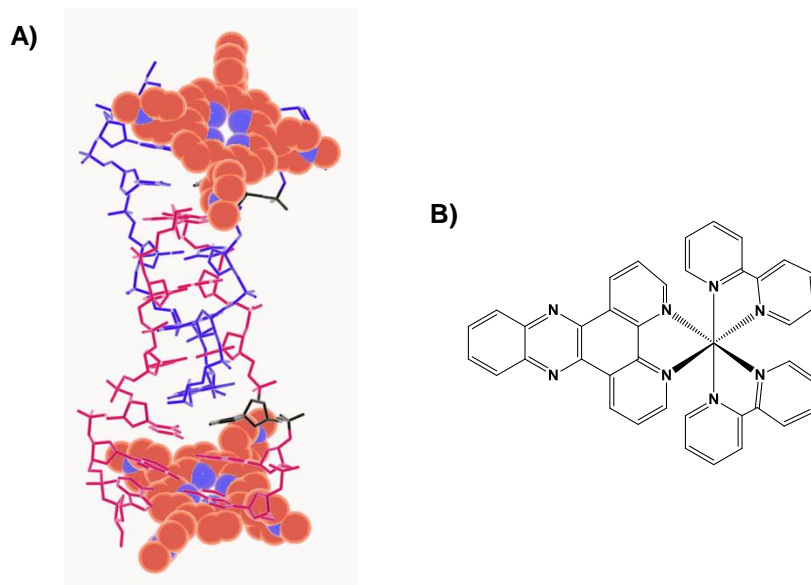


Figure 51 Interaction de la TMPyP4 avec le i-motif et complexe de ruthénium utilisé dans la référence 125

125 Fedoroff, O. Y.; Rangan, A.; Chemeris, V. V.; Hurley, L. H., Cationic Porphyrins Promote the Formation of i-Motif DNA and Bind Peripherally by a Nonintercalative Mechanism†. *Biochemistry (Mosc)* **2000**, *39* (49), 15083-15090.

126 Fernández, S.; Eritja, R.; Aviñó, A.; Jaumot, J.; Gargallo, R., Influence of pH, temperature and the cationic porphyrin TMPyP4 on the stability of the i-motif formed by the 5'-(C3TA2)4-3' sequence of the human telomere. *Int J Biol Macromol* **2011**, *49* (4), 729-736.

127 Li, X.; Peng, Y.; Ren, J.; Qu, X., Carboxyl-modified single-walled carbon nanotubes selectively induce human telomeric i-motif formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (52), 19658-19663.

V. Présentation du projet

V.1. Chimie supramoléculaire et concept de TASQ

La chimie supramoléculaire est régie par la formation de liaisons non covalente entre des molécules. Basée sur ce principe, elle a ces dernières années été utilisée de nombreuses fois dans le but de former des édifices mimant des structures de la nature. Les G-quadruplexes dont la formation repose sur la formation de liaisons hydrogène et d'interaction par empilement peuvent donc s'inscrire comme appartenant à ce type d'édifice et il est envisageable d'utiliser la chimie supramoléculaire pour obtenir des modèles de ces structures. Cette approche a été dénommée TASQ (pour Template-Assembled Synthetic G-Quartets)¹²⁸.

Les premiers travaux de pré organisation d'une tétrade ont été entrepris par l'équipe de J.T. Davis sur un calixarène 1,3 alterné (Figure 52)¹²⁹. L'édifice, présentant deux guanosines de part et d'autre de son plan moyen n'a pu être caractérisé que dans CDCl₃ saturé en eau. La présence de molécules d'eau stabilise la structure formée d'un dimère qui est stabilisé grâce à la formation d'une tétrade de guanines entre deux édifices. D'autres propriétés ont été identifiées sur cet édifice notamment celle d'extraire d'une phase aqueuse des sels vers un solvant organique avec une préférence pour les K⁺ et Br⁻ par rapport à Na⁺ et Cl⁻. Lors de ces interactions avec les sels, le cation se place entre les O₆ des guanines de la tétrade quand les anions interagissent sur les NH des liens amides reliant l'édifice au support calixarène. Toutefois lorsque l'anion est trop important (ajout de NaBPH₄), la structure polymérise avec le cation à l'extérieur de l'édifice.

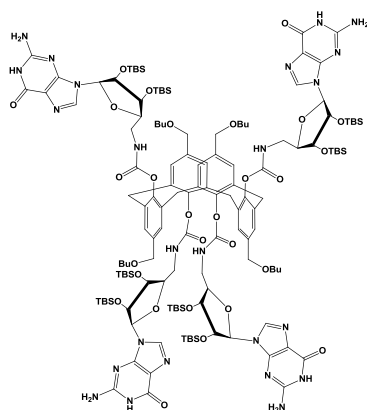


Figure 52 Utilisation d'un calixarène pour contraindre des tétrades de guanines

128 Nikan, M.; Sherman, J. C., Template-Assembled Synthetic G-Quartets (TASQs). *Angew Chem Int Ed* **2008**, 47 (26), 4900-4902.

129 Kotch, F. W.; Sidorov, V.; Lam, Y.-F.; Kayser, K. J.; Li, H.; Kaucher, M. S.; Davis, J. T., Water-Mediated Association Provides an Ion Pair Receptor. *J Am Chem Soc* **2003**, 125 (49), 15140-15150.

La notion de TASQ n'a réellement été avancée qu'en 2008 avec J.C. Sherman lors de ses travaux dans le but de ne stabiliser qu'une seule tétrade de guanine. Ce principe est un dérivé du concept TASP (template-assembled synthetic proteins) développé par M. Mutter en 1989 concernant la stabilisation de parties peptidiques (voir paragraphe suivant)¹³⁰. Il repose sur l'utilisation de la préorganisation apportée par un gabarit et du gain entropique en résultant pour faciliter la formation d'une structure. Sur ce principe, les travaux de J.C. Sherman reposent sur l'utilisation d'un cavitand qui permet de former la tétrade dans du chloroforme (Figure 53A). Ainsi il a été possible d'obtenir la première tétrade isolée et stabilisée dans CDCl_3 et sans ajout de cation. Cependant la formation de la tétrade n'est pas possible dans un solvant protique compétiteur. D'autres propriétés sur cette tétrade ont entre autre été retrouvées, concernant la stabilisation de cation : un monomère se forme lors de l'interaction avec des cations de petite taille (Na^+ ou Cs^+) quand un dimère se forme en présence de cations au volume plus important bloqués entre deux tétrades (K^+ ou Sr^+). Ceci a été confirmé récemment par l'obtention de structures cristallographiques sur un dérivé de la structure¹³¹.

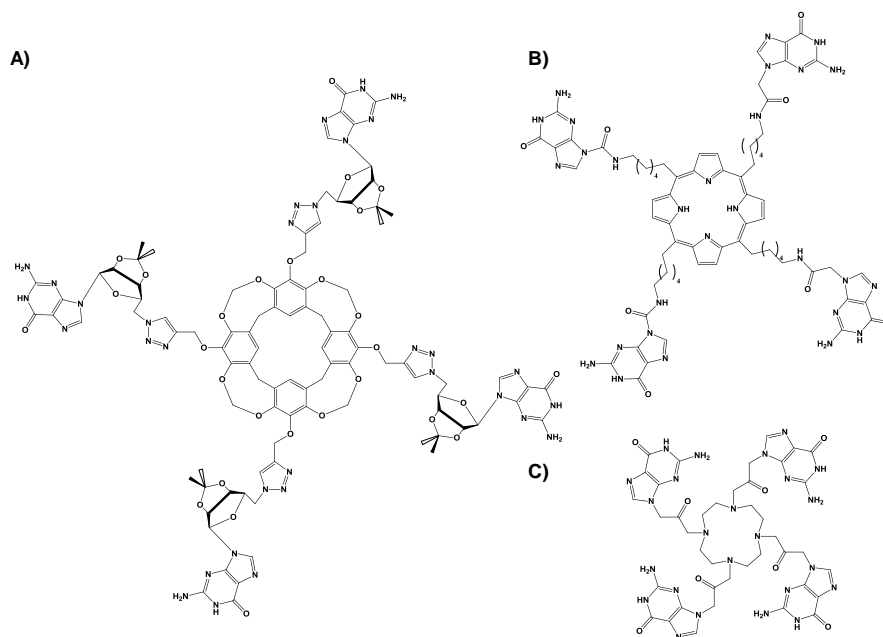


Figure 53 Différents type de TASQ : Cavitand utilisé par Sherman (A), PorphyTASQ (B) et DOTASQ (C)

130 (a) Mutter, M.; Altmann, K. H.; Tuchscherer, G.; Vuilleumier, S., Template assembled synthetic proteins. 1989; (b) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G., Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angew Chem Int Ed* **1996**, *35* (13-14), 1482-1485.

131 Nikan, M.; Patrick, B. O.; Sherman, J. C., Crystal Structure of a Template-Assembled Synthetic G-Quadruplex. *ChemBioChem* **2012**, *13* (10), 1413-1415.

Sur ce principe de TASQ, l'équipe de D. Monchaud a entrepris d'utiliser soit un DOTA (Figure 53C)¹³² soit une porphyrine (Figure 53B)¹³³ pour stabiliser les G-quartets dans le but d'en faire des ligands de G-quadruplexe sur le principe du « like likes like ». Il s'est avéré que le premier gabarit ne stabilise pas(ou peu) le motif G-quadruplexe, à moins d'utiliser le Tb^{3+} pour complexer le DOTA. Cependant l'utilisation d'une porphyrine a permis d'obtenir un ligand un peu meilleur mais qui semble être sélectif des G-quadruplexes avec des gains supérieurs de température de dénaturation du G-quadruplexes (ΔT_m jusqu'à $6,5^\circ C$).

V.2. Utilisation d'un gabarit peptidique dérivé du TASP pour contraindre des G-quartets et des G-quadruplexes

Cité précédemment, le TASP repose sur l'utilisation d'un cyclodécapeptide (Figure 54). Ce dernier se structure en feuillet β croisé *via* la formation de deux coudes β proline-glycine de type II. Des études structurales par résonance magnétique nucléaire et par rayons X ont permis de montrer que la présence du feuillet β permet de rigidifier la structure et de la stabiliser grâce aux liaisons hydrogène formées sur chacune des liaisons peptidiques en *trans*. Les chaînes latérales des acides aminés présents s'orientent de part et d'autre du plan moyen du cycle permettant ainsi de délimiter deux faces fonctionnelles sur la structure. La diversité des différents acides aminés pouvant être présents sur l'édifice permet d'incorporer différentes fonctionnalisations sur chacune d'elles.

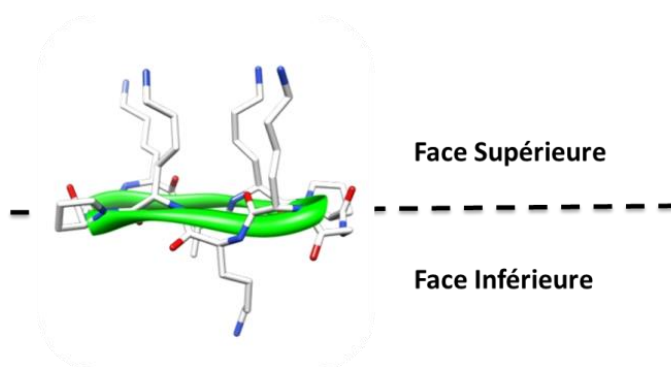


Figure 54 Modélisation moléculaire du gabarit TASP

132 Stefan, L.; Guedin, A.; Amrane, S.; Smith, N.; Denat, F.; Mergny, J.-L.; Monchaud, D., DOTASQ as a prototype of nature-inspired G-quadruplex ligand. *Chem Commun* **2011**, 47 (17), 4992-4994.

133 Xu, H.-J.; Stefan, L.; Haudecoeur, R.; Vuong, S.; Richard, P.; Denat, F.; Barbe, J.-M.; Gros, C. P.; Monchaud, D., Porphyrin-templated synthetic G-quartet (PorphySQ): a second prototype of G-quartet-based G-quadruplex ligand. *Org Biomol Chem* **2012**, 10 (27), 5212-5218.

Appliqué au TASQ, le gabarit peptidique a été relié à des guanosines (Figure 55A)¹³⁴. Contrairement aux travaux précédents de Sherman, la tétrade obtenue a pu cette fois-ci être observée dans l'eau sans ajout de cation. Un tel résultat a pu être obtenu grâce aux triazoles qui relient le gabarit aux guanosines et qui s'empilent sous le G-quartet. De façon intéressante, lorsque le ribose des guanosines est protégé par un groupement *isopropylidène*, qui bloque les riboses en conformation Nord pour inciter les bases à se mettre en *syn*, un seul monomère se forme (Figure 55B). Par contre, la déprotection du ribose conduit à la formation d'un dimère dont l'interaction résulte de l'empilement entre les deux tétrades de chaque molécule (Figure 55C). Cet édifice est également capable d'induire la formation d'agrégats de G-quartets en solution, en agissant en tant qu'initiateur.

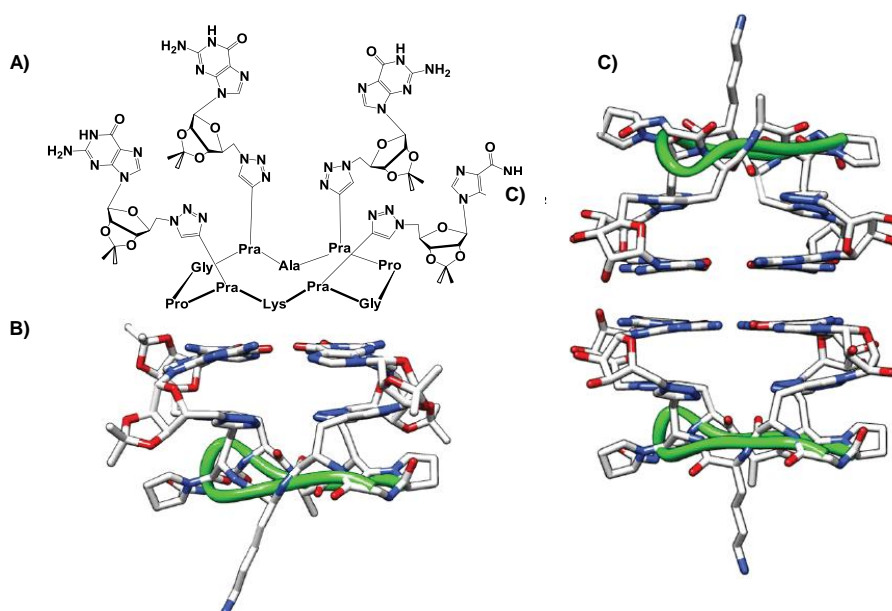


Figure 55 Représentation de gabarit TASP pour contraindre une tétrade de guanines (A), modélisation par RMN de la structure protégée sous forme de monomère (B) ou déprotégée sous forme de dimère (C)

Les quadruplexes étant des molécules qui présentent un polymorphisme important dépendant de leur séquence et de leur condition de formation, il arrive souvent que différentes topologies soient présentes en solution. Arriver à contraindre de tels édifices à se structurer selon la topologie voulue pourrait permettre de mieux comprendre les forces qui les régissent. Ceci pourrait également permettre de mieux comprendre les interactions entre des ligands et ces molécules. C'est pourquoi les propriétés du gabarit ont été utilisées au laboratoire pour stabiliser

134 Murat, P.; Gennaro, B.; Garcia, J.; Spinelli, N.; Dumy, P.; Defrancq, E., The Use of a Peptidic Scaffold for the Formation of Stable Guanine Tetrads: Control of a H-bonded Pattern in Water. *Chem Eur J* **2011**, *17* (21), 5791-5795.

un G-quadruplexe parallèle **1** (Figure 56)¹³⁵. Quatre brins oligonucléotidiques ont pu être reliés en 3' sur le gabarit en utilisant un lien éther d'oxime. Ceci a permis de stabiliser le G-quadruplexe par gain entropique et de former la structure sans ajout supplémentaire de cation. *Via* sa face inférieure fonctionnalisée par une biotine, ce mime a ensuite été utilisé dans le cadre d'étude de ligands de G-quadruplexe par résonance de plasmon de surface (SPR)¹³⁶. Il a ainsi été possible de déterminer l'affinité, la sélectivité par rapport à un duplexe de différentes familles de molécules. De plus, l'utilisation d'un « G-quadruplexe simplifié » a permis d'évaluer le mode d'interaction de ligand par comparaison avec une molécule plus complexe. (Voir chapitre 1).

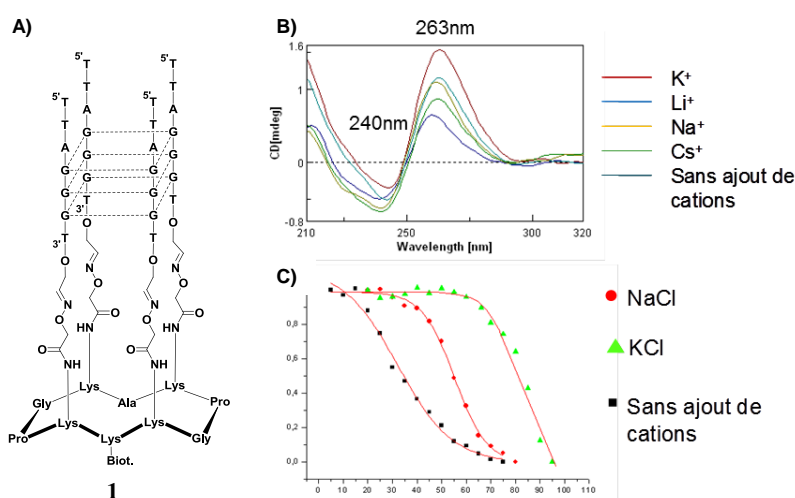


Figure 56 Utilisation du TASP pour contraindre des G-quadruplexes parallèles (A), spectre de dichroïsme circulaire de **1** en présence de différents cations (B), dénaturation de l'édifice **1** suivie par dichroïsme circulaire.

V.3. Objectifs des travaux de thèse

Les différentes parties décrites dans l'introduction mettent en avant l'importance de trouver des ligands aptes à se lier spécifiquement aux G-quadruplexes. S'il est important que les molécules testées restent spécifiques par rapport aux structures en duplexe, le nombre et la diversité de structures potentielles de G-quadruplexes retrouvées dans la cellule laissent penser que les ligands testés doivent également être spécifiques d'une seule topologie. Le polymorphisme des G-quadruplexes se retrouve au niveau de l'orientation des brins, des caractéristiques des différentes boucles ainsi que de la taille des sillons en résultant. Dans ce contexte, les travaux de recherches au laboratoire se sont orientés vers le développement de nouveaux quadruplexes

135 Murat, P.; Cressend, D.; Spinelli, N.; Van der Heyden, A.; Labbé, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., A Novel Conformationally Constrained Parallel G Quadruplex. *ChemBioChem* **2008**, *9* (16), 2588-2591.

136 Murat, P.; Bonnet, R.; Van der Heyden, A.; Spinelli, N.; Labbé, P.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P.; Dumy, P.; Defrancq, E., Template-Assembled Synthetic G-Quadruplex (TASQ): A Useful System for Investigating the Interactions of Ligands with Constrained Quadruplex Topologies. *Chem Eur J* **2010**, *16* (20), 6106-6114.

antiparallèles, aux topologies contrôlées grâce au gabarit TASP. Le but de synthétiser de telles structures est de créer des outils utilisés de façon ultérieure par SPR pour mieux comprendre le comportement des ligands et aider à leur conception.

Ce travail de thèse se divise en deux parties. Une première partie du travail se concentrera sur l'évaluation de complexes métalliques en utilisant le test de SPR développé au laboratoire. Les complexes étudiés sont des dérivés de porphyrines, synthétisés par l'équipe de G. Pratviel ou bien des dérivés salphen synthétisés par l'équipe de F. Thomas. Par la suite, dans le but de diversifier les mimes et les contraintes apportées par le gabarit peptidiques, il sera présenté la synthèse et la caractérisation de structures antiparallèles. Pour se faire, des oligonucléotides ont pu être reliés sur le gabarit par leur extrémité 5' ou 3' au moyen de deux ligations chimiosélectives orthogonales : la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par le Cuivre I et la ligation oxime. Ceci a d'abord été réalisé sur un i-motif, naturellement antiparallèle mais moins apte à former des structures secondaires. Par la suite, les synthèses ont été appliquées à des mimes antiparallèles de G-quadruplexes. Deux types de structure sont reportés : des mimes de G-quadruplexes tétramoléculaires et des mimes de G-quadruplexes bimoléculaires dont la topologie de boucle est contrainte (Figure 57).

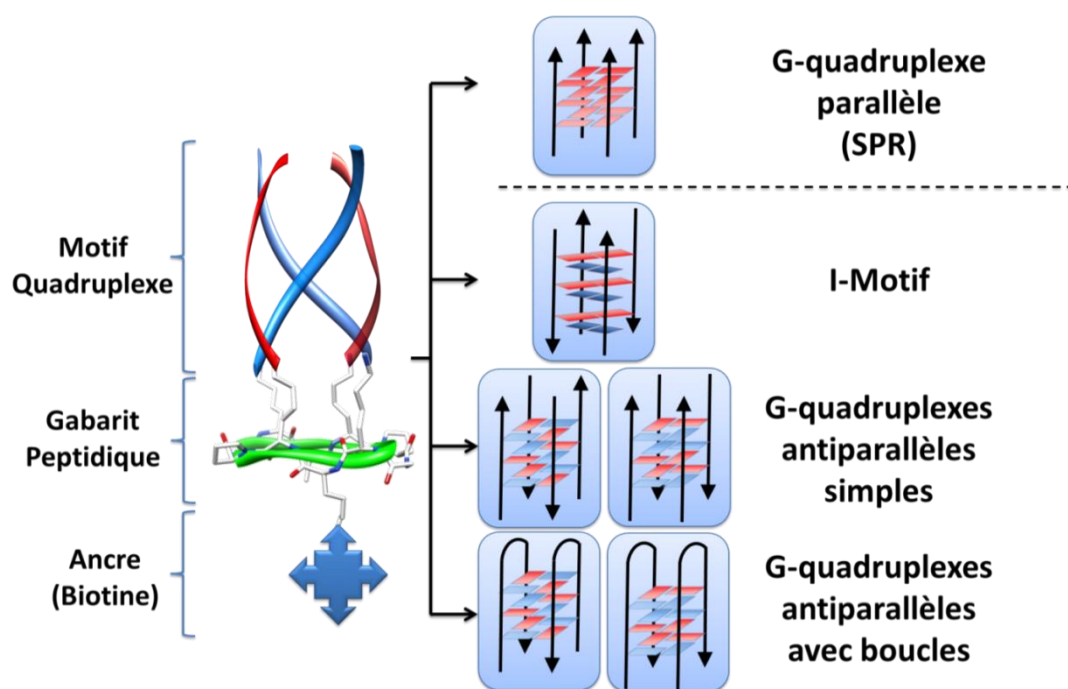


Figure 57 Illustration du projet de recherche

Chapitre 1 : Etudes SPR de ligands de G-quadruplexe

I. Introduction

Ce chapitre traite de l'étude de complexes métalliques par résonance plasmonique de surface (SPR) fondée sur l'utilisation des mimes de G-quadruplexes présentés dans l'introduction. Lors de ce test, deux séries ont été évaluées, à savoir des dérivés porphyriniques, en collaboration avec l'équipe de G. Pratviel, et des dérivés de type Salphen, en collaboration avec l'équipe de F. Thomas.

I.1. Utilisation de complexes métalliques en tant que ligands de G-quadruplexe

Actuellement de nombreuses équipes travaillent sur le développement de ligands capables de stabiliser un G-quadruplexe. Dans ce but, de nombreux complexes métalliques sont utilisés¹³⁷. Plusieurs raisons peuvent justifier l'ajout d'un métal au sein d'un ligands de G-quadruplexes. Premièrement, le métal permet de faire adopter au ligand une configuration spécifique au quadruplexe. Deuxièmement, le métal permet de réduire la densité électronique sur les ligands aromatiques reliés à ce dernier ayant pour conséquence d'augmenter fortement les interactions de « π -stacking » entre le ligand et un G-quartet. Enfin, il peut également arriver que les propriétés intrinsèques du métal lui permettent d'être utilisé comme sonde optique. Cependant lors des paragraphes suivants, seules les propriétés structurales apportées par les métaux aux ligands vont être présentées.

1c. Ligands macrocycliques

ii) Dérivés porphyriniques

Les porphyrines ont été les premiers complexes métalliques à être utilisées pour cibler les G-quadruplexes¹⁰³. Ces travaux ont été effectués par l'équipe de L. Hurley en 1999, lors de deux études sur la relation structure-activité sur les porphyrines¹³⁸. Comme la TmpyP4, ces porphyrines ont vraisemblablement un mode d'interaction principal par empilement sur la dernière tétrade de guanine du quadruplexe. Lors des travaux, différents complexes de la TmpyP4 ont été testés. Pourtant il apparaît lors de cette étude qu'aucun métal n'apporte de gain d'activité en ce qui

137 Georgiades, S. N.; Abd Karim, N. H.; Suntharalingam, K.; Vilar, R., Interaction of Metal Complexes with G-Quadruplex DNA. *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49* (24), 4020-4034.

138 (a) Shi, D.-F.; Wheelhouse, R. T.; Sun, D.; Hurley, L. H., Quadruplex-Interactive Agents as Telomerase Inhibitors: Synthesis of Porphyrins and Structure-Activity Relationship for the Inhibition of Telomerase. *J Med Chem* **2001**, *44* (26), 4509-4523; (b) Izbicka, E.; Wheelhouse, R. T.; Raymond, E.; Davidson, K. K.; Lawrence, R. A.; Sun, D.; Windle, B. E.; Hurley, L. H.; Von Hoff, D. D., Effects of Cationic Porphyrins as G-Quadruplex Interactive Agents in Human Tumor Cells. *Cancer Res* **1999**, *59* (3), 639-644.

concerne l'inhibition de la télomérase. Lorsque le métal possède une géométrie pyramidale tel que le Zn^{II} ou plan carré tel que le Cu^{II} , l'interaction avec le G-quadruplexe est permise par la présence d'une face plane de la porphyrine. Par contre, dans le cas où le métal présente une géométrie octaédrique (Mg^{II} , Mn^{III}), l'interaction est fortement défavorisée. La taille du métal est également importante et des complexes possédant des métaux trop volumineux tels que les lanthanides ou bien l' Au^{III} se sont avérés être de moins bons ligands. D'autres études ont également été entreprises sur des dérivés de la TmPyP4. Son complexe de Zn^{II} , par exemple, a été identifié comme favorisant la formation de G-quadruplexes parallèles¹³⁹.

D'autres complexes porphyriniques ont été testés par la suite sur les G-quadruplexes (Figure 58), notamment par l'équipe de G. Pratviel. Classiquement, ils sont fonctionnalisés soit par quatre groupements similaires (méthylpyridinium, méthylquinolinium) soit par quatre groupements 1-méthyl-4-pyridinium dont un ou deux possèdent en *ortho* une fonction faisant office de « bras » pour interagir dans les sillons du G-quadruplexe¹⁴⁰. Il a été ainsi observé que la fonctionnalisation en *ortho* de porphyrines (avec Ni^{II} ou Mn^{III}) d'un ou deux groupements pyridinium par des bras aminoquinolines n'augmentait que faiblement l'affinité de la porphyrine. Il en va de même lorsque la fonctionnalisation se fait par des groupements aminopropylamine ou bien par une seconde porphyrine. Seuls de légers gains d'affinité sont obtenus.

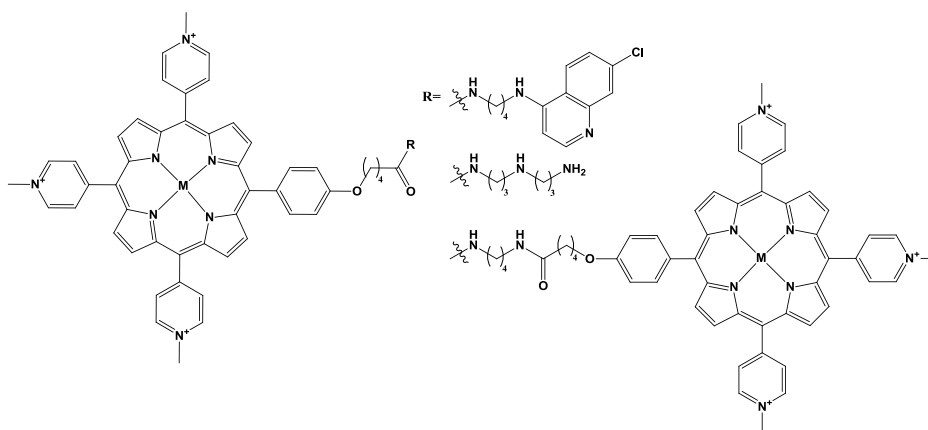


Figure 58 Complexes porphyriniques dérivés de la TmPyP4

Le ligand le plus efficace de type porphyrinique trouvé à ce jour résulte de la fonctionnalisation des quatre pyridiniums du macrocycle par des groupements arylamide. Le complexe de manganèse de cette porphyrine (MnLB, Figure 59) s'avère être très sélectif pour les

139 Bhattacharjee, A. J.; Ahluwalia, K.; Taylor, S.; Jin, O.; Nicoludis, J. M.; Buscaglia, R.; Brad Chaires, J.; Kornfilt, D. J. P.; Marquardt, D. G. S.; Yatsunyk, L. A., Induction of G-quadruplex DNA structure by Zn(II) 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin. *Biochimie* **2011**, 93 (8), 1297-1309.¹³⁹

140 Dixon, I. M.; Lopez, F.; Estève, J.-P.; Tejera, A. M.; Blasco, M. A.; Pratviel, G.; Meunier, B., Porphyrin Derivatives for Telomere Binding and Telomerase Inhibition. *ChemBioChem* **2005**, 6 (1), 123-132.

G-quadruplexes¹⁴¹. En effet, si son affinité est de l'ordre de la centaine de micromolaire pour des duplexes de type AT et CG, elle est proche du nanomolaire pour le G-quadruplexe. La sélectivité de ce complexe est donc d'environ 10^4 . De façon surprenante, ce résultat est obtenu avec un ligand possédant un manganèse, de géométrie octaédrique qui est connue pour diminuer l'affinité du ligand. Les explications d'un tel résultat pourraient venir du fait qu'un des ligands axiaux soit remplacé par des hétéroatomes présents sur les boucles pour permettre une interaction de type empilement sur la molécule.

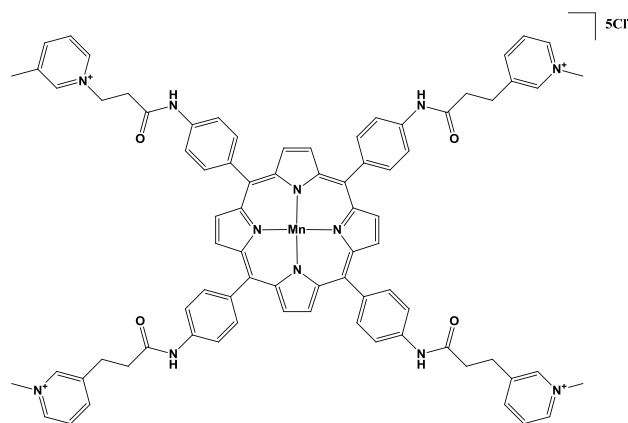


Figure 59 Structure chimique de MnLB

ii) Phthalocyanines

Une autre grande famille de complexes métalliques utilisés en tant que ligands de G-quadruplexe, est celle des phthalocyanines (Figure 60)¹⁴². Les différents dérivés synthétisés varient par leurs groupements fonctionnels présents sur les cycles aromatiques. Les premiers ligands développés par l'équipe de X. Zhou¹⁴³, possédant quatre ou huit fonctions ammoniums quaternaires, ont été complexés en présence de Zn^{II} ou de Ni^{II}. C'est en présence de Ni^{II} que les meilleures affinités sont obtenues et avec les composés les plus chargés. Certains de ces ligands présentent de bonnes IC₅₀ qui peuvent aller jusqu'à 20nM pour le composé le plus efficace, possédant quatre bras, chacun fonctionnalisé par deux amines quaternaires. L'effet du Zinc quant à lui est assez difficile à déterminer car sa présence peut diminuer les affinités dans certains cas et les augmenter dans d'autres. A part pour un des composés de nickel, la sélectivité des molécules pour le G-quadruplexe reste moyenne. Par la suite, d'autres phthalocyanines présentant des bras

141 Dixon, I. M.; Lopez, F.; Tejera, A. M.; Estève, J.-P.; Blasco, M. A.; Pratviel, G.; Meunier, B., A G-Quadruplex Ligand with 10000-Fold Selectivity over Duplex DNA. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (6), 1502-1503.

142 Yaku, H.; Fujimoto, T.; Murashima, T.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N., Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications. *Chem Commun* **2012**, *48* (50), 6203-6216.

143 Zhang, L.; Huang, J.; Ren, L.; Bai, M.; Wu, L.; Zhai, B.; Zhou, X., Synthesis and evaluation of cationic phthalocyanine derivatives as potential inhibitors of telomerase. *Biorg Med Chem* **2008**, *16* (1), 303-312.

amido sur la structure ont été synthétisés¹⁴⁴ Il apparaît qu'une longueur de ces derniers d'au moins deux carbones est nécessaire pour favoriser des interactions de l'ordre de la dizaine de nanomolaire. Un troisième groupe a été testé sur les G-quadruplexes avec cette fois-ci des guanidiniums présents sur le cycle phthalocyanine¹⁴⁵. Le complexe de Zn^{II} issu de cette famille présente une bonne sélectivité de l'ordre de 10^3 . De plus son affinité est de l'ordre du micromolaire et ceci se fait en faveur des G-quadruplexes parallèles. L'utilisation de groupements anioniques, dans le but de diminuer les interactions électrostatiques sur le duplexe, a également permis d'obtenir des molécules très sélective pour le G-quadruplexe¹⁴⁶. Ces molécules ont une activité de l'ordre de $1\mu M$ quel que soit le métal utilisé (ici Cu^{II} ou Ni^{II}).

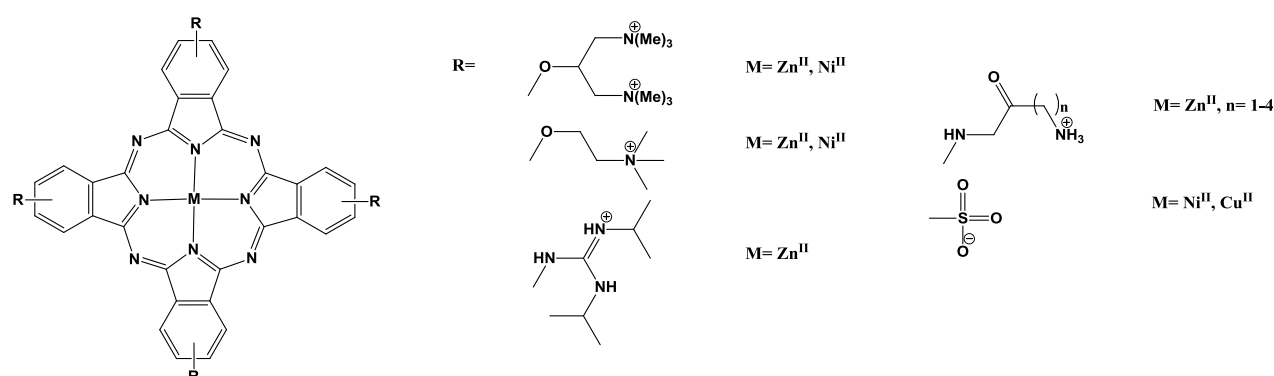


Figure 60 Structure chimique de phthalocyanines utilisées comme ligands de G-quadruplexes
iii)Autres complexes macrocycliques

D'autres structures macrocycliques ont été utilisées pour complexer des métaux et agir sur les G-quadruplexes. Dans le cas des complexes de porphyrazines (Figure 61A), peu d'études ont été entreprises¹⁴⁷. Il a toutefois été constaté que l'ajout de Zn^{II} sur la molécule entraîne une perte d'affinité d'un ordre de grandeur ($0,14\mu M$ contre $1\mu M$ pour le complexe). Ces molécules restent cependant plus spécifiques des G-quadruplexes en étant trente fois plus sélectives pour celui-ci que pour le duplexe. Dans une autre étude sur les corroles fonctionnalisés par des bras de type méthylpyridinium (Figure 61B)¹⁴⁸, il apparaît que le ligand le plus efficace possède de façon surprenante des ligands axiaux, Mn^{III} et, avec une valeur d' IC_{50} proche de $1\mu M$. Ceci peut être expliqué par le fait que le macrocycle adopte une conformation en « selle de cheval » pour

144 Alzeer, J.; Luedtke, N. W., pH-Mediated Fluorescence and G-Quadruplex Binding of Amido Phthalocyanines. *Biochemistry (Mosc)* **2010**, *49* (20), 4339-4348.

145 Alzeer, J.; Vummidi, B. R.; Roth, P. J. C.; Luedtke, N. W., Guanidinium-Modified Phthalocyanines as High-Affinity G-Quadruplex Fluorescent Probes and Transcriptional Regulators. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48* (49), 9362-9365.

146 Yaku, H.; Murashima, T.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N., Anionic phthalocyanines targeting G-quadruplexes and inhibiting telomerase activity in the presence of excessive DNA duplexes. *Chem Commun* **2010**, *46* (31), 5740-5742.

147 Goncalves, D. P. N.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S.; Sanders, J. K. M., Tetramethylpyridiniumporphyrazines-a new class of G-quadruplex inducing and stabilising ligands. *Chem Commun* **2006**, (45), 4685-4687.

148 Fu, B.; Zhang, D.; Weng, X.; Zhang, M.; Ma, H.; Ma, Y.; Zhou, X., Cationic Metal-Corrole Complexes: Design, Synthesis, and Properties of Guanine-Quadruplex Stabilizers. *Chem Eur J* **2008**, *14* (30), 9431-9441.

interagir avec le G-quadruplexe (Figure 61C)¹⁴⁹. Les corroles étudiés dans la majorité des cas ont semblé induire une transition de la topologie antiparallèle du G-quadruplexe vers une autre, hybride.

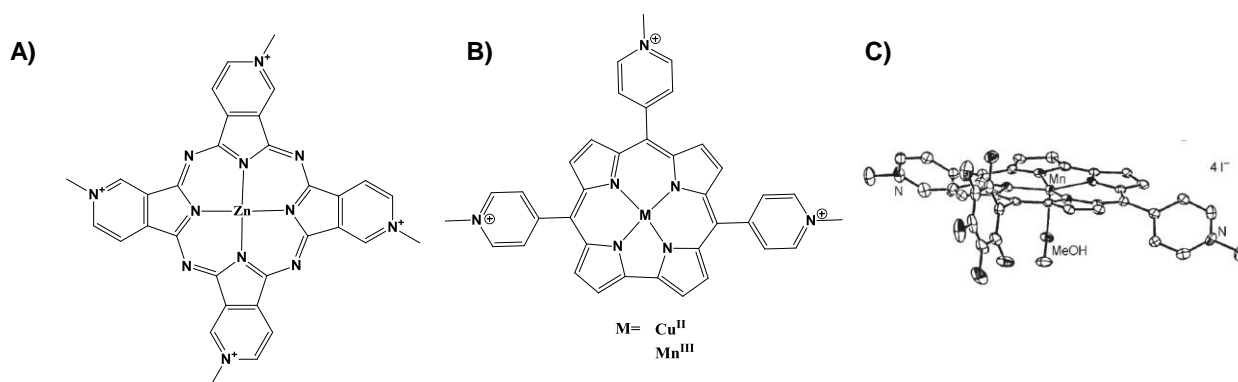


Figure 61 A) Structure chimique de la Zn^{II} -porphyrazine et B) des dérivés corroles C) structure cristallographiques du corrole de manganèse III ¹⁴⁹

1d. Ligands non-macrocycliques

ii) 360A et dérivés

L'un des exemples les plus connus de l'influence d'un métal sur un ligand est vraisemblablement celui du 360A. Les propriétés de ce cycle pyridinium fonctionnalisé par des bisquinoliniums tant au niveau de son affinité pour le G-quadruplexe que de sa sélectivité par rapport au duplexe ont été présentées précédemment (voir Introduction). Lorsque ce dernier complexe le Cu^{II} , il apparaît un changement de conformation faisant drastiquement chuter ses propriétés (Schéma 1)¹⁵⁰. Ainsi, l'ajout du métal sur le complexe lui fait adopter une forme linéaire quand auparavant *via* une stabilisation par des liaisons hydrogène, il possédait une « forme en V ». D'autres métaux comme le Pd^{II} ont également été introduits sur d'autres ligands de type pyridine, toutefois leur activité est moyenne tout comme leur sélectivité (Figure 59B, Schéma 1)¹⁵¹

149 Gershman, Z.; Goldberg, I.; Gross, Z., DNA Binding and Catalytic Properties of Positively Charged Corroles. *Angew Chem Int Ed* **2007**, *46* (23), 4320-4324.

150 Monchaud, D.; Yang, P.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Mergny, J.-L., A Metal-Mediated Conformational Switch Controls G-Quadruplex Binding Affinity. *Angew Chem* **2008**, *120* (26), 4936-4939.

151 Reed, J. E.; White, A. J. P.; Neidle, S.; Vilar, R., Effect of metal coordination on the interaction of substituted phenanthroline and pyridine ligands with quadruplex DNA. *Dalton Trans* **2009**, (14), 2558-2568.

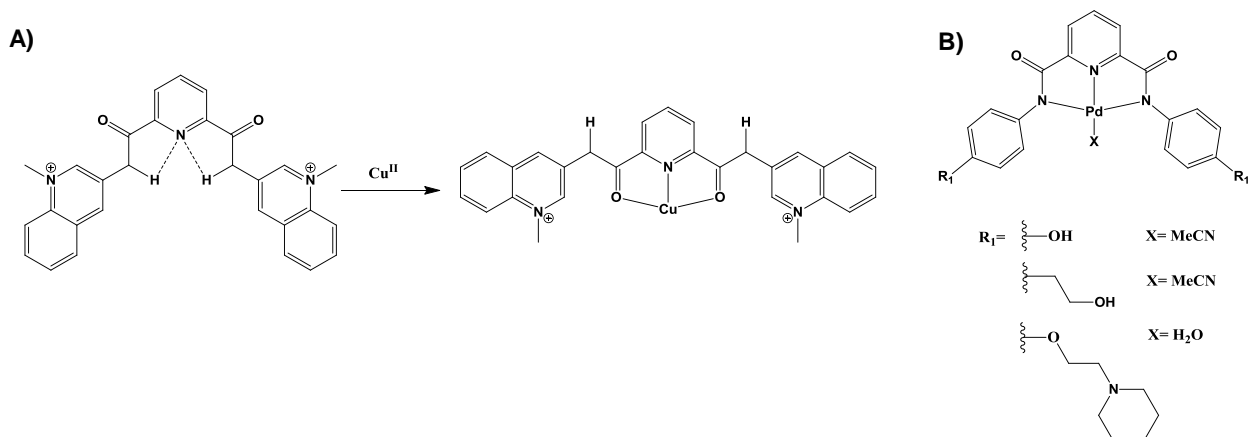


Schéma 1 A) Changement de conformation du ligand 360A en présence de Cu^{II} B) Ligand de type pyridine complexant le palladium

iii) Complexes de type salphen et salen

En tant que ligands plans possédant des cycles hétéroaromatiques, les complexes de type salphen (*N,N'*-bis(salicylidene)-1,2-diaminobenzène) peuvent s'avérer être des ligands intéressants de G-quadruplexes (Figure 62). Les premières études sur ces molécules ont été effectuées par J.E. Reed et *al.* sur deux complexes de nickel¹⁵². Dans un second temps d'autres complexes avec d'autres chaînes latérales et différents métaux ont été testés¹⁵³. Dans le cas du nickel les molécules se sont avérées avoir un fort pouvoir stabilisant sur les G-quadruplexes (ΔT_m jusqu'à 33,2°C) et être de bons inhibiteurs de la télomérase (TRAP IC₅₀ 0,14µM) et sélectifs par rapport au duplexe (50 fois). Il apparaît lors de ces travaux que l'utilisation de métaux permettant au ligand de présenter une face plane pour interagir par « π -stacking » sur une tétrade (Cu^{II} ou Ni^{II}) est préférentielle par rapport à d'autres ligands testés comme le Zn^{II} ou le V^{IV}. De même, l'utilisation de Salphen par rapport à des Salen (*N,N'*-bis(salicylidene)ethylenediamine) (semble préférable, vraisemblablement à cause de la présence d'un cycle aromatique supplémentaire. Ceci est confirmé lors d'une étude par Che et *al* sur d'autres complexes du même type¹⁵⁴. Lors de cette étude, des ligands salphen ont également été identifiés dont certains capables d'inhiber à 25µM l'expression de *C-myc*, tout en possédant une bonne sélectivité pour celui-ci par rapport aux duplexes.

152 Reed, J. E.; Arnal, A. A.; Neidle, S.; Vilar, R., Stabilization of G-Quadruplex DNA and Inhibition of Telomerase Activity by Square-Planar Nickel(II) Complexes. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (18), 5992-5993.

153 Arola-Arnal, A.; Benet-Buchholz, J.; Neidle, S.; Vilar, R. n., Effects of Metal Coordination Geometry on Stabilization of Human Telomeric Quadruplex DNA by Square-Planar and Square-Pyramidal Metal Complexes. *Inorg Chem* **2008**, *47* (24), 11910-11919.

154 Wu, P.; Ma, D.-L.; Leung, C.-H.; Yan, S.-C.; Zhu, N.; Abagyan, R.; Che, C.-M., Stabilization of G-Quadruplex DNA with Platinum(II) Schiff Base Complexes: Luminescent Probe and Down-Regulation of *c-myc* Oncogene Expression. *Chem Eur J* **2009**, *15* (47), 13008-13021.

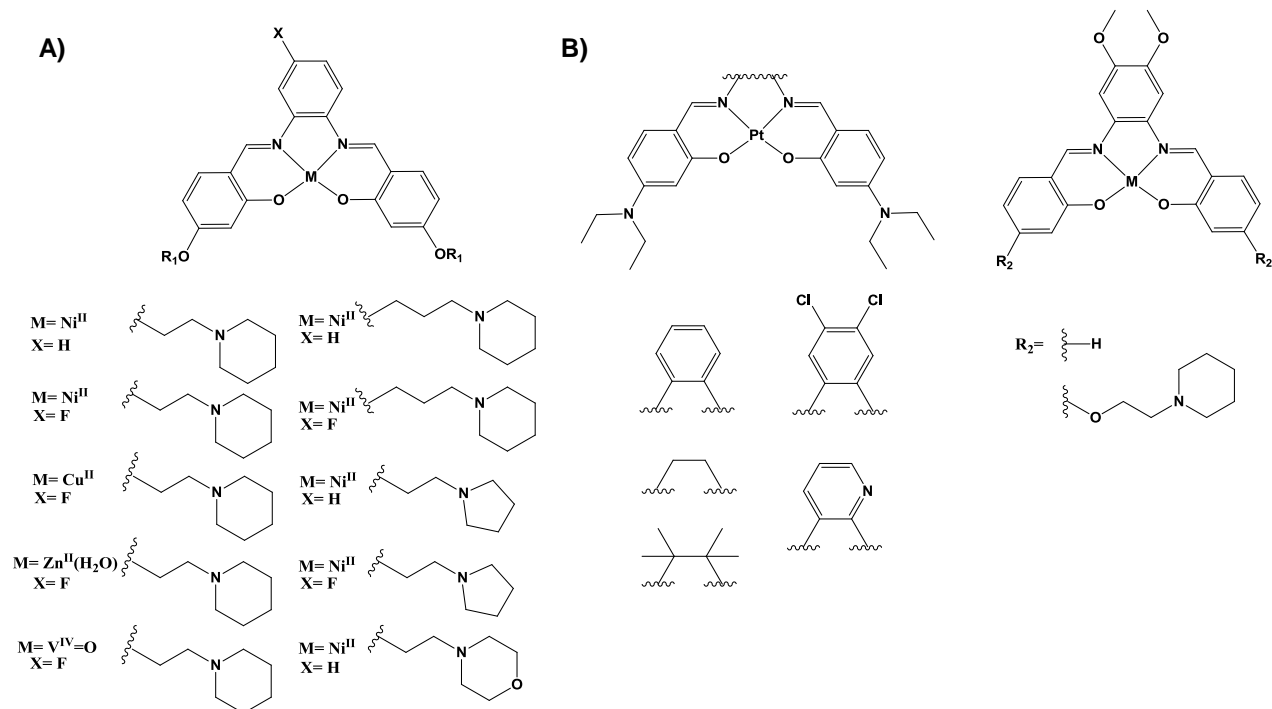


Figure 62 Structure chimique des molécules de type Salphen A) ligands utilisés par J.E Reed et al. B) ligands utilisés par l'équipe de C.M. Che.

iv) Terpyridines

D'autres complexes non macrocycliques ont également été testés pour interagir avec les G-quadruplexes. Différents dérivés de terpyridine ou de tolylterpyridine ont par exemple été étudiés par les équipes de M-P. Teulade-Fichou¹⁵⁵ et de R. Vilar¹⁵⁶ (Figure 63A). Ici, non seulement l'ajout de métal permet d'augmenter l'affinité des terpyridines pour le G-quadruplexe et de nouveau, il a été observé que les complexes plans (Pt^{II} ou Cu^{II}) présentent les meilleures affinités. Il est également intéressant de constater que l'ajout d'une charge positive (présence de polyamines) dans le cas du Pt^{II} sur le groupement tosyl augmente la stabilité du G-quadruplexe en présence de molécule mais diminue sa sélectivité. D'autres travaux également ont montré que l'affinité de la molécule augmente légèrement par l'ajout d'amine cyclique sur cette chaîne. Il a par contre été observé que l'ajout d'un second complexe métallique pour agir avec l'ossature de l'ADN¹⁵⁷ augmentait de près de dix fois l'affinité de ces ligands. De plus, les complexes bimétalliques obtenus (de Pt^{II} et de Cu^{II}) sont également environ cent fois plus sélectifs pour les G-quadruplexes (Figure 63B) que pour les duplexes.

155 Bertrand, H.; Monchaud, D.; De Cian, A.; Guillot, R.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P., The importance of metal geometry in the recognition of G-quadruplex-DNA by metal-terpyridine complexes. *Org Biomol Chem* **2007**, 5 (16), 2555-2559.

156 Suntharalingam, K.; White, A. J. P.; Vilar, R., Synthesis, Structural Characterization, and Quadruplex DNA Binding Studies of Platinum(II)-Terpyridine Complexes. *Inorg Chem* **2009**, 48 (19), 9427-9435.

157 Suntharalingam, K.; White, A. J. P.; Vilar, R., Two Metals Are Better than One: Investigations on the Interactions between Dinuclear Metal Complexes and Quadruplex DNA. *Inorg Chem* **2010**, 49 (18), 8371-8380.

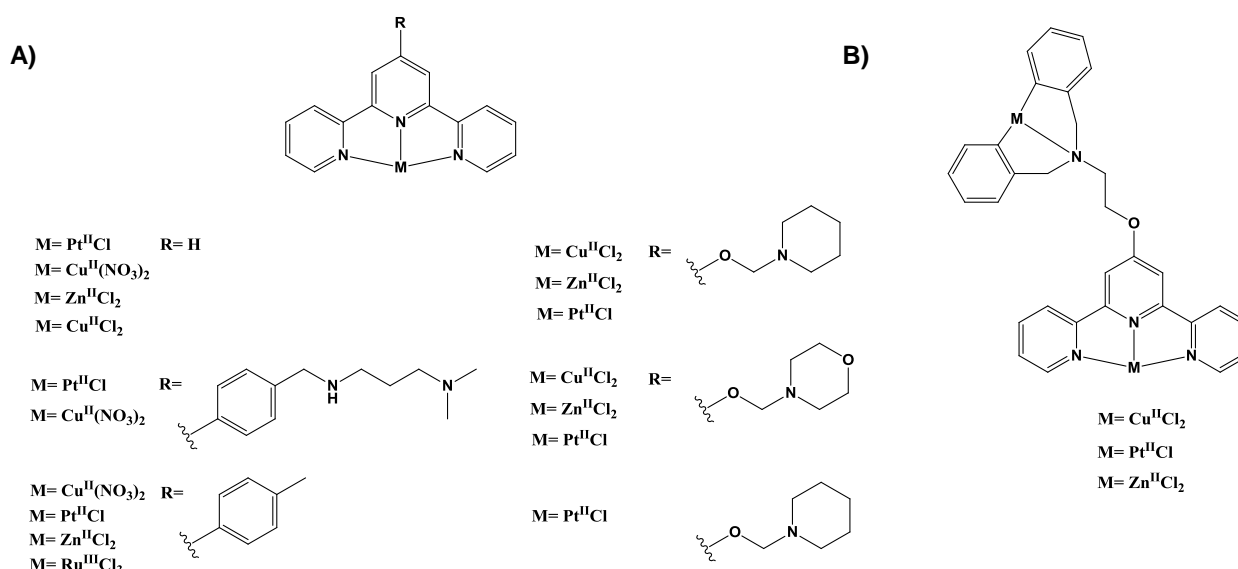


Figure 63 Structures des terpyridines :A) ligands de G-quadruplexes monométalliques et B) Complexes bimétalliques

v) Phénanthrolines et dérivés

L'ajout de Pt^{II} à des phénanthrolines ou des dérivés influence leur capacité à agir sur le G-quadruplexe (Figure 64A)^{151,158}. Les premières molécules à avoir été testées ont été substituées sur un de leur cycle azoté par l'utilisation de lien amide. La présence de métal sur la molécule est préférable pour qu'elle ait son effet de stabilisation sur le G-quadruplexe et une forte sélectivité. Suite à ces travaux, il a été envisagé d'augmenter la surface aromatique présentée par le ligand en utilisant des phénanthroimidazoles substituées (Figure 64B)¹⁵⁹. Dans ce cas, les ligands se sont avérés avoir une affinité de l'ordre de la centaine de nanomolaire et une bonne sélectivité (entre 10 et 100 selon les molécules). Des cycles de type pyridophenazine (Figure 64C) ou bien des phénylpyridines C-coordinées (Figure 64D)¹⁶⁰ ont également été choisis pour complexer le Pt^{II}. Certains de ces complexes présentent ainsi une affinité plus de 800 fois supérieure à celles obtenues avec le duplexe et une IC₅₀ de 760nM. Des métaux comme le ruthénium ou le nickel ont également été complexés à des phénanthrolines ou des dérivés mais leur affinité a été reconnue comme étant modeste ou faible. Le mode d'interaction se fait vraisemblablement avec les boucles de la structure.

158 (a) Wang, J.-T.; Zheng, X.-H.; Xia, Q.; Mao, Z.-W.; Ji, L.-N.; Wang, K., 1,10-Phenanthroline platinum(ii) complex: a simple molecule for efficient G-quadruplex stabilization. *Dalton Trans* **2010**, 39 (31), 7214-7216; (b) Reed, J. E.; Neidle, S.; Vilar, R., Stabilisation of human telomeric quadruplex DNA and inhibition of telomerase by a platinum-phenanthroline complex. *Chem Commun* **2007**, (42), 4366-4368.

159 Kiełtyka, R.; Fakhoury, J.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F., Platinum Phenanthroimidazole Complexes as G-Quadruplex DNA Selective Binders. *Chem Eur J* **2008**, 14 (4), 1145-1154.

160 Ma, D.-L.; Che, C.-M.; Yan, S.-C., Platinum(II) Complexes with Dipyridophenazine Ligands as Human Telomerase Inhibitors and Luminescent Probes for G-Quadruplex DNA. *J Am Chem Soc* **2008**, 131 (5), 1835-1846.

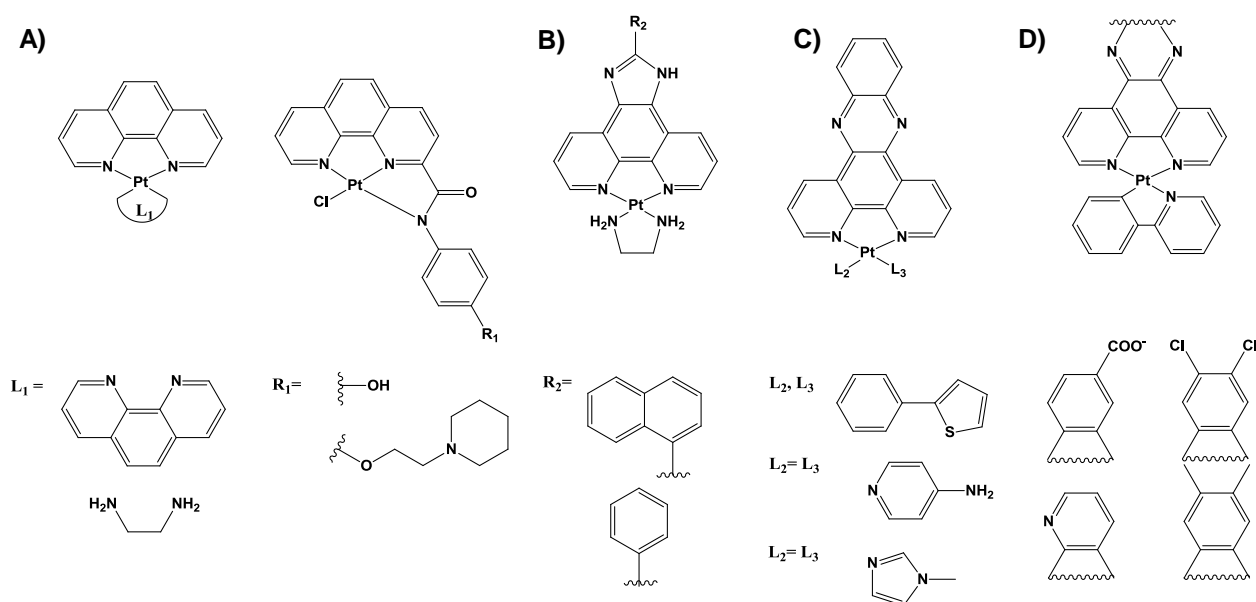


Figure 64 Structure ligands de G-quadruplexes dérivées de phénanthrolines
 A) Phénanthrolines B) Phénanthroimidazoles C) pyridophenazine
 D) phénylpyridines C-coordinées

1e. Assemblages supramoléculaires

Il a été montré précédemment, à travers les travaux de l'équipe de D. Monchaud, que la chimie supramoléculaire pouvait être utilisée pour obtenir des ligands de G-quadruplexe, notamment à travers les exemples du DOTASQ et du PorphyTASQ (Voir Introduction). D'autres édifices supramoléculaires plus complexes utilisant les métaux ont également été élaborés. Ainsi un cube moléculaire (Figure 65A), basé également sur l'utilisation de deux porphyrines de Zn^{II}, reliées entre elles par des complexes de Ru^{II} a été synthétisé¹⁶¹. Si son affinité pour le quadruplexe semble intéressante, il s'avère que sa sélectivité par rapport au duplexe est faible (environ 2). De même, un ligand carré aux dimensions d'une tétrade a été synthétisé par l'équipe de H.F. Sleiman¹⁶². L'obtention d'une telle géométrie repose sur la géométrie plan carré du platine II (Figure 65B). Ce ligand possède une bonne TRAP IC₅₀ de 0,197 μM et malgré le fait que la molécule est fortement chargée positivement, elle n'interagit que faiblement sur le duplexe.

161 Barry, N. P. E.; Abd Karim, N. H.; Vilar, R.; Therrien, B., Interactions of ruthenium coordination cubes with DNA. *Dalton Trans* **2009**, (48), 10717-10719.

162 Kieltyka, R.; Englebienne, P.; Fakhoury, J.; Autexier, C.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F., A Platinum Supramolecular Square as an Effective G-Quadruplex Binder and Telomerase Inhibitor. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (31), 10040-10041.

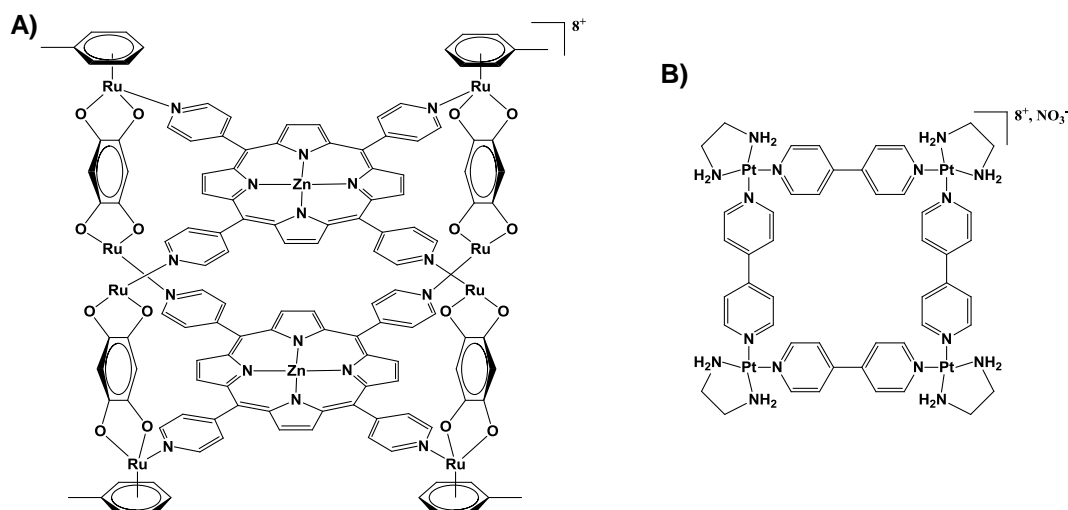


Figure 65 Edifices supramoléculaires ligands de G-quadruplexes

1.2. Résonance plasmonique de surface

Dans le but de déterminer l'interaction entre un ligand et un G-quadruplexe, de nombreux outils ont été développés¹⁶³. Parmi ceux-ci, on retrouve l'utilisation de la résonance plasmonique de surface (SPR)¹⁶⁴. Cette technique, développée dans les années 70 par H. Raether et K. Welford¹⁶⁵, repose sur la capacité d'un métal (classiquement l'or) à effectuer un plasmon lorsqu'il rencontre une lumière polarisée en conditions de réflexion totale (Figure 66)¹⁶⁶. Ceci ne peut se faire que lorsqu'il est entre deux milieux d'indice de réflexion différents (classiquement du verre et un milieu biologique pour les études). Ainsi, *via* l'utilisation d'un prisme, lorsqu'une lumière polarisée frappe une surface, une partie va être réfractée et une autre réfléchi. Dans les conditions de réflexion totale, une onde évanescente se crée et entre en résonance avec les électrons libres des couches électroniques périphériques du métal à la surface. Il en résulte la formation d'un plasmon qui entraîne une diminution de l'intensité du rayon réfléchi. Lorsque l'angle formé par le faisceau réfléchi varie, l'intensité du rayon réfléchi varie également. Pour un certain angle, appelé angle de résonance, cette valeur est minimum et c'est sa variation qui est suivie par SPR. En effet, la variation de l'indice de réfraction sur la surface d'or entraîne une variation de l'intensité du plasmon faisant ainsi varier l'angle minimum. De ce fait, des études sur les phénomènes à la surface peuvent être effectuées et ceci en temps réel en suivant les variations de cet angle.

163 (a) Jaumot, J.; Gargallo, R., Experimental Methods for Studying the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands. *Curr Pharm Des* 18 (14), 1900-1916; (b) Murat, P.; Singh, Y.; Defrancq, E., Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chem Soc Rev* 2011, 40 (11), 5293-5307.

164 Redman, J. E., Surface plasmon resonance for probing quadruplex folding and interactions with proteins and small molecules. *Methods* 2007, 43 (4), 302-312.

165 Pockrand, I.; Raether, H., Surface plasma oscillations at sinusoidal silver surfaces. *Appl Opt* 1977, 16 (7), 1784-1786.

166 (a) Rich, R. L.; Myszk, D. G., Grading the commercial optical biosensor literature—Class of 2008: 'The Mighty Binders'. *J Mol Recognit* 2010, 23 (1), 1-64; (b) Wilson, W. D., Analyzing Biomolecular Interactions. *Science* 2002, 295 (5562), 2103-2105; (c) Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002, 1 (7), 515-528.

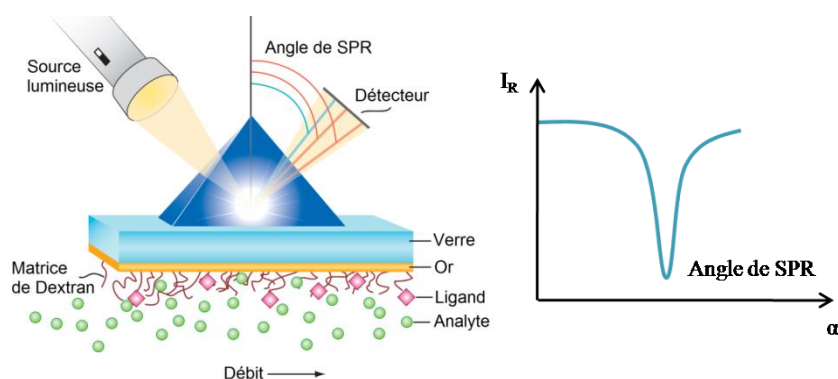


Figure 66 Représentation schématique d'un système de SPR

En SPR, lorsqu'une molécule libre en solution (appelée analyte), entraînée par un débit, entre en contact avec une autre molécule adsorbée à la surface d'or (appelée ligand), la variation de masse à la surface, et donc de l'indice de réfraction, entraîne des changements de l'angle de résonance permettant ainsi les études. Une variation de $0,1^\circ$ de ce dernier correspond à une valeur arbitraire de 1000 RU (pour Resonance Unit). L'évolution de l'angle de résonance au cours du temps est appelé sensorgramme (Figure 67). Ce dernier se distingue classiquement en trois phases distinctes : la première est une phase d'association entre l'analyte et le ligand. Suit alors une phase d'équilibre thermodynamique pendant laquelle les échanges avec le ligand sont constants puis arrive en dernier lieu une phase de dissociation. Il faut noter que souvent une phase supplémentaire de régénération est nécessaire pour arriver à décrocher l'analyte du ligand et pouvoir ainsi réutiliser la piste. En effet, les mesures par SPR reposent sur l'étude de sensorgrammes à différente concentration, nécessitant ainsi plusieurs utilisation de la piste.

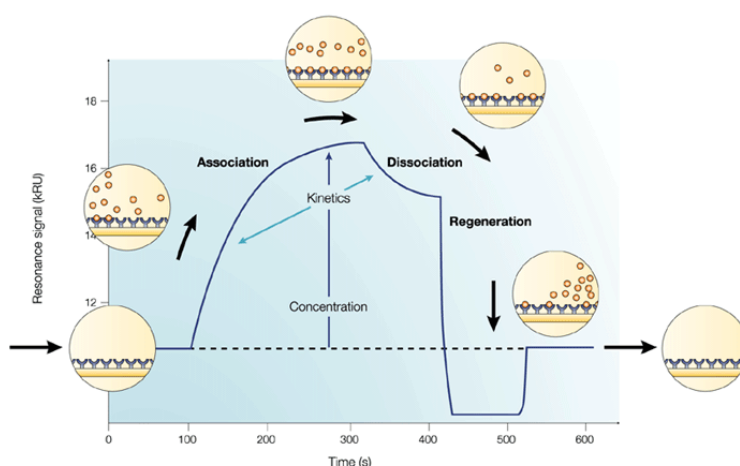


Figure 67 Représentation schématique d'un sensorgramme

Deux approches peuvent être utilisées pour interpréter les sensorgrammes. La première est une approche thermodynamique, fondée sur la réponse à l'équilibre en fonction de la

concentration, approche qui permet d'obtenir une constante d'équilibre de dissociation (K_d). La seconde approche est cinétique et repose sur une modélisation adéquate des phases d'association et de dissociation de chaque sensorgramme obtenu à différente concentration. Ceci permet d'obtenir les constantes cinétiques d'association (k_a) et de dissociation (k_d) qui permettent également de déterminer la constante K_d par l'équation 1. Le détail des méthodes de détermination des constantes thermodynamiques et cinétiques des modèles sera donné par la suite.

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = \frac{1}{K_d} \text{ (équation 1)}$$

Ces dernières années, cette technique a été utilisée de nombreuses fois pour étudier les interactions avec des biomolécules dont les G-quadruplexes¹⁶⁴. Dans ce cas, plusieurs approches ont été utilisées lors de ces études de surface. Il peut s'agir de l'ODN qui fait office de ligand, relié à la surface, ou bien qui sert d'analyte lors d'étude sur des une protéine par exemple. De façon plus occasionnelle, une molécule organique peut servir de ligand. Lorsque l'ODN est relié à la surface ceci se fait classiquement soit par l'utilisation d'une fonction thiol (en 5' ou en 3') qui réagit sur l'or de la surface, soit au moyen d'une biotine qui interagira alors sur une puce fonctionnalisée par une streptavidine. Les protéines, quant à elles, sont classiquement reliées à la surface par la formation d'amides entre leurs fonctions amines et la fonction acide carboxylique d'un dextran. Quant aux molécules organiques, les techniques varient selon toutes les méthodes présentées jusqu'à maintenant. Il est important de noter que même si cette technique s'effectue sur surface, les constantes qui ont été observées sont similaires à celles obtenues dans d'autres études reposant sur des techniques où les G-quadruplexes sont en solution.

1.3. Utilisation de mime de G-quadruplexe parallèle dans le cadre d'un test de screening par SPR

Le mime **1** présenté précédemment (voir introduction, p57), de par la présence d'une biotine sur sa face inférieure, a pu être utilisé pour fonctionnaliser une surface et étudier ainsi par SPR les interactions de ligands avec les G-quadruplexes¹³⁶. Le système Biacore[®] utilisé pour ces études permet d'effectuer le suivi en parallèle de quatre pistes fonctionnalisées différemment. Ceci a permis d'obtenir des données sur des ligands en utilisant des mimes de différentes structures d'ODN (Figure 68). Ainsi *via* ce test, plusieurs caractéristiques des ligands peuvent être obtenues : leur affinité directe de la structure G4, leur sélectivité par rapport au duplexe ainsi qu'une idée de leur mode d'interaction. Une première piste non fonctionnalisée sert de référence. La deuxième

piste est fonctionnalisée par le mème **1**. Celui-ci fait office de G-quadruplexe simple, sans boucle ni brin antiparallèle en comparaison d'un second mème de G-quadruplexe **3**, monobrin replié sur lui-même formant ainsi des boucles et des sillons de tailles différentes. Ce dernier, présent sur une troisième piste, présente la séquence télomérique humaine qui a été choisie 5'-(GGGTTA)₃GGGTT-3, comme cela a été choisi pour le mème **1**. Enfin, un troisième mème **2** représentant un « hairpin » est présent sur la dernière piste libre. Il a été choisi d'utiliser de façon systématique le gabarit peptidique couplé aux séquences oligonucléotidiques afin d'obtenir des surfaces les plus similaires.

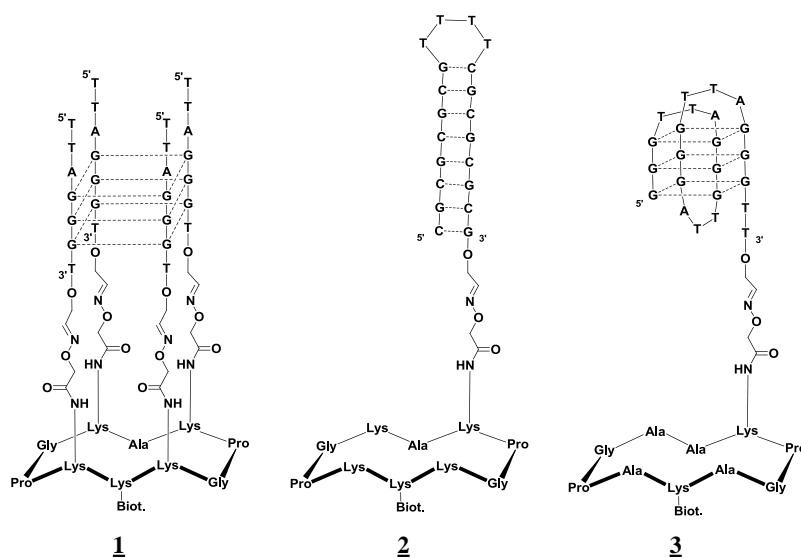


Figure 68 Structure chimique des différents mèmes d'ODN utilisé par SPR.

Lors de ce test, différentes informations peuvent alors être déterminées selon le comportement du ligand sur les différentes pistes et donc vis-à-vis des différents mèmes :

- L'affinité du ligand pour le G-quadruplexe est l'un des critères les plus importants. Elle peut être déterminée par SPR sur les deux mèmes **1** ou **3**. Toutefois dans le cadre d'étude, c'est sur le mème **3** que la valeur obtenue est la plus pertinente du fait qu'elle représente la séquence naturelle monobrin présente sur les télomères.

- La comparaison des affinités du ligand pour le G4 intramoléculaire **3** et le duplexe **2** permet d'estimer la sélectivité par rapport au duplexe. Il a été choisi d'utiliser une séquence riche en guanine sur le duplexe par similarité avec le G-quadruplexe. La sélectivité repose sur le rapport entre l'affinité pour le G-quadruplexe et l'affinité pour le duplexe.

- Enfin en comparant les constantes de dissociations des mèmes intermoléculaire **1** (K_D^{inter}) et intramoléculaire **3** (K_D^{intra}), une idée du mode d'interaction du ligand pour le G-quadruplexe

peut être obtenue. Ainsi une molécule présentant une affinité plus élevée pour le mime intermoléculaire, dont l'accessibilité aux tétrades est moins contrainte, interagira vraisemblablement par « π -stacking ». Un mode de réponse privilégiant le mime **3** indiquera vraisemblablement une préférence du ligand pour interagir avec les boucles d'une structure et qui ne sont présentes uniquement sur le mime **3**. Enfin une affinité similaire pour les deux mimes pourra indiquer un mode d'interaction avec les sillons. Afin de confirmer ce mode réponse, différents ligands dont le mode d'interaction est connu ont été testés (Tableau 3). Les modes d'interaction ont été modélisés à l'aide d'une échelle, le G4-BMI (G4 Binding Mode Index) qui résulte du rapport :

$$G4BMI = \frac{K_D^{\text{intra}}}{K_D^{\text{inter}}}$$

Ligand	G-quadruplexe 1 intermoléculaire				G-quadruplex 3 intramoléculaire				Duplex 2			
	K_D eq (M)	k_a (1/M.s)	k_d (1/s)	K_D cin (M)	K_D eq (M)	k_a (1/M.s)	k_d (1/s)	K_D cin (M)	K_D eq (M)	k_a (1/M.s)	k_d (1/s)	K_D cin (M)
TMPyP ₄	2.5×10^{-8}	1.2×10^6	0.027	2.3×10^{-8}	3.9×10^{-7}	2.9×10^5	0.056	1.9×10^{-7}	2.6×10^{-7}	2.2×10^9	509.2	2.3×10^{-7}
MMQ ₁ *	8.0×10^{-7}	6.8×10^4	0.028	4.1×10^{-7}	3.9×10^{-6}	4.1×10^4	0.057	1.4×10^{-6}	1.8×10^{-5}	7482	0.17	2.4×10^{-5}
MMQ ₃ *	6.4×10^{-8}	2.7×10^6	0.153	5.7×10^{-8}	2.8×10^{-7}	2.6×10^6	0.351	1.3×10^{-7}	1.2×10^{-6}	7.0×10^4	0.082	1.2×10^{-6}
FRHR	4.0×10^{-3}	nd	nd	nd	4.2×10^{-3}	nd	nd	nd	5.3×10^{-3}	nd	nd	nd
Distamycin A	1.9×10^{-4}	15.34	0.003	2.1×10^{-4}	2.8×10^{-4}	731.0	0.190	2.6×10^{-4}	2.9×10^{-4}	717.2	0.222	3.1×10^{-4}
DODC	1.3×10^{-5}	9.2×10^4	0.903	9.8×10^{-6}	7.9×10^{-6}	4.6×10^4	0.246	5.3×10^{-6}	nd	nd	nd	nd

Tableau 3 Evaluation de ligands par le test de SPR

Pour les raisons explicitées précédemment, un G4-BMI supérieur à 1 indique un ligand interagissant par « π -stacking ». Une valeur proche de 1 est révélateur d'interactions préférentielles sur les sillons et enfin une valeur inférieure à 1, d'une interaction principale avec les boucles. L'intérêt d'une telle échelle est simplement d'obtenir une idée principale des processus (Figure 69). Elle ne permet pas de déterminer de façon précise le mode d'interaction.

Ligand	Sélectivité	G ₄ -BMI	Mode d'interaction
TMPyP ₄	1.2	0.94	Empilement
MMQ1	21.6	0.53	Empilement
MMQ3	8.9	0.37	Empilement
FRHR	1.2	0.02	Sillons
Distamycin A	0.5	0.09	Sillons
DODC	<i>nd</i>	-0.22	Boucles

Figure 69 Caractérisation des ligands selon leur G₄-BMI et leur sélectivité

Par exemple, lors de ces études, la porphyrine TMPyP₄ a été évaluée. Elle agit sur le mime parallèle **1** par une interaction de type 1:1 laissant suggérer de « l'end-stacking » comme mode d'interaction principal tel que ceci est reporté pour un G-quadruplexe similaire lors des études effectuées par l'équipe de Yamamoto¹⁶⁷. Par contre le phénomène apparaît être plus complexe lors de l'interaction avec le mime intramoléculaire **3** possédant des boucles, ce qui coïncide avec les expériences réalisées précédemment¹⁰⁴. Il faut noter que le G₄-BMI de 8,35 ne permet de déterminer que le mode d'interaction principal. Les constantes d'affinités observées sont également en accord avec les analyses antérieures et le manque de sélectivité de la molécule par rapport au duplexe est également retrouvé.

¹⁶⁷ Mita, H.; Ohyama, T.; Tanaka, Y.; Yamamoto, Y., Formation of a Complex of 5,10,15,20-Tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)-21H,23H-porphyrin with G-Quadruplex DNA†. *Biochemistry (Mosc)* **2006**, *45* (22), 6765-6772.

II. Résultats et Discussions

II.1. Influence des métaux lors de l'interaction de porphyrines dérivées de la TmpyP4

1a. Présentation des molécules étudiées

La première étude a été effectuée sur différents complexes porphyriniques dérivés de la TmpyP4 (Figure 70). En effet, le métal va influencer sur la façon dont un ligand interagit avec un G-quadruplexe. Le but est de compléter des études effectuées antérieures et ainsi de mieux comprendre comment la géométrie d'un ligand va influencer son interaction. Six molécules ont été testées : quatre dérivés complexant le Nickel (NiT), le manganèse (MnT), le Cobalt (CoT) ou bien l'or (AuT) ainsi que la TmpyP4 (H2T) non complexée afin de s'assurer de l'homogénéité des résultats. Des études complémentaires sur le ligand MnLB (voir p63) ont également été réalisées. Ces résultats ont été regroupés dans la publication présentée en fin de chapitre dans laquelle sont présentés les différents sensorgrammes obtenus¹⁶⁸.

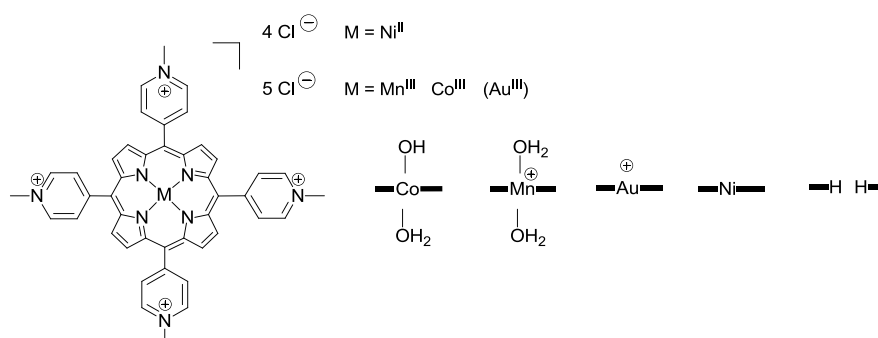


Figure 70 Présentation des différents complexes dérivés de la TmpyP4

1b. Préparation du test et études préliminaires

Les études sont réalisées en milieu salin (HEPES 10mM ; NaCl 0,15M; KCl 0,2M; surfactant P20 0,05%(v/v)) afin de permettre le repliement et la stabilisation des structures. Par rapport aux études précédentes, l'EDTA (Acide éthylène diamine *tétraacétique*) a été retiré du milieu afin de s'assurer qu'il ne puisse pas complexer les métaux présent dans les porphyrines. Il a également été vérifié que les réponses obtenues étaient similaires à celles obtenues avec la porphyrine testée lors des études précédentes.

168 Romera, C.; Bombarde, O.; Bonnet, R.; Gomez, D.; Dumy, P.; Calsou, P.; Gwan, J.-F.; Lin, J.-H.; Defrancq, E.; Pratviel, G., Improvement of porphyrins for G-quadruplex DNA targeting. *Biochimie* **2011**, 93 (8), 1310-1317.

L'immobilisation des molécules sur la piste s'est effectuée sur une puce de type SA (dextran préfonctionnalisé par des streptavidines) pour interagir avec les biotines présentes sur les différents mimes. Afin que le seuil de réponse soit du même ordre de grandeur que lors des expériences précédentes, il a été immobilisé sur chaque piste la même quantité de produit (430 RU environ). Chaque molécule étant un conjugué oligonucléotide-peptide possédant une masse moléculaire similaire, il a pu être estimé qu'un signal similaire d'immobilisation correspondait à une même quantité de conjugué immobilisé.

Avant de commencer les études sur les différentes molécules, il a fallu s'assurer que certains paramètres étaient respectés. Pour cela deux tests préliminaires ont été réalisés. Tout d'abord, il a fallu s'assurer qu'aucun phénomène de transfert de masse n'intervenait lors des interactions ligand-analyte et dans un second temps s'assurer que les temps d'association étaient suffisants pour atteindre les phases d'équilibre thermodynamique. Supprimer le transfert de masse n'est pas obligatoire lors d'études, cependant, ceci permet de limiter le nombre de paramètres intervenant lors des modélisations. Dans ce but, des premières études à différents débits sur chacune des molécules ont été effectuées pour chacun des ligands jusqu'à obtenir un débit limite à partir duquel les cinétiques des ligands restent les mêmes. Pour chacune des porphyrines, il a été conclu qu'un débit de $30\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ était adapté pour effectuer les mesures.

L'étude sur le temps d'injection des molécules a également été effectuée par la suite pour chacune des molécules. Pour la plupart des molécules un temps d'association mesuré de 300s secondes semble suffisant sauf pour les molécules MnT et CoT pour lesquelles un temps d'association de 600s est nécessaire (Figure 71). Il faut noter que ce temps d'association est le temps maximum accessible sur la machine et qu'après ce temps, la phase de stabilisation semble avoir à peine débuté. Ce phénomène peut éventuellement s'expliquer soit par une cinétique d'association très longue pour ces molécules soit par la présence importante de phénomènes de « stacking » (*vide infra*).

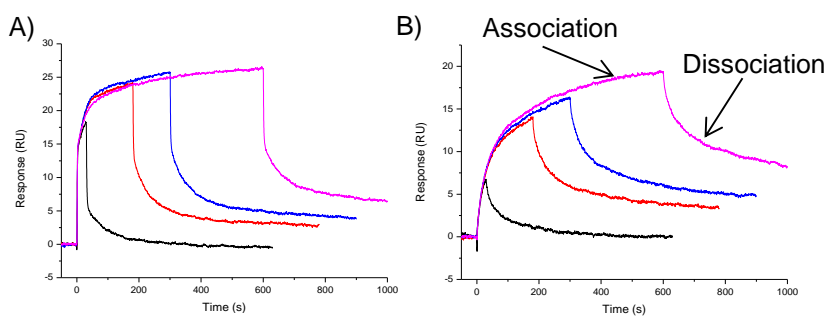


Figure 71 Détermination du temps d'association des ligands : AuT (à 500nM à gauche) et MnT (5µM à droite) à un débit de 30µL.min⁻¹ (à 25°C, la piste de référence est soustraite)

Les conditions de régénération sont restées celles classiquement utilisées (Glycine-HCl à un pH de 2) excepté pour MnLB pour qui des difficultés ont été rencontrées et qui a nécessité l'utilisation d'un surfactant (SDS 0,05% dans une solution d'eau:acétonitrile 3:1).

1c. Modélisation des résultats

La méthode de SPR Biacore[®] permet deux approches possibles pour interpréter un sensorgramme : l'approche thermodynamique et l'approche cinétique. Les études thermodynamiques reposent sur l'étude de la valeur de RU obtenu pendant l'état d'équilibre, R_{eq} , et ceci selon la concentration de l'analyte. Lorsque tous les récepteurs de la surface sont saturés, R_{eq} atteint une valeur maximum R_{max} . La détermination par thermodynamique repose sur le modèle de Langmuir qui définit la relation suivante pour un isotherme :

$$R_{eq} = \frac{K_a \cdot C}{(1 + K_a \cdot C)} \times R_{max} \text{ (équation 2)}$$

A partir de ce modèle, une simple linéarisation permet d'aboutir à la construction d'un modèle de Scatchard :

$$\frac{R_{eq}}{C} = n \cdot K_a \cdot R_{max} - K_a \cdot R_{eq} \text{ (équation 3)}$$

Les graphes de Scatchards permettent de déterminer la façon dont vont être modélisés les sensorgrammes de façon cinétique car ils permettent d'obtenir une idée sur les interactions du ligand avec le G-quadruplexe. Lorsque le modèle obtenu est linéaire, il reflète une interaction de stœchiométrie de type 1:1 entre le ligand et l'analyte. Par contre, l'obtention de courbes non-linéaires reflète un mode d'interaction plus complexe et nécessite des modélisations plus élaborées (voir partie expérimentale). Afin d'obtenir les résultats les plus probants possibles, les deux approches thermodynamiques et cinétiques ont été appliquées en parallèle.

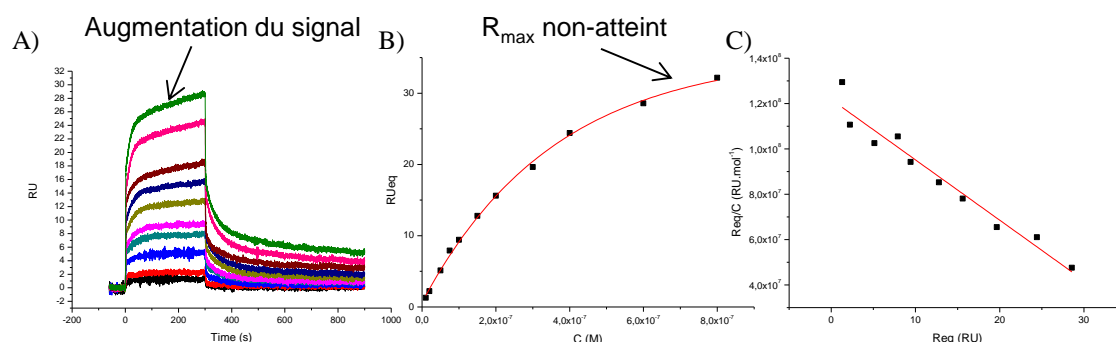


Figure 72 Etude sur le ligand AuT sur la piste 2 (G-quadruplex **1**) A) Sensorgrammes de 10 à 600 μ M B) Isotherme de Langmuir et C) graphe de Scatchard en résultant. La linéarité du graphe indique un modèle d'interaction 1:1 (mesures à 25°C- la piste de référence a été soustraite)

Il est important de noter que, dans le cas des ligands étudiés, la phase d'équilibre (Ru_{eq}) ne semble jamais être complètement atteinte sur les sensorgrammes faisant intervenir les deux quadruplexes **1** et **3**. De même, lors de la construction des isothermes de Langmuir aucun signal de Ru_{max} ne semble être atteint pour chacune de ces deux pistes. Par contre, ce phénomène ne se produit pas dans le cas du duplexe. Ces différents résultats pourraient principalement s'expliquer par des phénomènes d'empilement des molécules entre elles lors des études à haute concentration : il est en effet envisageable d'expliquer l'augmentation linéaire de Ru_{eq} obtenue au cours du temps par l'ajout de porphyrines supplémentaires sur celles qui auraient déjà interagi avec la tétrade de guanines par « stacking ». L'intercalation dans le duplexe ne pouvant faire intervenir ce phénomène, il semble cohérent que celui-ci ne se produise pas dans son cas. Ainsi les résultats obtenus par la construction des modèles de Langmuir qui reposent sur l'évolution de la courbe peuvent manquer de précision (essentiellement pour les molécules TMPyP4 et MnT). De même les modélisations cinétiques peuvent être légèrement faussées par les phénomènes d'augmentation du signal sur les sensorgrammes. Les données pour les modélisations de chacune des porphyrines étudiées sont répertoriées dans le Tableau 4.

Ligand étudié	Mime intermoléculaire 1				Mime intramoléculaire 3				Mime de duplexe 2				G4-BMI	Sélectivité
	K_d^{eq} (M)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d^{kin} (M)	K_d^{eq} (M)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d^{kin} (M)	K_d^{eq} (M)	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d^{kin} (M)		
H2T	$6,2 \cdot 10^{-8}$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$	$3,5 \cdot 10^{-7}$	$9,2 \cdot 10^2$	$7,6 \cdot 10^{-4}$	$8,3 \cdot 10^{-7}$	$3,4 \cdot 10^{-7}$	$4,8 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^{-1}$	$6,3 \cdot 10^{-7}$	6,9	0,8
NiT	$5,7 \cdot 10^{-8}$	$9,9 \cdot 10^5$	$6,5 \cdot 10^{-2}$	$6,5 \cdot 10^{-8}$	$2,4 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^{-1}$	$1,6 \cdot 10^{-7}$	$2,0 \cdot 10^{-7}$	$2,7 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^{-2}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$	2,4	0,9
AuT	$4,6 \cdot 10^{-7}$	$3,0 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$5,2 \cdot 10^{-7}$	$8,0 \cdot 10^{-7}$	$1,4 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$	$2,3 \cdot 10^{-7}$	$2,5 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	2,3	0,1
MnT	$6,6 \cdot 10^{-6}$	$6,7 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^{-3}$	$5,4 \cdot 10^{-6}$	$5,6 \cdot 10^{-6}$	$5,6 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^{-3}$	$6,1 \cdot 10^{-6}$	Nd	Nd	Nd	Nd	1,1	Nd
CoT	$9,3 \cdot 10^{-6}$	$4,8 \cdot 10^+$ 2	$1,1 \cdot 10^{-}$ 3	$2,2 \cdot 10^{-}$ 6	$9,7 \cdot 10^{-}$ 6	$3,8 \cdot 10^+$ 2	$1,1 \cdot 10^{-}$ 3	$2,9 \cdot 10^{-}$ 6	Nd	Nd	Nd	Nd	1,3	Nd
MnLB	$1,7 \cdot 10^{-}$ 7	Nd.	Nd.	Nd.	1,8E-7	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	1,1	Nd.

Tableau 4 Analyses des complexes porphyriniques testés par SPR (Nd : Non déterminé).

1d. Etudes sur la TMpyP4

Les résultats obtenus avec les molécules TMpyP4 sont en accord avec les résultats obtenus précédemment sur le même système¹³⁶. Les valeurs obtenues varient quelque peu (Tableau 4) mais ceci vient vraisemblablement du fait que la porphyrine utilisée ne provient pas du même lot que celle utilisée dans les expériences précédentes (pureté différente). Ceci peut expliquer des profils de sensorgrammes légèrement différents. Les constantes d'affinité restent cependant du même ordre de grandeur. La sélectivité de la molécule reste similaire (0,8 contre une sélectivité de 1,0 lors de l'étude précédente) et le G4-BMI proche de celui calculé auparavant (6,9 contre 8,3). Il faut toutefois constater que les résultats obtenus de façon thermodynamique (K_a^{eq}) ont peut-être été surévalués et que les résultats obtenus par modélisation cinétique (K_d^{kin}) sont plus probants.

1e. Etudes sur les complexes porphyriniques dérivés de la TMpyP4

Par la suite, les autres complexes porphyriniques ont été testés. Lors de l'étude présentée dans la publication, seuls les résultats obtenus par modélisation thermodynamique ont été présentés. Toutefois dans le but d'obtenir des résultats complémentaires, les constantes obtenues de façon cinétique vont être présentées dans cette partie.

Lors de cette étude, l'utilisation des modèles de Scatchards a permis d'identifier deux types de comportements de ligands: ainsi deux porphyrines interagissent selon un modèle 1:1 (AuT et MnT) tandis que les deux autres (CoT et NiT) impliquent des modes d'interactions plus complexes (Figure 73). Pour les premières molécules, il peut être supposé que l'interaction se fait majoritairement par « end-stacking » sur le G-quadruplexe comme ceci a été observé avec la

TMPyP4. Dans le cas des autres molécules, il est probable qu'il existe différents sites d'interaction sur le G-quadruplexe. Il est toutefois possible que les phénomènes d'empilement présentés précédemment puissent influencer la réponse et le mode d'interaction. Il faut également remarquer que les modèles de Scatchard sont les mêmes pour le duplexe et pour les quadruplexes. Les molécules AuT et MnT sont toutes les deux des molécules présentant des charges dans la cavité de la porphyrine et il est possible que ce soit cette charge qui soit à l'origine d'un changement de comportement. Toutefois il est difficile d'avancer une explication plus approfondie sans étude complémentaire.

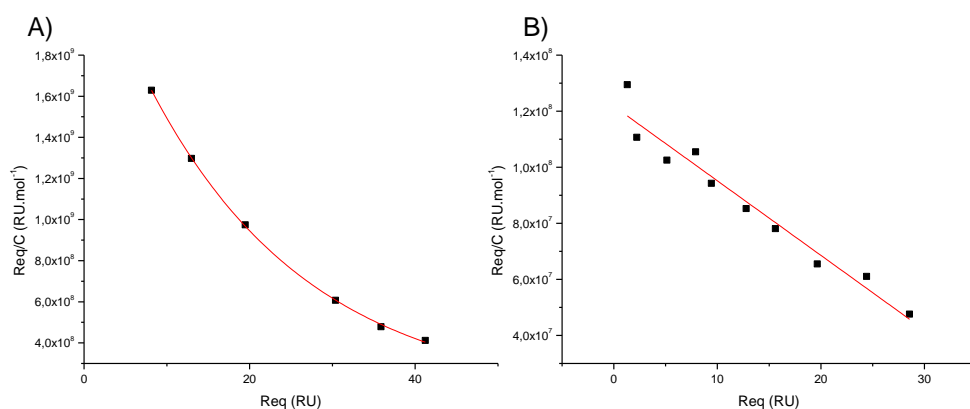


Figure 73 Exemple de modèle de Scatchards pour NiT (A) et AuT(B) lors de l'interaction sur le mime intermoléculaire de G-quadruplexe 1

Les constantes d'affinité obtenues pour les quatre complexes dérivés de la TMPyP4 sur les mimes de G-quadruplexes **1** et **3** sont regroupées dans le Tableau 4. Comparé à la TMPyP4 (H2T), le complexe porphyrinique NiT semble plus affiné tandis que les trois autres ligands le sont moins : AuT possède une affinité deux fois plus faible et il y a perte d'un ordre de grandeur pour les complexes de cobalt et de manganèse. De nouveau, les résultats obtenus sont en accord avec ce qui a été obtenu dans la littérature. Ainsi l'utilisation de ligands présentant une géométrie octaédrique (Co^{II} ou Mn^{III}) au sein de la cavité de la porphyrine diminue fortement l'affinité tout comme l'utilisation de métaux dont la taille est importante comme l'or. L'ajout d'une charge au sein de cavité de la porphyrine qui aurait pu stabiliser le quadruplexe n'apporte cependant pas de gain d'affinité sur la molécule.

Le G4-BMI des différentes molécules a également été calculé (Tableau 4) pour les différentes molécules. Encore une fois, il semblerait que ce soit une interaction de type « end-stacking » qui soit privilégiée pour les différents complexes porphyriniques (G4-BMI supérieur à 1) cependant ceci peut être discuté. Les valeurs trouvées sont très inférieures à celles obtenues pour la TMPyP4 et se rapprochent de 1, surtout dans les cas des complexes de cobalt et de manganèse.

Ceci correspondrait théoriquement à des interactions majoritairement dans les sillons du G-quadruplexe. De plus comme il a été expliqué précédemment, les molécules NiT et CoT ont des modèles de Scatchards non linéaires révélateurs d'interactions plus complexes qu'un mode d'interaction de type 1:1. Il est donc envisageable que des interactions boucles-sillons interviennent de façon non négligeable comme il a été suggéré auparavant pour MnLB, des interactions *via* les bases nucléiques des boucles pourraient également être possibles faisant ainsi varier la valeur de G4-BMI. En effet, cette échelle ne permet d'obtenir qu'une estimation du mode d'interaction principal et il est difficile de l'utiliser pour obtenir des conclusions précises sur le mode d'interaction des différentes porphyrines. D'autres études complémentaires seraient nécessaires pour arriver à comprendre l'ensemble des modes d'interaction des complexes avec les G-quadruplexes.

L'affinité des molécules pour le duplexe a été déterminée de la même façon qu'avec le quadruplexe et leur sélectivité a ainsi pu en être déduite (Tableau 4). Les complexes de nickel et d'or de la TMPyP4 sont peu sélectifs du G-quadruplexe tout comme cette dernière (voire sont plus affins pour le duplexe dans le cas de l'or). Cependant, les sensorgrammes obtenus sur le duplexe avec les complexes de cobalt et de manganèse indiquent que, dans la gamme de concentrations utilisées, aucune interaction n'est mesurable par cette technique (Figure 74). Pour ces deux ligands aucune affinité n'a pu être déterminée.

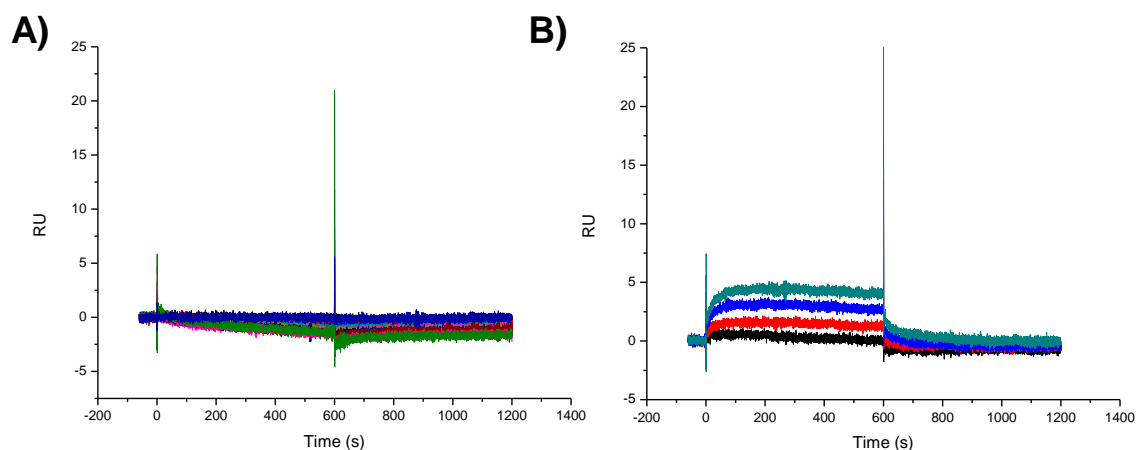


Figure 74 Sensorgrammes représentant l'interaction des complexes CoT(A) et MnT(B) sur le duplexe 2 (à 25°C - la courbe de référence a été soustraite)

Ainsi, deux familles de ligands se distinguent lors de ces études : une première catégorie (NiT et AuT) dont l'affinité est plus importante avec des constantes de dissociation de l'ordre de 10^{-7} M. L'ajout de nickel toutefois semble apporter un léger gain d'affinité. Par contre l'or, qui est

un métal volumineux, ne semble pas avoir cet effet. D'après le G4-BMI, l'interaction avec le G-quadruplexe semble se faire principalement par empilement. Cependant, la sélectivité ne semble pas pour autant être différente. En effet pour ces molécules, la comparaison des constantes aboutit à une valeur de sélectivité proche de 1.

Une seconde série de molécule (CoT et MnT) semble se distinguer. Contrairement aux autres molécules testées, ces molécules présentent une affinité plus faible pour les G-quadruplexes mais une sélectivité beaucoup plus importante par rapport au mime **2**. Ainsi il semblerait que la présence de molécule d'eau en axial sur la porphyrine empêche l'interaction dans le duplexe. Les valeurs de G4-BMI obtenue pour ces molécules pourraient indiquer des modes d'interactions différents sur les G-quadruplexes expliquant ainsi ces différences d'affinité. Toutefois, le manque de données structurales ne permet pas de conclure.

1f. Etude sur le complexe porphyrinique MnLB

En parallèle le ligand MnLB a également été testé lors de cette étude. Toutefois une interaction non spécifique du complexe avec la piste de référence et des conditions de régénération relativement compliquées d'autre part ont empêché de déterminer de façon précise les constantes d'interactions. Seules des données approximatives ont été obtenues. Si la sélectivité pour le G-quadruplexe par rapport au duplexe reste très importante, son affinité pour les G-quadruplexes semble moins importante que lors des études antérieures¹⁴¹ : une affinité de 1nM avait été retrouvées tandis que nous obtenons ici une valeur plus importante de 180nM sur le quadruplexe intramoléculaire (Tableau 4). Le G4-BMI de l'ordre de 1 pour ce ligand semblerait indiquer une interaction principale avec les sillons ou les boucles. Il s'agit vraisemblablement du même phénomène que celui rencontré avec le complexe de manganèse dérivé de la TMPyP₄. Les différences d'affinité rencontrées entre ces deux molécules est sans doute dû à la présence des bras arylamides de la molécule qui devraient interagir *via* leurs charges positives dans les sillons du quadruplexe. On est ici dans un cas limite du G4-BMI où on se retrouve en présence de molécules ayant un mode d'interaction complexe.

1g. Tests complémentaires effectués sur les molécules

D'autres tests par FRET ont été effectués par l'équipe de G.Pratviel sur ces molécules, confirmant les résultats obtenus lors de cette étude. Ils sont répertoriés dans la publication en fin de chapitre (partie IV). Cette publication met en avant les tests effectués par SPR présentés précédemment en plus d'autres études par FRET sur ces dérivés de la TMPyP₄. D'autres

molécules ayant la même structure de MnLB mais complexant d'autres métaux comme le Co^{III} ou le Ni^{II} ont également été testées par cette méthode.

1h. Bilan sur les complexes de porphyrines

Si l'étude effectuée sur les différents complexes issus de la TMpyP4 a permis de distinguer différentes classe de métaux selon la présence ou non de ligands axiaux sur ces derniers, celles effectuées sur un autre dérivé porphyrinique présentant des bras arylamide ne semblent pas les confirmer. Dans le cas de la TMPyP4, les ligands étudiés semblent mettre en avant l'importance d'une face plane du ligand pour interagir probablement avec la tétrade de guanine par « end-stacking ». A l'inverse, les autres métaux présentant des ligands axiaux, comme H₂O par exemple semble interagir moins fortement sur les G-quadruplexes mais semblent beaucoup plus sélectifs pour ces structures. Dans le cas de la molécule MnLB qui semble être, d'après les études en TRAP Assay, la plus affine de sa famille, il se trouve que le métal utilisé est le Mn^{III} présentant des ligands axiaux. Lors de ces études, il est en effet surprenant que le même complexe de Ni^{II}, plan, ne soit pas plus efficace. Il est possible que les différences obtenues entre les deux familles de métaux viennent du mode d'interaction différent selon la présence ou non de ligands axiaux. Dans le but de mieux comprendre l'interaction des métaux, des travaux sur d'autres complexes ont actuellement débuté.

II.2. Etude préliminaire sur des complexes de type SALPHEN

2a. Présentation des complexes étudiés :

Deux complexes ont été analysés lors de cette étude, à savoir un de cuivre et un de nickel. Ces deux complexes présentent chacun une face plane (Figure 75). Dans ces complexes, les cycles inférieurs (phénols) sont fonctionnalisés en *méta* par rapport au bras imine alors que dans le cas des molécules décrites par J.E. Reed^{152,153}, la fonction est en *ortho*. Des bras imidazoles sont présents impliquant la formation d'une amine quaternaire chargée positivement qui devrait favoriser les interactions avec les sillons du quadruplexe.

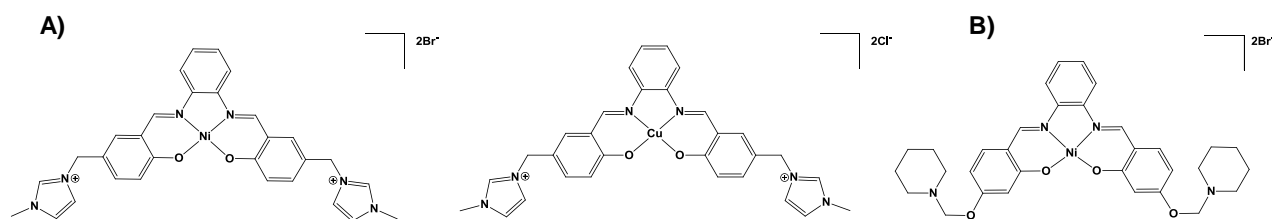


Figure 75 Structure chimiques des ligands de type Salphen : évalués par SPR lors de ce chapitre (A) ou étudiés de façon antérieure^{152,153,154}(B)

2b. Résultats et discussion

Les molécules ont été analysées dans les mêmes conditions que les porphyrines et les sensorgrammes sont présentés dans la figure ci-dessous.

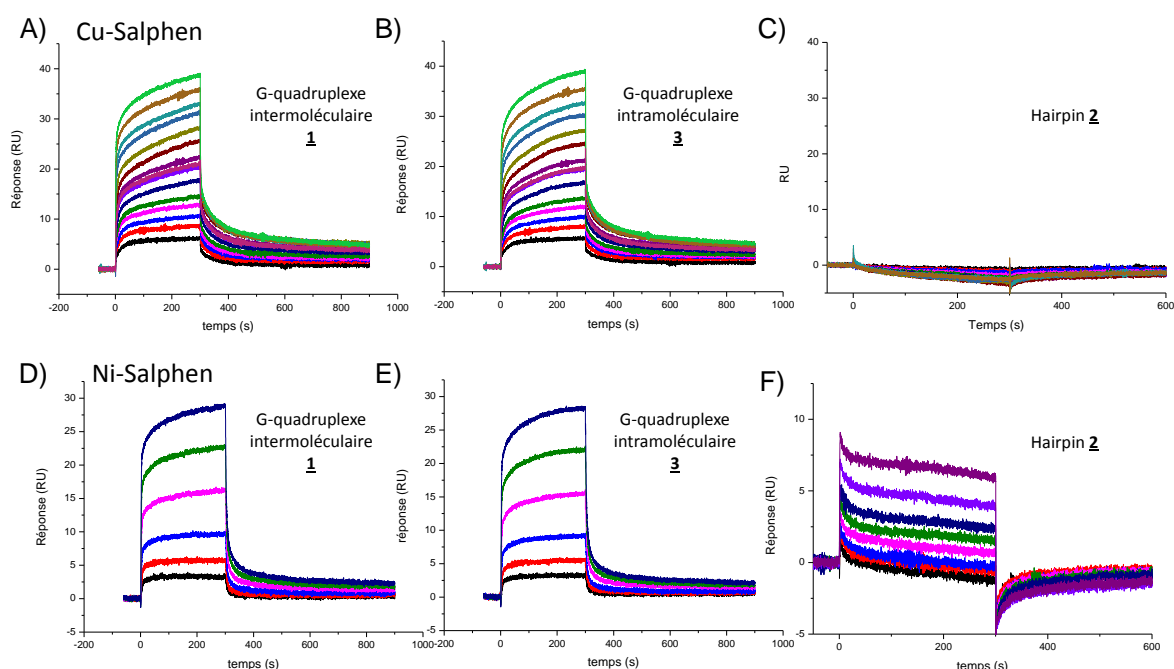


Figure 76 Sensorgrammes obtenus pour les molécules Cu-Salphen (Interactions avec le A : mime 1 B : mime 3 C : mime 2) et Ni-Salphen (Interactions avec le D : mime 1 E : mime 3 F : mime 2) lors du test SPR. (mesures à 25°C- la courbe de référence a été soustraite. Les concentrations sont données dans la partie expérimentale)

Ici encore le phénomène de « stacking » semble apparaître, surtout pour le complexe de nickel mais semble plus atténué dans le cas du cuivre. Ainsi la modélisation selon l'isotherme de Langmuir semble faussée, expliquant ainsi les différences d'affinité observées avec le test cinétique (Tableau 5). L'affinité est de l'ordre du micromolaire pour le complexe de cuivre et de la centaine de nanomolaire pour le complexe de nickel. Ces résultats coïncident avec les autres études effectuées sur la famille des salphens selon lesquelles les complexes de nickel sont plus affins que ceux de cuivre.

Ligand étudié	Mime intermoléculaire 1				Mime intramoléculaire 3				Mime de duplexe 2				G4-BMI	Sélectivité
	K_d^{eq} (M)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d^{kin} (M)	K_d^{eq} (M)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d^{kin} (M)	K_d^{eq} (M)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d^{kin} (M)		
Ni-Salphen	$4,5 \cdot 10^{-7}$	$1,8 \cdot 10^5$	$8,3 \cdot 10^{-2}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$	$5,1 \cdot 10^{-7}$	$8,2 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^{-2}$	$1,7 \cdot 10^{-7}$	Nd	Nd	Nd	Nd	1,2	Nd
Cu-Salphen	$1,5 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$2,1 \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$5,5 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$2,1 \cdot 10^{-6}$	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	1,0	Nd.

Tableau 5 Constantes thermodynamiques obtenues pour les ligands de type SALPHEN par étude SPR sur les mimes 1 et 3. (Nd. : Non-déterminé).

La valeur de G4-BMI est de l'ordre de 1 pour les deux molécules indiquant un mode d'interaction préférentiel sur les sillons. Toutefois la littérature reporte un mode d'interaction principal par « end-stacking » sur la tétrade et il est par contre probable que les interactions dans les sillons ne se fassent que *via* les groupements imidazoles des complexes, expliquant ainsi les réponses similaires obtenues sur les G-quadruplexes **1** et **3**.

Il apparaît par contre que l'affinité des deux ligands pour le duplexe est faible. Les sensorgrammes obtenus avec le duplexe **3** dans le cas du complexe de Cu^{II} n'indiquent pas de réponse spécifique et une très faible réponse est obtenue pour celui de Ni^{II} . Dans ce dernier cas, il n'est pas possible d'obtenir une affinité précise mais elle semblerait être, d'après les approximations, au-delà de $50\mu M$. Ces résultats sont en accord avec ce qui a déjà été observé pour les autres séries de salphens étudiées auparavant montrant leur faible affinité pour le duplexe. Cependant le duplexe utilisé ne présente que des paires de type GC et donc les études sont à élargir sur d'autres structure et notamment des duplexes riches en paires de bases de type AT. Il aurait été également intéressant d'augmenter la gamme de concentration utilisée pour estimer la réponse, cependant la solubilité des ligands étudiés dans le tampon de travail ne l'a pas permis.

2c. Autres travaux effectués sur les molécules

Ces études SPR ont été effectués en parallèle avec des études de modélisation (« docking ») de l'interaction du complexe de nickel avec le G-quadruplexe télomérique et comparées à l'étude sur le salphen de nickel utilisé par J.E. Reed¹⁵². De façon intéressante, cette étude semble indiquer que les deux complexes ne se positionnent pas de façon similaire sur le G-quadruplexe. Les deux complexes agissent par « end-stacking », cependant il apparaît que les chaînes latérales n'interagissent pas dans les mêmes sillons. Le complexe de J.E. Reed va interagir avec deux sillons adjacents alors que le complexe Ni-salphen étudié par SPR va interagir sur deux sillons opposés sur le quadruplexe (Figure 77). Ces résultats sont vraisemblablement dus à la

position différente des chaînes latérales en *ortho* ou en *méta* sur les cycles inférieurs des structures salphen.

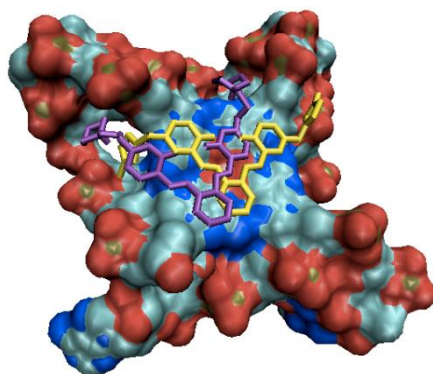


Figure 77 Superposition des modélisations moléculaires effectuées avec le salphen de JE. Reed (violet) et du complexe de Ni^{II} étudié (jaune).

2d. Bilan intermédiaire

Cette étude préliminaire sur les nouveaux complexes de type Salphen semble indiquer que ces molécules peuvent se comporter en ligands de G-quadruplexes potentiels. L'affinité des molécules reste bonne (ordre de la centaine de nanomolaire) et il apparaît qu'elles présentent une très bonne sélectivité pour le quadruplexe par rapport au duplexe. De plus, d'après les études de modélisation, il est intéressant de jouer sur la position de fonctionnalisation des cycles inférieurs des structures. Chaque topologie de G-quadruplexe présente des sillons de taille différente (voir introduction) variant selon leur positionnement. Ainsi il peut être intéressant d'étudier la spécificité des complexes selon les topologies de G-quadruplexes, ceci dans le but d'optimiser les molécules pour obtenir des ligands plus spécifiques.

III. Bilan

Cette étude s'est portée sur deux familles de ligand métalliques de G-quadruplexes de type porphyrinique et de type salphen. Dans de nombreux cas, ces ligands ont présenté une affinité correcte lors de leur interaction avec le G-quadruplexe. Lors de cette étude, la plupart des ligands étudiés ont présenté très peu d'affinité pour le duplexe et se sont donc révélés être très spécifiques du G-quadruplexe. Dans le cas des porphyrines, cette sélectivité est relative au métal complexé dans la structure tandis que pour les salphens, ceci serait plus dû à la structure même du ligand. Les études sur les porphyrines ont toutefois montré que la sélectivité des molécules par le test SPR était également dû à la spécificité du duplexe riche en GC et qu'elle est plus faible sur d'autres séquences. En effet, les résultats par FRET observé sur les mêmes molécules, bien qu'en accord avec ce qui a été observé, modère cet effet. Il peut être pertinent pour les études futures de synthétiser d'autres mimes avec des duplexes aux séquences différentes.

Lors de ces études, un second problème est apparu lors de l'analyse de la molécule MnLB. En effet, celle-ci est capable d'interagir avec la piste de référence rendant ainsi les modélisations obtenues difficiles à effectuer. Initialement, il était d'usage d'immobiliser un gabarit peptidique non fonctionnalisé afin de s'assurer que l'interaction des ligands obtenue était spécifique du motif d'ADN observé et non de la partie peptidique du mime. Toutefois, ce dernier pouvant présenter des charges, cette utilisation n'a pas été poursuivie. Dans le but d'obtenir une piste réellement spécifique du G-quadruplexe, il a été décidé de synthétiser un gabarit présentant une séquence T₂₈ reliée par oxime comme référent. Cette molécule, obtenue et caractérisée, sera utilisée dans les études futures sur d'autres dérivés porphyriniques et Salphen (Figure 78).

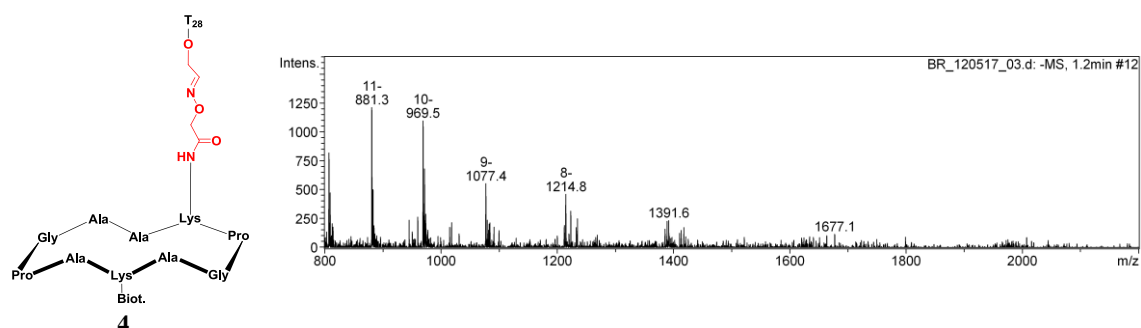


Figure 78 Présentation du gabarit T₂₈ 4 et caractérisation de la molécule par ESI-MS(-)

IV. Article sur les études effectuées sur les porphyrines

Biochimie 93 (2011) 1310e-1317



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Improvement of porphyrins for G-quadruplex DNA targeting

Carmen Romera^{a,b}, Oriane Bombarde^c, Romaric Bonnet^d, Dennis Gomez^c, Pascal Dumy^d, Patrick Calsou^c, Jean-Fang Gwan^e, Jung-Hsin Lin^e, Eric Defrancq^d, Geneviève Pratiel^{a,b,*}

^a CNRS, Laboratoire de Chimie de Coordination, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 4, France

^b Université de Toulouse, F-31077 Toulouse, France

^c Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse Cedex 4, France

^d Ingénierie et Interactions BioMoléculaires, Département de Chimie Moléculaire, UMR CNRS 5250, Université J. Fourier, 570 rue de la Chimie, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France

^e Research Center for Applied Sciences, Academia Sinica, No. 128, Academia Road Sec. 2, Taipei 115, Taiwan

article info

Article history:

Received 9 September 2010

Accepted 7 June 2011

Available online 17 June 2011

Keywords:

Porphyrin

Quadruplex DNA

Metal complexes

abstract

G-quadruplex nucleic acids are emerging as therapeutic targets for small molecules referred to as small-molecule G-quadruplex ligands. The porphyrin H₂-TMPyP4 was early reported to be a suitable motif for G-quadruplex DNA recognition. It probably binds to G-quadruplex nucleic acid through π-π stacking with the external G-quartets. We explored chemical modifications of this porphyrin such as insertion of various metal ions in the centre of the aromatic core and addition of bulky substituents that may improve the specificity of the compound toward G-quadruplex DNA. Porphyrin metallation, affording a G4-ligand with two symmetric faces, allowed the conclusion that the presence of an axial water molecule perpendicular to the aromatic plane lowered but did not hamper π-π stacking interactions between the aromatic parts of the ligand on the one hand and the external G-quartet on the other. The charge introduced in the centre of the porphyrin had little influence on binding. Thus, the ionic channel in the centre of G-quadruplex nucleic acids was not found to provide clear additional molecular clues for G-quadruplex nucleic acids targeting by porphyrins tested in the present study. Furthermore, we confirmed the unique G-quadruplex selectivity of a porphyrin modified with four bulky substituents at the meso positions and showed that although the compound is not "drug-like" it was capable of entering cells in culture and mediated some of the typical cellular effects of small-molecule G-quadruplex ligands.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

G-quadruplex (G4) are higher-order four-stranded structures occurring in nucleic acid sequences composed of several runs of guanine nucleosides [1]. G4 structures have been well characterized in vitro and although their existence in vivo is still controversial, many G-rich sequences having the potential to adopt a G4 structure (PQS) have been associated with cellular processes [2]. Thus, PQS are found in the telomere, in nuclease hypersensitive promoter regions of oncogene [3e 6], and in RNA [7e 9]. Drug targeting quadruplex DNA at the telomeres interferes with telomerase and telomere function [10e 13] whereas targeting quadruplex-forming sequences in gene promoters or in the 5' UTR regions of mRNAs was found to reduce the production of the related products

[14e 19]. Therefore, due to the involvement of quadruplex DNA (or RNA) in the fundamental biological processes related to cancer, small-molecule G-quadruplex ligands, referred to as G4-ligands, are emerging as potential anticancer agents [20].

During the last decade an intensive research was focused on the synthesis of selective G4-ligands [21e 23] however, up to now, only few molecules showed high selectivity for quadruplex with respect to double-stranded DNA [24e 31].

The cationic porphyrin, meso-tetrakis(4-N-methylpyridiniumyl) porphyrin (H₂-TMPyP4) belongs to the earlier discovered small molecules able to bind G-quadruplex DNA [3,14,32e 36], and has shown interesting biological effects related to telomere dysfunction [37e 43]. However, H₂-TMPyP4 is not selective for G-quadruplex DNA. Its affinity for double-stranded and G-quadruplex DNA is quite similar [33,44,45]. The affinity of the non-metallated H₂-TMPyP4 porphyrin for G-quadruplex may be modulated by the insertion of a metal ion in the centre of the porphyrin core [46e 48] and although this insertion leads to some changes in selectivity [45], the modification doesn't really improve the specificity of the ligand. On the other hand, new generation of porphyrins can be

* Corresponding author. CNRS, Laboratoire de Chimie de Coordination, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France. Tel.: þ 33 561 33 31 46; fax: þ 33 561 55 30 03.

E-mail address: genevieve.pratiel@cc-toulouse.fr (G. Pratiel).

designed by modification of the porphyrin macrocycle [49e53]. Thus, the incorporation of bulky cationic substituents at the meso positions of the porphyrin macrocycle led to the synthesis of quadruplex selective porphyrins [50,51,53]. Among these modified porphyrins, the manganese derivative of porphyrin H₂-1, Mn-1 (Fig. 1) was reported by Dixon et al. to show a unique selectivity for G-quadruplex with respect to duplex DNA [51]. This selectivity was only assessed by surface plasmon resonance technology.

In the present work, the selectivity of Mn-1 for G-quadruplex could be confirmed by other methods. Furthermore, the compound was compared to other G4-ligands under the same experimental conditions. The influence of the central metal on G-quadruplex recognition was also studied for the large substituted porphyrins in comparison with the TMPyP4 series. Moreover, since the presence of the bulky substituents proved necessary for selective recognition of G-quadruplex DNA yet may preclude cell penetration, we tested Mn-1 porphyrin in cell culture experiments. The results show that the large porphyrin is indeed a selective G-quadruplex ligand *in vitro*. Additionally, it produces cellular effects such as the formation of nuclear foci of gH2AX, which is one of the typical DNA damage response induced by G4-ligands and is analogous to the response that follows knock out of the telomeric protein TRF2.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Porphyrins were prepared according to published procedures [45,51,54]. Metallation with cobalt(III) and gold(III) is provided in Supporting information. The molecule 360D (soluble in water with two CH₃SO₃^A counter ions) was a gift from P. Mailliet (Sanofi-Aventis, Vitry/Seine, France). The oligonucleotides were purchased from Eurogentec (Belgium).

2.2. FRET melting assay

Fluorescence melting curves were determined (ABIP 7000 real-time PCR machine) with F21T oligonucleotide (5⁰-FAM-G₃(TTAGGG)₃-TAMRA-3⁰) (0.2 nM) (where FAM is the donor fluorophore 6-carboxyfluorescein and TAMRA is the acceptor 6-carboxy tetramethylrhodamine) in 10 mM lithium cacodylate buffer pH

7.2, 5 mM KCl, and 95 mM LiCl [55,56]. The melting of the G-quadruplex was monitored by measuring the fluorescence of FAM (520 nm) in 25 mL reaction samples. After a first equilibration step at 23 °C during 8 min, a stepwise increase of 1 °C every minute for 71 cycles to reach 95 °C was performed and measurements were made after each cycle. Thermal denaturation of F21T was performed in the presence of various concentrations of porphyrin (0, 0.2, 0.5 and 1 nM) as well as in the presence of porphyrin (1 nM) and DNA competitors to test the binding selectivity of the porphyrin to the quadruplex structure: (i) double-stranded DNA (hairpin 26-mer oligonucleotide ds26: 5⁰-CAA TCG GAT CGA ATT CGA TCC GAT TG-3⁰), (ii) single-stranded (27-mer ss27: 5⁰-GGC TAT CGG TAT GCG TAT GGC TAT CGG-3⁰). Emission of FAM was normalized and T_{1/2} was defined as the temperature for which the normalized emission is 0.5. T_{1/2} and DT_{1/2} are the mean of at least 3e5 values.

2.3. SPR measurements

SPR measurements were performed on a BIAcore T100 (GE Healthcare) operated with BIAcore T100 evaluation Software 2.0.1. All measurements were performed at 25 °C using a running buffer (HEPES-buffered saline), which was prepared using 0.01 M HEPES (pH 7.4), 0.15 M NaCl, 0.2 M KCl, and 0.05%(v/v) surfactant P20. The biomolecular systems containing the quadruplexes 1, 2 and the duplex 3 were prepared as previously reported [57]. 1 is an intermolecular-like quadruplex formed by the tetramolecular assembly of d[TTAGGG]₄, 2 is an intramolecular quadruplex formed by the sequence d(GGG(TTAGGG)₃TT) and 3 is a hairpin duplex which sequence is d(CGCGCGCTTTTCGCGCGCG) (see also the Supporting information, Scheme S1). 1e3 were immobilized on streptavidin-coated surfaces (SA sensor chip) to obtain a response around 430 u.a. An empty channel was used as reference. Binding experiments were conducted at 30 mL/min by injection of the ligand (300 s excepted for Co-TMPyP4 and Mn-TMPyP4 for which a 600 s span was used) on the four channels. Regeneration of the surface was achieved by injections of glycine HCl 10 mM (pH ¼2) solutions, excepted for Mn-1 for which a 0.05% SDS/25% acetonitrile solution was used. Curves obtained on the reference surface were subtracted from the curves recorded on the other ones, allowing elimination of refractive index changes due to buffer effects and correction of non-specific interactions.

2.4. Circular dichroism measurements

Circular dichroism (CD) spectra were recorded on a Jasco J-815 CD spectropolarimeter using 1 cm path length quartz cuvette containing a reaction volume of 1.2 mL. The oligonucleotides samples, Telo27 (5⁰-(TTAGGG)₄TTA-3⁰), were dissolved at a concentration of 0.5 nM in (i) 10 mM KCl, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 or (ii) 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. During the titration, aliquot (6e24 mL) of 100 nM porphyrin aqueous solution (1e9 mol equiv.) was added to the cuvette, and the solution was mixed. After the solutions were incubated for 15 min the CD spectra were recorded. For each sample, spectrum scans was accumulated between 220 and 400 nm at 20 °C at a scanning rate of 50 nm/min with a 1 nm step size, a 2 s measurement time-per-point, and a spectral bandwidth of 2 nm. Spectra were buffer baseline corrected.

2.5. Telomerase assay

Telomerase assay was performed as previously reported [58]. Telomerase extracts were prepared from A549 cells as described before [59]. The TRAP assay was performed in the presence of an

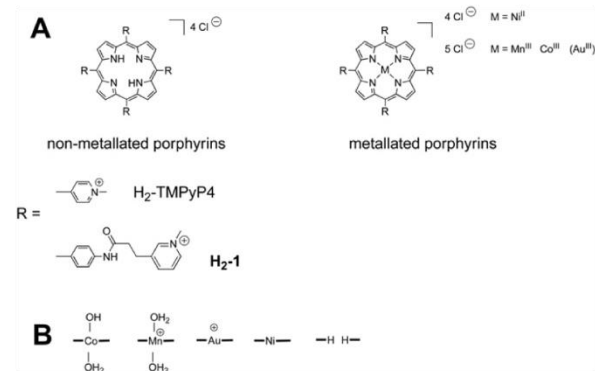


Fig. 1. (A) Structure of the porphyrins. Non-metallated and nickel(II) porphyrins bear four chloride counter ions. Manganese(III) and cobalt(III) porphyrins bear two water molecules as axial ligands (omitted for clarity) on the central metal ion and five chloride counter ions. (B) Scheme illustrating the variations of charge and shape in the centre of the porphyrin core. One axial water molecule of the cobalt(III) porphyrin may deprotonate at physiological pH (pK_a of the axially bound water molecule on cobalt is 6.0). The gold derivative was prepared only in the TMPyP4 series, Au-TMPyP4 has five chloride counter ions and no axial ligand.

internal control (internal telomerase assay standard) corresponding to the 36-mer ($5^{\circ}\text{AATCCGTCGAGCAGAGTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3}^{\circ}$) according to [60]. TRAP-G4 was performed by using a modification of the TRAP assay [60e62]. PCR was performed in a final 50- μL reaction volume composed of a 45- μL reaction mix containing 20 mM Trise HCl (pH 8.0), 50 mM deoxynucleotide triphosphates, 1.5 mM MgCl_2 , 63 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.005% Tween 20, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, 3.5 pmol of primer TSG4 ($5^{\circ}\text{GGATTGGGATTGGGATTGGTT-3}^{\circ}$), 18 pmol of primer TS ($5^{\circ}\text{AATCCGTGAGCAGAGTT-3}^{\circ}$), 22.5 pmol of primer CXext ($5^{\circ}\text{GTGCCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3}^{\circ}$), 7.5 pmol of primer NT ($5^{\circ}\text{ATCGCTTCTCGCCTTTT-3}^{\circ}$), 0.01 amol of TSNT internal control ($5^{\circ}\text{ATCCGTGAGCAGAGTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3}^{\circ}$), 2.5 units of Taq DNA polymerase (New England Biolabs), and 100 ng of telomerase. Compounds or distilled water were added under a volume of 5 μL . PCR were performed in an Eppendorf Mastercycler equipped with a hot lid and incubated for 15 min at 30°C , 1 min at 90°C followed by 30 cycles: 30 s 92°C , 30 s 52°C , and 30 s 72°C . After amplification, 8 μL of loading buffer containing 20% sucrose, 5 \AA Trise Boratee EDTA buffer, 0.2% bromphenol blue, and 0.2% xylene cyanol were added to the reaction. A 15- μL aliquot was loaded onto a 12% nondenaturing acrylamide gel (19:1) in 1 \AA TBE and electrophoresed at 200 V for 1 h using Xcell Surelock Minicell apparatus (Novex). Gels were stained with 1 \AA SYBR Green I (Roche) and digitalized by a CCD camera (Bioprint). As indicated, classical TRAP was performed in the same buffer and PCR conditions but without TSG4 and in the presence of primer TS and CXext (15 pmol), with or without ITAS primers NT (7.5 pmol) and TSNT (0.01 amol).

2.6. Cell culture and treatments

HT1080 cell lines were obtained from the ATCC. Cells were grown in DMEM with 100 units of penicillin and 0.1 mg of streptomycin per ml and 10% fetal bovine serum (Invitrogen). For short-term treatments, HT1080 cells, treated or untreated cells were seeded at 150×10^3 cells into 28- cm^2 tissue culture dishes for 4 days, then trypsinized and counted. For long-term growth of HT1080 cells, treated or untreated cells were seeded at 150×10^3 cells into 28- cm^2 tissue culture dishes for 4 days, then trypsinized and counted. Each time, 150×10^3 cells were replated onto a new culture flask with fresh drug solution.

2.7. Porphyrin penetration

1×10^4 HT1080 cells were plated on glass coverslips into 24-wells tissue culture plates. After 72 h of treatment cells were washed three times in PBS (phosphate buffered saline), fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde and washed again with PBS for three times.

2.8. Immunofluorescence

For gH2AX staining, 1×10^4 HT1080 cells were plated on glass coverslips into 24-wells tissue culture plates. After 96 h of treatment cells were washed three times in PBS, fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde and then neutralized for 2 min with NH_4Cl 50 mM solution. After two washes with PBS, cells were incubated for 45 min in blocking buffer (10% fetal bovine serum, 2% bovine serum albumin, 0.2% Triton X-100 in PBS 1X). Cells were stained for 60 min with a 1/500 dilution of the gH2AX antibody (JBW 301, Upstate Biotechnology, USA) in the hybridization buffer (2% fetal bovine serum, 0.2% Triton X-100 in PBS 1X), followed by a 1/500 dilution of the Alexa 488-conjugated anti-mouse IgG antibody (Invitrogen) in the hybridization buffer for 30 min. After hybridization, cells were washed three times with the hybridization buffer and the DNA was stained using a propidium iodide solution (Propidium iodide 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -RNase protein 0.1 mg/mL).

3. Results and discussion

The interaction of the porphyrin $\text{H}_2\text{-TMPyP4}$ with G-quadruplex DNA is well documented [3,15,32e36,44,49,52,63e69]. Due to its large planar aromatic structure (Fig. 1), the porphyrin $\text{H}_2\text{-TMPyP4}$ stacks at the end of the G-quartet stem of the G-quadruplex structure, with pep overlap between guanine bases and the porphyrin [3,35]. On the other hand, $\text{H}_2\text{-TMPyP}$ is also able to intercalate between the base pairs of DNA [70,71]. In addition, this porphyrin binds strongly the minor groove of AT-rich sequences of B-DNA [72e76]. Thus, $\text{H}_2\text{-TMPyP}$ is clearly not a specific G4-ligand [33,44,45,50]. The introduction of four bulky cationic substituents on the porphyrin macrocycle by Dixon et al. led to a G-quadruplex specific ligand, Mn-1 [51] (Fig. 1). Previous surface plasmon resonance (SPR) experiments led to the determination of a binding constant in the order of $K_a \approx 10^8\text{e}10^9 \text{M}^{-1}$ for G-quadruplex DNA and $K_a \approx 10^4\text{e}10^5 \text{M}^{-1}$ for double-stranded DNA for Mn-1 porphyrin. The selectivity toward double-stranded DNA was, as a result, of 10^4 . We aimed at confirming this data by other methods and we compared the characteristics of this porphyrin with other classical G4-ligands such as $\text{H}_2\text{-TMPyP4}$ and 360D (Fig. S1). Furthermore, we studied the influence of the incorporation of a metal ion in the center of the porphyrin in the TMPyP4 series as well as in the bulky substituted porphyrins. Therefore, the Ni^{II} , Mn^{III} , and Co^{III} derivatives of the $\text{H}_2\text{-1}$ porphyrin were prepared together with the Ni^{II} , Mn^{III} , Co^{III} , and Au^{III} derivatives of $\text{H}_2\text{-TMPyP4}$ (Fig. 1).

A convenient method for the evaluation of the selectivity of a ligand toward quadruplex DNA is the in solution FRET melting assay developed by Mergny and coll [55,56]. This assay is based on

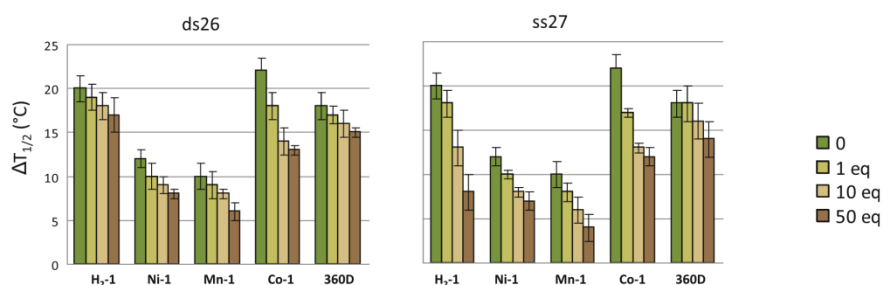


Fig. 2. FRET melting results for the non-metallated porphyrin $\text{H}_2\text{-1}$ and the Ni^{II} , Mn^{III} , and Co^{III} metallated derivatives, at 1 nM concentration, carried out with F21T (0.2 nM) without (green bars) or with increasing concentrations (0.2, 2 and 10 nM, i.e. 1, 10, and 50 mol equiv.) of competitor double-stranded DNA (ds26) and single-stranded DNA (ss27) in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2) with 5 mM KCl, 95 mM LiCl. Comparison with compound 360D (1 nM) under the same experimental conditions is shown.

the measurement of the stabilization induced by a ligand to a fluorescently labelled quadruplex-forming oligonucleotide (F21T, 5'-FAM-G₃(TTAG₃)₃-TAMRA-3'). The denaturation of the quadruplex structure upon heating allows the fluorescence emission of FAM. It is characterized by a half-melting temperature ($T_{1/2}$) at which half of the fluorescence emission is measured. The stabilization effect of a G4-ligand induces an increase in the melting temperature of F21T ($DT_{1/2}$). When a competitor DNA is added in the sample, the G4-ligand may bind to the competitor DNA. The consequent decrease in $DT_{1/2}$ indicates the displacement of the G4-ligand from F21T to the competitor DNA. In the case of a selective G4-ligand, the $DT_{1/2}$ is not affected by the presence of any competitor DNA. The FRET melting test was used in numerous reports for the evaluation of the binding properties of G4-ligands (stabilization and selectivity) [77]. Thus, it is particularly convenient for comparison purpose. As depicted in Fig. 2 (and Fig. S2), the bulky porphyrins stabilized G-quadruplex F21T DNA (0.2 nM) at 1 nM concentration. The compounds exhibit $DT_{1/2}$ between 10 and 20 °C in the absence of competitor DNA (green bars). For comparison, under the same experimental conditions, the classic G4-ligand 360D exhibited a $DT_{1/2}$ of 18 °C, and as detailed later the $DT_{1/2}$ of H₂-TMPyP4 was 21 °C. G-quadruplex selectivity versus duplex DNA has been assessed by a series of FRET-based competition assay. The bulky porphyrins proved highly specific for G-quadruplex DNA as evidenced by stable $DT_{1/2}$ of F21T/porphyrin complex in the presence of ds26 double-stranded DNA, ss27 single-stranded DNA competitors. Thus, the bulky porphyrin series proved selective for G-quadruplex DNA as previously reported for the manganese derivative (Mn-1). Overall, the bulky porphyrins compare with 360D, which was reported as one of the best G-quadruplex ligands [24,77,78]. The affinity binding constant of 360A (same compound as 360D, yet with other counter ions) for G-quadruplex DNA was reported to be in the nM range [78]. It was also reported to poorly bind to single-stranded DNA, which is in accordance with the present data [78]. Two derivatives among the bulky porphyrins showed a lower stabilization capacity, Ni-1 and Mn-1. We don't find any rationale for this result in relation with a presumed role of the nature of the metal ion in the centre of the porphyrin.

To better understand whether the metal ions in the centre of a porphyrin core may indeed play a role in the interaction of the porphyrins with G-quadruplex DNA we tested different metallated TMPyP4 molecules in FRET melting assay. We reasoned that the smaller and simpler porphyrin scaffold would be more adequate for the study of the influence of the central metal considering that the bulky porphyrins may exhibit too high binding constants that may

Table 1

Affinity binding constants, K_a^{eq} (M⁻¹) determined by surface plasmon resonance for porphyrins toward G-quadruplex DNA and double-stranded DNA. Calculations for one binding site per DNA target.

Ligand	Intermolecular Qx parallel	Intramolecular Qx hybrid	Duplex
H ₂ -TMPyP4	1.6 Å 10 ⁷	2.9 Å 10 ⁶	2.9 Å 10 ⁶
Ni-TMPyP4	1.7 Å 10 ⁷	4.2 Å 10 ⁶	5.0 Å 10 ⁶
Au-TMPyP4	2.2 Å 10 ⁶	1.2 Å 10 ⁶	4.3 Å 10 ⁶
Co-TMPyP4	1.5 Å 10 ⁵	1.8 Å 10 ⁵	nb
Mn-TMPyP4	1.1 Å 10 ⁵	1.0 Å 10 ⁵	nb
Mn-1	1.7 Å 10 ⁷	1.8 Å 10 ⁷	nb

nb: No binding; In these cases the exact binding affinities for duplex could not be determined due to too weak interactions and therefore non-specific interactions caused by the high concentration of ligands to be used in these cases are observed.

hide the influence of a metal ion. The K_a for G-quadruplex was previously determined as 10⁶e 10⁷, 10⁷, and 10⁸e 10⁹ M⁻¹ for H₂-TMPyP4, Mn-TMPyP4, and Mn-1, respectively [45,50,51]. The results are shown in Fig. 3. For the TMPyP4 porphyrin series, the influence of the central metal can be rationalized. The Mn^{III} and Co^{III} derivatives showed lower stabilization of F21T compared to H₂-TMPyP4, Ni^{II}, and Au^{III} porphyrins. The manganese and cobalt derivatives are the only two derivatives of the series that bear two water molecules as axial ligands on the metal ion (Fig. 1). The presence of water molecules on either side of the porphyrin core might hinder the initial stacking of the porphyrin molecule on the last G-quadruplex plateau, but once the porphyrin stacked, one axial water molecule may occupy the empty space provided by the ionic channel of the G-quadruplex DNA, and in consequence may not preclude π - π stacking interactions between aromatics belonging to the DNA structure and the porphyrin macrocycle. On the other hand, the axial water molecules prevent the intercalation of the manganese and cobalt porphyrins between the base pairs of DNA and, consequently, decrease the mean binding affinity of these two porphyrins for double-stranded DNA. Interactions with single-stranded DNA are probably also mainly governed by π - π stacking with the nucleobases. Therefore, the axial ligands present in the centre of the porphyrin decrease the affinity toward single-stranded DNA in the same way. Furthermore, it may be concluded from the data of Fig. 3 that the central charge does not appear as a key factor in the interactions of the TMPyP4 porphyrins with G-quadruplex DNA. An improving role for the central metal might be expected because the positively charged metallic cation may act as a supplementary potassium ion in the central ion channel of the G-quadruplex and therefore might increase the stabilization of the

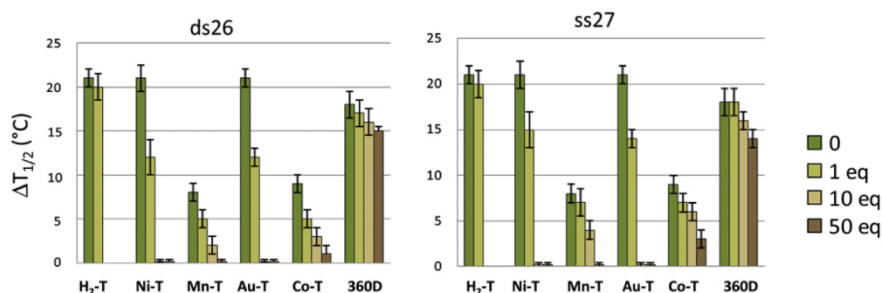


Fig. 3. FRET melting results for the non-metallated porphyrin H₂-TMPyP4 and the Ni^{II}, Mn^{III}, Au^{III}, and Co^{III} metallated derivatives, at 1 nM concentration, carried out with F21T (0.2 nM) without (green bars) or with increasing concentrations (0.2, 2 and 10 nM, i.e. 1, 10, and 50 mol equiv.) of competitor double-stranded DNA ds26 and single-stranded DNA (ss27) in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2) with 5 mM KCl, 95 mM LiCl. Comparison with compound 360D (1 nM) under the same experimental conditions is shown. T stands for TMPyP4. Due to the fluorescence of H₂-TMPyP4 in interaction with competitor (bathochromic shift of H₂-TMPyP4 absorbance when intercalated between DNA base pairs) the test measurements with 10 and 50 mol. equiv. of competitor could not be performed.

1314

C. Romera et al. / Biochimie 93 (2011) 1310e1317

Table 2
In vitro telomerase inhibition, determination of IC₅₀ values (nM) in TRAP and TRAP-G4 assays.

G4-ligand	TRAP IC ₅₀ ^a	TRAP selectivity	TRAP-G4 IC ₅₀ ^a	TRAP-G4 selectivity
Mn-1	0.21 ± 0.03 ^b	7	0.92 ± 0.25	9
H ₂ -1	0.35 ± 0.07	5	2.2 ± 1.0	4
Ni-1	0.84 ± 0.03	6	3.92 ± 0.72	7

^a Mean ± ESD of triplicates.

^b Previously reported 0.58 nM [51].

drug/G-quadruplex complex. The porphyrins bearing a positive charge in the centre of the aromatic motif, namely Mn-TMPyP and Au-TMPyP do not show better stabilizing properties with respect to the corresponding porphyrins devoid of such a positive charge, i.e. H₂-TMPyP4, Ni-TMPyP4 and Co-TMPyP4, respectively.

The impact of a metal ion in small-molecule G4-ligands was previously studied [78e82] and the conclusions were essentially based on geometrical factors. Metal complexes with at least one aromatic planar face (Ni^{II}, Pt^{II}, Cu^I) prove able to bind G-quadruplex DNA whereas metal complexes with octahedral (Ru^{III}) and tetrahedral or square pyramidal (Zn^{II}) geometry were unable to bind G-quadruplex DNA. However, neither the influence of the central charge nor the effect of two axial water molecules was studied in details before for metal complexes. The present work shows that in the case of the relatively small TMPyP4 porphyrins (i) the presence of a positive charge at the centre of the aromatic core does not help in the binding process and (ii) the presence of an axial water molecule on one and other face of the aromatic core lowers but does not hamper the binding of an aromatic metal complex with G-quadruplex DNA. Besides, the two axial ligands do not allow the aromatic molecule to undergo π-π stacking interactions with DNA base pairs (intercalation) or DNA nucleobases (non-specific interactions with single-stranded DNA). It is also noteworthy that metallated porphyrins bearing two axial ligands are less prone to aggregations in aqueous solution [79].

The binding affinity of the different ligands for G-quadruplex and double-stranded DNA was also studied by SPR. For this purpose, a recently reported method that allows the investigation of the interaction of the ligands with constrained DNA quadruplex topologies has been used [57]. The values of the binding constants are reported in Table 1 and the sensorgrams are shown in the Supporting information. The reported data are in agreement with FRET assay. Mn-TMPyP4 and Co-TMPyP4 show a lower affinity compared to H₂-, Ni- and Au-TMPyP4, but unambiguously proved specific for quadruplex DNA compared to double-stranded DNA. Mn-1 was included in the same series of measurements for comparison purpose. Unfortunately, it was not possible to perform measurements with the other compounds of the bulky porphyrin series because they interacted with the streptavidine-coated

surface of the control channel. Although surprisingly, the FRET melting assay (Fig. 2, Fig. S2, and Fig. 3) did not evidence any significant difference in the DT_{1/2} of the TMPyP4 and the bulky porphyrins, the SPR data supported Mn-1 as a better G-quadruplex ligand compared to TMPyP4 porphyrins. In previous reports the K_a of Mn-1 was probably overestimated [51]. On the other hand, previous work stated a unique selectivity factor of 10⁴ versus double-stranded DNA for Mn-1 [51]. The available information concerning the metallated TMPyP4 porphyrins include TRAP assays that showed that metallated porphyrins with two axial ligands were poor inhibitors of telomerase [46] and in vitro physicochemical tests showing that copper, zinc, and lead TMPyP4 porphyrins were G-quadruplex ligands [47,48]. The data of the present work are in agreement with these reports.

Preliminary circular dichroism studies on porphyrin complexes of the human telomeric quadruplex indicated that in solution they probably exist as a mixture of topologies. The spectra in K^b solution show a strong shoulder at ca. 260e265 nm and a major peak at 290 nm, consistent with a mixed population of parallel and antiparallel species, as has been observed in a number of previous studies with ligands binding to human telomeric quadruplexes [25,80,81]. The (3 β 1) hybrid-2 structure of telo27 [82e84] is moderately modified during titration with Mn-1 and Mn-TMPyP4 showing an increase of antiparallel CD signature (Fig. S9) in analogy with previous reports with H₂-TMPyP4 [68,85]. Most of the G4-ligands are able to induce the folding of single-stranded G-rich DNA into quadruplex structure in the absence of salts. H₂-TMPyP is known to induce the antiparallel folding of telomeric DNA [68,85]. In the same way, Mn-1 induced the folding of the single-stranded DNA telo27, in an antiparallel predominant form. However, the capacity of Mn-1 to promote DNA folding is lower than that of Mn-TMPyP under the same conditions since the same induction of folding was observed at higher concentration (Fig. S10).

Three compounds of the bulky porphyrin series were tested as telomerase inhibitors. Two cell-free enzyme-based telomeric repeat amplification protocol (TRAP and TRAP-G4) assays were performed with H₂-1, Ni-1, and Mn-1. TRAP assay allows the detection of G-quadruplex induced telomerase inhibition after the synthesis of four TTAGGG repeats. In the TRAP-G4 assay [58], the TSG4 oligonucleotide used as a primer for telomerase comprises a modified telomeric repeat and forms an intramolecular G-quadruplex. The three compounds caused inhibition of telomerase-mediated elongation of the two primers at micromolar (H₂-1 and Ni-1) and submicromolar (Mn-1) concentrations (Table 2). The higher IC₅₀ values observed for H₂-1 and Ni-1 in TRAP-G4 compared to TRAP assays is not in favour of a real interaction of these compounds with G-quadruplex DNA, but rather implies non-specific interactions. On the opposite, Mn-1 appeared more like a G4-ligand. This data reinforces the importance of axial ligands on the central metal in the lowering of aggregation properties and

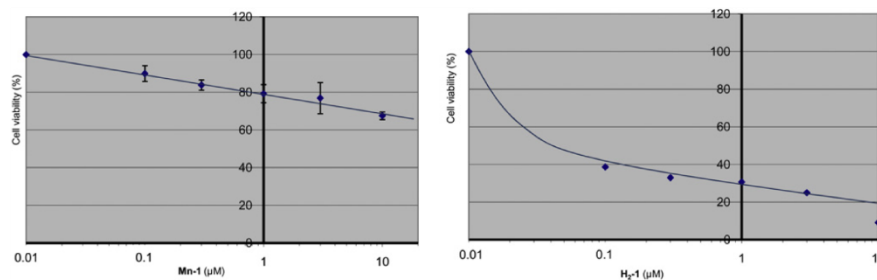


Fig. 4. Short-term cytotoxicity of H₂-1 and Mn-1 porphyrins after 96 h of treatment of HT1080 cells.

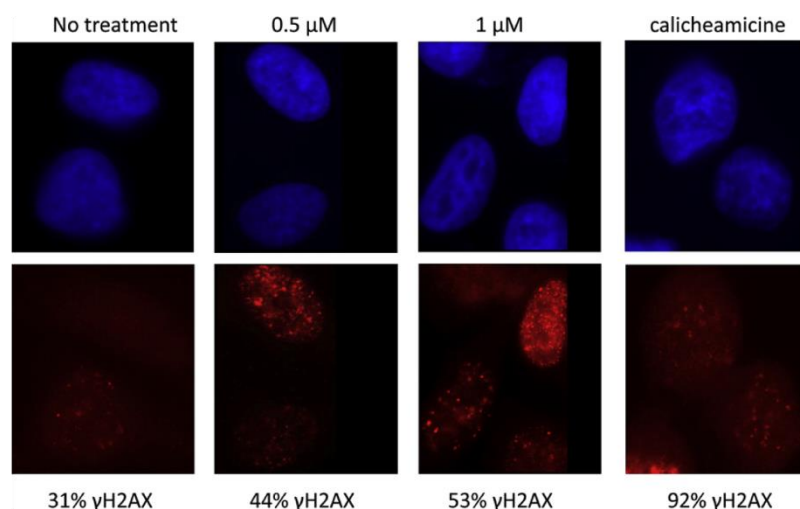


Fig. 5. gH2AX foci in HT1080 cells. DNA damage response after Mn-1 treatment in HT1080 cells. Immunofluorescence for gH2AX (red) and Hoechst fluorescence (blue) in untreated or treated cells for 96 h with 0.5 and 1 nM Mn-1. Calicheamicin was used as a positive control.

non-specific interactions of this series of molecules. A typical G4-ligand would be expected to show a higher inhibition capacity in TRAP-G4 assay [58], which is not the case for Mn-1. The similar inhibition in the two assays exhibited by Mn-1 may be due to the different quadruplex folding between the natural telomeric sequence and TSGA primer. The selectivity of the compounds with respect to the inhibition of polymerase proved modest (Table 2). Nevertheless, the inhibition of telomerase by Mn-1 is comparable to that of typical G4-ligands such as BRACO19 (0.12 nM) [86,87] and RHPS4 (0.33 nM) [88].

Short-term antiproliferative activity of H₂-1 and Mn-1 was assayed. Treatment of HT1080 cells (human fibrosarcoma) resulted in moderate short-term cytotoxicity for Mn-1 on the opposite to H₂-1 (Fig. 4). The weak cytotoxicity of Mn-1 might be compatible with a biological activity related to telomeres targeting, while H₂-1 may be considered as a more classic cytotoxic agent. Compounds acting on the telomeres induce relatively delayed cell growth arrest. Telomestatin (5 nM) was active after 8 days of treatment [89], BRACO19 (7 days) [87], and RHPS4 [88] after c.a. 20 days. The exposure of HT1080 cells to nonacute cytotoxic concentration of Mn-1 (5 nM) only resulted in a reduction of cell growth after 80 days of treatment (not shown).

It was possible to check the cell penetration of the fluorescent porphyrin H₂-1 (l ex ¼ 417 nm, l em ¼ 653 nm, red fluorescence) by fluorescence confocal microscopy. In agreement with its cytotoxic action, H₂-1 proved able to accumulate in the cell nuclei after 24 h (Supporting Information, Fig. S11). This data indicates that the large substituents present on the porphyrin do not preclude cell penetration. The manganese porphyrin Mn-1, which is not fluorescent, is not compatible with such an experiment. However, further tests confirmed indirectly that Mn-1 is also capable of cell penetration.

Dysfunctional telomeres have been shown to be associated with a DNA damage response involving in particular gH2AX. We tested whether Mn-1 treatment was associated with such a DNA damage signal [90,91]. We used gH2AX immunofluorescence after short-term exposure of cells with the drug. As shown in Fig. 5, Mn-1 induced a DNA damage response evidenced by an increase in the gH2AX foci (53%) compared to control (31%), which definitely confirms the cell penetration of this compound. Since these effects start to be observed at low concentration of Mn-1 (0.5 nM) it is

likely that they are not related to some classical double-strand breaks. Indeed, DNA oxidative damage properties of Mn-1 were tested in vitro in previous work. Due to the very low affinity of Mn-1 for DNA, the compound was not efficient in mediating oxidative DNA damage even at high concentration [54]. In summary, the moderate short-term toxicity and the formation of gH2AX foci are in favour of an interaction of Mn-1 with G-quadruplex DNA at the telomeres. Of course, these preliminary data need further studies to establish the real potential of this molecule as a G4-ligand in biology.

4. Conclusions

Porphyrins with their large aromatic structure and the four meso positions available for substitution are interesting scaffold for the targeting of G-quadruplex DNA. In the present work we investigated the influence of bulky substituents at the periphery and metal ion in the center of the porphyrin aromatic system and explored the potentials of porphyrins substituted with bulky substituents as small-molecule G-quadruplex ligands in cells.

The data confirm the large Mn-1 porphyrin as excellent G-quadruplex selective agent in comparison to TMPyP4 porphyrins. Its selectivity compares with that of 360D in FRET melting assay. The influence of a metal ion in the centre of the bulky substituted porphyrins was not conclusive. However, it was possible to show that the presence of two axial water molecules on a central metal in the TMPyP4 porphyrin series decreases the stabilization properties but enhances the selectivity for G-quadruplex DNA owing to geometrical constraints. The cellular tests with H₂-1 and Mn-1 proved encouraging showing that, regardless of the presence of large cationic substituents, the porphyrin derivatives are able to penetrate cells and mediate some of the typical cellular effects of small-molecule G-quadruplex ligands (Mn-1).

Acknowledgements

This research was partly supported by a joint Taiwan-France program (ANRe 07e BLANe 0343e 01). Dr. Chris S.-C. Jao from Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, is acknowledged for SPR measurements and Dr. Laurent Sabater, LCC,

for the metallation of Co-1. R. B. and E. D. are grateful to NanoBio program for access to the synthesis and surface characterization platforms.

Appendix. Supporting information

Supplementary data related to this article can be found online at doi:10.1016/j.biochi.2011.06.008.

References

- [1] S. Neidle, S. Balasubramanian, *Quadruplex Nucleic Acids*, RSC Biomolecular Sciences (2006) Cambridge, U.K.
- [2] D.J. Patel, A.T. Phan, V. Kuryavyi, Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 7429e7455.
- [3] A.T. Phan, V. Kuryavyi, H.Y. Gaw, D.J. Patel, Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter, *Nat. Chem. Biol.* 1 (2005) 167e173.
- [4] A.T. Phan, V. Kuryavyi, S. Burge, S. Neidle, D.J. Patel, Structure of an unprecedented G-quadruplex scaffold in the human c-kit promoter, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 4386e4392.
- [5] J. Dai, D. Chen, R.A. Jones, L.H. Hurley, D. Yang, NMR solution structure of the major G-quadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 5133e5144.
- [6] J.L. Huppert, S. Balasubramanian, G-quadruplexes in promoters throughout the human genome, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 406e413.
- [7] D. Drygin, A. Siddiqui-Jain, S. O'Brien, M. Schwaebe, A. Lin, J. Bliesath, C.B. Ho, C. Proffitt, K. Trent, J.P. Whitten, J.K. Lim, D. Von Hoff, K. Anderes, W.G. Rice, Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis, *Cancer Res.* 69 (2009) 7653e7661.
- [8] H. Martadinata, A.T. Phan, Structure of propeller-type parallel-stranded RNA G-quadruplexes, formed by human telomeric RNA sequences in K⁺ solution, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 2570e2578.
- [9] Y. Xu, K. Kaminaga, M. Komiya, G-quadruplex formation by human telomeric repeats-containing RNA in Na⁺ solution, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 11179e11184.
- [10] D. Gomez, T. Wenner, B. Brassart, C. Douarre, M.F. O'Donohue, V. El Khoury, K. Shin-Ya, H. Morjani, C. Trentesaux, J.F. Riou, Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 38721e38729.
- [11] A. Rizzo, E. Salvati, M. Porru, C. D'Angelo, M.F. Stevens, M. D'Incalci, C. Leonetti, E. Gilson, G. Zupi, A. Biroccio, Stabilization of quadruplex DNA perturbs telomere replication leading to the activation of an ATR-dependent ATM signaling pathway, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 5353e5364.
- [12] A.M. Burger, F. Dai, C.M. Schultes, A.P. Reszka, M.J. Moore, J.A. Double, S. Neidle, The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function, *Cancer Res.* 65 (2005) 1489e1496.
- [13] P. Phatak, J.C. Cookson, F. Dai, V. Smith, R.B. Gartenhaus, M.F. Stevens, A.M. Burger, Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHP54 inhibits clonogenic tumour cell growth in vitro and in vivo consistent with a cancer stem cell targeting mechanism, *Br. J. Cancer* 96 (2007) 1223e1233.
- [14] A. Siddiqui-Jain, C.L. Grand, D.J. Bearss, L.H. Hurley, Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11593e11598.
- [15] S. Cogoi, L.E. Xodo, G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 2536e2549.
- [16] M. Bejugam, S. Sewitz, P.S. Shirude, R. Rodriguez, R. Shahid, S. Balasubramanian, Trisubstituted isoalloxazines as a new class of G-quadruplex binding ligands: small molecule regulation of c-kit oncogene expression, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 12926e12927.
- [17] Y. Qin, L.H. Hurley, Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions, *Biochimie* 90 (2008) 1149e1171.
- [18] D. Gomez, A. Guedin, J.L. Mergny, B. Salles, J.F. Riou, M.P. Teulade-Fichou, P. Calsou, A G-quadruplex structure within the 5'-UTR of TRF2 mRNA represses translation in human cells, *Nucleic Acids Res.* (2010).
- [19] J.D. Beaudoin, J.P. Perreault, 5'-UTR G-quadruplex structures acting as translational repressors, *Nucleic Acids Res.* (2010).
- [20] S. Balasubramanian, S. Neidle, G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 345e353.
- [21] A. De Qian, L. Lacroix, C. Douarre, N. Temime-Smaali, C. Trentesaux, J.F. Riou, J.L. Mergny, Targeting telomeres and telomerase, *Biochimie* 90 (2008) 131e155.
- [22] T.M. Ou, Y.J. Lu, J.H. Tan, Z.S. Huang, K.Y. Wong, L.Q. Gu, G-quadruplexes: targets in anticancer drug design, *ChemMedChem* 3 (2008) 690e713.
- [23] D. Monchaud, M.P. Teulade-Fichou, A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands, *Org. Biomol. Chem.* 6 (2008) 627e636.
- [24] G. Pennarun, C. Granotier, L.R. Gauthier, D. Gomez, F. Hoffschir, E. Mandine, J.F. Riou, J.L. Mergny, P. Mailliet, 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* 24 (2005) 2917e2928.
- [25] P.S. Shirude, E.R. Gillies, S. Ladame, F. Godde, K. Shin-Ya, I. Huc, S. Balasubramanian, Macrocyclic and helical oligoamides as a new class of G-quadruplex ligands, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 11890e11891.
- [26] A. De Qian, E. Delemos, J.L. Mergny, M.P. Teulade-Fichou, D. Monchaud, Highly efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 1856e1857.
- [27] J. Dash, P.S. Shirude, S.T. Hsu, S. Balasubramanian, Diarylethynyl amides that recognize the parallel conformation of genomic promoter DNA G-quadruplexes, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 15950e15956.
- [28] Z.A. Waller, P.S. Shirude, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, Triarylpyridines: a versatile small molecule scaffold for G-quadruplex recognition, *Chem. Commun.* (2008) 1467e1469.
- [29] S. Sparapani, S. Bellini, M. Gunaratnam, S.M. Haider, A. Andreani, M. Rambaldi, A. Locatelli, R. Morigi, M. Granaola, L. Varoli, S. Burnelli, A. Leoni, S. Neidle, Bis-guanyldiazole diimidazo[1,2-a:1,2-c]pyrimidine as a novel and specific G-quadruplex binding motif, *Chem. Commun.* 46 (2010) 5680e5682.
- [30] S. Sparapani, S.M. Haider, F. Doria, M. Gunaratnam, S. Neidle, Rational design of acridine-based ligands with selectivity for human telomeric quadruplexes, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 12263e12272.
- [31] H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto, Anionic phthalocyanines targeting G-quadruplexes and inhibiting telomerase activity in the presence of excessive DNA duplexes, *Chem. Commun.* 46 (2010) 5740e5742.
- [32] H. Arthanari, S. Basu, T.L. Kawano, P.H. Bolton, Fluorescent dyes specific for quadruplex DNA, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 3724e3728.
- [33] N.V. Anantha, M. Azam, R.D. Sheardy, Porphyrin binding to quadruplexed T(4)G(4), *Biochemistry* 37 (1998) 2709e2714.
- [34] R.T. Wheelhouse, D. Sun, H. Han, F. Xiaoguang Han, L.H. Hurley, Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: the interaction of Tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine with quadruplex DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 3261e3262.
- [35] G.N. Parkinson, R. Ghosh, S. Neidle, Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres, *Biochemistry* 46 (2007) 2390e2397.
- [36] M. del Toro, P. Bucek, A. Avino, J. Jaumot, C. Gonzalez, R. Eritja, R. Gargallo, Targeting the G-quadruplex-forming region near the P1 promoter in the human BCL-2 gene with the cationic porphyrin TMPyP4 and with the complementary C-rich strand, *Biochimie* 91 (2009) 894e902.
- [37] E. Izbic, D. Nishioka, V. Marcell, E. Raymond, K.K. Davidson, R.A. Lawrence, R.T. Wheelhouse, L.H. Hurley, R.S. Wu, D.D. Von Hoff, Telomere-interactive agents affect proliferation rates and induce chromosomal destabilization in sea urchin embryos, *Anticancer Drug Des.* 14 (1999) 355e365.
- [38] S.Y. Rha, E. Izbic, R. Lawrence, K. Davidson, D. Sun, M.P. Moyer, G.D. Roodman, L. Hurley, D. Von Hoff, Effect of telomere and telomerase interactive agents on human tumor and normal cell lines, *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 987e993.
- [39] C.L. Grand, H. Han, R.M. Munoz, S. Weitman, D.D. Von Hoff, L.H. Hurley, R.T. Bearss, The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo, *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 565e573.
- [40] M.A. Shammass, R.J. Shmookler Reis, M. Akiyama, H. Koley, D. Chauhan, T. Hideshima, R.K. Goyal, L.H. Hurley, K.C. Anderson, N.C. Munshi, Telomerase inhibition and cell growth arrest by G-quadruplex interactive agent in multiple myeloma, *Mol. Cancer Ther.* 2 (2003) 825e833.
- [41] M.Y. Kim, M. Gleason-Guzman, E. Izbic, D. Nishioka, L.H. Hurley, The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures, *Cancer Res.* 63 (2003) 3247e3256.
- [42] D. Sun, W.J. Liu, K. Guo, J.J. Rusche, S. Ebbinghaus, V. Gokhale, L.H. Hurley, The proximal promoter region of the human vascular endothelial growth factor gene has a G-quadruplex structure that can be targeted by G-quadruplex-interactive agents, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 880e889.
- [43] Y. Mikami-Terao, M. Akiyama, Y. Yuza, T. Yanagisawa, O. Yamada, H. Yamada, Antitumor activity of G-quadruplex-interactive agent TMPyP4 in K562 leukemic cells, *Cancer Lett.* 261 (2008) 226e234.
- [44] J. Ren, J.B. Chaires, Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands, *Biochemistry* 38 (1999) 16067e16075.
- [45] I.M. Dixon, F. Lopez, J.P. Esteve, A.M. Tejera, M.A. Blasco, G. Pratviel, B. Meunier, Porphyrin derivatives for telomere binding and telomerase inhibition, *ChemBiochem* 6 (2005) 123e132.
- [46] D.F. Shi, R.T. Wheelhouse, D. Sun, L.H. Hurley, Quadruplex-interactive agents as telomerase inhibitors: synthesis of porphyrins and structure-activity relationship for the inhibition of telomerase, *J. Med. Chem.* 44 (2001) 4509e4523.
- [47] S.E. Evans, M.A. Mendez, K.B. Turner, L.R. Keating, R.T. Grimes, S. Melchior, V.A. Szalai, End-stacking of copper cationic porphyrins on parallel-stranded guanine quadruplexes, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 1235e1249.
- [48] J. Pan, S. Zhang, Interaction between cationic zinc porphyrin and lead ion induced telomeric guanine quadruplexes: evidence for end-stacking, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 401e407.
- [49] T. Yamashita, T. Uno, Y. Ishikawa, Stabilization of guanine quadruplex DNA by the binding of porphyrins with cationic side arms, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 2423e2430.

- [50] P. Wang, L. Ren, H. He, F. Liang, X. Zhou, Z. Tan, A phenol quaternary ammonium porphyrin as a potent telomerase inhibitor by selective interaction with quadruplex DNA, *Chembiochem* 7 (2006) 1155e1159.
- [51] I.M. Dixon, F. Lopez, A.M. Tejera, J.P. Esteve, M.A. Blasco, G. Pratiel, B. Meunier, A G-quadruplex ligand with 1000-fold selectivity over duplex DNA, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 1502e1503.
- [52] C. Wei, G. Ja, J. Zhou, G. Han, C. Li, Evidence for the binding mode of porphyrins to G-quadruplex DNA, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 4025e4032.
- [53] Y. Du, D. Zhang, W. Chen, M. Zhang, Y. Zhou, X. Zhou, Cationic N-confused porphyrin derivative as a better molecule scaffold for G-quadruplex recognition, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 1111e1116.
- [54] C. Romera, L. Sabater, A. Garofalo, I.M. Dixon, G. Pratiel, Interaction of cationic nickel and manganese porphyrins with the minor groove of DNA, *Inorg. Chem.* 49 (2010) 8558e8567.
- [55] J.L. Mergny, J.C. Maurizot, Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat, *Chembiochem* 2 (2001) 124e132.
- [56] A. De Cian, L. Guittat, M. Kaiser, B. Sacca, S. Amrane, A. Bourdoncle, P. Alberti, M.P. Teulade-Fichou, L. Lacroix, J.L. Mergny, Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands, *Methods* 42 (2007) 183e195.
- [57] P. Murat, R. Bonnet, A. Van der Heyden, N. Spinelli, P. Labbe, D. Monchaud, M.P. Teulade-Fichou, P. Dumy, E. Defranco, Template-assembled synthetic G-quadruplex (TASQ): a useful system for investigating the interactions of ligands with constrained quadruplex topologies, *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 6106e6114.
- [58] D. Gomez, J.L. Mergny, J.F. Riou, Detection of telomerase inhibitors based on G-quadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay, *Cancer Res.* 62 (2002) 3365e3368.
- [59] W. Fu, J.G. Begley, M.W. Killen, M.P. Mattson, Anti-apoptotic role of telomerase in pheochromocytoma cells, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 7264e7271.
- [60] G. Krupp, K. Kuhne, S. Tamm, W. Klapper, K. Heidorn, A. Rott, R. Parwaresch, Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 919e921.
- [61] N.W. Kim, M.A. Platyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, J.W. Shay, Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, *Science* 266 (1994) 2011e2015.
- [62] N.W. Kim, F. Wu, Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP), *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 2595e2597.
- [63] I. Haq, J.O. Trent, B.Z. Chowdhry, T.C. Jenkins, Intercalative G-tetraplex stabilization of telomeric DNA by a cationic porphyrin, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 1768e1779.
- [64] H. Han, D.R. Langley, A. Rangan, L.H. Hurley, Selective interactions of cationic porphyrins with G-quadruplex structures, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 8902e8913.
- [65] H. Mita, T. Ohyama, Y. Tanaka, Y. Yamamoto, Formation of a complex of 5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)-21H,23H-porphyrin with G-quadruplex DNA, *Biochemistry* 45 (2006) 6765e6772.
- [66] C. Wei, G. Han, G. Ja, J. Zhou, C. Li, Study on the interaction of porphyrin with G-quadruplex DNAs, *Biophys. Chem.* 137 (2008) 19e23.
- [67] G. Ja, Z. Feng, C. Wei, J. Zhou, X. Wang, C. Li, Dynamic insight into the interaction between porphyrin and G-quadruplex DNAs: time-resolved fluorescence anisotropy study, *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 16237e16245.
- [68] L. Martino, B. Pagano, I. Fotticchia, S. Neidle, C. Giancola, Shedding light on the interaction between TMPyP4 and human telomeric quadruplexes, *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 14779e14786.
- [69] R. McGuire J., D.R. McMillin, Steric effects direct the binding of porphyrins to tetramolecular quadruplex DNA, *Chem. Commun.* (2009) 7393e7395.
- [70] J.M. Kelly, M.J. Murphy, D.J. McConnell, C. OhUigin, A comparative study of the interaction of 5,10,15, 20-tetrakis (N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin and its zinc complex with DNA using fluorescence spectroscopy and topoisomerisation, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 167e184.
- [71] R.J. Fiel, Porphyrin-nucleic acid interaction: a review, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 6 (1989) 1259e1274.
- [72] B. Ward, A. Skorobogaty, J.C. Dabrowiak, DNA cleavage specificity of a group of cationic metalloporphyrins, *Biochemistry* 25 (1986) 6875e6883.
- [73] J.C. Dabrowiak, B. Ward, J. Goodisman, Quantitative footprinting analysis using a DNA-cleaving metalloporphyrin complex, *Biochemistry* 28 (1989) 3314e3322.
- [74] M. Pttie, G. Pratiel, J. Bernadou, B. Meunier, Preferential hydroxylation by the chemical nuclease meso-tetrakis-(4-N-methylpyridiniumyl)porphyrin-atomanganeseIII pentaacetate/KHSO₅ at the 5' carbon of deoxyriboses on both 3' sides of three contiguous A.T base pairs in short double-stranded oligonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 3967e3971.
- [75] P. Arnaud, K. Zakrzewska, B. Meunier, Theoretical study of the interaction between a high-valent manganese porphyrin oxyl-(hydroxo)-Mn(IV)-TMPyP and double-stranded DNA, *J. Comput. Chem.* 24 (2003) 797e805.
- [76] M. Bennett, A. Krah, F. Wien, E. Garman, R. McKenna, M. Sanderson, S. Neidle, A DNA-porphyrin minor-groove complex at atomic resolution: the structural consequences of porphyrin ruffling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 9476e9481.
- [77] D. Monchaud, C. Allain, H. Bertrand, N. Smargiasso, F. Rosu, V. Gabelica, A. De Cian, J.L. Mergny, 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* 90 (2008) 1207e1223.
- [78] A. De Cian, J. Gros, A. Guedin, M. Haddi, S. Lyonnois, L. Guittat, J.F. Riou, C. Trentesaux, B. Sacca, L. Lacroix, P. Alberti, J.L. Mergny, DNA and RNA quadruplex ligands, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 24 (2008) 7e8.
- [79] P. Hambright, Chemistry of water soluble porphyrins, in: K.M. Kadish, K.M. Smith, R. Guillard (Eds.), *The Porphyrin Handbook*, Academic Press, San Diego, 2000, Vol. 3, pp. 129e210.
- [80] G. Li, J. Huang, M. Zhang, Y. Zhou, D. Zhang, Z. Wu, S. Wang, X. Weng, X. Zhou, G. Yang, Bis(benzimidazole)pyridine derivative as a new class of G-quadruplex inducing and stabilizing ligand, *Chem. Commun.* (2008) 4564e4566.
- [81] T.P. Garner, H.E. Williams, K.I. Gluszyk, S. Roe, N.J. Oldham, M.F. Stevens, J.E. Moses, M.S. Searle, Selectivity of small molecule ligands for parallel and anti-parallel DNA G-quadruplex structures, *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 4194e4200.
- [82] A.T. Phan, K.N. Luu, D.J. Patel, Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3p1) G-quadruplexes in K⁺ solution, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 5715e5719.
- [83] J. Dai, M. Carver, C. PUNCHIHEWA, R.A. JONES, D. Yang, Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 4927e4940.
- [84] J. Dai, M. Carver, D. Yang, Polymorphism of human telomeric quadruplex structures, *Biochimie* 90 (2008) 1172e1183.
- [85] H.J. Zhang, X.F. Wang, P. Wang, X.C. Ai, J.P. Zhang, Spectroscopic study on the binding of a cationic porphyrin to DNA G-quadruplex under different K⁺ concentrations, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 948e955.
- [86] S.M. Gowan, J.R. Harrison, L. Patterson, M. Valenti, M.A. Read, S. Neidle, L.R. Kelland, A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity, *Mol. Pharmacol.* 61 (2002) 1154e1162.
- [87] M. Gunaratnam, O. Greciano, C. Martins, A.P. Reszka, C.M. Schultes, H. Morjani, J.F. Riou, S. Neidle, Mechanism of acridine-based telomerase inhibition and telomere shortening, *Biochem. Pharmacol.* 74 (2007) 679e689.
- [88] S.M. Gowan, R. Heald, M.F. Stevens, L.R. Kelland, Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes, *Mol. Pharmacol.* 60 (2001) 981e988.
- [89] D. Gomez, R. Paterski, T. Lemarteleur, K. Shin-Ya, J.L. Mergny, J.F. Riou, Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 41487e41494.
- [90] F. d'Adda di Fagnagna, P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, S.P. Jackson, A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence, *Nature* 426 (2003) 194e198.
- [91] H. Takai, A. Smogorzewska, T. de Lange, DNA damage foci at dysfunctional telomeres, *Curr. Biol.* 13 (2003) 1549e1556.

Supporting Information**Improvement of porphyrins for G-quadruplex DNA targeting**

Carmen Romera^{a,b}, Oriane Bombarde^c, Romaric Bonnet^d, Dennis Gomez^c, Pascal Dumy^d, Patrick Calsou^c, Jean-Fang Gwan^e, Jung-Hsin Lin^c, Eric Defrancq^d, Geneviève Pratviel^{a,b,*}

- a) *CNRS, Laboratoire de Chimie de Coordination, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France*
- b) *Université de Toulouse, F-31077 Toulouse, France*
- c) *Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205 Route de Narbonne, F-31077 Toulouse, France.*
- d) *Ingénierie et Interactions BioMoléculaires, Département de Chimie Moléculaire-UMR CNRS 5250, Université J. Fourier, 570 rue de la Chimie, BP 53 38041 Grenoble Cedex 9*
- e) *Research Center for Applied Sciences, Academia Sinica, No. 128 Academia Road Sec. 2, Taipei, 115, Taiwan.*

Metalation procedure for Co-TMPyP4, Au-TMPyP4, and Co-1.**Materials**

The following compounds were commercially available: cobalt(II) chloride hexahydrate (Fluka), potassium hexafluorophosphate, cobalt(II) acetate, and potassium tetrachloroaurate(III) (Aldrich), DOWEX 1x8-200 resin (chloride form) (Acros). Sep-Pak C18 cartridges (Vac 20cc, 5g) were from Waters. ¹H NMR spectra were recorded on Bruker Avance-300, and ARX-250 spectrometer with the residual solvent peak as internal calibration. Mass spectra were recorded either on a PerkinElmer SCIEX API 365 or Applied Biosystems Q TRAP. UV-visible spectra

were recorded on a Hewlett Packard 8452A spectrophotometer. Porphyrins were prepared according to literature procedures [1-3].

Meso-5,10,15,20-tetrakis(4-N-methyl-pyridiniumyl)porphyrinatocobalt(III) pentachloride (Co-TMPyP4) [4]. H₂-TMPyP4 tetrachloride (30 mg, 0.037 mmol), cobalt(II) chloride hexahydrate (17.4 mg, 0.073 mmol) and KOH 20% (equilibration to pH = 8) were mixed in 25 mL of H₂O, and incubated during 12 hours under argon at room temperature. The reaction was monitored by UV-visible spectroscopy and was stopped when the Soret band shift was complete (from 422 to 441 nm, H₂O). The pH was adjusted with HCl to 1.5 and air was bubbled into the solution. The oxidation Co(II) to Co(III) was monitored by the shift of the Soret band from 441 to 433 nm at acidic pH. KPF₆ (80 mg, 0.43 mmol) in 1 mL H₂O was added in the solution and the porphyrin precipitated. The solution was centrifuged and the solid was taken in 1 mL DMSO. Hexafluorophosphate anions were exchanged by chlorides on anion exchange resin (DOWEX 1x8-200) (1 g of resin) by slow stirring at ambient temperature for 48 h. Total exchange by chloride anions was monitored by ³¹P NMR (no signal at -145 ppm). The solution was filtered and the resin was washed with methanol (10 mL). The solvent was evaporated to dryness. The product was taken in 2-propanol (12 mL)/ Et₂O (50 mL) and the porphyrin precipitated. The porphyrin was filtered, dried and taken in water (1 mL). The cobalt salts were allowed to precipitate at 4 °C. The aqueous phase was separated, evaporated to dryness. The solid was dried under vacuum. Yield: 36 mg (0.039 mmol, 100%) black-blue solid. UV-Vis (H₂O) λ max nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) = 435 (77x10³), 554 (9x10³). ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ (ppm) 9.26 (s, 8H, pyrrole), 9.24 (d, J = 6.8 Hz, 8H, pyridine), 8.91 (d, J = 6.8 Hz, 8H, pyridine), 4.72 (under water signal, CH₃). ES⁺-MS m/z = 268.5 (M(Co^{III})-3Cl)³⁺, 257.2 (M(Co^{II})-4Cl)³⁺, 245.2 (M(Co^I)-5Cl)³⁺.

Meso-5,10,15,20-tetrakis(4-N-methyl-pyridiniumyl)porphyrinatogold(III) pentachloride (Au-TMPyP4). H₂-TMPyP4 tetrachloride (60 mg, 0.073 mmol) was refluxed in water (15 mL) with KAuCl₄ (38 mg, 0.1 mmol) during 24 h at 100 °C in the dark. The reaction was monitored

by UV-visible spectroscopy and was stopped when the Soret band shift was complete (from 422 nm to 404 nm, H₂O). At the end of the metallation, water was evaporated. The solid was taken in a mixture of CH₃OH /Et₂O (3:30) and the product precipitated. The porphyrin was filtered, dried and taken in water (4 mL). Gold salts were allowed to precipitate at 4 °C. The aqueous phase was separated, evaporated to dryness. The solid was dried under vacuum. Yield: 60 mg (0.06 mmol, 80%) red solid. UV-Vis (H₂O) λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) 404 (200x10³), 521 (14x10³), 556 (6x10³). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD), δ (ppm) 9.68 (s, 8H, pyrrole), 9.53 (d, J = 6.3 Hz, 8H, pyridine), 9.11 (d, J = 6.3 Hz, 8H, pyridine), 4.88 (s under HOD signal, CH₃). ES⁺-MS m/z = 174.7 (M-5Cl)⁵⁺, 227.3 (M-4Cl)⁴⁺, 314.5 (M-3Cl)³⁺, 490.1 (M-2Cl)²⁺.

Co-1. A mixture of the non metallated porphyrin H₂-1 (46 mg, 0.032 mmol), cobalt(II) acetate tetrahydrate (14 mg, 0.056 mmol) and NaOH (0.1 mL, NaOH 1M) was heated in H₂O (21 mL) at 100 °C in the dark under argon for 3-4 h. The reaction was monitored by UV-visible spectroscopy and was stopped when the Soret band shift was complete (from 448 to 428 nm, H₂O, acidic pH and stirring for oxidation of Co^{II} to Co^{III}). The reaction mixture was evaporated. The solid was dissolved in 20 mL of aqueous HCl (0.1 M) and stirred at room temperature for 15 h. The solution is filtered and dried under vacuum. The solid was dissolved in a minimum volume of H₂O. Desalting of the porphyrin was performed by reverse phase chromatography on a C18 Sep-Pak cartridge (5g, Waters) by elution with milliQ water followed by MeOH/H₂O (50:50). The collected fractions were evaporated to dryness and product taken in methanol. The fractions were analyzed by TLC [for TLC conditions see ref. 3]. The fractions of interest were evaporated and taken in methanol. The product was precipitated by the addition of diethyl ether, filtered, washed with Et₂O. Yield: 30 mg (0.02 mmol, 62%) green solid.

UV-Vis (H₂O), λ max nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) 428 (350x10³), 540 (19x10³), 574 (8x10³). ¹H NMR (300 MHz, D₂O), δ 9.21 (s, 8H, pyrrole), 8.79 (s, 4H, pyridine), 8.64 (d, J = 6 Hz, 4H, pyridine), 8.49 (d, J = 8 Hz, 4H, pyridine), 8.23 (d, J = 8 Hz, 8H, phenyl), 7.99 (dd, J = 8, 6 Hz, 4H, pyridine),

4

7.77 (d, $J = 8$ Hz, 8H, phenyl), 4.36 (s, 12H, CH_3-N), 3.31 (t, 8H, CH_2), 3.01 (t, 8H, CH_2). ES^+ -
MS $m/z = 265.0$ ($M(Co^{III})-5Cl$) $^{5+}$, 331.4 ($M(Co^{II})-5Cl$) $^{4+}$.

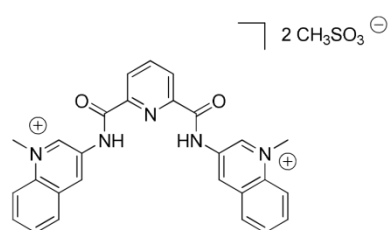


Figure S1. Structure of 360D

5

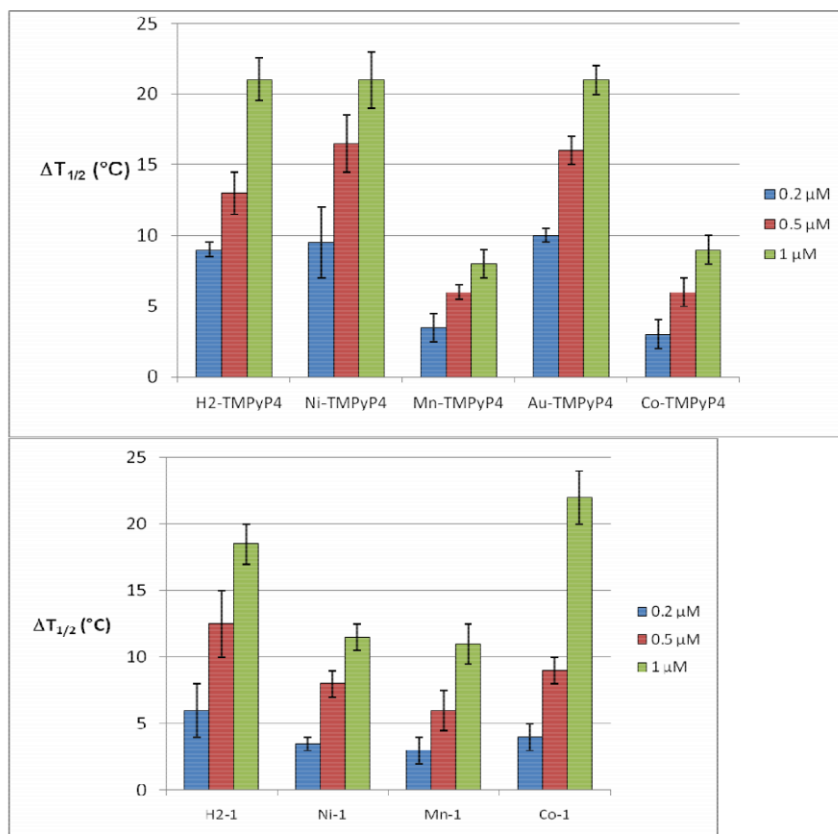
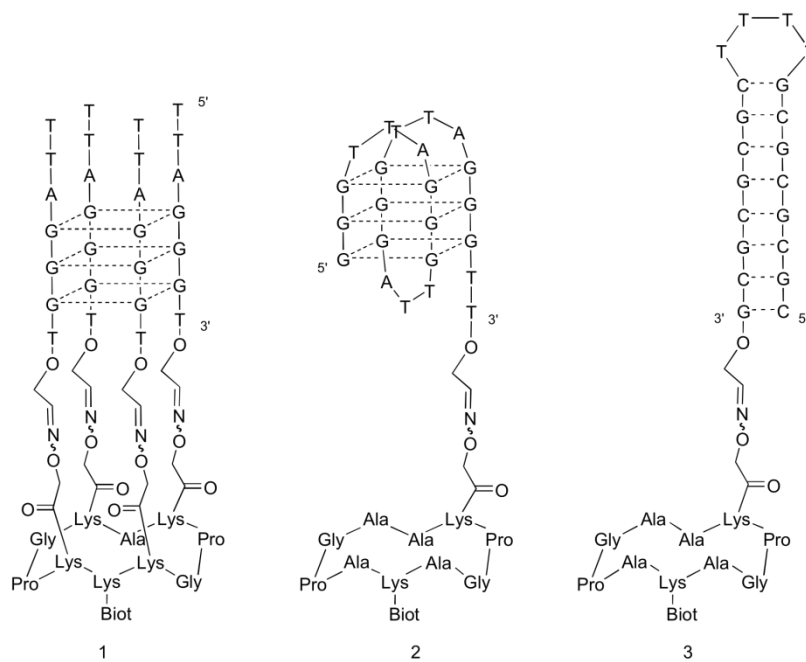


Figure S2. FRET-melting results for the non-metallated and metallated porphyrins of the TMPy4 (A) and bulky (B) porphyrin series, at 0.2 (blue), 0.5 (red), and 1 μM (green) concentration, carried out with F21T (0.2 μM) in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2) with 5 mM KCl and 95 mM LiCl.

SPR studies



Scheme S1. Biomolecular systems **1-3** containing different DNA structures: A) parallel-stranded quadruplex **1**; B) intramolecular-folded quadruplex **2**; and C) duplex **3**.

7

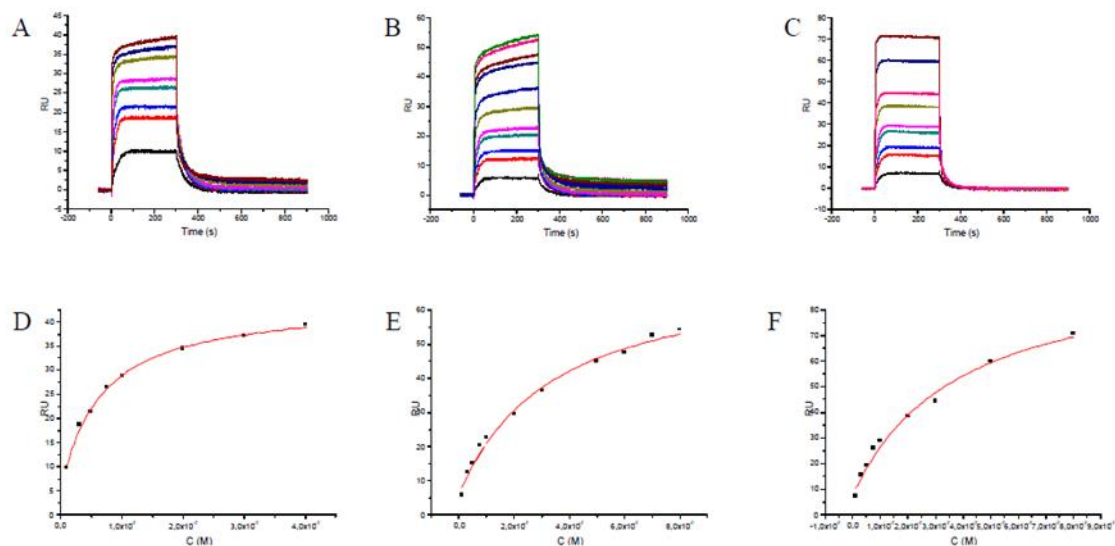


Figure S3. SPR sensorgrams for the interaction of H2-TMPyP4 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2** and C) the duplex **3**. The ligand concentration was varied from 10nM (bottom curve) to 400nM (top curve) for **1** and 800nM for **2** and **3**. D)-F) Absorption isotherms fitted in first approximation with a Langmuir model.

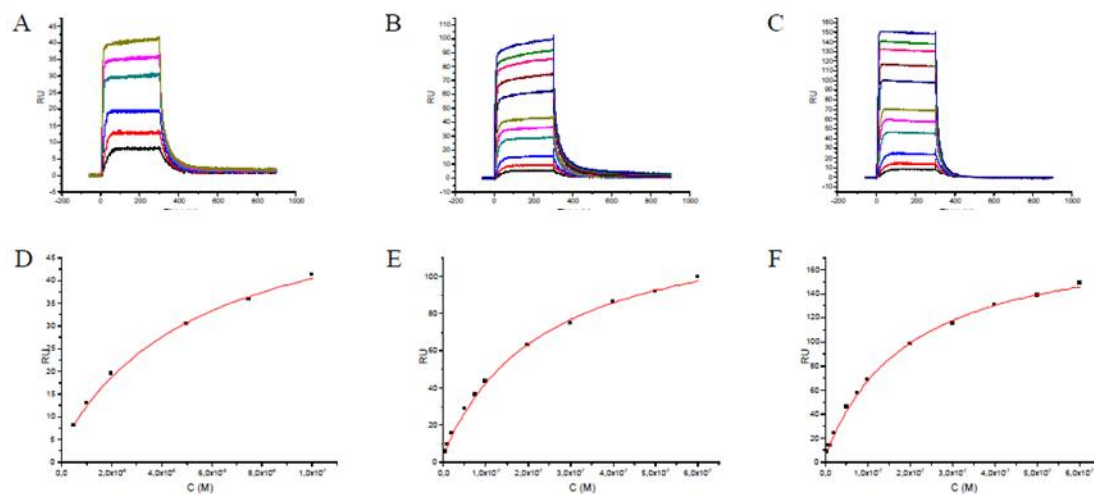


Figure S4. SPR sensorgrams for the interaction of Ni-TMPyP4 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2** and C) the duplex **3**. The ligand concentration was varied from 5nM (bottom curve) to 100nM (top curve) for **1** and 600nM for **2** and **3**. D)-F) Absorption isotherms fitted in first approximation with a Langmuir model.

8

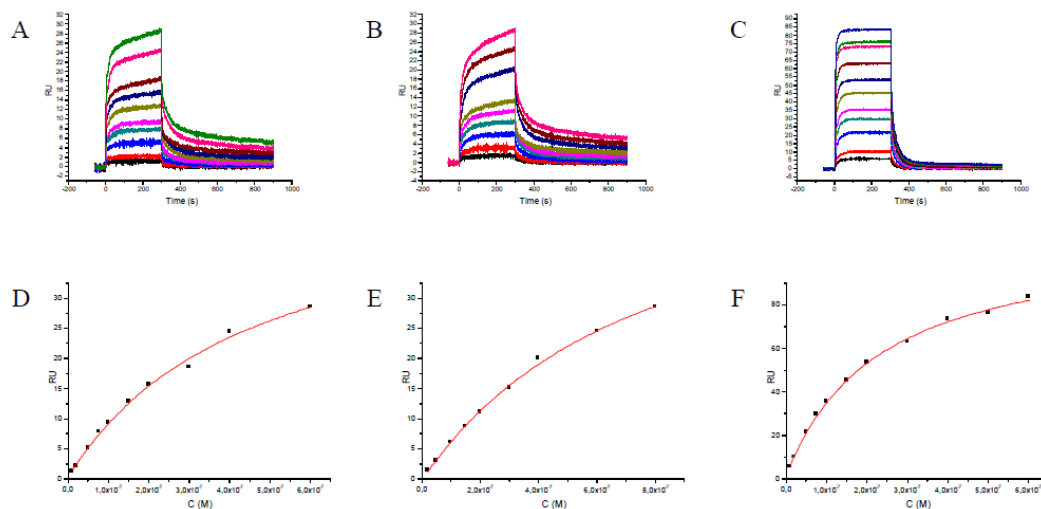


Figure S5. SPR sensorgrams for the interaction of Au-TMPyP4 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2** and C) the duplex **3**. The ligand concentration was varied from 10nM (bottom curve) to 600nM (top curve) for **1** and **3** and 20nM (bottom curve) to 800nM (top curve) for **2**. D)-F) Absorption isotherms fitted in first approximation with a Langmuir model.

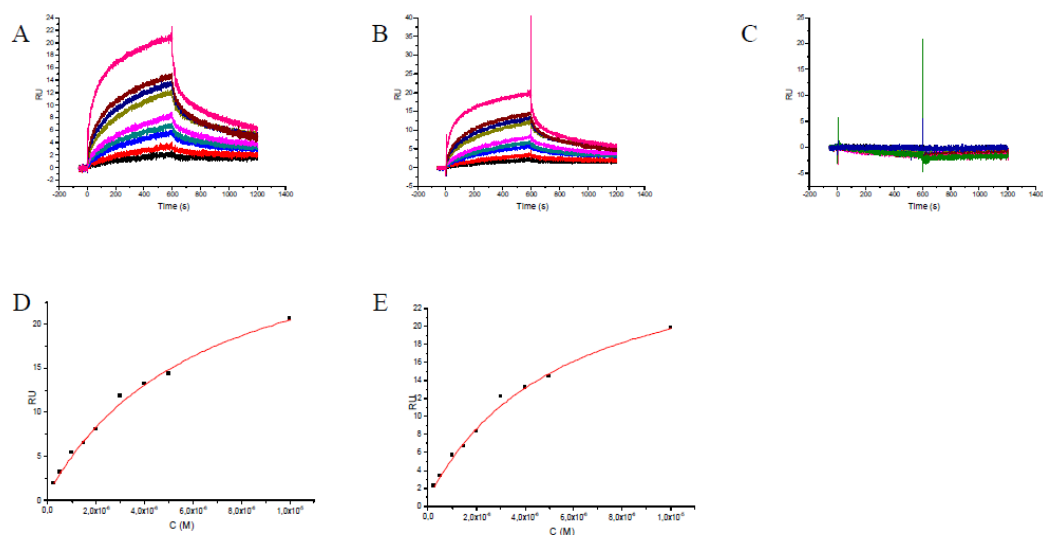


Figure S6. SPR sensorgrams for the interaction of Co-TMPyP4 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2** and C) the duplex **3**. The ligand concentration was varied from 250nM (bottom curve) to 10 μ M (top curve) for **1-3**. D)-E) Absorption isotherms fitted in first approximation with a Langmuir model.

9

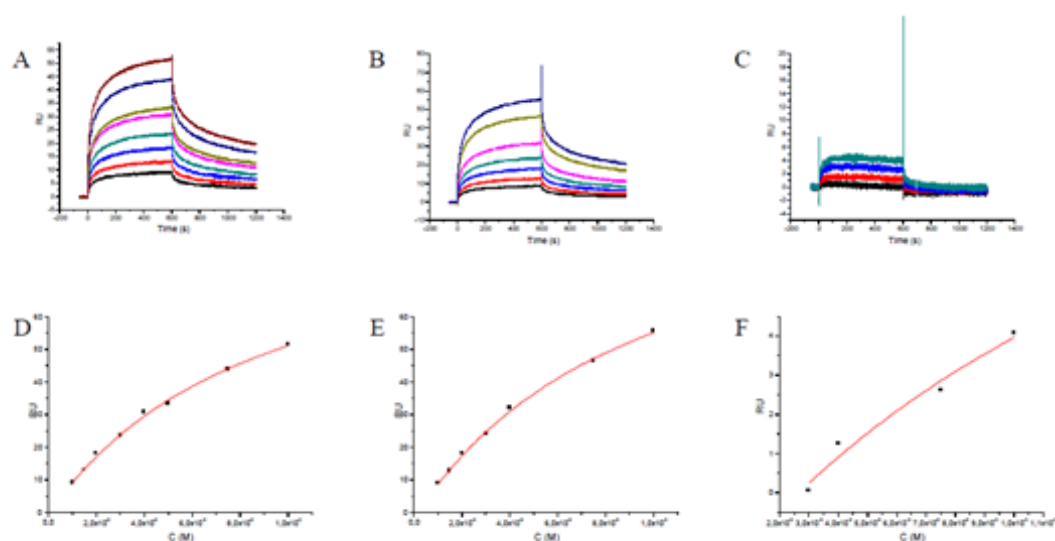


Figure S7. SPR sensorgrams for the interaction of Mn-TMPyP4 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2** and C) the duplex **3**. The ligand concentration was varied from $1\mu\text{M}$ (bottom curve) to $10\mu\text{M}$ (top curve) for **1** and **2** and from $3\mu\text{M}$ (bottom curve) to $10\mu\text{M}$ (top curve) for **3**. D)-F) Absorption isotherms fitted in first approximation with a Langmuir model.

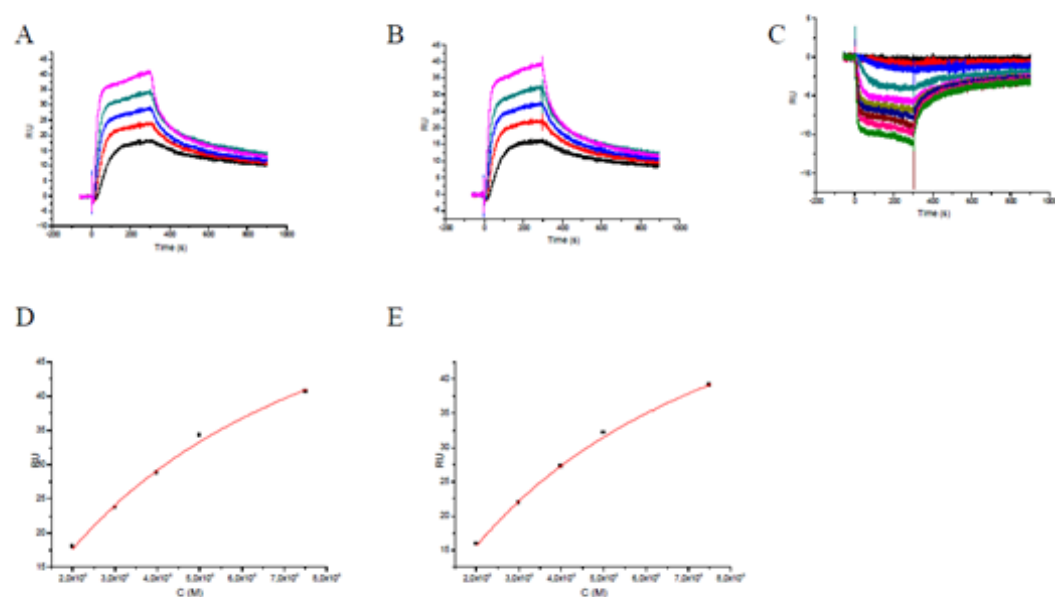


Figure S8. SPR sensorgrams for the interaction of Mn-1 with A) the intermolecular-like quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **2** and C) the duplex **3**. The ligand concentration was varied from 20nM (bottom curve) to 75nM (top curve) for **1** and **2** and from 1nM (bottom curve) to 100nM (top curve) for **3**. D)-E) Absorption isotherms fitted in first approximation with a Langmuir model.

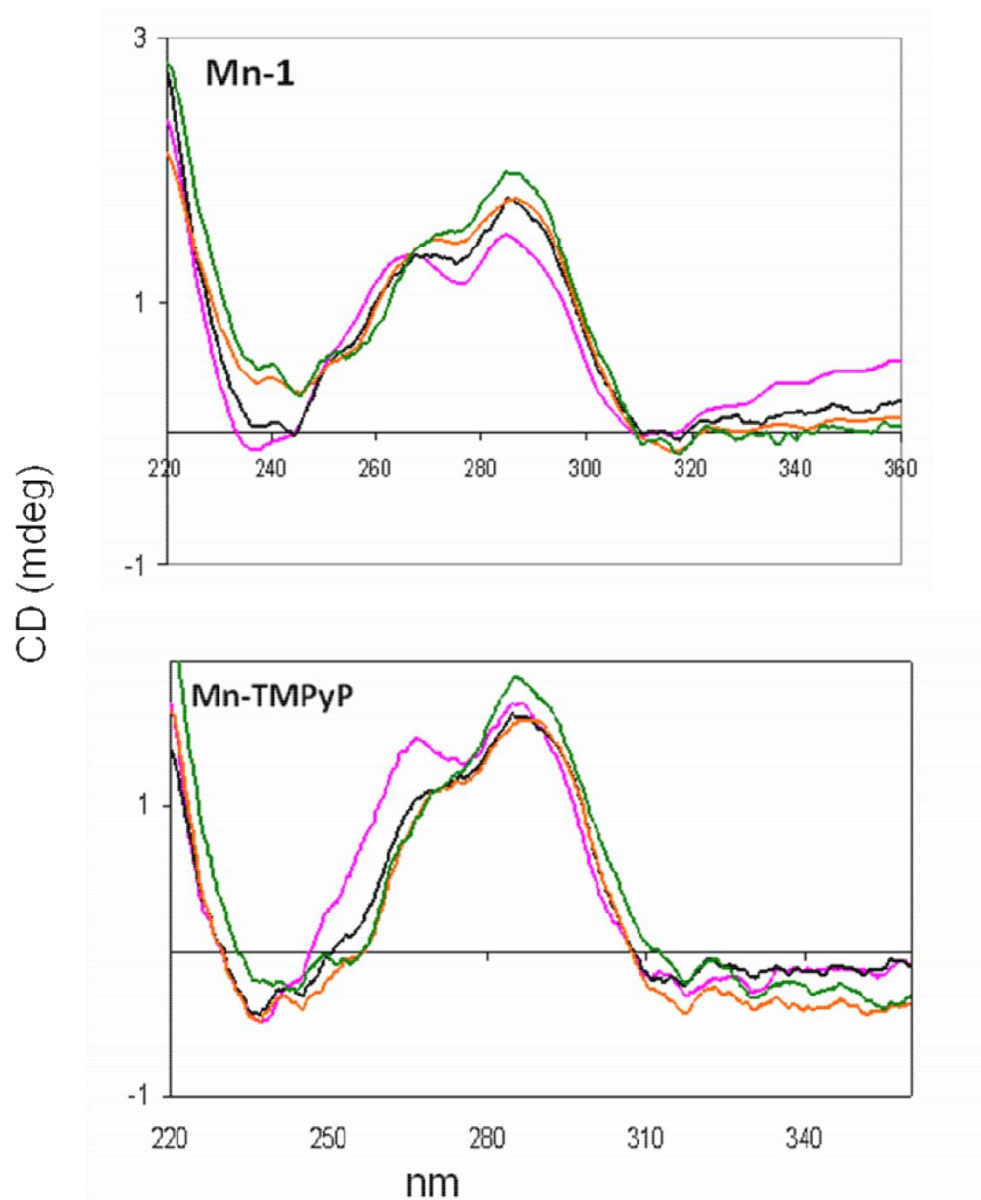


Figure S9. Circular dichroism spectra for porphyrins **Mn-1** and Mn-TMPyP4 titrated against the 27-mer human intramolecular telomeric quadruplex (telo27) in K^+ solution (10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2, 10 mM KCl). Telo27 DNA 0.5 μ M (pink), telo27/porphyrin, 1:1 (black), 1:3 (orange), 1:9 (green)

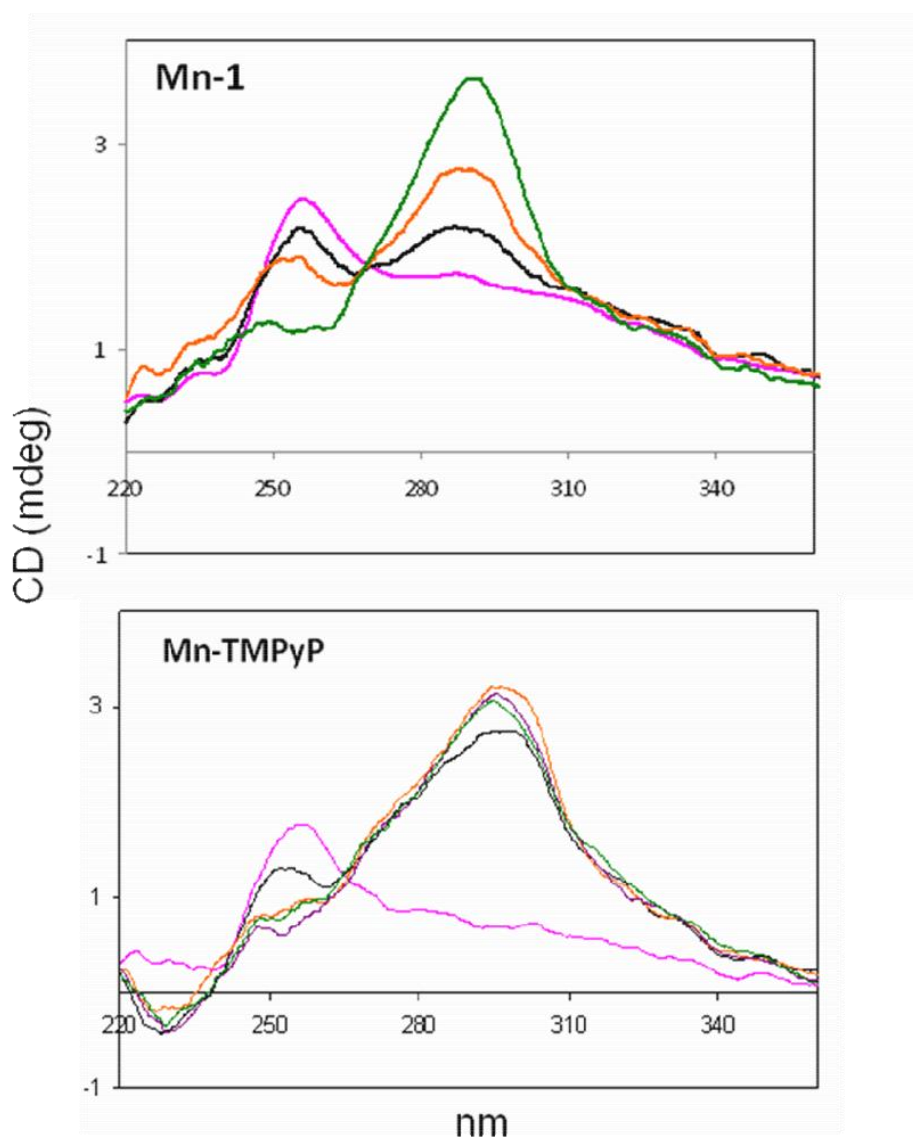


Fig. S10. Circular dichroism spectra for porphyrins **Mn-1** and Mn-TMPyP4 titrated against the 27-mer human intramolecular telomeric quadruplex (telo27) in “no salt” solution (10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2). Telo27 DNA 0.5 μ M (pink), telo27/porphyrin, 1:1 (black), 1:3 (orange), 1:9 (green). The porphyrins induce quadruplex folding in the absence of KCl.

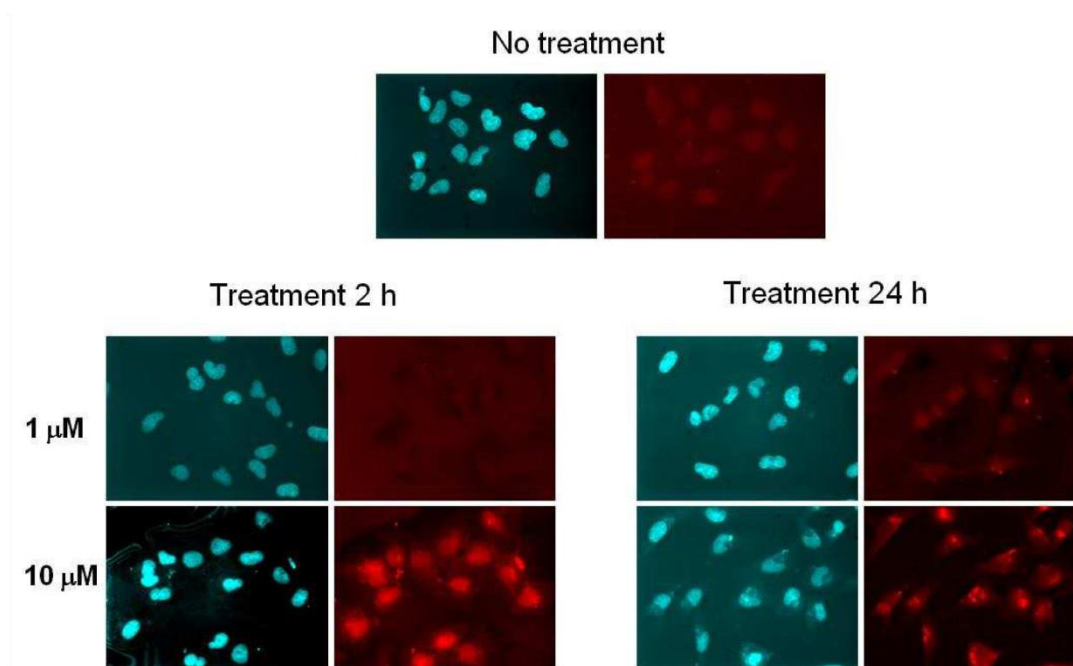


Figure S11. Cell penetration of **H₂-1**. HeLa cells were incubated with 1 and 10 μM **H₂-1** for 24 h. Nuclear staining: DAPI.

References

- [1] I.M Dixon, F. Lopez, J.-P.Esteve, A.M. Tejera, M.A. Blasco, G. Pratviel, B. Meunier *ChemBioChem* 6 (2005) 123-132.
- [2] I.M. Dixon, F. Lopez, A.M. Tejera, J.-P. Esteve, M.A. Blasco, G. Pratviel, B. Meunier *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 1502-1503.
- [3] C. Romera, L. Sabater, A. Garofalo, I.M. Dixon, G. Pratviel *Inorg. Chem.* 49 (2010) 8558–8567.
- [4] M. Lin, L.G. Marzilli, *Inorg. Chem.* 33 (1994) 5309-5315.

V. *Partie Expérimentale*

V.1. *Porphyrins SPR measurements (complementary informations)*

Preliminary measures were performed for each ligand making changing the flow and the dissociation time to ensure the reproducibility of the experiments and the no-mass transfer during analyses. A flow of 30 μ L.min⁻¹ was chosen for each ligand analyze. For H2T, NiT, AuT, MnLB, the association time also determined. It was 300s long except for CoT and MnT (600s). For all molecules the dissociation time was 600s long. A range a concentration corresponding to the response of the ligand was determined. The constants $K_{eq}^d = 1 / K_A$ was determined using Biacore evaluation software based on the Langmir adsorption equation $R_{eq}/R_{max} = K_A \cdot C_{free} / (1 + K_A \cdot C_{free})$ where R_{eq} correspond to the maximum signal during the steady state, R_{max} to the completed saturation of the DNA-mimic by the ligand tested and C_{free} to the concentration of the analyte in solution. K_{kin}^d constant were determined using the same software. The model of fit was determined depending on the Scatchard binding plot $R_{eq}/C_{free} = n \cdot K_A \cdot R_{max} - K_A \cdot R_{eq}$. Linear Scatchards curves were corresponding to 1:1 interactions whereas nonlinear curves were fitted using heterogeneous ligand binding mode. According to the software, 1:1 binding model interaction correspond to interaction between a model $A + B = AB$ whereas heterogeneous ligand fitting correspond to $A + BB' + A = ABB' + A = ABB'A$.

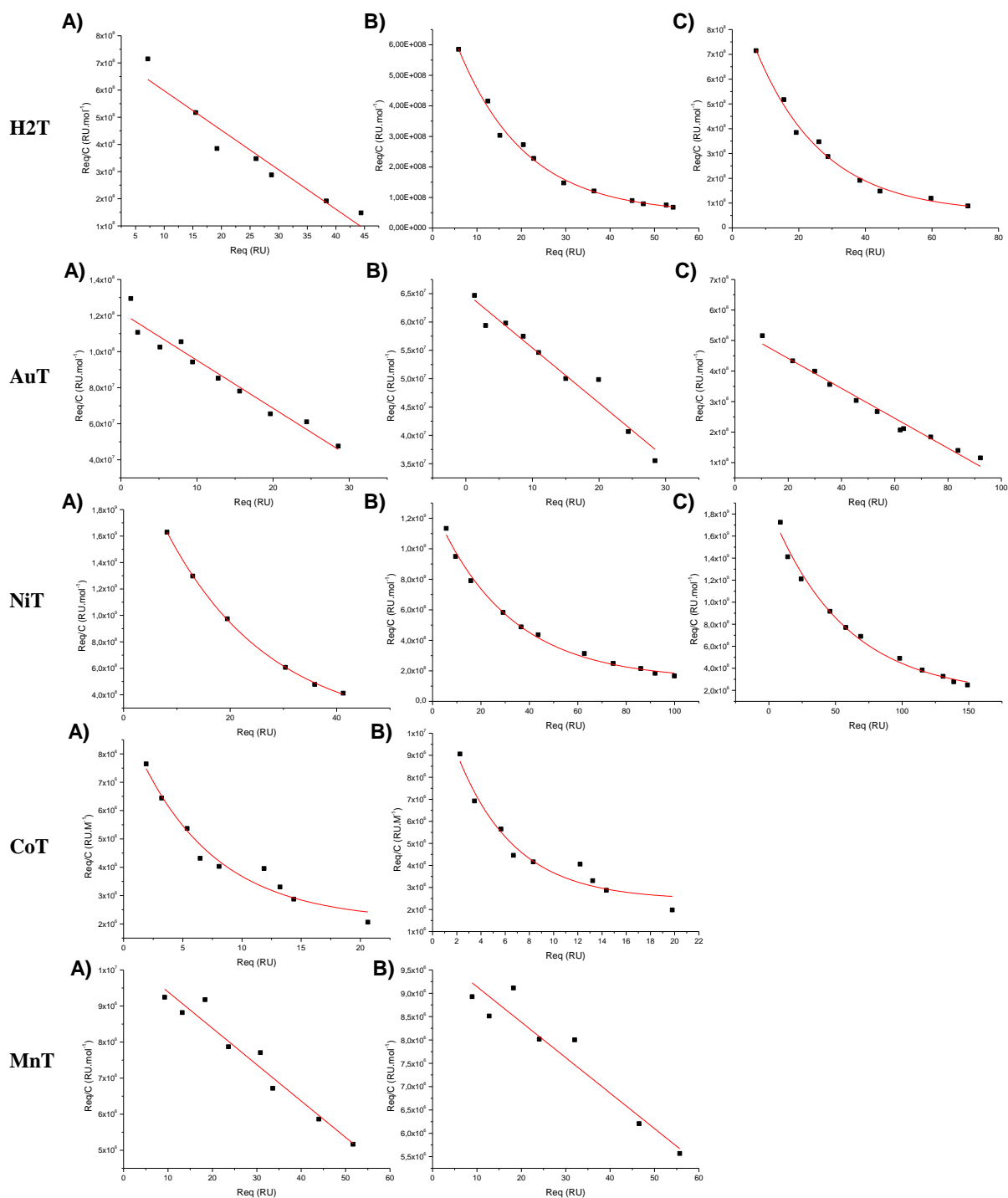


Figure 79 Scatchard binding plots of the interaction of TMPyP4(H2T) and complexes with intermolecular G-quadruplex 1 (A), intramolecular G-quadruplex 3 (B), and duplex 2 (C).

V.2. Salphen SPR Measurements

The same functionalized chip was used with salphen and porphyrins. For these molecules, association time was 300s and dissociation time was 600s. Flow tests was determined and optimized for a flow of $30 \mu\text{L.L}^{-1}$. The regeneration was operated using three cycles of 30s with Gly.HCl (10 mM, pH2). The evaluation of data was performed with the same procedure.

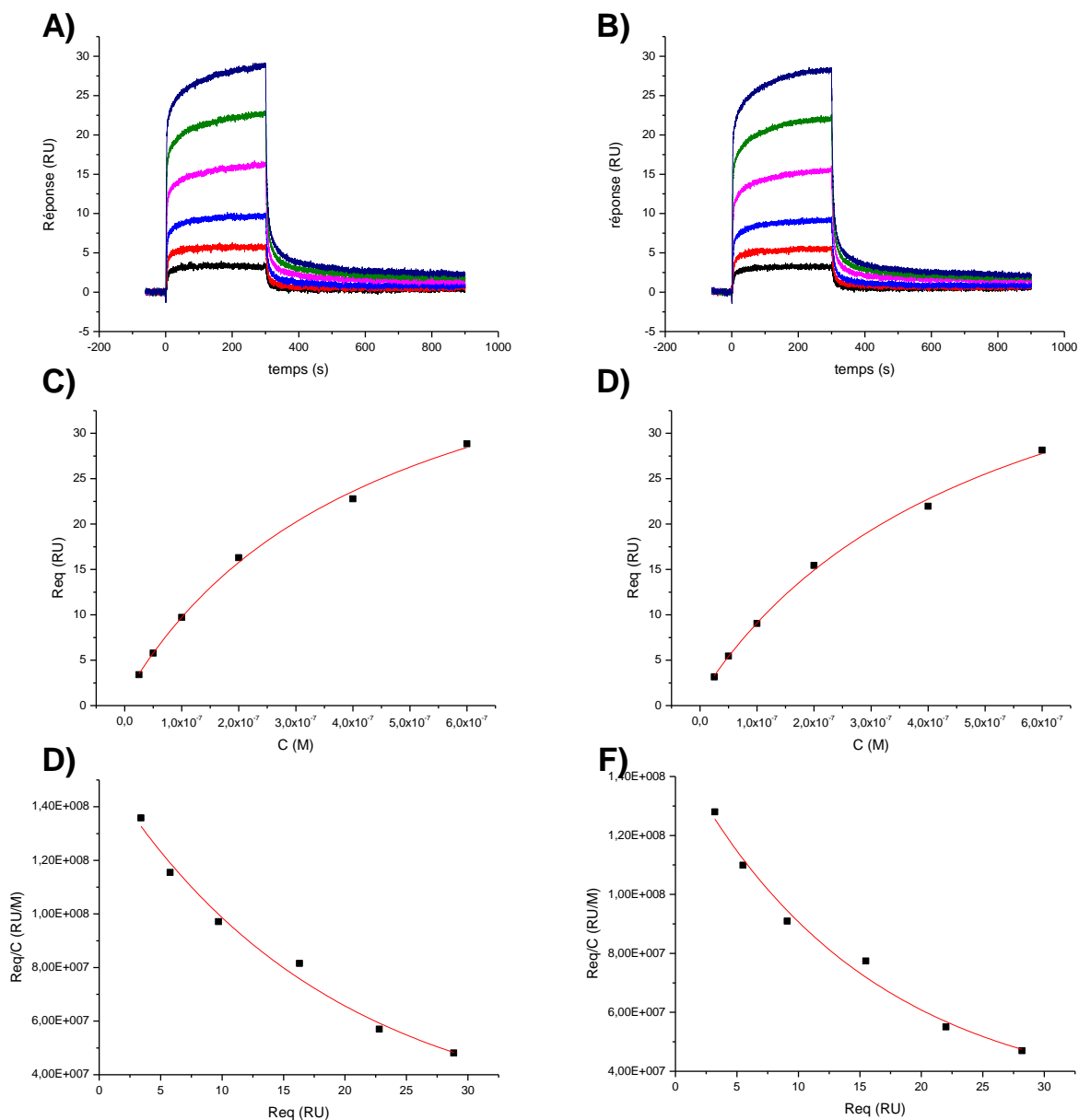


Figure 80 SPR sensorgrams for the interaction of Ni-TMPyP4 with A) the intermolecular-like quadruplex 1, B) the intramolecular quadruplex 3. The ligand concentration was varied from 25nM (bottom curve) to 600nM (top curve). Adsorption isotherm fitted with Langmuir model for association of the Ni-Salphen with 1(C) and 3(D). Scatchard binding plots of the interaction of Ni-Salphen and complexes with intermolecular G-quadruplex 1 (E), intramolecular G-quadruplex 3(F)

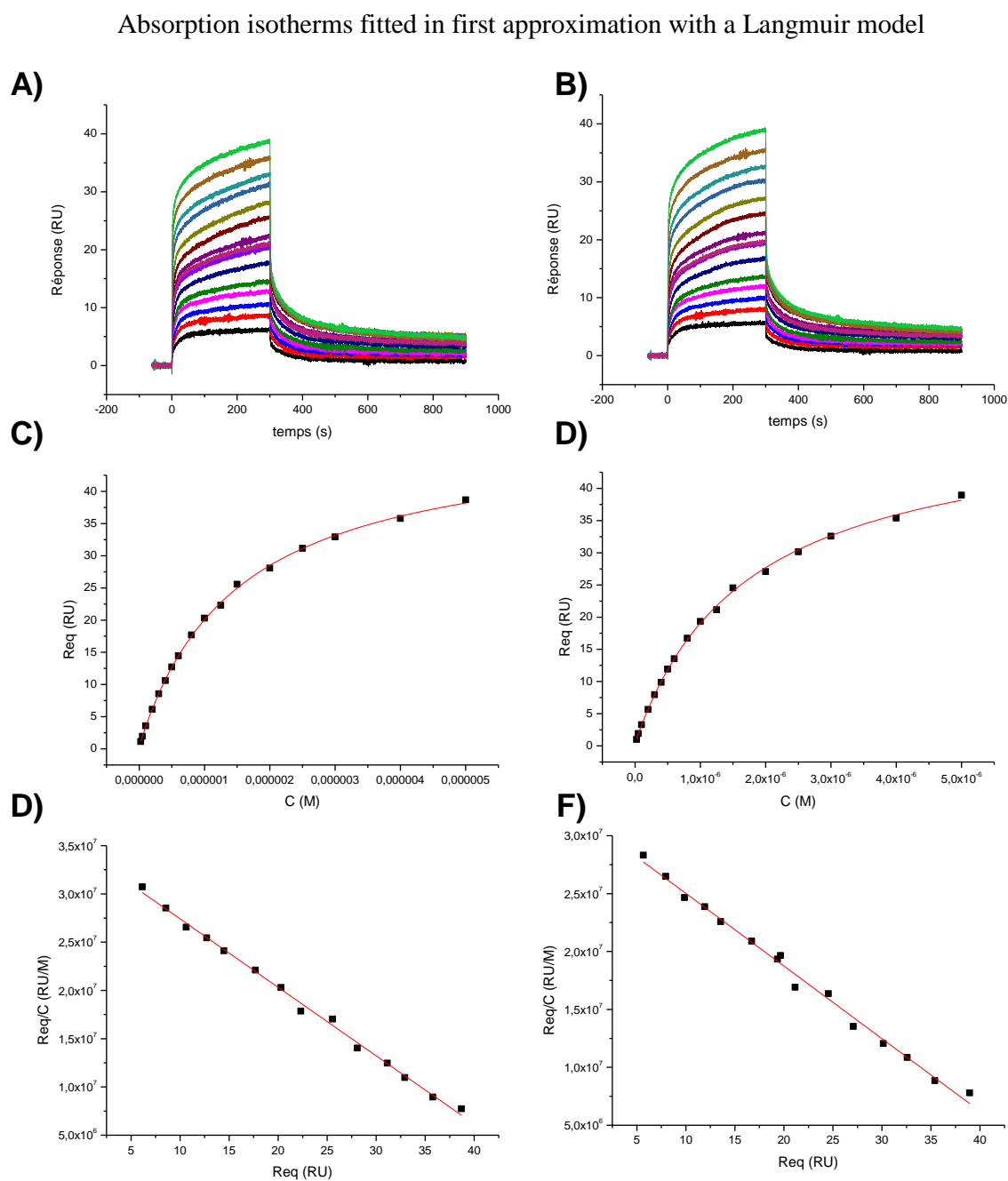


Figure 81 SPR sensorgrams for the interaction of Cu-TMPyP4 with A) the intermolecular-like G-quadruplex **1**, B) the intramolecular quadruplex **3**. The ligand concentration was varied from 25nM (bottom curve) to 600nM (top curve). Adsorption isotherm fitted with Langmuir model for association of the Cu-Salphen with **1**(C) and **3**(D). Scatchard binding plots of the interaction of Cu-Salphen and complexes with intermolecular G-quadruplex **1** (E), intramolecular G-quadruplex **3**(F)

Chapitre 2 :
Synthèse de mimes antiparallèles
de quadruplexes

I. Introduction

I.1. Rappels bibliographiques

Ce chapitre sera consacré à la description de la synthèse de mimes antiparallèles de quadruplexes et fait suite aux études réalisées sur le mime de G-quadruplexe parallèle **1**. En effet, il a été montré précédemment que les quadruplexes étaient des structures polymorphes de topologies variables. Celles-ci peuvent dépendre de l'orientation et du nombre de brins, de la taille et de l'agencement des sillons ainsi que du nombre et de la topologie des différentes boucles qu'ils peuvent présenter. Les tests réalisés par SPR, nous ont montré également l'intérêt de pouvoir caractériser au mieux les interactions d'un ligand avec un quadruplexe dans le but d'obtenir les données les plus précises sur son mode d'interaction. En effet, c'est en ayant connaissance du mode d'interaction du ligand avec sa cible qu'il sera possible d'optimiser sa structure afin d'augmenter son affinité pour celle-ci. C'est pourquoi mes travaux se sont orientés vers la diversification des mimes en synthétisant d'autres structures aux topologies contrôlées, avec les brins orientés en antiparallèle.

D'autres études ont déjà été effectuées dans le but de contrôler les topologies de G-quadruplexe. L'équipe de G. Piccialli a ainsi synthétisés différents G-quadruplexes parallèles et antiparallèles contraints par différents espaceurs dendrimériques (Schéma 2A)¹⁶⁹. Il a notamment été rapporté la synthèse d'un mime entièrement parallèle composé de quatre séquences de type 3'TGGGGT-5'. La stabilité du G-quadruplexe ainsi formé s'est montré être fortement augmentée par rapport à la séquence naturelle tétramoléculaire. Par la suite, par le biais de groupe protecteurs différents et en utilisant des synthèses débutant soit en 5' soit en 3', des mimes antiparallèles ont été obtenus. Toutefois, ces derniers semblent adopter majoritairement des topologies parallèles, à cause d'une trop grande flexibilité du dendrimère et de la formation de structures intermoléculaires. Ceci a été observé pour deux types d'espaceurs dont les longueurs sont différentes. Plus récemment, R. Ferreira et *al.* ont utilisé une stratégie similaire pour synthétiser *via* un autre espaceur tétravalent, des mimes de G-quadruplexes de type hybride (Schéma 2B)¹⁷⁰. La topologie attendue pour ce mime, n'a été obtenue qu'en présence d'acétate d'ammonium. En

169 (a) Oliviero, G.; Amato, J.; Borbone, N.; Galeone, A.; Petraccone, L.; Varra, M.; Piccialli, G.; Mayol, L., Synthesis and Characterization of Monomolecular DNA G-Quadruplexes Formed by Tetra-End-Linked Oligonucleotides. *Bioconjugate Chem* **2006**, *17* (4), 889-898; (b) Oliviero, G.; Borbone, N.; Amato, J.; D'Errico, S.; Galeone, A.; Piccialli, G.; Varra, M.; Mayol, L., Synthesis of quadruplex-forming tetra-end-linked oligonucleotides: Effects of the linker size on quadruplex topology and stability. *Biopolymers* **2009**, *91* (6), 466-477.

170 Ferreira, R.; Alvira, M.; Aviñó, A.; Gómez-Pinto, I.; González, C.; Gabelica, V.; Erićja, R., Synthesis and Structural Characterization of Stable Branched DNA G-Quadruplexes Using the Trebler Phosphoramidite. *ChemistryOpen* **2012**, *1* (2), 106-114.

présence de potassium ou de sodium, des topologies parallèles ont été observées résultant selon les auteurs d'interactions intermoléculaires.

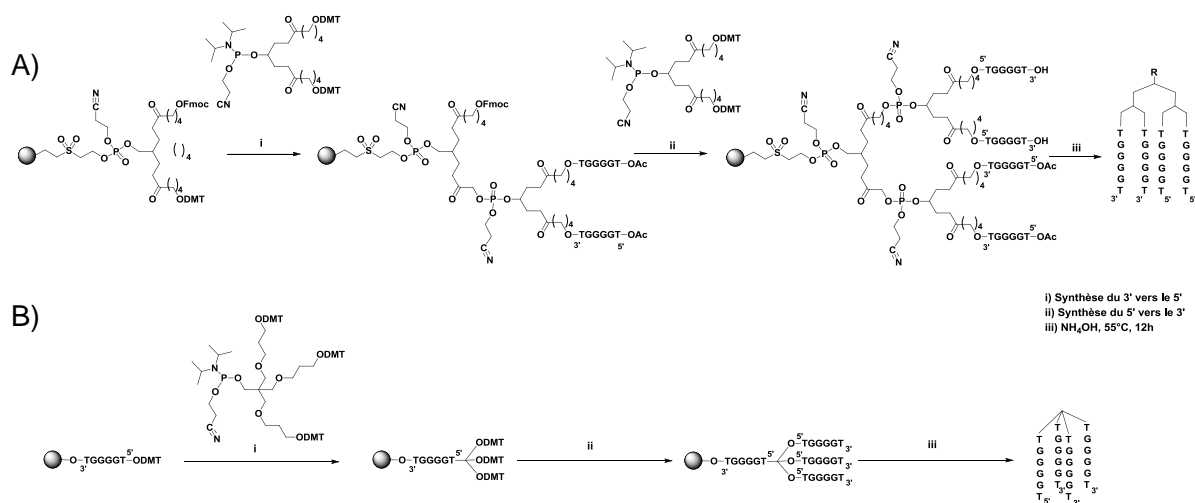


Schéma 2 Exemple de stratégies développées pour l'obtention de G-quadruplexes antiparallèles

1.2. Stratégie envisagée

L'utilisation du gabarit peptidique utilisé pour la préparation du mime **1** a donc été envisagée pour l'obtention des mimes antiparallèles. Ceci nécessite par contre d'immobiliser certains brins par leur extrémité 3' et d'autres par leur extrémité 5'. Pour se faire, il a été choisi d'utiliser deux ligations chimiosélectives¹⁷¹ orthogonales et compatibles. En effet, ce type de réaction est parfaitement adapté pour « conjuguer » des biomolécules (oligosaccharides, peptides ou oligonucléotides) dont les chimies ne sont pas toujours compatibles. Elles permettent d'effectuer des réactions en milieu aqueux sans utilisation de groupes protecteurs.

Pour l'immobilisation des brins par leur extrémité 3', nous avons conservé la même stratégie que celle utilisée pour la préparation du mime parallèle **1**, à savoir l'utilisation du lien éther d'oxime. Ce lien résulte de la réaction entre un carbonyle (aldéhyde ou cétone) sur une oxyamine. Il a été décrit pour la première fois en 1959¹⁷² mais n'a cependant été réutilisée comme ligation chimiosélective que plus tard par Rose et *al.* pour la formation de protéines à haut poids moléculaire¹⁷³. La présence de l'effet inductif donneur de l'oxygène du lien éther d'oxime lui confère une stabilité dans une large gamme de pH (allant de 2 à 9) et donc en milieu biologique¹⁷⁴.

171 Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed* **2001**, *40* (11), 2004-2021.

172 Jencks, W. P., Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation I. *J Am Chem Soc* **1959**, *81* (2), 475-481.

173 Rose, K., Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J Am Chem Soc* **1994**, *116* (1), 30-33.

174 Kalia, J.; Raines, R. T., Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47* (39), 7523-7526.

A moins d'utiliser un catalyseur comme l'aniline pour réaliser la réaction à pH neutre¹⁷⁵, la formation du lien est favorisée en milieu acide (pH optimal 4-5). Elle est également aujourd'hui classiquement utilisée pour l'obtention de conjugués oligonucléotidiques¹⁷⁶.

La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par le Cu^I (ou CuAAC pour Copper catalyzed Azide alkyne Cycloaddition) a été envisagée pour relier le gabarit peptidique et les oligonucléotides par leur extrémité 5'. Cette réaction s'effectue entre un alcyne et un azoture pour former ainsi un cycle triazole en 1,4 ou en 1,5. Elle a été développée en tout premier lieu en 1963 par R. Huisgen¹⁷⁷. Pourtant ce n'est que plus tard, en 2002, après que les équipes de K.B. Sharpless et de M. Meldal ont utilisé le Cu^I pour rendre cette dernière régiosélective en 1,4, que son utilisation a vraiment été exploitée, ceci en particulier dans le domaine des biomolécules dont les oligonucléotides¹⁷⁸. De plus, différents travaux ont montré la compatibilité de la CuAAC avec la ligation oxime, en particulier dans le domaine des biomolécules. Au sein du laboratoire le gabarit TASP a pu notamment être fonctionnalisé de différentes manières pour relier *via* ces deux réactions chimiosélectives des peptides de types c-RGD avec c-RAD ou encore des carbohydrates (Figure 82A)¹⁷⁹. La combinaison de ces deux réactions a également été utilisée pour la préparation d'hétéroglycoclusters (Figure 82B)¹⁸⁰.

175 Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E., Nucleophilic Catalysis of Oxime Ligation. *Angew Chem Int Ed* **2006**, *45* (45), 7581-7584.

176 (a) Singh, Y.; Murat, P.; Defrancq, E., Recent developments in oligonucleotide conjugation. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (6), 2054-2070; (b) Lu, K.; Duan, Q.-P.; Ma, L.; Zhao, D.-X., Chemical Strategies for the Synthesis of Peptide–Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjugate Chem* **2009**, *21* (2), 187-202.

177 Huisgen, R., Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew Chem Int Ed* **1963**, *2* (11), 633-645.

178 (a) Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F., Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide–Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Chem Rev* **2009**, *109* (9), 4207-4220; (b) El-Sagheer, A. H.; Brown, T., Click chemistry with DNA. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (4), 1388-1405.

179 (a) Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48* (14), 2576-2579; (b) Galibert, M.; Sancey, L.; Renaudet, O.; Coll, J.-L.; Dumy, P.; Boturyn, D., Application of click-click chemistry to the synthesis of new multivalent RGD conjugates. *Org Biomol Chem* **2010**, *8* (22), 5133-5138.

180 Thomas, B.; Fiore, M.; Bossu, I.; Dumy, P.; Renaudet, O., Synthesis of heteroglycoclusters by using orthogonal chemoselective ligations. *Beilstein J Org Chem* **2012**, *8*, 421-427.

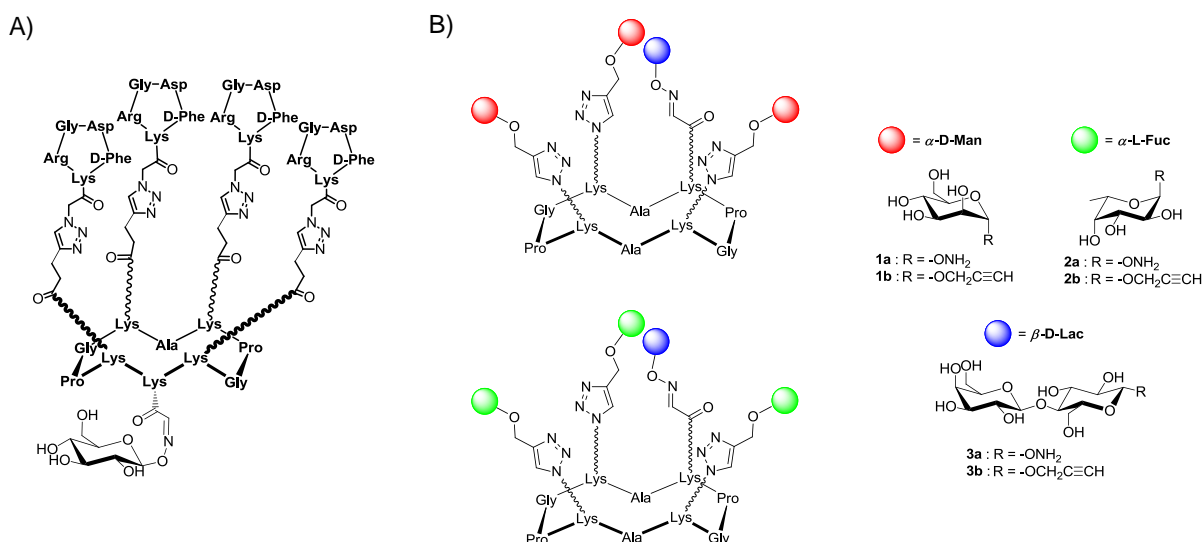


Figure 82 Fonctionnalisation du gabarit TASP par les réactions chimiosélectives de type ligation oxime et CuAAC. par M. Galibert et al. (A) et B. Thomas et al. (B.)

L'utilisation conjointe de ces deux réactions chimiosélectives a également été appliquée aux oligonucléotides. Par exemple, ces derniers ont pu être fonctionnalisés en 3' sous forme d'aldéhyde et en 5' par une fonction alcyne. Par cette stratégie, ils ont ainsi pu être reliés à différentes biomolécules dont des résidus peptidiques (c-RGD) ou des sucres (Figure 83A)¹⁸¹. Sur le même principe, l'équipe de H. Lönnberg a utilisé de façon séquentielle la CuAAC puis la ligation oxime pour obtenir des oligonucléotides présentant des glycoclusters soit en 5' de la molécule *via* l'utilisation d'un espaceur, soit au sein de la séquence par l'utilisation d'un ribose modifié par une fonction oxyamine (Figure 83B)¹⁸².

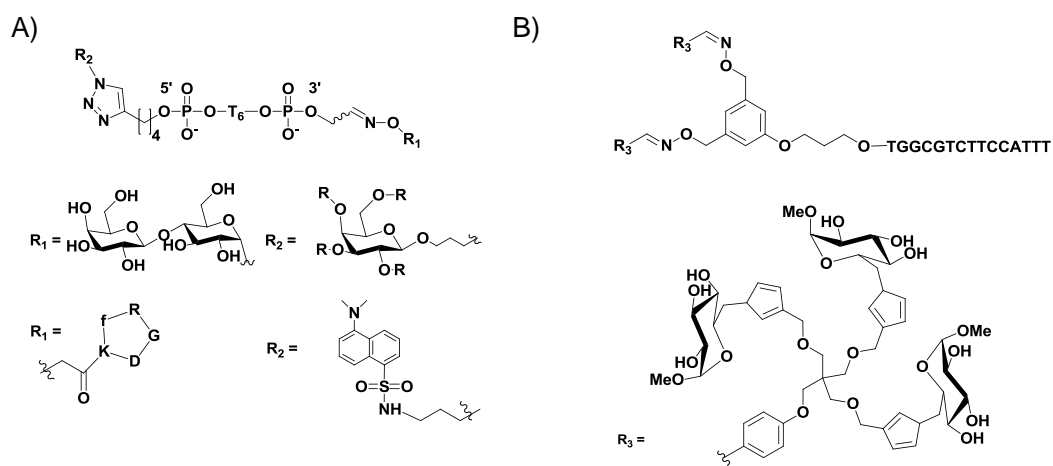


Figure 83 Fonctionnalisation d'oligonucléotides par les réactions chimiosélectives de type ligation oxime et CuAAC. par A. Meyer et al. (A.) et M. Karskela et al. (B.)

181 Meyer, A.; Spinelli, N.; Dumy, P.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F.; Defrancq, E., Oligonucleotide Sequential Bis-Conjugation via Click-Oxime and Click-Huisgen Procedures. *J Org Chem* **2010**, 75 (11), 3927-3930.

182 Karskela, M.; Helkearo, M.; Virta, P.; Lönnberg, H., Synthesis of Oligonucleotide Glycoconjugates Using Sequential Click and Oximation Ligations. *Bioconjugate Chem* **2010**, 21 (4), 748-755.

Ainsi lors de la stratégie développée, les oligonucléotides vont être reliés au gabarit peptidique par deux types de liens (éther d'oxime et triazole) faisant office d'espaceurs (Figure 84). Dans le cas de la ligation oxime, les oligonucléotides présenteront à leur extrémité 3' une fonction aldéhyde qui pourra réagir sur une fonction oxyamine présente sur le gabarit. De même, les oligonucléotides présentant une fonction alcyne en 5' pourront être reliés sur le gabarit présentant une fonction azoture *via* la formation d'un lien triazole par CuAAC. Dans le cadre de ces travaux de thèse, cette stratégie a été employée pour préparer différents mimes de quadruplexe antiparallèle incluant le i-motif, des G-quadruplexes antiparallèles présentant ou non des boucles.

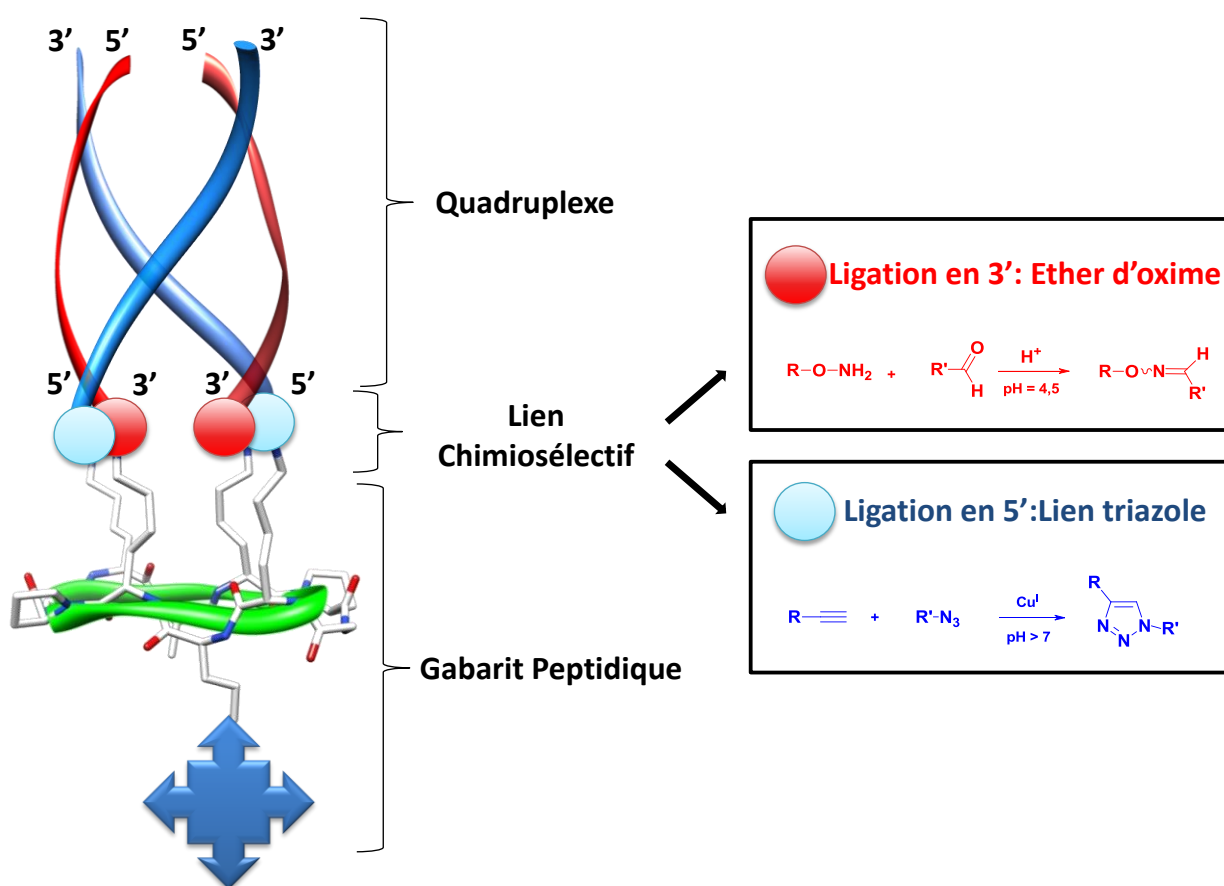


Figure 84 Stratégie envisagée pour la synthèse de mimes de quadruplexe antiparallèle

II. Synthèse et caractérisation d'un mime de i-motif

Dans un premier temps, les travaux se sont orientés vers l'obtention d'un mime de i-motif (Figure 85). Cette structure a été choisie pour servir de preuve de concept car elle est préférentiellement antiparallèle et moins apte à former des structures secondaires. Enfin, il a été montré que ce motif pouvait avoir éventuellement un rôle au niveau biologique. Créer un modèle « simplifié » de ce dernier dans le but de trouver des ligands spécifiques à cette structure peut donc s'avérer pertinent. La préparation de ce mime a donc nécessité au préalable la synthèse du gabarit présentant les fonctions oxyamines et azotures ainsi que celles des oligonucléotides fonctionnalisés en 5' ou en 3'. Par la suite l'assemblage des conjugués a pu être effectué par les ligations chimiosélectives. La première partie de ce travail a conduit à une publication dans laquelle sont présentées les deux voies de synthèse possibles pour l'obtention du mime de i-motif en utilisant soit l'étape d'assemblage par ligation oxime puis la CuAAC soit l'inverse (voir partie VI)¹⁸³.

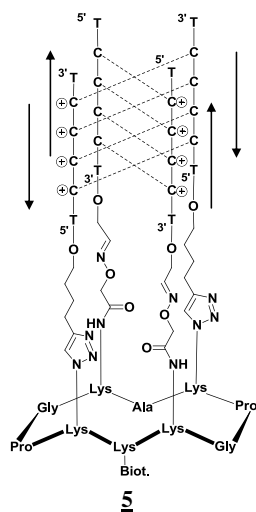


Figure 85 Structure chimique du mime de i-motif 5

II.1. Synthèse du gabarit peptidique

La synthèse du gabarit peptidique se fait par synthèse supportée en phase solide (SPPS) selon les principes développés par R.B. Merrifield en 1960¹⁸⁴ et reste similaire à celle utilisée avec le mime de G-quadruplexe parallèle. Toutefois des modifications sont nécessaires pour répondre

183 Bonnet, R.; Murat, P.; Spinelli, N.; Defrancq, E., Click-click chemistry on a peptidic scaffold for easy access to tetrameric DNA structures. *Chem Commun* **2012**, 48 (48), 5992-5994.

184 Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, 85 (14), 2149-2154.

aux critères imposés pour l'obtention d'un édifice antiparallèle. Ainsi il présente deux fonctions oxyamines et deux fonctions azotures sur sa face supérieure. Chacune de ces fonctions est positionnée de manière à favoriser la formation du i-motif (Figure 86). Une biotine est insérée sur sa face inférieure pour des études de surface. Deux stratégies ont été utilisées pour l'introduction de ces fonctions : soit l'introduction d'acides-aminés modifiés (« building block ») lors de la synthèse peptidique, soit par la post fonctionnalisation de chaînes latérales de lysines *via* l'utilisation d'esters actifs.

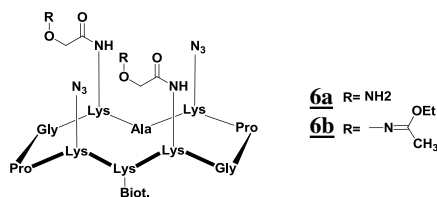
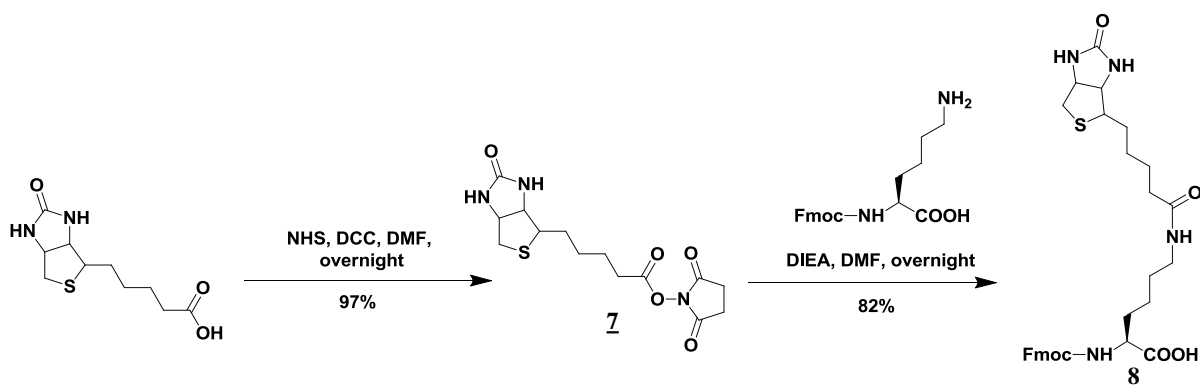


Figure 86 Structures chimiques du « gabarit diagonal » 6.

1a. Outils pour l'insertion des fonctions utiles aux chimies click

i) Insertion de la fonction biotine

Lors de la synthèse, la fonction biotine est introduite sur le gabarit peptidique sous forme d'un « building block » préformé compatible avec la SPPS. Comme c'était le cas lors de la synthèse du mème parallèle 1, celui-ci est constitué d'une lysine fonctionnalisée sur sa fonction amine ϵ par une biotine *via* la formation d'une amide. Afin que cette lysine puisse être incorporée en synthèse peptidique lors d'une synthèse de type Fmoc/tBu, l'amine α de la molécule a été protégée par une fonction Fmoc (pour Fluorenylmethyloxycarbonyl). Ainsi l'obtention du « building block » nécessite dans un premier temps d'activer la fonction carboxylique de la biotine par un groupement *N*-hydroxysuccinimide. La DCC (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide) est utilisée comme agent de couplage. Par la suite, la biotine activée 7 est couplée à la Fmoc-Lys-OH en milieu basique à pH 8 en présence de DIEA (*N,N*-Diisopropyléthylamine, Schéma 3). Après recristallisation, le produit est obtenu avec un rendement global de 79% et sera utilisé lors de la synthèse peptidique.

Schéma 3 Synthèse du « building block » Fmoc-Lysine(Biotine)-OH **8**

ii) Insertion des fonctions oxyamines protégées.

Deux stratégies sont possibles pour l'insertion de la fonction oxyamine sur le gabarit peptidique reposant chacune sur la fonctionnalisation en ϵ de la lysine par un espaceur dérivé de l'acide 2-aminoxyacétique (Schéma 4). La première consiste en la post fonctionnalisation du gabarit par l'utilisation de l'acide Boc-aminoxyacétique activé sur sa fonction acide carboxylique par un groupement *N*-hydroxysuccinimide. Ceci est effectué en utilisant la DCC comme agent de couplage. Ainsi le linker **9** est obtenu avec un rendement de 87%. La seconde stratégie utilise une oxyamine protégée par un groupement 1-éthoxyéthylidène (Acm). Elle a été développée pour introduire la fonction oxyamine sous forme de « building block ». En effet, il a été montré que ceci n'était pas possible en utilisant un groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc) car, malgré la protection, l'oxyamine conserve une certaine réactivité qui peut conduire à des acylations secondaires lors de la synthèse peptidique¹⁸⁵. De plus, le groupement 1-éthoxyéthylidène présente l'avantage de pouvoir être enlevé dans des conditions acides plus douces. Ce groupement protecteur est obtenu *via* la substitution nucléophile de l'ethyl-*N*-hydroxyacétimidate sur l'acide iodoacétique. Par la suite, l'activation de la fonction acide carboxylique de ce dernier (composé **10a**) se fait par une fonction *N*-hydroxysuccinimide dans les mêmes conditions que précédemment. Le composé **10b**, obtenu avec un rendement global de 69%, peut lui aussi être introduit par post fonctionnalisation du gabarit. Lors des différentes stratégies utilisées pour les synthèses de mème, il a été choisi d'introduire les oxyamines sur le châssis par post fonctionnalisation *via* les composés **9** ou **10b** afin de pouvoir garder une certaine modularité lors des synthèses (voir partie III).

185 Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P., 1-Ethoxyethylidene, a New Group for the Stepwise SPPS of Aminoxyacetic Acid Containing Peptides. *J Org Chem* **2008**, 73 (3), 983-991.

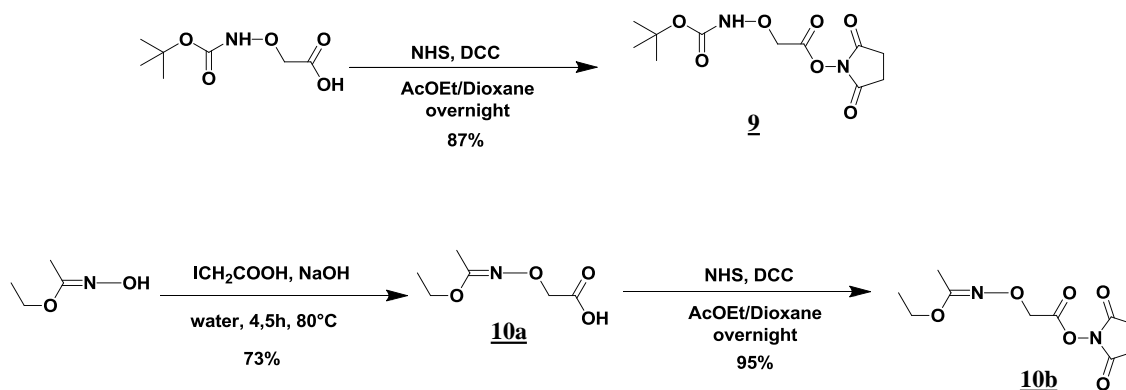
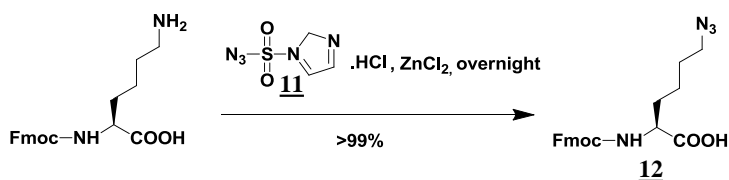


Schéma 4 Synthèse des « Linkers » présentant les fonctions oxyamines protégées

iii) Insertion des fonctions azotures

L'insertion des fonctions azotures sur le gabarit peptidique se fait sous forme d'un « building block » en utilisant la Fmoc-azidonorleucine. Ceci peut être réalisé à condition de respecter certaines conditions comme éviter l'utilisation d'agents réducteurs utilisés pour la déprotection des groupements alloc (allyloxycarbonyl) tel que les complexes de palladium. Bien que ce produit soit commercial, il a été choisi de le synthétiser au laboratoire par commodité. Comme pour la Fmoc-Lysine(biotine)-OH, le produit de départ est la Fmoc-lysine-OH. La fonction azoture est obtenue par l'utilisation d'un réactif de diazotransfert **11** qui réagit en milieu basique et en présence d'un catalyseur métallique sur la fonction amine en ϵ de la lysine (Schéma 5) ¹⁸⁶. De nombreux travaux ont été rapportés décrivant l'utilisation de réactifs de diazotransferts pour obtenir des fonctions azotures sur les amines de nombreux composés ¹⁸⁷. La Fmoc-azidonorleucine **12** est obtenue avec un rendement considéré comme quantitatif et une pureté suffisante pour être utilisée pour la synthèse peptidique (supérieure à 95%, analysée par phase inverse, RP-HPLC).

Schéma 5 Synthèse de la Fmoc-azidonorleucine **12** par diazotransfert

186 Nyffeler, P. T.; Liang, C.-H.; Koeller, K. M.; Wong, C.-H., The Chemistry of Amine–Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (36), 10773-10778.

187 Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V., An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. *Org Lett* **2007**, *9* (19), 3797-3800.

1b. Synthèse du gabarit peptidique

La synthèse du gabarit peptidique est réalisée par SPPS (Synthèse Peptidique en Phase Solide) en utilisant la stratégie Fmoc/tBu du C-terminal vers le N-terminal. La SPPS repose sur une succession d'étapes de couplages et de déprotection permettant l'élongation d'une séquence peptidique greffée sur une résine de polymère. Elle consiste à coupler à chaque étape, *via* la formation d'une liaison peptidique, un nouvel acide aminé sur la séquence greffée la résine. Cet acide aminé devra être protégé sur son amine α afin qu'un seul acide aminé puisse être ajouté lors de chaque couplage. Suit alors une étape de déprotection de l'amine α du dernier acide aminé accroché pour pouvoir effectuer le couplage suivant. L'intérêt de cette technique est qu'elle permet d'éliminer par filtration les excès d'acides aminés utilisés lors des différentes étapes de couplages quand le peptide synthétisé reste accroché sur la résine. Cette stratégie nécessite également la protection des fonctions réactives sur les chaînes latérales des différents acides aminés par des groupements orthogonaux adaptés aux conditions de couplage et de déprotection utilisées pendant l'allongement du peptide.

Dans notre stratégie, la résine utilisée pour toutes les synthèses est la Fmoc-gly-SASRIN[®]. Cette résine a pour particularité d'être préfonctionalisée et d'être compatible avec les étapes suivantes de couplage. Les amines α des différents acides aminés sont protégées par un groupement Fmoc qui peut être aisément éliminé par β -élimination lors des cycles de déprotection par l'utilisation de la pipéridine à 10% dans le *N,N*-Diméthylformamide (DMF). Les couplages sont effectués en utilisant du PyBOP (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) comme agent activateur en présence et de DIEA. La synthèse a été effectuée en couplant par SPPS les différents acides aminés nécessaires à l'obtention du gabarit peptidique.

En fin d'élongation, le peptide **13** est détaché de la résine par l'utilisation de TFA (acide trifluoroacétique) à 1% dans le dichlorométhane avant d'effectuer une cyclisation. Cette dernière est réalisée en présence de PYBOP comme agent de couplage et de DIEA. Elle est réalisée en milieu dilué (10^{-3} M) afin d'éviter tout risque de polymérisations du peptide. De plus il est à noter que la cyclisation s'effectue sur une glycine en C-terminal car cet acide aminé non chiral permet d'éviter tout risque d'épimérisation. L'étape suivante consiste à déprotéger les amines en ϵ des lysines (Boc) de la molécule **14**. Ceci se fait en milieu acide fort (TFA à 50%) en présence d'eau et de triisopropylsilane (TIS) comme piègeurs des *tertiobutyles* formés. Les amines libres sont alors fonctionnalisées par les linker oxyamines choisis **9** et **10b**. Le gabarit protégé **6b** est obtenu après purification par RP-HPLC avec un rendement total de 41%. Sinon les fonctions oxyamines du produit **6b** brut sont déprotégées par un traitement acide fort (TFA à 50% en présence d'eau)

pour former le peptide **6a**. Ce dernier est obtenu avec un rendement total de 39% suite à une purification dans les conditions décrites précédemment (Schéma 6).

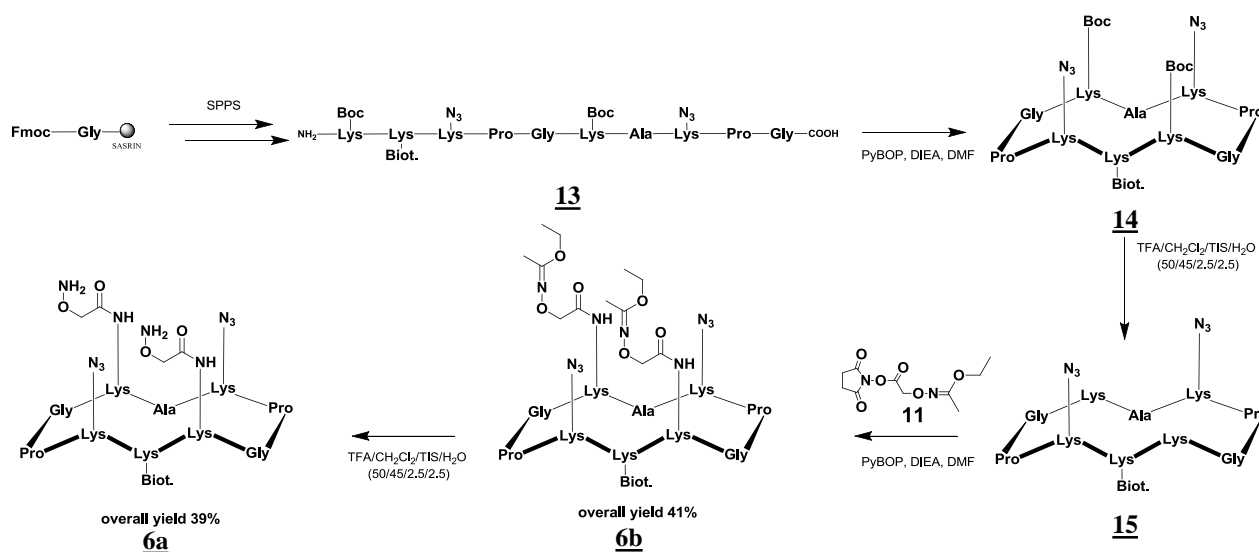


Schéma 6 Synthèse du « gabarit diagonal » **6**

II.2. Synthèse oligonucléotidique

Deux séquences oligonucléotidiques ont été synthétisées en phase solide par la chimie dite « aux phosphoramidites » (Schéma 7) à l'échelle d'une micromole¹⁸⁸. La première séquence fonctionnalisée (5'-TCCCCTX-3', X = 3'-aldéhyde) a été obtenue en utilisant une résine 3'-glycéryl CPG qui permet d'obtenir une extrémité 3'-diol après libération de l'oligonucléotide de la résine. Il est à noter qu'un prétraitement de la résine à la pipéridine à 10% dans l'acétonitrile est préalablement effectué afin d'empêcher une éventuelle réaction de cyclisation de la fonction diol du « linker » glycéryl sur le phosphate qui pourrait entraîner la formation d'alcool en 3'¹⁸⁹. Après purification par phase inverse (RP-HPLC), l'oligonucléotide 3'-diol **16** est traité par le métapériodate de sodium pour former par coupure oxydante du diol, un aldéhyde¹⁹⁰. Les sels de métapériodate et le formaldéhyde formés lors de la réaction sont éliminés sur cartouche d'exclusion de taille (SEC). L'oligonucléotide 3'-aldéhyde **17** est obtenu avec un rendement de 67%. La seconde séquence oligonucléotidique fonctionnalisée en 5' par un alcyne (5'-YTCCCCT-3', Y = 5'-alcyne) a été obtenue grâce à l'introduction en fin d'élongation d'un phosphoramidite

188 Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H., Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J Am Chem Soc* **1981**, *103* (11), 3185-3191.

189 Laurent, A.; de Lambert, B.; Charreyre, M.-T.; Mandrand, B.; Chaix, C., A one step derivatization of controlled pore glass for oligonucleotide solid-phase synthesis. *Tetrahedron Lett* **2004**, *45* (48), 8883-8887.

190 Forget, D.; Renaudet, O.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Dumy, P., 3'-Oligonucleotides conjugation via chemoselective oxime bond formation. *Tetrahedron Lett* **2001**, *42* (52), 9171-9174.

modifié par groupement hexynyl. Après purification par RP-HPLC le rendement de synthèse conduisant à l'oligonucléotide **18** est de 85%.

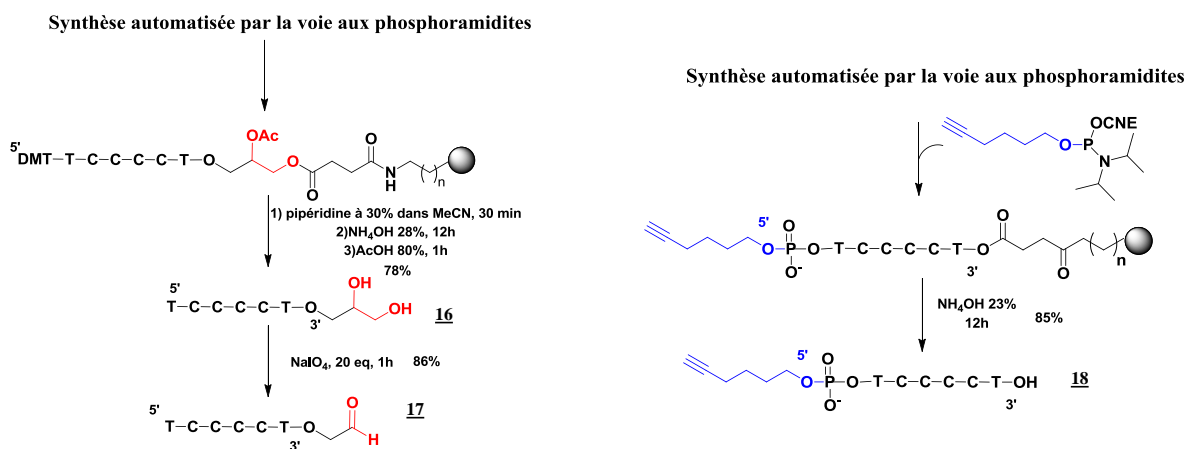


Schéma 7 Synthèse des oligonucléotides 3'-aldéhyde **17** (A) et 5'-alcyne **18** (B)

II.3. Assemblages du mème de i-motif par ligations chimiosélectives

Deux stratégies sont possibles pour effectuer les assemblages par ligation chimiosélective et ainsi former le mème de i-motif. En effet, il est possible de commencer les assemblages soit par la ligation oxime puis continuer par la CuAAC (stratégie 1) soit d'effectuer les opérations inverses (stratégie 2). Afin d'étudier la polyvalence de la synthèse, les deux stratégies ont été réalisées (Schéma 8). La stratégie 1 nécessite de débiter les assemblages en utilisant le gabarit peptidique **6a** possédant ses fonctions oxyamines libres. Par contre dans le cas de la stratégie 2, il est nécessaire de travailler avec des fonctions oxyamines protégées pour empêcher toutes réactions secondaires de ces fonctions très réactives sur des impuretés aldéhydiques éventuellement présentes dans le milieu (utilisation du gabarit **6b**). Il est donc nécessaire d'effectuer une étape de déprotection des oxyamines sur l'intermédiaire de réaction **20**. Il a été choisi d'utiliser le groupement 1-éthoxyéthylidène comme groupement protecteur des oxyamines car il est plus labile en milieu acide que le groupement Boc. Ceci permet d'éviter ainsi une dégradation des ODN (perte de bases) lors des synthèses par un milieu trop fortement acide.

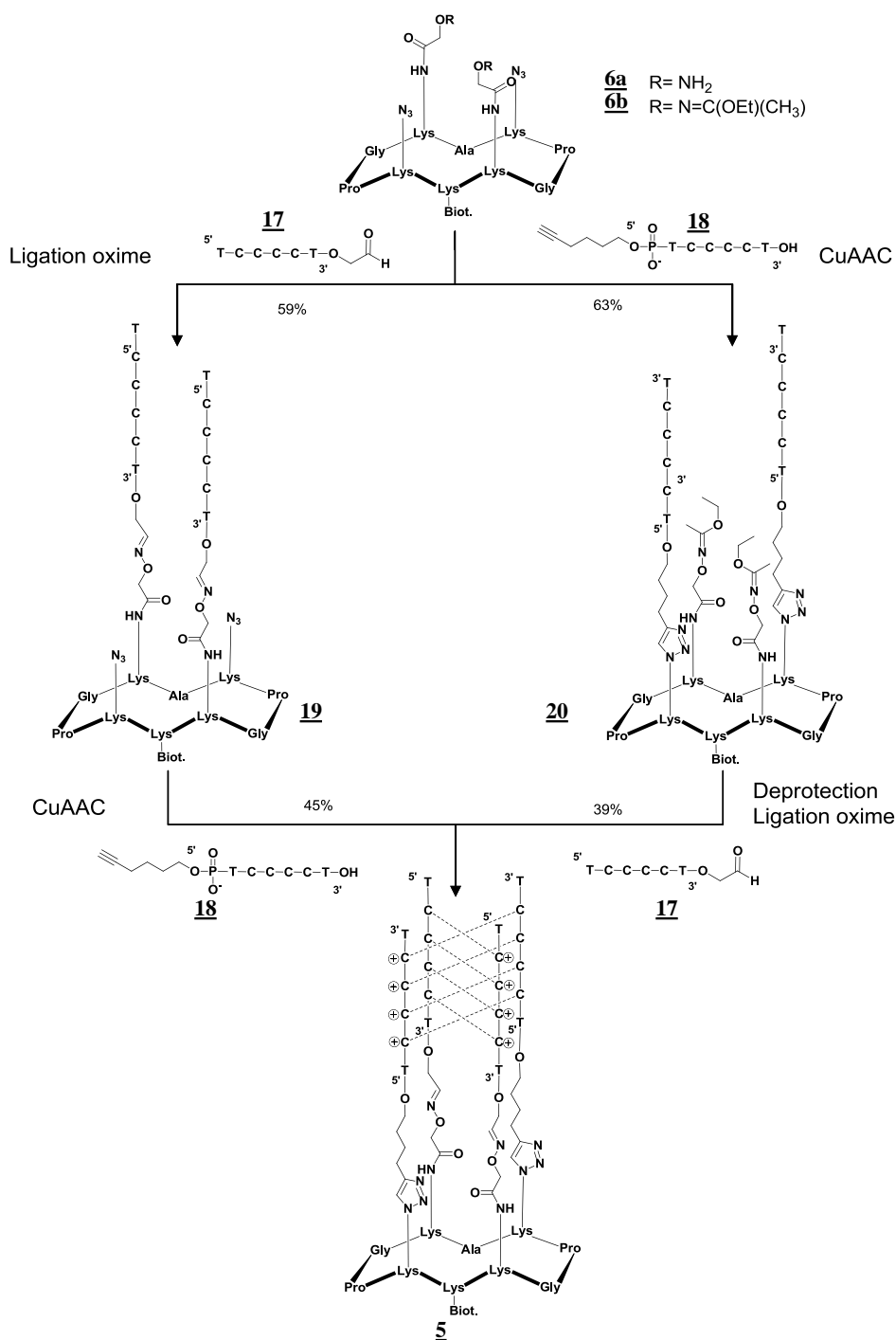


Schéma 8 Synthèse du mème de i-motif **5** : par la stratégie 1 : ligation oxime puis CuAAC (à droite) ou par la stratégie 2 : CuAAC puis ligation oxime (à gauche)

3a. Stratégie 1: ligation oxime puis CuAAC

i) Ligation oxime en première étape

La synthèse du i-motif par cette stratégie commence par la formation de liens éthers d'oxime entre l'oligonucléotide 3'-aldéhyde **17** et le gabarit peptidique **6a**. Le couplage est réalisé en milieu tamponné d'acétate d'ammonium (0,4M à pH 4,5) pendant deux heures à 55°C. Un

excès d'oligonucléotides 3'-aldéhyde **17** (1,2Eq) est ajouté du fait de la présence d'oligonucléotides diols **16** non oxydés lors de l'étape précédente (observé par spectrométrie de masse). L'analyse puis la purification de l'échantillon se font par RP-HPLC. Lors du couplage, un second pic avec un temps de rétention de 21,2min est présent (Figure 87A). Il correspond à un produit de monocouplage (déterminé par spectrométrie de masse). Après purification par phase inverse, l'intermédiaire **19** est obtenu avec un bon rendement (59%). Ce produit a ensuite été caractérisé par ESI-MS (Spectrométrie de Masses par Ionisation Electrospray, Figure 87B) et par dichroïsme circulaire (voir partie 4).

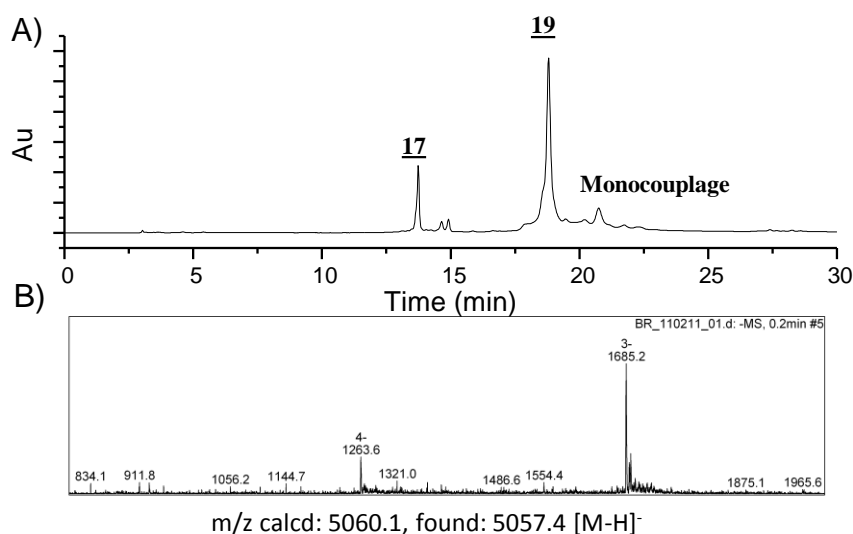


Figure 87 Chromatogramme RP-HPLC (A) et caractérisation ESI-MS (B) de l'intermédiaire **19**

ii) CuAAC en seconde étape

La seconde étape conduisant à l'obtention du i-motif est la CuAAC entre l'intermédiaire **19** et l'oligonucléotide 5'-alcyne **18**. A ce stade, plusieurs conditions de réaction ont été testées. Ainsi, les premiers essais ont été effectués en présence de sulfate de cuivre(II) réduit par l'ascorbate de sodium en cuivre I pour la catalyse de la réaction. Cependant aucune formation de produit n'a été observée dans ces conditions après une nuit de réaction. L'utilisation des micro-ondes pourrait être une option intéressante pour la formation accélérer la formation des produits cependant leur utilisation entraînant la dégradation des liens éther d'oxime, celles-ci ne pourront pas être utilisées dans notre cas. Les travaux se sont alors orientés vers l'utilisation de micropoudre de cuivre en présence de *tert*butanol pour effectuer cette réaction de ligation CuAAC. La micropoudre s'oxyde en cuivre I en présence d'oxygène et le *tert*butanol permet de stabiliser ce dernier. Cependant quelques inconvénients incombent à cette technique : tout d'abord

la cinétique de la réaction est lente (une nuit) et ne permet pas de contrôler la quantité du Cu^{I} formé. Or ceci conduit à la formation de Cu^{II} en solution qui risque d'induire des coupures oxydantes sur les ODNs¹⁹¹. De ce fait, nous avons donc choisi d'utiliser un ligand du cuivre, le THPTA (tris[(1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine) pour effectuer la réaction. En effet il a été rapporté que l'utilisation d'un ligand du cuivre tel que le THPTA ou bien encore le TBTA (tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)méthyl]amine) pouvait permettre d'augmenter la cinétique de réaction de CuAAC¹⁹².

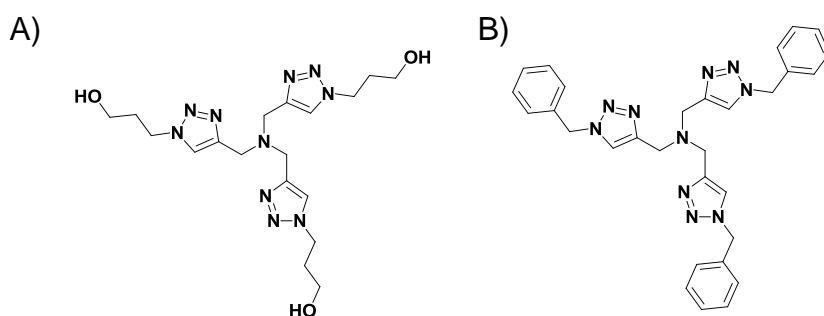


Figure 88 Structure chimique du THPTA (A) et du TBTA (B)

La réaction a donc été réalisée dans un tampon HEPES (100mM, pH 7,4) en utilisant le sulfate de cuivre (2 équivalents par alcyne), du THPTA (5 équivalents par alcyne) et de l'ascorbate de sodium (10 équivalents par alcyne). Après deux heures de réaction, les profils HPLC observés ne semblent plus évoluer. Les analyses et les purifications ont été tentées dans un premier temps sur colonne phase inverse, toutefois cette méthode n'est pas satisfaisante pour séparer les oligonucléotides non couplés. C'est pourquoi ces opérations ont été effectuées par chromatographie liquide haute performance échangeuse d'ions (IE-HPLC) sur une colonne de type SAX (« Strong Anion Exchange », Figure 89). Cette méthode présente cependant l'inconvénient d'apporter de nombreux sels à l'édifice qu'il est nécessaire d'éliminer par la suite. Ainsi deux étapes de dessalage sur cartouche d'exclusion de type NAP 25 sont effectuées. Le gabarit final **5** est obtenu avec un rendement total de 26%.

191 Sigman, D. S.; Graham, D. R.; D'Aurora, V.; Stern, A. M., Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline . cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. *J Biol Chem* **1979**, *254* (24), 12269-72.

192 (a) Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Gardinier, S.; Lim, Y.-H.; Finn, M. G., Benzimidazole and Related Ligands for Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (42), 12696-12704; (b) Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E., Reliable and Efficient Procedures for the Conjugation of Biomolecules through Huisgen Azide-Alkyne Cycloadditions. *Angew Chem Int Ed* **2011**, *50* (38), 8794-8804.

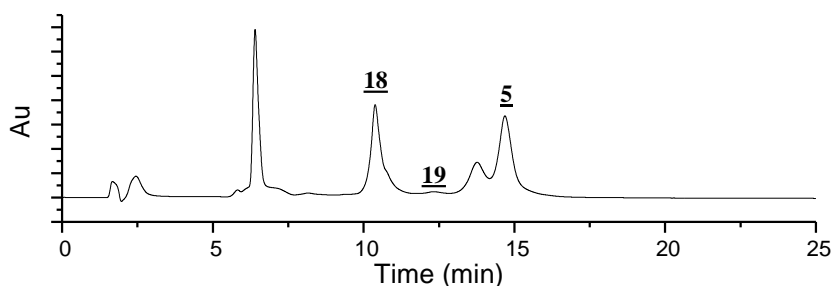


Figure 89 Chromatogramme IE-HPLC(SAX) de *i*-motif 5 synthétisé par la stratégie 1

3b. Stratégie 2: CuAAC puis ligation oxime

i) CuAAC en première étape

La ligation CuAAC est réalisée avec les oligonucléotides 5'-alcyne 18 et le gabarit protégé par les groupements 1-éthoxyethylidinène 6b. En effet, rappelons qu'il est nécessaire de conserver les oxyamines protégées pour empêcher toutes réactions secondaires avec des contaminants porteurs de fonctions aldéhydes. La réaction de CuAAC est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment, à savoir en utilisant du sulfate de cuivre II réduit par de l'ascorbate et complexé par le THPTA. Après deux heures de réaction à température ambiante, le suivi RP-HPLC indique que la quasi-totalité des oligonucléotides présentant les fonctions alcynes a été couplée sur le gabarit peptidique. La purification peut se faire classiquement en phase inverse et le produit 20, obtenu avec un rendement de 63%, a pu être caractérisé par ESI-MS sans difficulté (Figure 90).

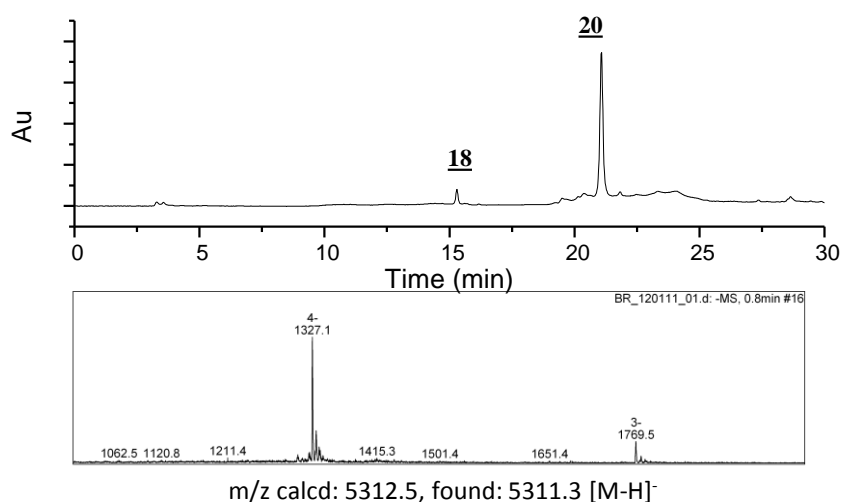


Figure 90 Chromatogramme et caractérisation ESI-MS de l'intermédiaire 20

ii) Ligation oxime en seconde étape

L'obtention du mime de i-motif **5** a ensuite nécessité la formation du lien éther d'oxime en faisant réagir les oligonucléotide 3'-aldéhyde **17** sur l'intermédiaire **20**. Cependant par rapport à la stratégie précédente, une étape supplémentaire de déprotection des oxyamines est nécessaire. Celle-ci a été effectuée en milieu TFA à 10% pendant 30 minutes. Il faut noter que ceci a été possible car les oligonucléotides présents sur le gabarit sont composés exclusivement de bases pyrimidiniques, moins sensibles aux conditions acides que les purines. La réaction de déprotection a été suivie par RP-HPLC (Figure 91). Le mélange réactionnel a été directement lyophilisé sans purification ni caractérisation du fait de sa réactivité.

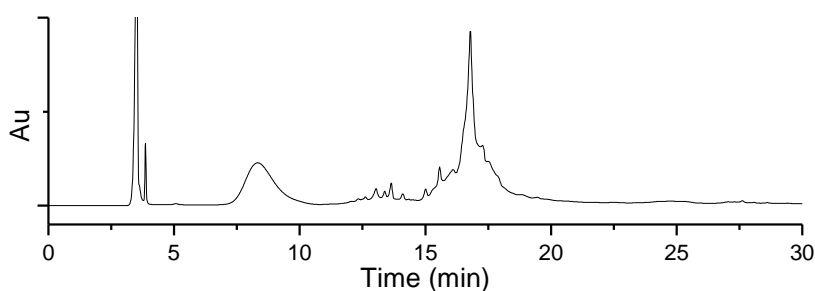


Figure 91 Chromatogramme RP-HPLC après déprotection dans le TFA à 10% de l'intermédiaire **20**

Afin que la formation du lien éther d'oxime soit réalisée dans les meilleures conditions, un excès d'oligonucléotide **17** (4Eq) a été ajouté pour former le produit final **5**. La réaction est effectuée en milieu acétate d'ammonium tamponné (0,4M ; pH 4,5) pendant deux heures à 55°C selon les conditions classiques utilisées pour ce genre de ligation. La purification de ce produit a également nécessité l'utilisation d'une purification par IE-HPLC (SAX, Figure 92). Le mime de i-motif a été obtenu par cette stratégie avec un rendement total de 25%.

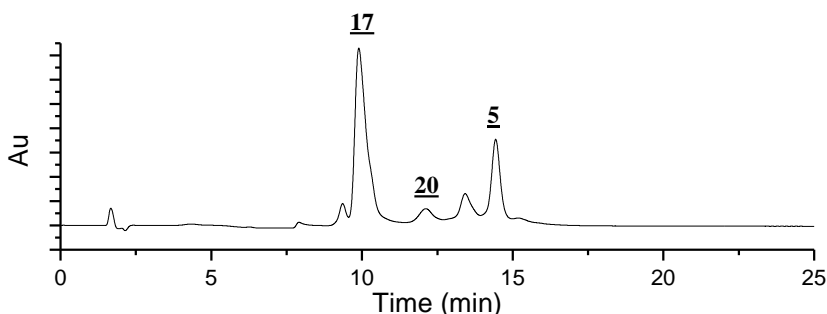


Figure 92 Chromatogramme IE-HPLC(SAX) de la synthèse du mime **5** par la stratégie 2

3c. Caractérisation par spectrométrie de masse

Quelle que soit la stratégie utilisée, le composé **5** a été tout d'abord caractérisé par spectrométrie de masse. Dans un premier temps des analyses ont été effectuées par ESI-MS. Afin d'arriver à caractériser l'édifice, il a été nécessaire d'utiliser des conditions décrites par l'équipe de V. Gabelica pour caractériser les oligonucléotides dont les G-quadruplexes¹⁹³. Celles-ci reposent sur l'utilisation de l'acétate d'ammonium comme contre ion en solution, qui lors de sa vaporisation formera de l'ammoniac et de l'acide acétique. De plus, la présence d'*isopropanol* comme cosolvant a favorisé les analyses (Figure 93A). Cependant la caractérisation s'est avéré être difficile et les spectres obtenus ont été peu satisfaisants. C'est pourquoi des analyses par MALDI (« Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry ») ont été nécessaires (Figure 93B). Sur le spectre de masse correspondant, deux pics supplémentaires sont présents. Si le premier correspond à la présence de ionisation double $(M-2H)^{-2}$, le second est vraisemblablement dû à une coupure induite par la technique d'un des oligonucléotides relié en 3' sur sa fonction oxyamine. Ce phénomène a en effet déjà été observé sur de tels conjugués obtenus au laboratoire. Toutefois les spectres obtenus dans chacun des cas ont permis de confirmer que l'édifice obtenu **5** était celui attendu.

193 Rosu, F.; De Pauw, E.; Gabelica, V., Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. *Biochimie* **2008**, *90* (7), 1074-1087.

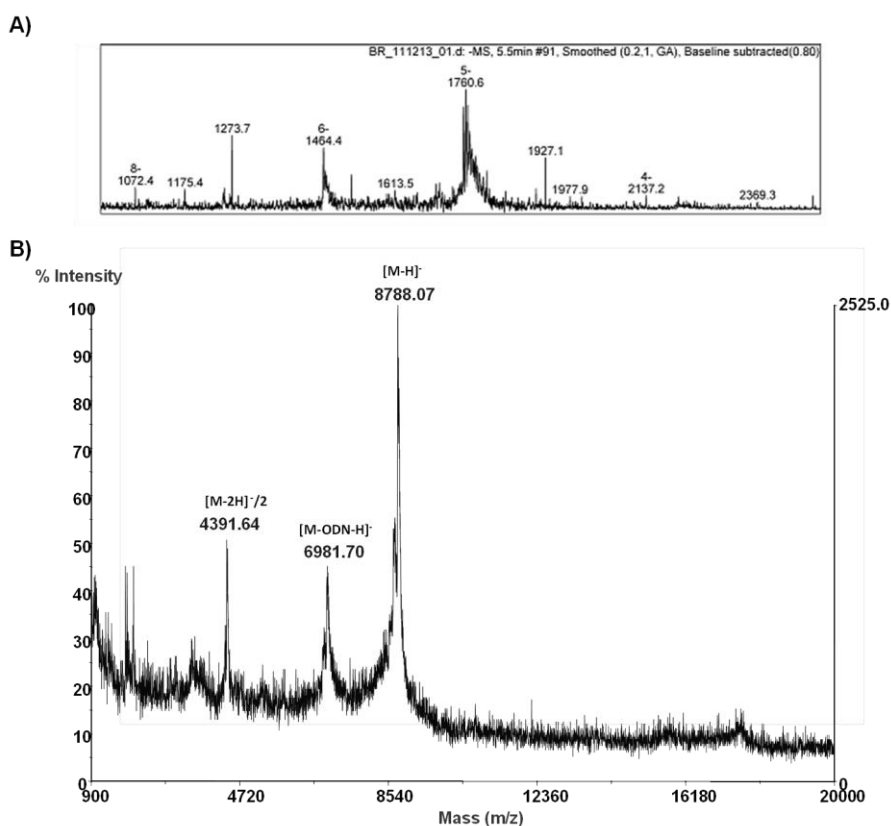


Figure 93 Caractérisations par spectrométrie de masse du mime 5 par ESI-MS (A) et par MALDI-MS (B)

II.4. Caractérisation de la structuration en i-motif au sein du mime synthétisé

4a. Etude par dichroïsme circulaire

La capacité du mime 5 à adopter une structuration de i-motif a été montrée par dichroïsme circulaire (CD). Cette technique de spectrophotométrie a beaucoup été utilisée ces dernières années pour caractériser les structures secondaires adoptées par les oligonucléotides en obtenant, pour chaque structure, un signal caractéristique (une signature)¹⁹⁴. De plus cette technique présente l'avantage d'être non destructrice, nécessite peu de produit et reste de ce fait particulièrement adaptée aux molécules synthétisées. Le spectre CD connu de i-motif est caractérisé par un maximum proche de 285nm et un minimum proche de 260nm. Ce signal est dû à l'hélicité de la structure et à la façon dont s'apparient les bases nucléiques dans l'édifice formé. Des études comparatives ont été effectuées entre un i-motif tétramoléculaire formé à partir de

194 Kyr, J.; Kejnovská, I.; Renčíuk, D.; Vorlíčková, M., Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res* **2009**, 37 (6), 1713-1725.

quatre brins de séquence 3'-TCCCCT-5', un des intermédiaire de réaction **19** capable de former un i-motif bimoléculaire et le composé **5**.

i) Etude sur la structure intermoléculaire formée par la séquence 3'-TCCCCT-5'

Par similarité avec le mime obtenu **5**, le i-motif tétramoléculaire possède la même séquence 5'-TCCCCT-3'. Sa formation a été étudiée en fonction du pH (dans un tampon PBS 10mM) car l'appariement des cytosines dans la structure implique la protonation de l'une d'elle en position N3. La dénaturation du produit a été suivie pour chacun des pH étudiés. Ainsi le spectre CD du i-motif tétramoléculaire présente un maximum à 284nm et un minimum à 261nm à un pH de 4 ce qui correspond à un signal de i-motif (Figure 94A). L'augmentation de pH entraîne des variations du signal. A pH5 le maximum du signal est à 283nm et le minimum à 255nm (Figure 94B). A pH6 le signal ne présente plus qu'un maximum à 276nm indiquant la déstructuration de l'édifice (Figure 94C). Les études de dénaturation ont donc été effectuées à pH 4 et 5 pour obtenir des températures de demi-dénaturation (T_m) respectivement à 44°C et 43°C.

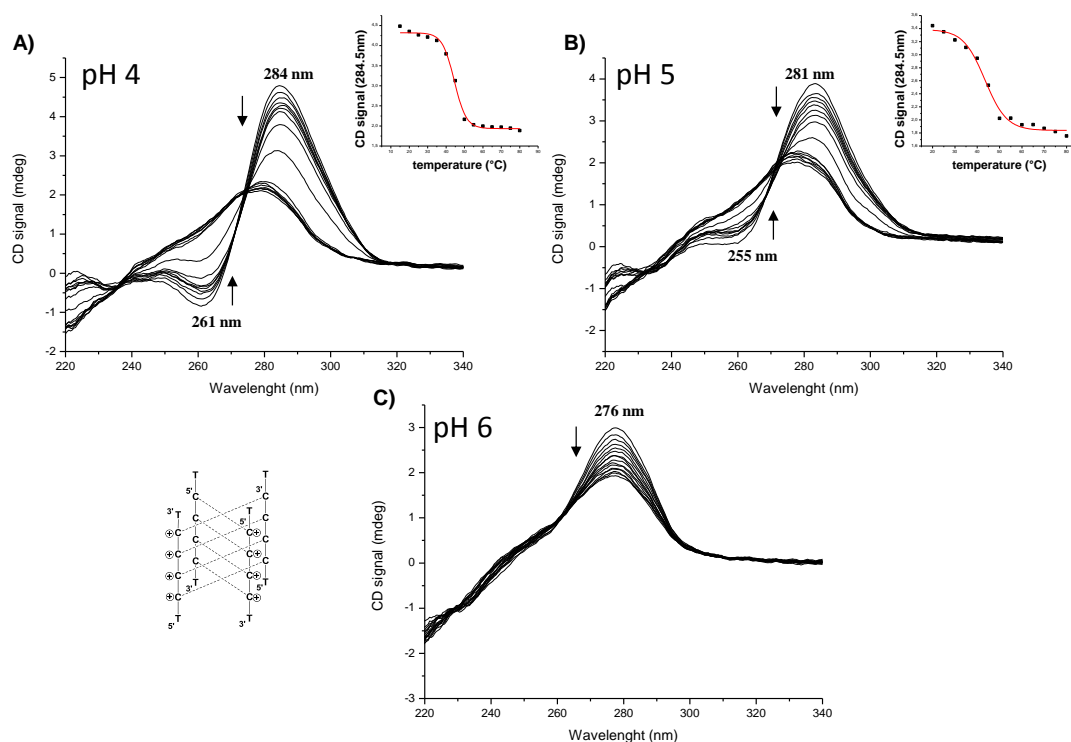


Figure 94 Spectres CD correspondant à la dénaturation du i-motif tétramoléculaire à pH4 (A), pH5 (B) et pH6 (C). La dénaturation est suivie à 284nm.

*ii) Etude de la structuration en i-motif bimoléculaire formé par l'intermédiaire **19***

Les études par dichroïsme ont également été effectuées sur l'intermédiaire **19** obtenu après la réaction de ligation par lien oxime de seulement deux oligonucléotides sur le gabarit peptidique

(Figure 95). La formation d'un i-motif peut se faire par le biais d'un édifice bimoléculaire. A pH 4, à une température de 5°C, ce dernier présente un signal maximum à 285,5nm et un minimum à 263,5nm indiquant la structuration des oligonucléotides sous la forme attendue. Toutefois le spectre est légèrement différent du motif tétramoléculaire précédent. De plus, de la même façon, les maxima et minima des spectres étudiés à différents pH varient légèrement avec l'augmentation du pH jusqu'à disparition du signal à un pH de 7. Ce phénomène était visible à pH6 dans le cas du i-motif tétramoléculaire. Les températures de dénaturation ont pu être mesurées aux pH de 4, 5 et 6 et des valeurs de 50°C, 43°C et 39°C ont été obtenues respectivement. L'édifice formé avec le composé **19** semble donc plus stable sur une plus large gamme de pH.

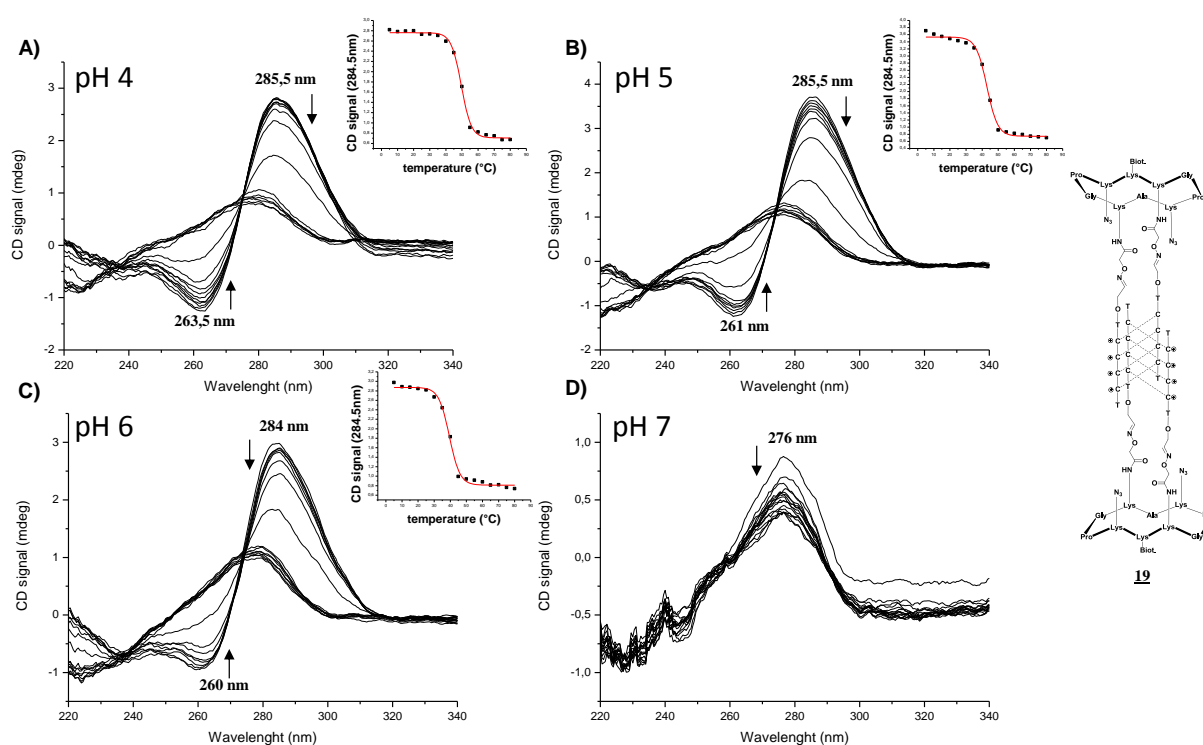


Figure 95 Spectres CD de dénaturation du i-motif bimoléculaire **19** à pH4 (A), pH5 (B), pH6 (C) et pH7 (D). La de dénaturation est suivie à 285,5nm.

iii) Etude de la structuration en i-motif du composé **5**

Les spectres obtenus à différents pH (4, 5 et 6) sur le mime final **5** sont caractéristiques d'un i-motif avec un maximum à 286nm et un minimum à 262nm (Figure 96). A pH 7 par contre de légères variations du spectre apparaissent avec un maximum à 284nm et un minimum moins intense à 262nm. Ce dernier signal, quoique légèrement différent, correspond également à un i-motif et indique qu'il est possible de former la structure à pH neutre. Il faut atteindre pH 8 pour obtenir la destruction de la topologie des i-motif. Les études de dénaturation ont permis de déterminer des T_m de 57°C, 56°C, 47°C et 24°C aux pH de 4, 5, 6 et 7. On retrouve ainsi une forte stabilisation du motif par la présence du gabarit peptique et la

formation d'un édifice monomoléculaire. Il est intéressant de constater que la structure peut se former quand une différence de pH avec le pK_a de la cytosine est de 2. Il est possible que la présence du gabarit permette la formation du motif sans que toutes les liaisons hydrogènes au sein du i-motif ne soient formées (coopérativité différente).

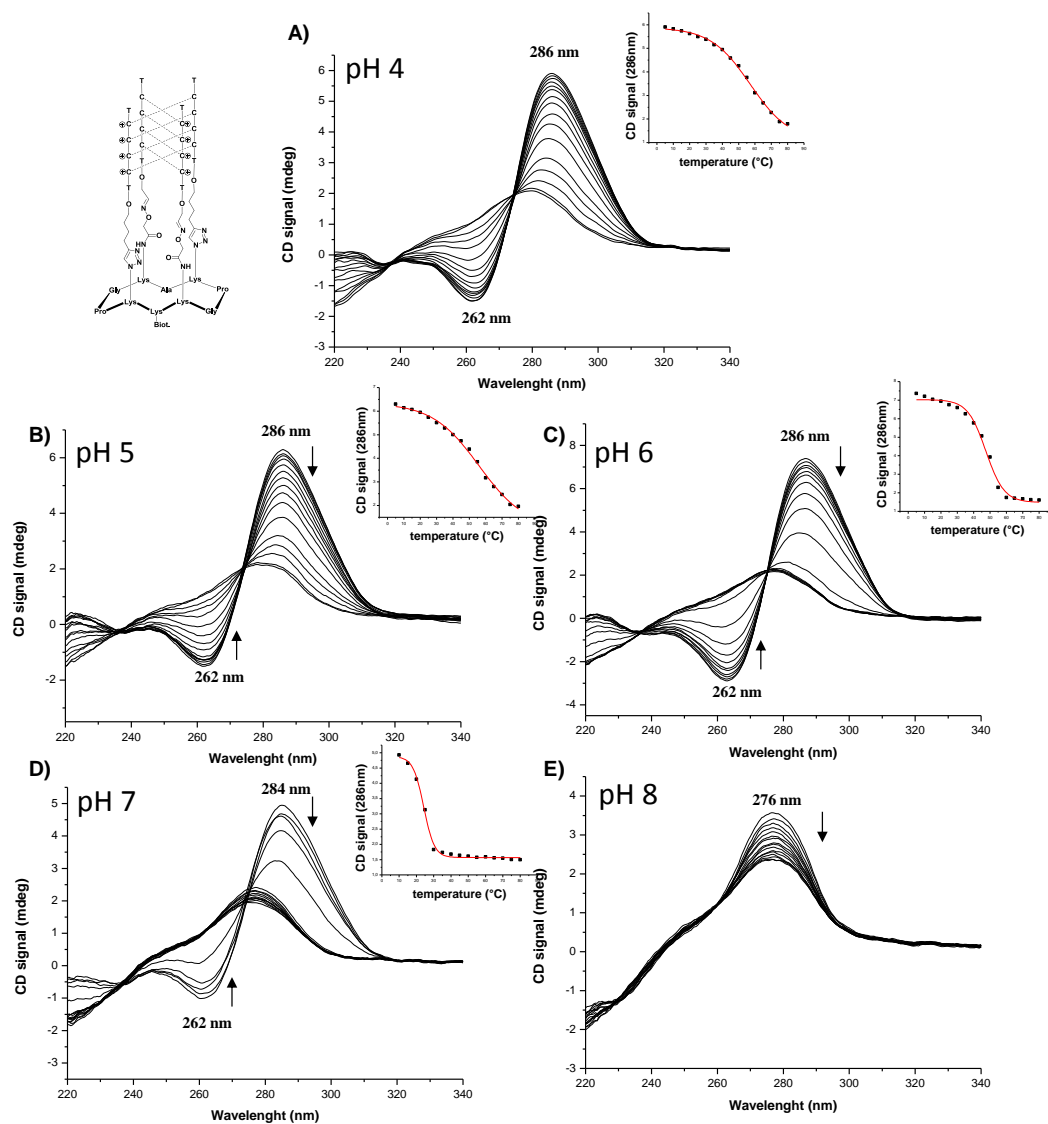


Figure 96 Spectres de dénaturation du mème de i-motif 5 à pH 4 (A), pH 5 (B), pH 6 (C), pH 7 (D) et pH(8). La de dénaturation est suivie à 286nm.

iv) Etudes thermodynamiques

L'utilisation des courbes de dénaturation des oligonucléotides permet également de déterminer les constantes thermodynamiques qui régissent la formation des différents édifices. A partir de la relation de Van't Hoff $\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$, on peut en déduire que $\ln K = -(\Delta H^\circ/R)(1/T) + (\Delta S^\circ/R)$. Les paramètres K, ΔG° , ΔH° , ΔS° représentent respectivement la constante d'équilibre, l'enthalpie libre, l'enthalpie et l'entropie lors de la formation de l'édifice. T

représente la température et R la constante de Boltzmann. Ainsi le tracé de $\ln(K)$ en fonction de $1/T$ permet d'obtenir ces données. ΔH° peut être déduit de la pente de la courbe et ΔS° de l'ordonnée à l'origine de la droite obtenue¹⁹⁵. Dans les cas de différentes molécules étudiées, K peut être déduit des courbes de dénaturation. Ainsi dans le cas d'un système intramoléculaire (mime **5**), on aura $K = \alpha / (1 - \alpha)$ où α représente la fraction de structure formée. En considérant que l'ensemble des structures est formé à basse température et qu'à l'inverse à haute l'ensemble des motifs sont dénaturés, α peut être déduit. Dans le cas de l'intermédiaire **19** les constantes peuvent également être obtenues en considérant que cette fois-ci K est résolu par l'équation $K = \alpha / (2C_0(1 - \alpha)^2)$ et dans le cas de la structure tétramoléculaire, K est obtenu par la relation $K = \alpha / (4C_0^3(1 - \alpha)^4)$. Les analyses ayant été effectuées dans les mêmes conditions, les constantes peuvent être comparées. Elles sont répertoriées dans le Tableau 6.

Molécule	pH	T_m (°C)	ΔH° (kcal.mol ⁻¹)	ΔS° (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔG° (kcal.mol ⁻¹)
i-motif tétramoléculaire	4	44	-100	-251	-25
	5	43	-69	-157	-23
i-motif bimoléculaire 19	4	50	-90	-253	-14,9
	5	43	-79	-227	-11,4
	6	39	-75	-213	-11,1
Mime Intramoléculaire 5	4	57	-24	-74	-2,1
	5	56	-23	-72	-1,9
	6	47	-19	-59	-1,4
	7	24	-10	-36	1,2

Tableau 6 Données thermodynamiques des structures de i-motifs obtenues

L'étude des différentes constantes thermodynamiques semblent indiquer que la stabilisation des motifs est bien obtenue par gain entropique comme dans le cas du mime de G-quadruplexe parallèle **1**. Toutefois le modèle utilisé n'est pas vraiment adapté à l'étude des édifices intermoléculaires et les résultats obtenus ne sont qu'approximatifs expliquant ainsi la meilleure stabilisation des édifices intermoléculaires par rapport au composé **5** (ΔG° supérieurs en valeur absolue). Toutefois les constantes obtenues pour le mime **5**, intramoléculaire, peuvent être interprétées. Il apparait que la stabilisation à bas pH est plus favorisée de façon enthalpique qu'à

195 Mergny, J. L.; Lacroix, L., Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides* **2003**, *13* (6), 515-37.

des pH plus élevés. Par contre, le phénomène s'inverse au niveau entropique. Ainsi à pH 7, l'entropie du phénomène est plus favorable qu'à pH 4. Ceci indique bien un effet de stabilisation de la molécule par gain entropique. De plus est possible qu'il y ait un effet d'augmentation du pK_a des cytosines grâce à la présence du gabarit expliquant ainsi le gain de stabilité du i-motif dans une gamme de pH plus étendue. Il se peut que nous soyons dans le cas d'un effet similaire au « proton sponge » retrouvé sur des naphthalènes¹⁹⁶.

4b. Caractérisation par résonance magnétique nucléaire (RMN) du mime 5

Des études complémentaires par RMN ont été réalisées sur le mime de i-motif final dans le but de confirmer la structuration des oligonucléotides. Toutefois seules des analyses 1D ont pu être réalisées, la technique nécessitant beaucoup de produit final (Figure 97). Ceci a été réalisé à pH 4 et à pH 7 dans les conditions similaires à celles utilisées lors du dichroïsme circulaire. Par cette méthode, il est donc difficile d'attribuer chacun des protons cependant la formation de i-motif peut toutefois être observée¹⁹⁷. En effet, lors d'études antérieures par RNM sur le i-motif, il a été mis en avant que lors de la structuration de l'édifice, les protons imino des cytosines se délocalisent aux alentours de 15ppm. Ceci est simplement dû à la formation de liaisons hydrogène entre ces différents protons. Ce signal est présent sur le spectre à pH 4 mais également à pH 7 bien que plus faible. Ceci confirme donc la formation d'un i-motif sur le gabarit peptidique. De plus, la présence de ces protons à pH neutre pourrait également confirmer l'effet d'éponge à proton proposé précédemment. En effet, malgré une différence de 2 avec le pK_a de la cytosine, les protons imino sont encore présents sur la structure. Des études complémentaires seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

196 Alder, R. W.; Bowman, P. S.; Steele, W. R. S.; Winterman, D. R., The remarkable basicity of 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene. *Chem Commun* **1968**, (13), 723-724.

197 Dai, J.; Ambrus, A.; Hurley, L. H.; Yang, D., A Direct and Nondestructive Approach To Determine the Folding Structure of the I-Motif DNA Secondary Structure by NMR. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (17), 6102-6104.

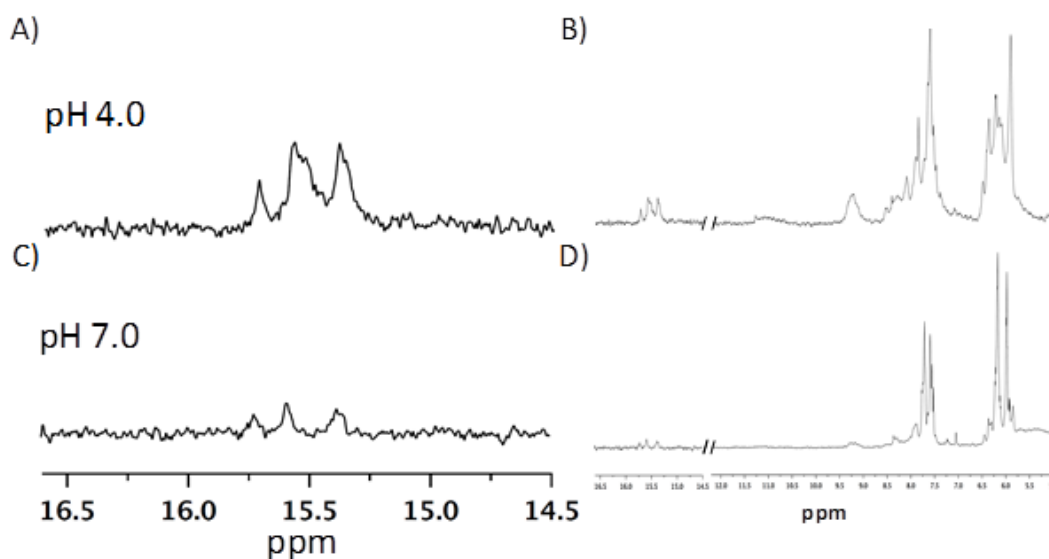


Figure 97 Spectres RMN H^1 du mime de i-motif 5 à pH 4 (A et B) et à pH 7 (C et D)

II.5. Bilan intermédiaire.

La synthèse du composé 5 montre qu'il est possible de relier des oligonucléotides par leurs extrémités 5' ou 3' dans le but de former une structure de type quadruplexe. Ainsi *via* l'utilisation de deux réactions chimiosélectives, une structure a été obtenue capable d'après les analyses par RMN et CD d'adopter une topologie de i-motif. Il a également été montré que la structure était capable de se former dans une gamme de pH plus large qu'un i-motif naturel. Toutefois d'autres études sont nécessaires afin de comprendre la stabilisation apportée par le gabarit. En effet, s'il semble qu'une partie du phénomène puisse s'expliquer par gain entropique, il est possible que d'autres phénomènes interviennent (« proton sponge »). Un suivi pHmétrique plus précis sur la structure pour déterminer les pK_a des cytosines est envisageable. Il est possible également que plusieurs sous-structures (5'E ou 3') existent en solution⁴¹. Des études plus approfondies par RMN peuvent être également pertinentes.

III. Synthèse des G-quadruplexes antiparallèles

Les travaux se sont ensuite logiquement orientés vers la synthèse de mimes de G-quadruplexes antiparallèles suivant la même stratégie. Deux mimes ont été envisagés à savoir un « mime latéral » **21** (Figure 98A), et un « mime diagonal » (Figure 98B) **22**, l'orientation des brins variant entre les deux édifices. Le premier présente deux brins parallèles adjacents et en antiparallèle avec les deux autres. Sur le second mime, chaque brin est en antiparallèle avec ses deux voisins adjacents. De ce fait, les deux édifices obtenus devraient théoriquement varier entre eux par la position de leurs sillons. Ainsi le « mime latéral » devrait présenter deux sillons moyens opposés en plus d'un sillon étroit et d'un sillon large (Figure 98C). A l'inverse le « mime diagonal » devrait présenter deux sillons larges opposés sur la structure et deux sillons étroits (Figure 98D). Deux stratégies de synthèse ont également été envisagées en parallèle en commençant soit pour la ligation oxime soit par la CuAAC.

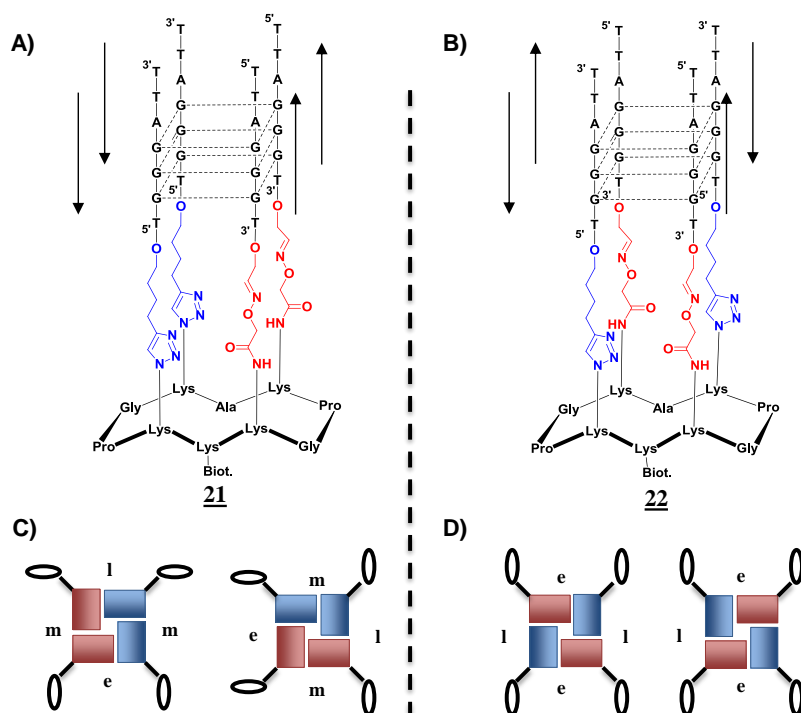


Figure 98 Structure chimique du « mime latéral » **21** (A) et du « mime diagonal » **22** (B) et représentation de l'organisation de leurs sillons (C et D).

Pour la synthèse de ces édifices, les séquences oligonucléotidiques utilisées sont les mêmes que dans le cas du mime parallèle obtenu auparavant (3'– TTAGGGT– 5'). Elles sont fonctionnalisées par les mêmes groupements que ceux utilisés avec le i-motif. Ainsi elles possèdent soit en 3' une fonction aldéhyde (composé **24**, Schéma 9A), obtenue après coupure

oxydante d'une fonction 3'-diol par le *métapériodate* de sodium, soit en 5' une fonction hexynyl (composé **25**, Schéma 9B). De même, la synthèse des deux mimes nécessite deux châssis peptidiques différents. Dans le cas du « mime diagonal », il s'agit du gabarit **6**, utilisé pour la synthèse du i-motif et qui est qualifié de « gabarit diagonal ». Pour l'obtention du « mime latéral », un deuxième châssis **30** a été nécessaire. Il présente deux fonctions azotures adjacentes qui font face à deux fonctions oxyamines. Il est qualifié de « gabarit latéral ». La voie de synthèse de ce deuxième châssis étant similaire à celle présentée précédemment, elle ne sera pas décrite (Schéma 9C).

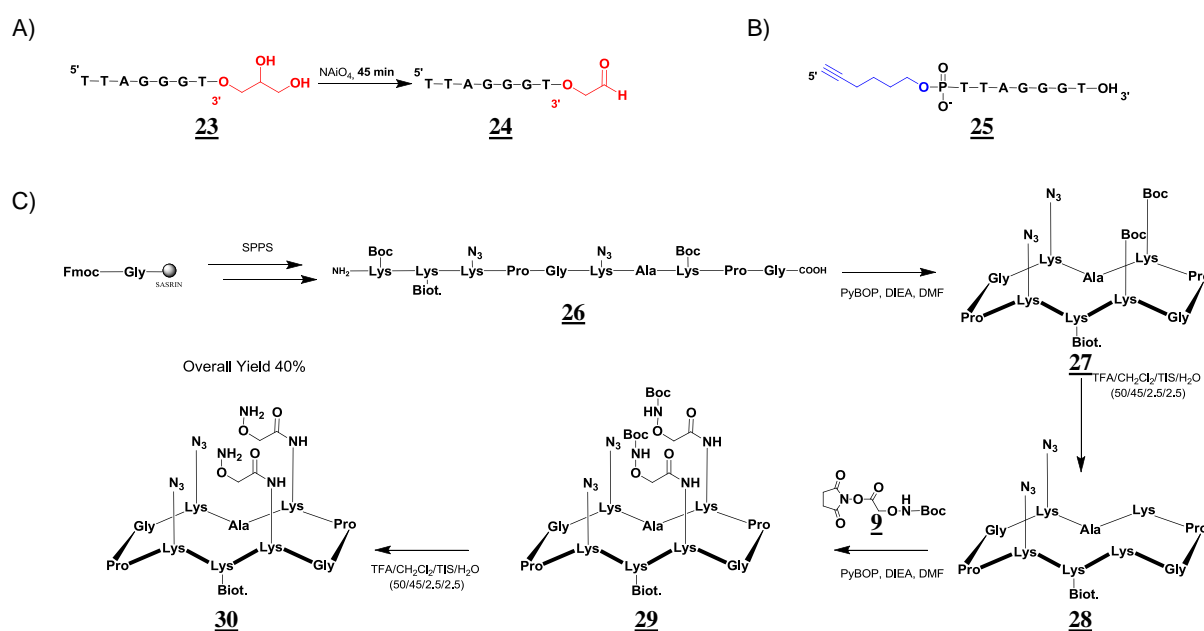


Schéma 9 A) synthèse de l'oligonucléotide 3'-aldéhyde **24** B) oligonucléotide 5'-alcyne **25** et C) Synthèse du gabarit latéral **30**

III.1. Stratégie 1: ligation oxime puis CuAAC

1a. Ligation oxime en première étape

La première stratégie choisie commence par la ligation oxime car elle nécessite moins d'étapes sur les conjugués. Cette stratégie a été appliquée pour la synthèse des deux mimes (Schéma 10) en utilisant le « gabarit latéral » **30** et le « gabarit diagonal » **6a** dont les fonctions oxyamines sont déprotégées afin qu'elles puissent réagir avec les oligonucléotides 3'-aldéhyde **24**. Cette réaction est effectuée dans les conditions similaires à celles utilisées lors de la synthèse du i-motif, à savoir dans une solution tamponnée d'acétate d'ammonium (0,4 M ; pH de 4,5) pendant deux heures à 55°C.

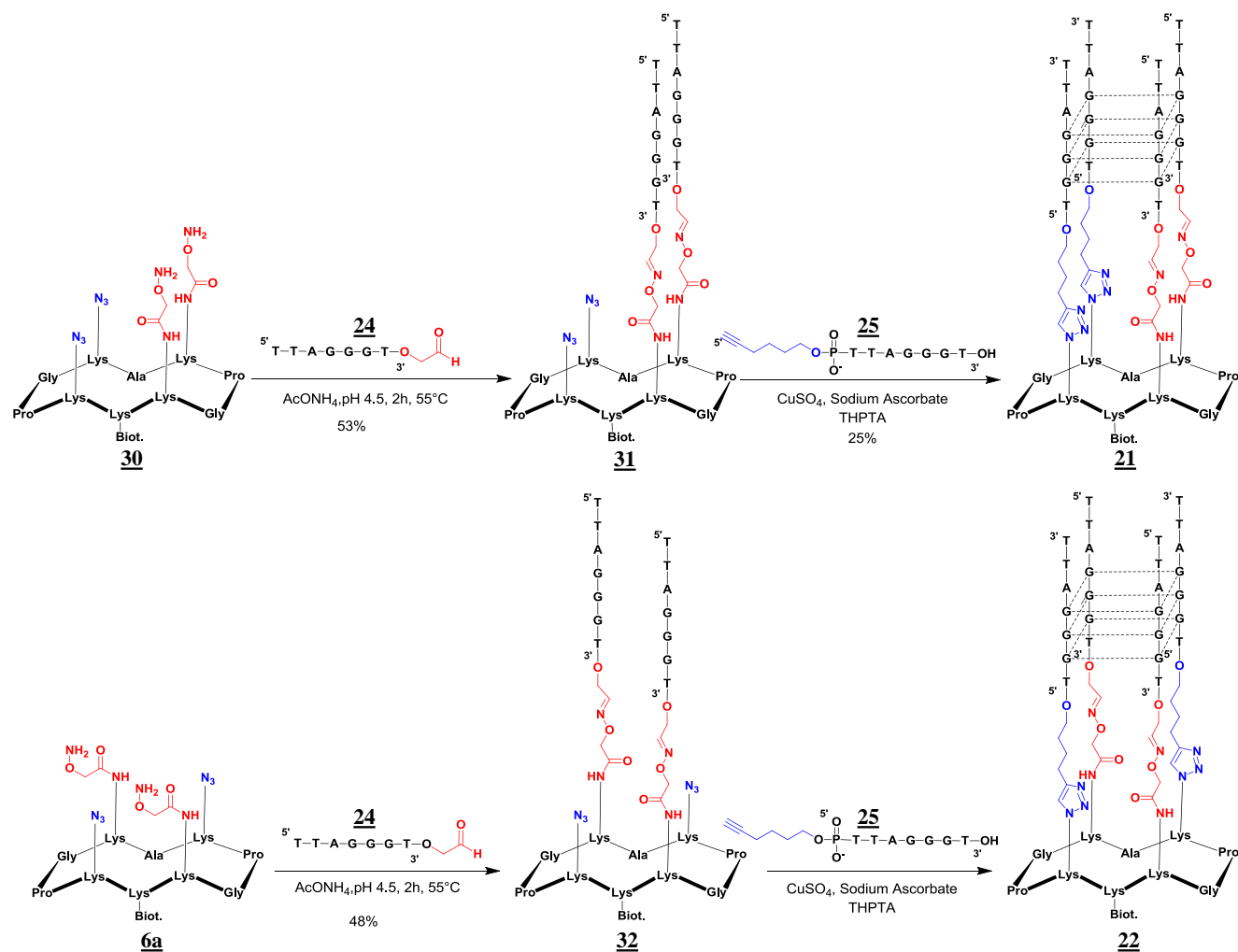


Schéma 10 Synthèse du « mème diagonal » **21** et du « mème latéral » **22** de G-quadruplexe par la stratégie 1

Les chromatogrammes RP-HPLC obtenus dans le cas de ces synthèses sont similaires à ceux obtenus lors de la synthèse du i-motif. Ainsi un produit de monocouplage est retrouvé à 20,2 minutes tandis que le produit attendu possède un temps de rétention 17,8 minutes. Ce résultat est logique puisque les conjugués sont plus hydrophiles que le gabarit seul. La caractérisation des intermédiaires **31** et **32** a été effectuée par ESI-MS dans les conditions citée précédemment (Figure 99). Ils sont chacun obtenus avec des rendements respectifs de 48% et 53%.

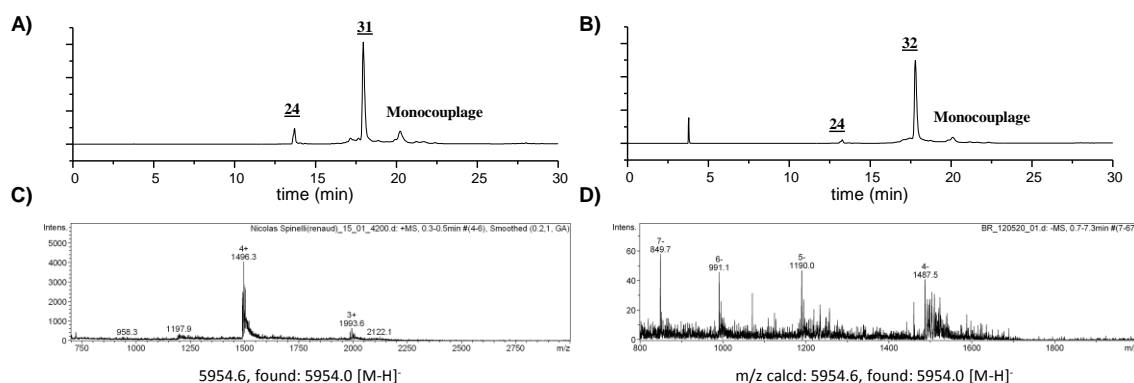


Figure 99 Chromatogrammes RP-HPLC et caractérisations ESI-MS des intermédiaires 31 (A et C) et 32 (B et D)

1b. CuAAC en seconde étape

L'étape suivante consiste à relier les oligonucléotides par leur extrémité 5' par utilisation de la ligation CuAAC. Cette dernière est effectuée dans les conditions déterminées lors de la synthèse du i-motif (sulfate de cuivre, ascorbate de sodium et THPTA) entre les intermédiaires 31 et 32 et l'oligonucléotide 5'-alcyne 25. Les analyses et les purifications des produits ont été effectuées dans un premier temps par chromatographie échangeuse d'ions afin d'empêcher la formation de structures secondaires. Les profils des chromatogrammes IE-HLPC(SAX) observés dans le cas des G-quadruplexes sont similaires à ceux observés avec le i-motif (Figure 100).

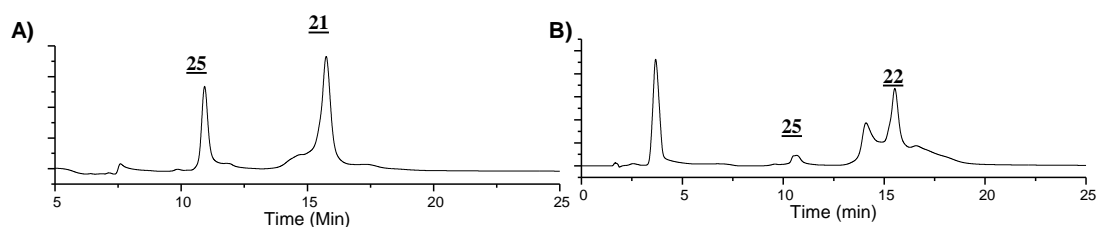


Figure 100 Chromatogrammes IE-HLPC(SAX) après CuAAC des produits 21 (A) et 22 (B)

Cependant il n'a pas été possible de caractériser les produits 21 et 22 par spectrométrie de masse à cause de la présence de nombreux adduits. L'observation des spectres lors de l'analyse a tout de même semblé montrer la présence de produits dans la bonne gamme de masse. De ce fait, des premières caractérisations des composés obtenus ont été effectuées par dichroïsme circulaire. Le spectre CD d'un G-quadruplexe antiparallèle est classiquement caractérisé par deux maxima vers 240nm et 295nm ainsi que par un minimum vers les 260nm. Dans le cas des molécules 21 et 22, les spectres CD observés se sont révélés être différents en présentant un maximum à 260nm et

un minimum à 240nm (Figure 101). Ce spectre est la signature d'un G-quadruplexe parallèle¹⁹⁸. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'obtention d'un tel signal. Tout d'abord il est possible que l'édifice formé soit antiparallèle, cependant le dichroïsme circulaire en résultant présente une signature différente. En effet, des variations de signature en CD ont déjà été observées lors d'études sur les G-quadruplexes, notamment dans le cas de l'insertion de bromodéoxyguanine dans la séquence¹⁹⁹. Une autre possibilité est la formation d'édifices formant des G-quadruplexes résultant de l'appariement non covalent d'oligonucléotides alcynes selon une topologie parallèle (Figure 101E)²⁰⁰.

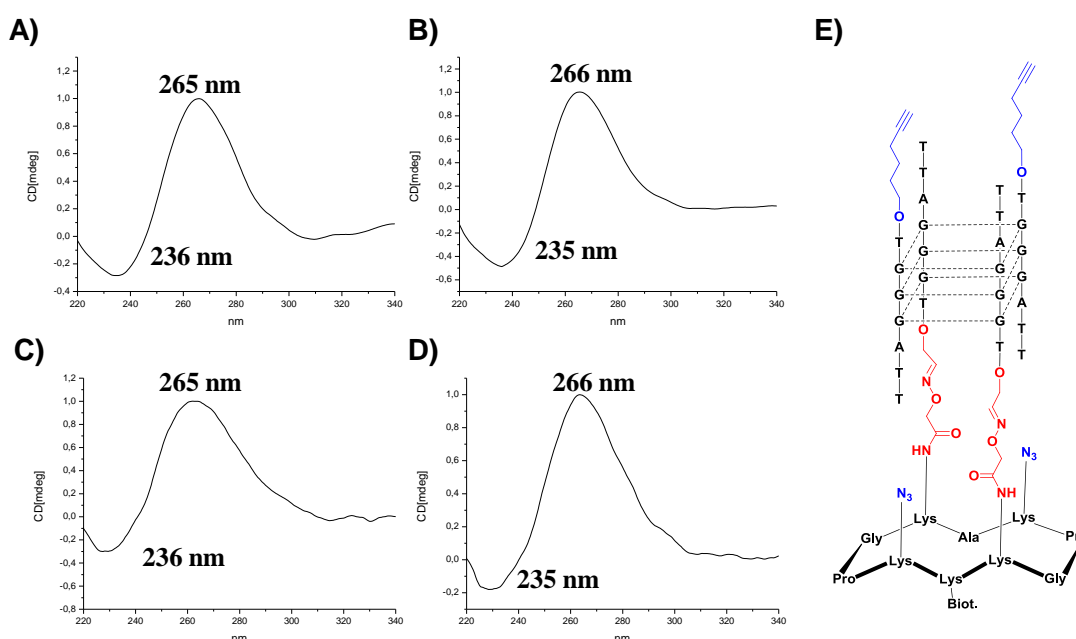


Figure 101 Spectre CD en présence de 100mM KCl ou 100mM NaCl pour les composés **21** (A et C) et **22** (B et D) après purification sur colonne SAX. Hypothèse de la structuration des produits formés par cette méthode (E).

Ce problème semble avoir été résolu récemment en effectuant des études préliminaires des méthodes de purifications plus efficaces, notamment par l'utilisation d'un autre type de colonne de purification par échangeuse d'ion de meilleure résolution (DNAPac PA-100, 9 x 250 mm, procédure IE-HPLC(Dionex), Figure 102A) et par l'utilisation d'un four à colonne pour effectuer les purifications à 60°C. Ainsi par cette méthode, le « mime latéral » **21** a été obtenu avec un rendement de 46%. En effet, le spectre CD de ce composé en présence de NaCl possède les

198 Paramasivan, S.; Rujan, I.; Bolton, P. H., Circular dichroism of quadruplex DNAs: Applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods* **2007**, *43* (4), 324-331.

199 Esposito, V.; Randazzo, A.; Piccialli, G.; Petraccone, L.; Giancola, C.; Mayol, L., Effects of an 8-bromodeoxyguanosine incorporation on the parallel quadruplex structure [d(TGGGT)]₄. *Org Biomol Chem* **2004**, *2* (3), 313-318.

200 (a) Yuan, G.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Li, H., Mass spectrometry of G-quadruplex DNA: Formation, recognition, property, conversion, and conformation. *Mass Spectrom Rev* **2011**, *30* (6), 1121-1142; (b) Rosu, F.; Gabelica, V.; Poncelet, H.; De Pauw, E., Tetramolecular G-quadruplex formation pathways studied by electrospray mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* **2010**, *38* (15), 5217-5225.

caractéristiques d'un G-quadruplexe antiparallèle (Figure 102B). De plus, des analyses par MALDI-MS semblent également indiquer la présence de l'édifice. Toutefois les spectres obtenus n'indiquent seulement que des traces du produit final (sous forme d'impureté comprenant cinq adduits Na^+). D'autres analyses sont nécessaires pour confirmer la structure.

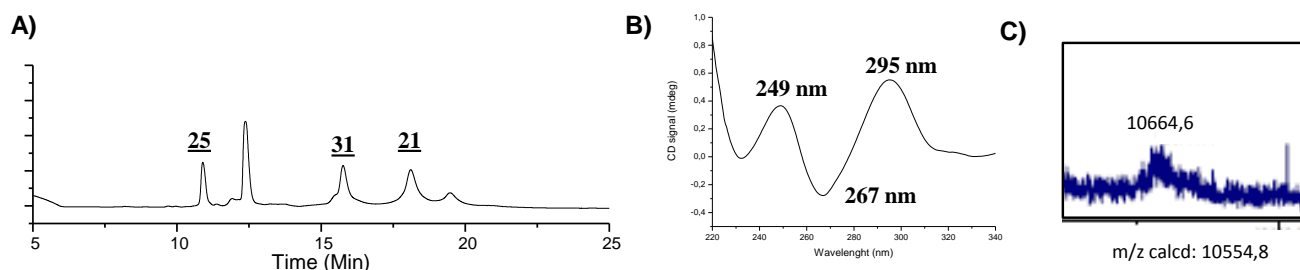


Figure 102 Chromatogramme IE-HPLC(Dionex) (A), spectre CD en présence de Tris 10mM et 100mM NaCl (B) et caractérisation MALDI-MS (C) du « mime latéral » 21 après purification sur colonne DNAPac PA 100, 9 x 250 mm à 60°C.

III.2. Stratégie 2: CuAAC puis ligation oxime

Développer la stratégie 2, commençant par la CuAAC et finissant par la ligation oxime, peut permettre d'arriver à déterminer par spectrométrie de masse si les oligonucléotides sont bien couplés sur le châssis. En effet, la formation du lien éther d'oxime entraîne une perte d'une molécule d'eau et donc une différence de masse (-18Da par ligation oxime). Par contre, lorsque la ligation CuAAC est réalisée en second étape de couplage (stratégie 1), il n'y a aucune différence de masse entre l'édifice couplé par cette ligation et un édifice non covalent formant le G-quadruplexe. Cependant, il n'est pas possible d'utiliser la stratégie 2 dans les conditions utilisées pour le i-motif. En effet, l'hydrolyse des groupes protecteurs 1-éthoxyéthylidène lors la déprotection de l'oxyamine implique un traitement en milieu acide fort (10% TFA) qui risque d'entraîner la dépurination des oligonucléotides couplés sur le gabarit. Pour cette raison, il a été nécessaire d'utiliser d'autres groupements protecteurs pour les oxyamines afin d'obtenir la déprotection de ces dernières dans des conditions plus douces, compatibles avec les oligonucléotides. De plus, ceci pourra permettre d'effectuer la déprotection et le couplage de l'oligonucléotide en une seule étape, en évitant ainsi de garder une fonction oxyamine, réactive, libre.

2a. Synthèse d'un groupement fonctionnel possédant une fonction oxyamine dont le groupement protecteur est compatible avec les oligonucléotides

Les groupements de type trityle ayant déjà été employés lors de travaux antérieurs pour protéger des oxyamines²⁰¹, les travaux se sont orientés vers ces derniers. Ils sont effectivement connus pour être labiles en milieu acide faible. Le nouveau « linker » a été obtenu selon la même stratégie de synthèse que les précédents. La fonction oxyamine de l'acide aminooxyacétique a ainsi été protégée par le trityle par utilisation du chlorure de trityle en milieu basique (triéthylamine dans la pyridine)²⁰² puis la fonction acide carboxylique présente a ensuite été activée par une fonction *N*-hydroxysuccinimide par utilisation de la DCC (Schéma 11). Le produit **34** est obtenu avec un rendement de 40%.

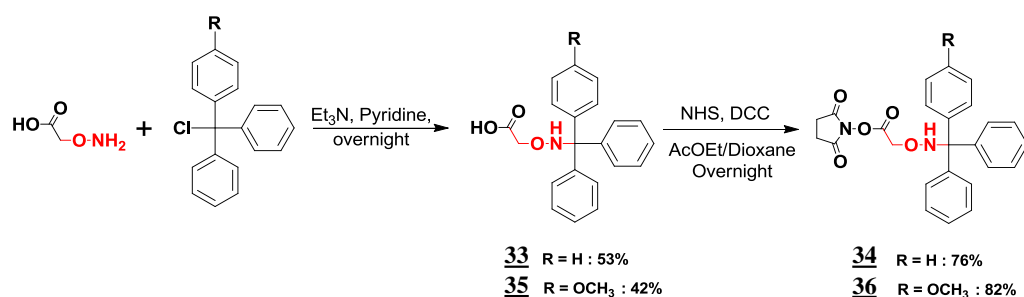


Schéma 11 Synthèse des « linkers » oxyamines présentant de groupements protecteurs clivables en conditions douces

Ce linker a par la suite pu être couplé en présence de DIEA sur les gabarits peptidiques **15** et **28** présentant tous deux des fonctions amines libres en ϵ des lysines (formation des composés **37** et **38**). Des tests de conditions pour enlever le groupement protecteur ont dans un premier temps été effectués. Mais il s'est avéré, certainement par la présence d'un amide en γ de l'oxyamine, que la déprotection du groupement nécessitait des conditions acides trop fortes. En effet, 12h sont nécessaires pour obtenir la déprotection totale des oxyamines en présence d'acide acétique à 80%.

201 Forget, D.; Boturn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P., Highly Efficient Synthesis of Peptide–Oligonucleotide Conjugates: Chemoselective Oxime and Thiazolidine Formation. *Chem Eur J* **2001**, *7* (18), 3976-3984.

202 Kojima, N.; Takebayashi, T.; Mikami, A.; Ohtsuka, E.; Komatsu, Y., Construction of Highly Reactive Probes for Abasic Site Detection by Introduction of an Aromatic and a Guanidine Residue into an Aminoxy Group. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (37), 13208-13209.

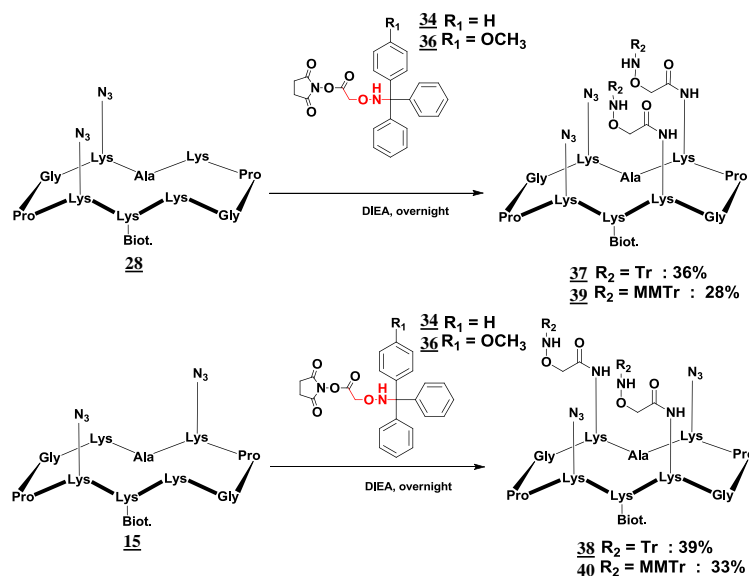
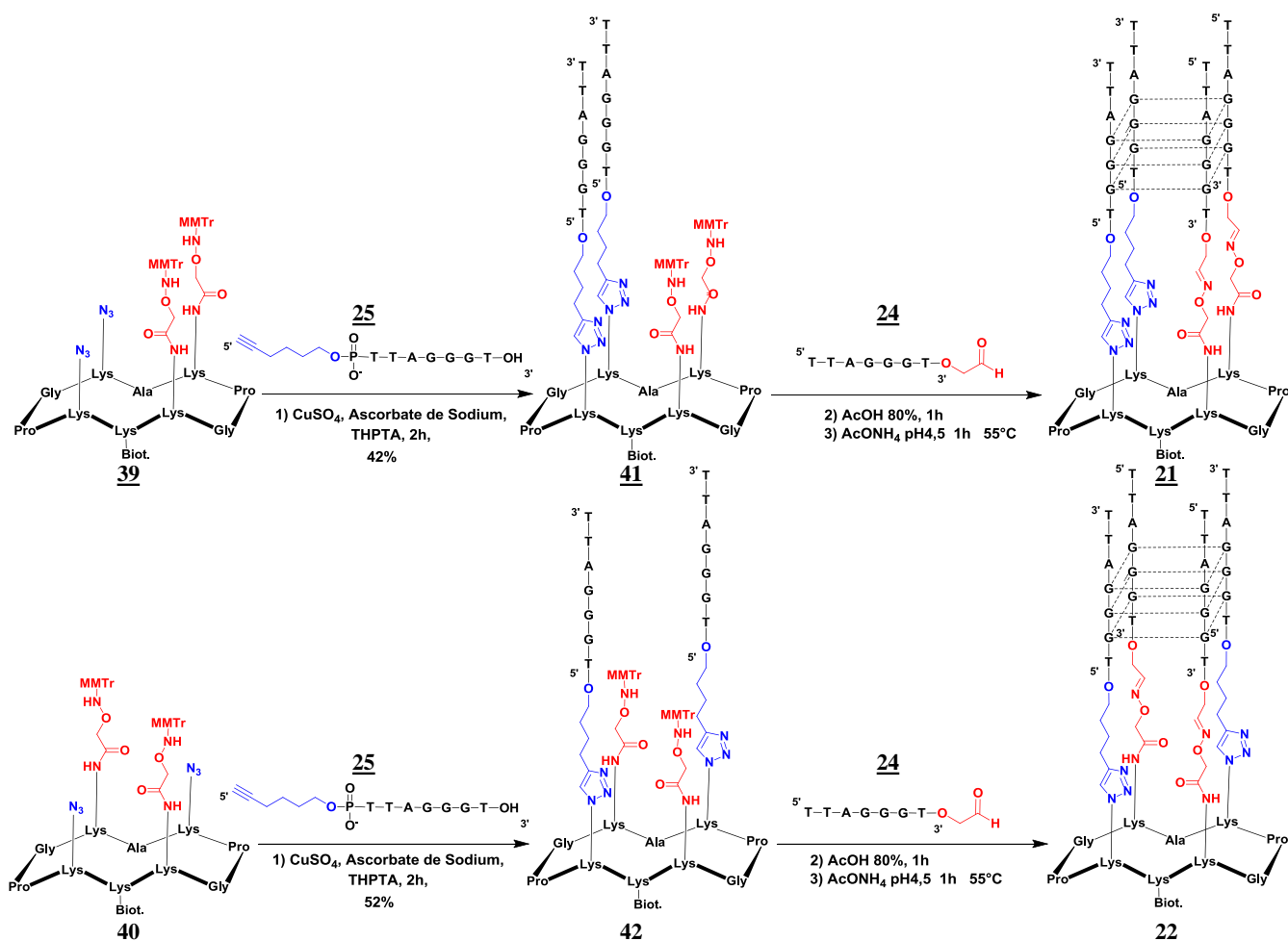


Schéma 12 Synthèse des gabarits peptidiques 39 et 40 présentant des fonctions oxyamines protégées par les groupements trityles ou monométhoxytrityles.

Afin de limiter les risques de dépurination, il a été choisi d'utiliser un groupement protecteur plus labile que le trityle, le monométhoxytrityle. Par les mêmes voies de synthèse et avec un rendement total de 34%, le composé 36, présentant une oxyamine protégée par un groupement monométhoxytrityle et une fonction acide carboxylique activée, a été obtenu. Couplé sur le gabarit, il s'est avéré cette fois-ci qu'en trente minutes dans l'acide acétique à 80% ou bien en quinze minutes dans le TFA à 0,1%, la déprotection est totale. Ces conditions de déprotection étant compatibles avec la présence d'oligonucléotides, la synthèse des édifices 21 et 22 a été débutée selon la stratégie 2 (Schéma 13).

Schéma 13 Synthèses du « mime diagonal » **22** et du « mime latéral » **21** selon la stratégie 2

2b. CuAAC en première étape

La synthèse des édifices antiparallèles est débutée par la réaction de CuAAC en couplant sur les gabarits peptidiques **39** et **40** l'oligonucléotide 5'-alcyne **25**, ceci selon les conditions utilisées lors des couplages précédents (sulfate de cuivre, ascorbate de sodium et THPTA). D'après les analyses des produits par RP-HPLC, il apparaît que le couplage est moins efficace que dans le cas du i-motif car les produits résultant de monocouplage sont plus présents avec un temps de rétention de 18.2min. Toutefois, les composés **41** et **42** ont été obtenus avec de bons rendements (52% et 42%) après purification par chromatographie en phase inverse. Leur caractérisation par ESI-MS a nécessité d'utiliser les conditions reportées par V. Gabelica.

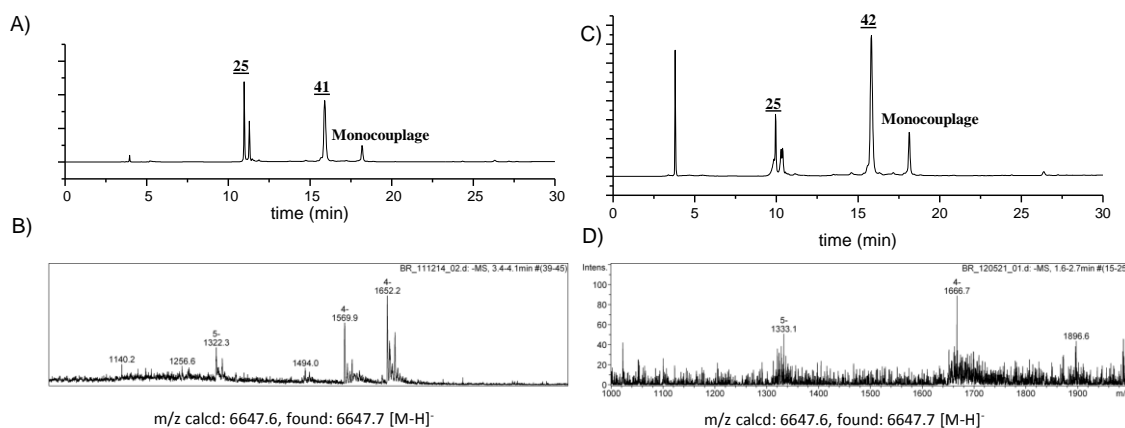


Figure 103 Chromatogrammes et spectres ESI-MS des intermédiaires **41** (A et B) et **42** (C et D)

2c. Ligation oxime en seconde étape

Seules des manipulations préliminaires ont pu être effectuées pour coupler les oligonucléotides par leur extrémité 3' *via* la ligation oxime et aucune caractérisation ni purification des produits n'ont été effectuées par manque de temps. Il apparaît que la déprotection des oxyamines dans des conditions acides en présence d'AcOH à 80% ou bien en présence de TFA aqueux à 0,1% permet de former un produit majoritaire, suffisamment pur pour pouvoir être couplé (Figure 104A). Il faut noter que l'acide acétique utilisé pour cette déprotection, a préalablement été traité afin de neutraliser l'acétaldéhyde présent dans l'acide acétique et capable de réagir sur les oxyamines libres. Ce traitement consiste à ajouter de l'hydroxylamine dans le milieu pour piéger les composés aldéhydes présents. Par la suite l'excès de composé oxyamine est retiré par un traitement avec une résine fonctionnalisée par du formaldéhyde de type Toyopearl[®] AF-Formyl-650M pendant deux heures.

Ainsi après une étape de déprotection des oxyamines par l'acide acétique pendant 30 minutes, le composé **41** a été déprotégé. Le composé obtenu n'a pas été caractérisé à cause de la réactivité des oxyamines. Par la suite, l'oligonucléotide **24** a été ajouté au milieu dans un tampon d'acétate d'ammonium (0,4M ; pH4,5) pour effectuer la ligation oxime. Le profil obtenu par chromatographie échangeuse d'ions semble indiquer la formation du produit **21**. (Figure 104B).

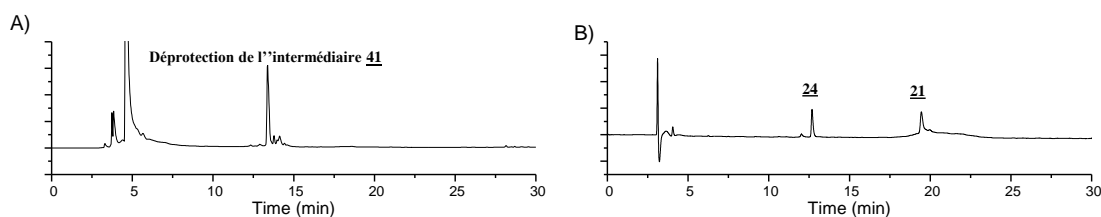


Figure 104 A) Chromatogramme RP-HPLC de la déprotection des groupements monométhoxytrityles sur l'intermédiaire **41** B) chromatogramme par IE-HPLC (Dionex) du couplage par ligation oxime formant le gabarit **21**

III.3. Etudes préliminaires des gabarits par dichroïsme circulaire

Des études préliminaires par CD ont été entreprises sur les différents intermédiaires obtenus par les stratégies 1 et 2 ainsi que sur le mime latéral **21** dans le but de les caractériser. De la même façon qu'avec le mime de i-motif, différentes conditions ont été testées afin de pouvoir analyser le comportement des mimes. Ceci a été effectué en faisant varier les différents cations présents dans les tétrades puisque ceci influence les topologies adoptées par les G-quadruplexes. Ainsi les mesures ont été effectuées dans un tampon Tris 10mM à pH 7,4 en présence de 100mM KCl ou 100mM NaCl. Comme précédemment des études de dénaturation des oligonucléotides ont été effectuées pour chacune des molécules étudiées.

3a. Etudes sur les intermédiaires **31**, **32** et **42** présentant deux oligonucléotides

Des études par dichroïsme circulaire ont été effectuées sur les intermédiaires ne présentant que deux brins reliés au gabarit car il est intéressant d'observer leur structuration sous forme de G-quadruplexe intermoléculaire. Trois intermédiaires ont été étudiés. Les composés **31** et **32**, obtenus par ligation oxime, diffèrent par la position de leur brin sur le gabarit. Le troisième composé étudié (**42**) possède des fonctions monométhoxytrityle qui peuvent stabiliser les structures et ses oligonucléotides sont reliés par un lien triazole au gabarit.

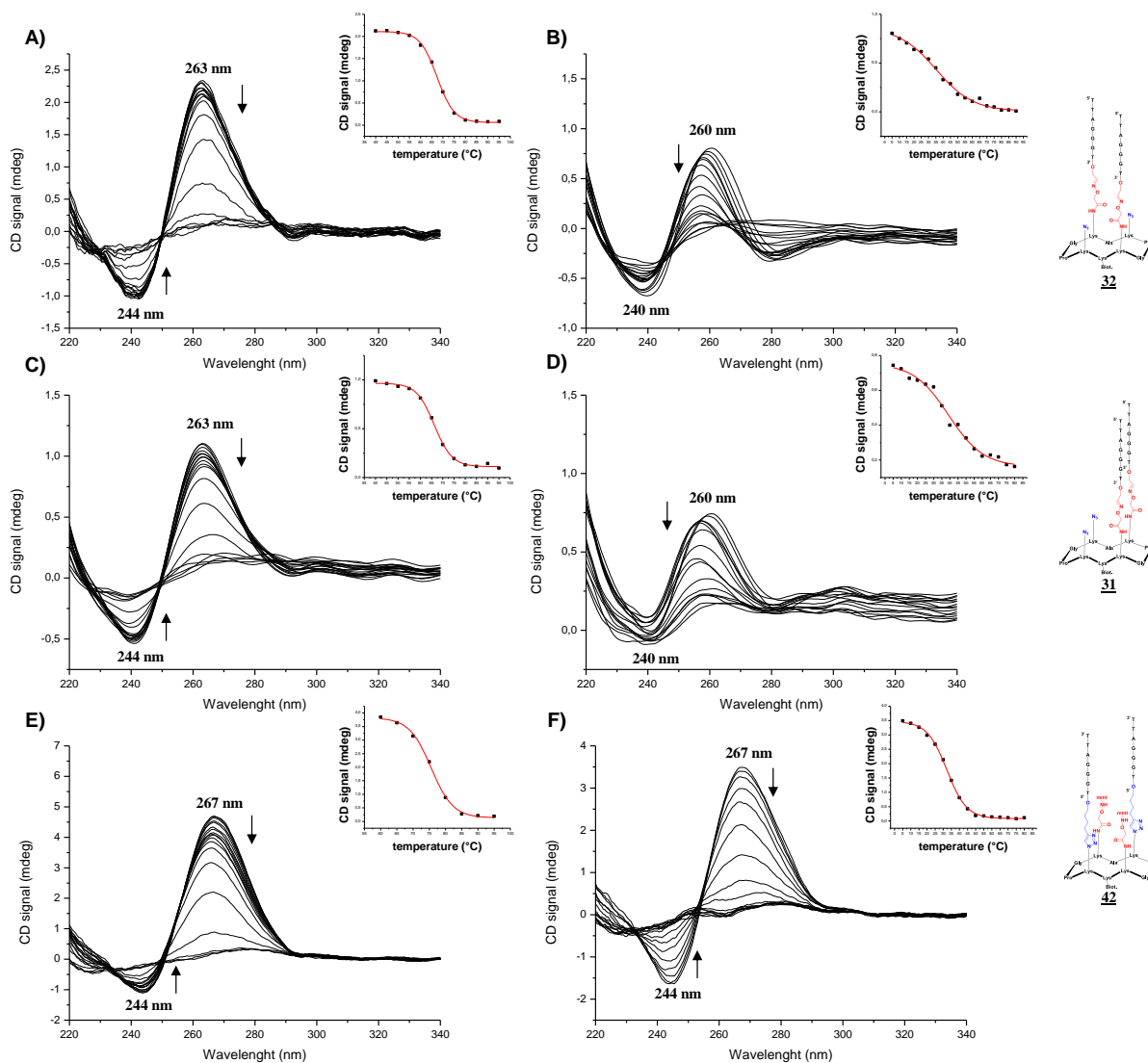


Figure 105 Spectres CD de dénaturation dans Tris 10mM pH 7,4 des G-quadruplexes bimoléculaires **32** (A : 100mM KCl B : 100mM NaCl), **31** (C : 100mM KCl D : 100mM NaCl) et **42** (E : 100mM KCl puis F : 100mM NaCl). La courbe de dénaturation est suivie au maximum des spectres.

Les spectres effectués lors des analyses ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles utilisées auparavant sur le mime de G-quadruplexe parallèle, à savoir dans un tampon Tris 10mM à un pH de 7,4 en présence d'un sel pour favoriser la formation du G-quadruplexe. Ces expériences ont été suivies en présence de KCl et de NaCl (Figure 105). Quel que soit le sel utilisé, les spectres obtenus présentent chacun un minimum proche de 240nm et un maximum à 260nm indiquant la formation d'une topologie parallèle (Figure 106). Le gabarit apportant de l'encombrement aux oligonucléotides, il aurait été envisageable que la structure adopte une topologie antiparallèle. Toutefois, les topologies parallèles étant préférentielles, le résultat obtenu reste logique.

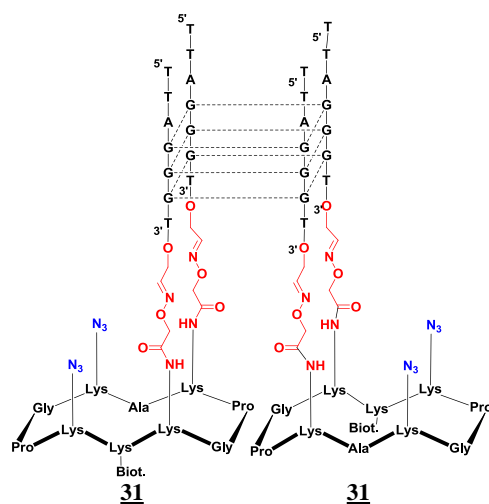


Figure 106 Exemple de formation d'un G-quadruplexe intermoléculaire formé par le composé 31

Les études de dénaturation permettent d'observer que la présence du gabarit stabilise le G-quadruplexe par rapport à ce qui a été retrouvé dans la littérature (Tableau 7)²⁸. Pour chacun des intermédiaires, il y a un gain de 10°C en moyenne par rapport au G-quadruplexe intermoléculaire (3'-TTAGGGT-5') x 4 et un gain de 14°C en présence de potassium par rapport à un G-quadruplexe intramoléculaire 3'-(TTAGGG)4-5'. Par contre les édifices sont moins stabilisés que le mime 1. Il est intéressant de noter que la présence de monométhoxytrityle semble stabiliser de façon plus importante l'édifice en présence de potassium. Il est possible que ces groupements aient un effet stabilisateur sur le G-quadruplexe par un éventuel « π -stacking ». La formation de ces édifices résultant d'interactions bimoléculaires, les constantes thermodynamiques obtenues manquent de précision et ne sont pas montrées. Cependant des études de dénaturation de l'édifice selon la concentration ont été débutées qui permettront d'obtenir des données.

molécule	Sel	T_m
Intermédiaire 31	NaCl	36°C
	KCl	67°C
Intermédiaire 32	NaCl	39°C
	KCl	66°C
Intermédiaire 42	NaCl	33°C
	KCl	75°C
Mime parallèle 1	NaCl	56°C
	KCl	87°C
(5'-TTAGGG-3') x 4	NaCl	24°C
	KCl	55°C

Tableau 7 Température de semi-dénaturation des composés 31, 32 et 42

3b. Etudes préliminaires sur le mime antiparallèle latéral 21

Des premières études par dichroïsme circulaire ont également été entreprises sur le premier mime antiparallèle latéral 21. Elles ont été effectuées en présence de potassium ou de sodium afin de comprendre la façon dont s'agence la structure. En présence de sodium à basse température, le mime présente des caractéristiques d'une topologie antiparallèle avec deux maxima à 295nm et à 249nm ainsi qu'un minimum à 267nm (Figure 107A). Par contre, son spectre en présence d'ions potassium possède deux maxima à 289nm et 264nm ainsi qu'un minimum à 239nm (Figure 107D). Ceci correspondant à une signature de structure hybride (trois brins parallèles et un quatrième en antiparallèle). Il est également possible, d'après le spectre, que des différents édifices soient présents en solution (antiparallèle et parallèle). Afin de mieux comprendre ces phénomènes, des études de dénaturation de la structure ont été réalisées.

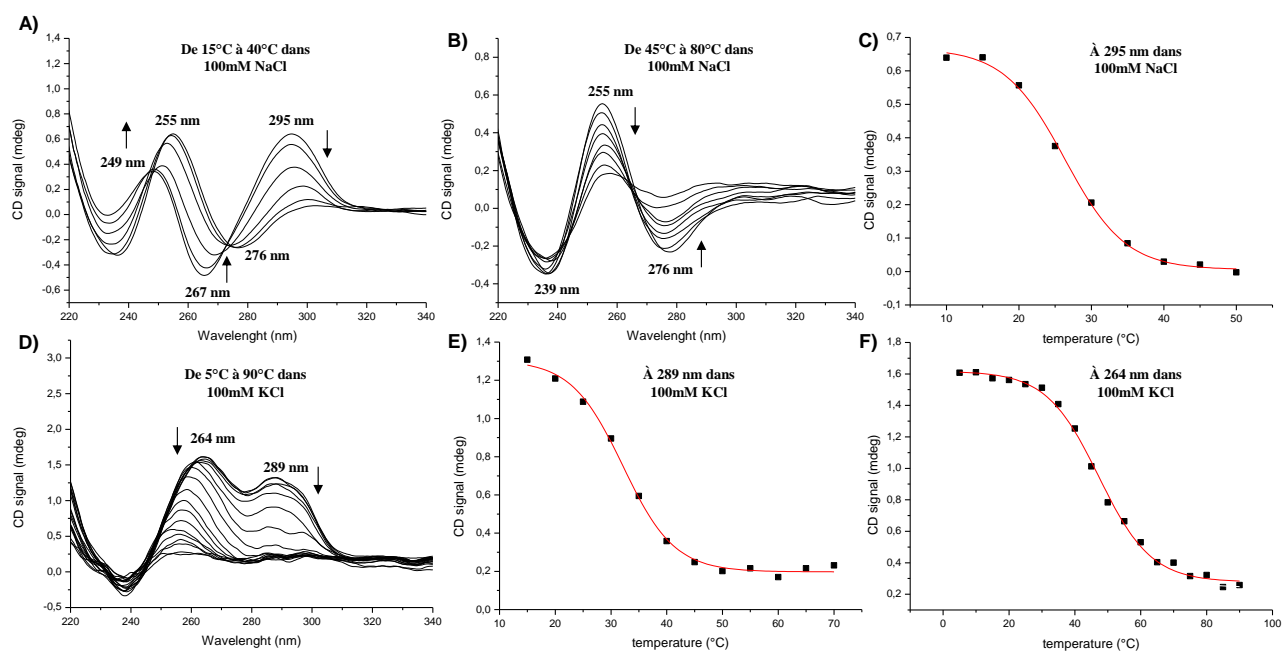


Figure 107 Etude de dénaturation sur le « mime latéral » 21 : spectre dénaturation dans Tris 10mM avec 100mM NaCl de la structure de 15°C à 40°C (A) puis de 45 à 80°C (B) et courbe de dénaturation à 295nm de l'édifice. Spectre dénaturation dans Tris 10mM avec 100mM KCl (D) et courbes de dénaturation à 289nm (E) et 264nm (F)

L'étude de la dénaturation du mime 21 en présence de Na^+ indique la présence de deux phénomènes. A 295nm le signal diminue indiquant la destruction du motif avec un T_m mesuré de 26°C (Figure 107C). Par contre, un autre phénomène semble se produire lors de la dénaturation. Ainsi, plutôt que de diminuer en intensité, le maximum à 249nm se déplace vers 255nm en augmentant de 15°C à 40°C. Il en est de même pour le minimum à 267nm qui se déplace à 276nm (Figure 107A). Au-delà de 40°C, le signal à 255nm diminue progressivement (Figure 107B). En

présence d'ions potassium, un phénomène similaire semble se produire lors de la dénaturation du composé **21** (Figure 107C). Si les deux maxima observés à 289nm et 264nm diminuent tous deux en intensité, les T_m observés diffèrent : à 289nm on retrouve un T_m de 32°C (Figure 107D) tandis qu'à 263nm, il est de 47°C (Figure 107E).

L'origine de ces phénomènes, rencontrés dans les deux conditions salines peut être dûe à la présence d'édifices parallèles (maximum à 260nm et minimum à 240nm). Ceux-ci résultent probablement de la formation de structure intermoléculaire entre les édifices **21** lors de la formation des structures. Ceci expliquerait également leur présence de façon plus importante en présence d'ions potassium car les structures sont plus stabilisées. Il est nécessaire d'effectuer des études du composé selon sa concentration pour comprendre le phénomène.

III.4. Bilan intermédiaire

Si les deux réactions chimiosélectives utilisées lors de ces deux synthèses semblent être compatibles et efficaces, il est important d'améliorer grandement les conditions de purification pour obtenir les édifices de G-quadruplexes antiparallèle attendus. Lors des synthèses du mime de i-motif, l'utilisation de colonne de type SAX semblait suffisante pour obtenir les molécules. Dans ce cas-ci l'utilisation d'un four à colonne pour augmenter la température a été nécessaire. Il peut être judicieux, pour les purifications par échange d'ions à suivre, d'utiliser un contre ion moins stabilisant que le sodium dans le but de déstructurer les édifices. L'utilisation de la stratégie 2 peut également permettre de confirmer la formation de G-quadruplexe reliés de façon covalente.

Toutefois les récents résultats ont permis d'obtenir le « mime latéral ». Ceci montre donc que la voie de synthèse employée permet la structuration sous la forme attendue. Dans ce cas, il semble que lors de la structuration du G-quadruplexe, des édifices intermoléculaires et des édifices intramoléculaires se forment. Il est cependant important de continuer les travaux pour effectivement comprendre ce phénomène

IV. Synthèse d'édifices à boucles

IV.1. Méthodologie de synthèse

Selon le même principe, il a été décidé de synthétiser des mimes de G-quadruplexe dont la topologie des boucles était contrainte. En effet, de plus en plus d'études tendent à montrer que la sélectivité d'un ligand pour un G-quadruplexe peut varier selon les boucles présentes²⁰³. Rappelons qu'il existe trois types de boucle sur un G-quadruplexe : les boucles latérales, les boucles diagonales et les boucles externes. Dans le cadre de cette thèse, les travaux n'ont porté que sur les boucles latérales. L'obtention de ces mimes a nécessité l'utilisation d'oligonucléotides fonctionnalisés en 5' et 3'. Comme lors des travaux antérieurs, la séquence modèle utilisée (3'-TGGGATTGGGA- 5') est similaire à la séquence télomérique humaine. L'oligonucléotide **44** utilisé pour la construction de ces structures est fonctionnalisé en 5' par un groupement alcyne et en 3' par un groupement aldéhyde afin de pouvoir le relier par ses deux extrémités sur le gabarit. Ce dernier est obtenu après coupure oxydante par NaIO₄ de l'oligonucléotide 3'-diol **43** (Schéma 14). Son rendement de synthèse est de 66%.

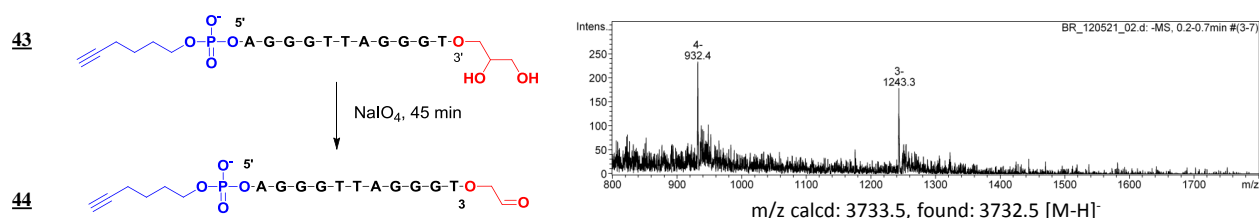
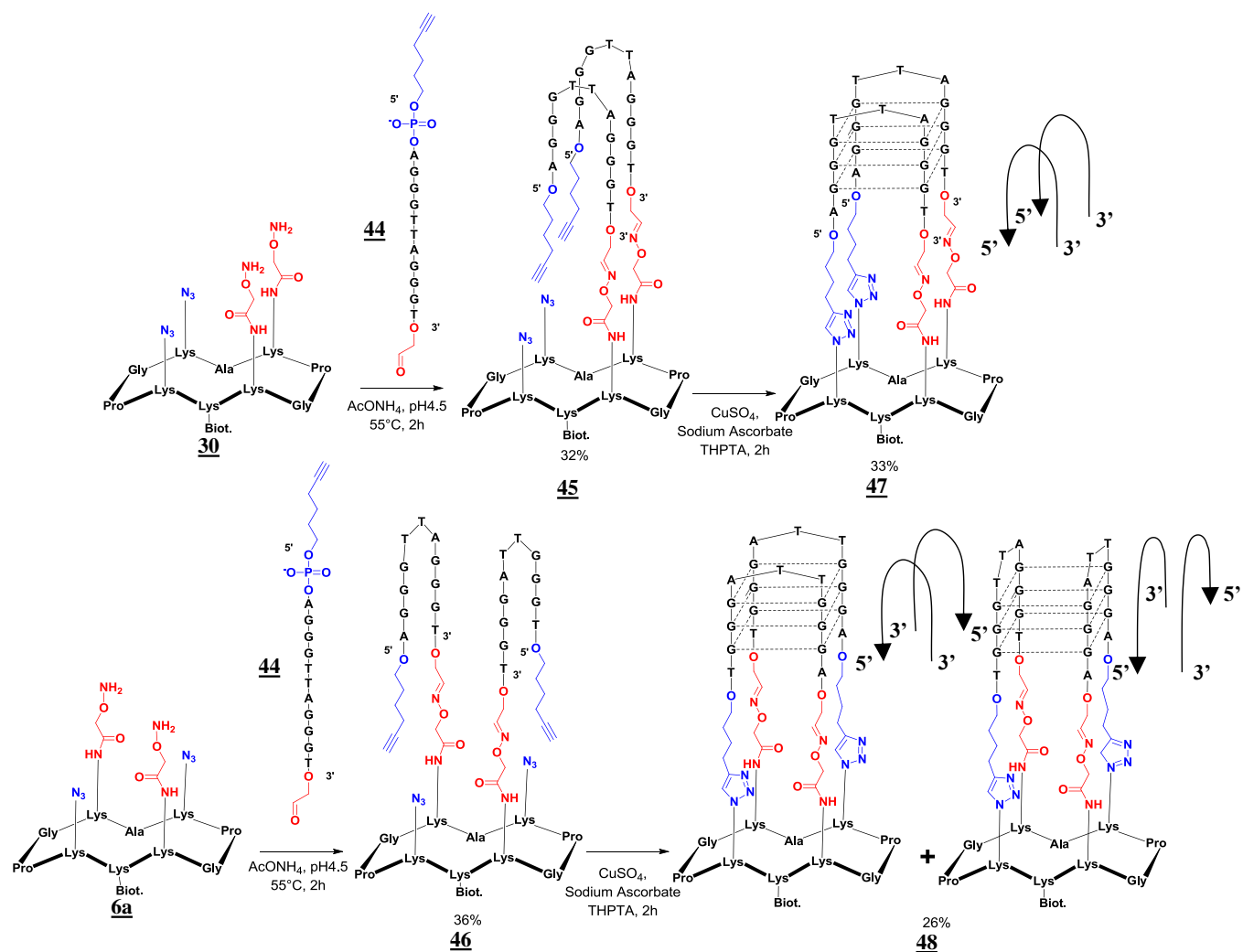


Schéma 14 Synthèse et caractérisation ESI-MS de l'oligonucléotide 3'-aldéhyde et 5-alcyne **44**.

Le « gabarit latéral » **30** et le « gabarit diagonal » **6a** ont été utilisés dans ce cadre permettant ainsi de construire deux édifices présentant tous deux des boucles latérales. Ces dernières seront orientées soit dans le même sens (« mime de boucle latéral » **47**) soit dans le sens contraire (« mime de boucle diagonal » **48**, Schéma 15). Dans ce dernier cas, il faut noter que, deux configurations de molécule peuvent être obtenues. Toutefois ceci ne devrait pas affecter la topologie du G-quadruplexe contraint sur le gabarit.

203 Campbell, N. H.; Patel, M.; Tofa, A. B.; Ghosh, R.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Selectivity in Ligand Recognition of G-Quadruplex Loops†. *Biochemistry (Mosc)* **2009**, *48* (8), 1675-1680.

Schéma 15 Synthèse des édifices à boucles **47** et **48** par la stratégie 1.

1a. Ligation oxime en première étape

La stratégie choisie pour l'assemblage de l'édifice est celle commençant par la ligation oxime (stratégie 1). L'oligonucléotide 3'-aldéhyde **44** (2 équivalents) a ainsi été couplé sur les gabarits peptidiques **6a** ou **30** dont les fonctions oxyamines sont libres. Ceci a été effectué dans les conditions classiques en milieu tamponné d'acétate d'ammonium (0,4M ; pH 4,5) pendant deux heures à 55°C. La purification du produit n'a pas posé de difficulté (Figure 108) et les produits **45** et **46** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 36% et 32% et caractérisés par ESI-MS. Si les spectres obtenus par cette méthode sont d'une qualité médiocre, ils indiquent toutefois la présence des édifices.

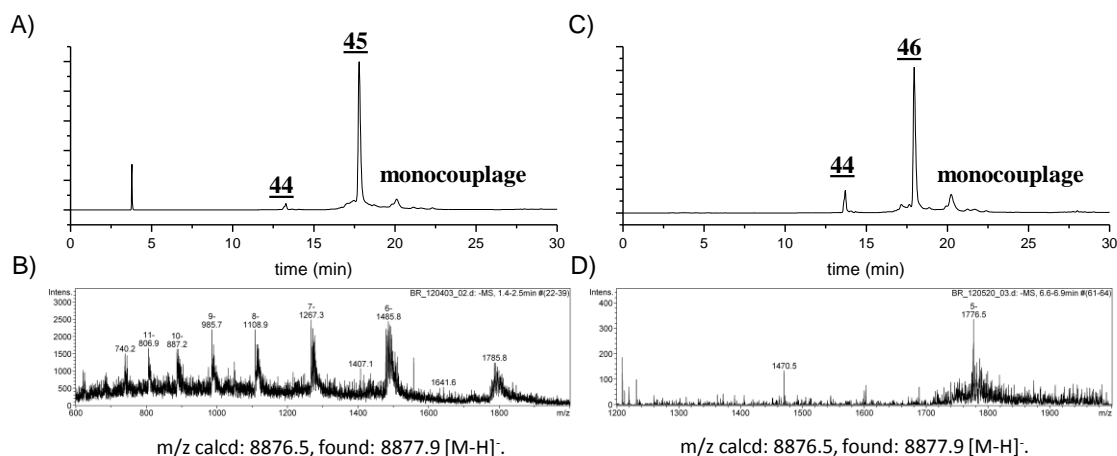


Figure 108 Chromatogrammes RP-HPLC et caractérisations ESI-MS des intermédiaires **45** (A et B) et **46** (C et D)

Pour chacun des intermédiaires obtenus **45** et **46**, des études supplémentaires par dichroïsme circulaire ont été effectuées afin d'observer les topologies adoptées par ces systèmes non-contraints. Sur les spectres effectués en présence de NaCl ou de KCl, on peut observer deux topologies différentes (Figure 109). Avec des ions NaCl, le spectre présente deux maxima à 295nm et 240nm et un minimum à 260nm, caractéristique d'un G-quadruplexe antiparallèle. La présence d'ions K^+ change la topologie adoptée avec un premier maximum à 260nm puis un second moins accentué à 295nm ainsi qu'un minimum à 240nm. Ceci indique un mélange de structures vraisemblablement de type parallèle et hybride. La présence de ces topologies, parallèle et hybride, ne peut se faire que par la formation de boucles externes sur l'édifice. Les boucles ne sont donc pas contraintes lorsque l'oligonucléotide n'est relié qu'en 3'.

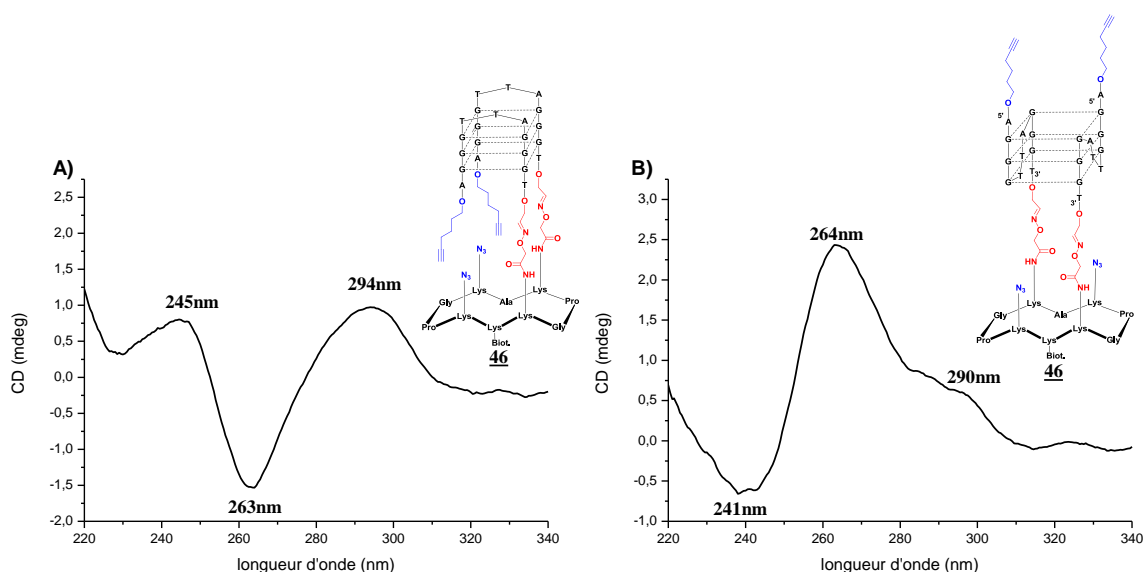


Figure 109 Spectres CD et structure chimique de l'intermédiaire **46** en présence de Tris 10mM, 100mM NaCl (A) ou 100mM KCl (B).

1b. *CuAAC en seconde étape*

La seconde étape de ligation CuAAC devrait permettre de contraindre les oligonucléotides à former les édifices attendus. Elle est réalisée dans les mêmes conditions que celles développées auparavant (sulfate de cuivre, ascorbate de sodium et THPTA). Cependant des difficultés de suivi de la réaction ont été rencontrées lors de cette étape. En effet, que ce soit par chromatographie échangeuse d'anions ou par chromatographie en phase inverse, les temps de rétention des édifices de départ et des composés finaux sont identiques (Figure 110A). Etant donné que la spectrométrie de masse ne permet pas de déterminer si les réactions de CuAAC ont bien eu lieu, les produits ont été analysés par dichroïsme circulaire. Ceci après une purification choisie par phase inverse.

En comparant les spectres des intermédiaires **45** et **46** avec les produits de purifications **47** et **48** obtenus, des informations sur les édifices ont pu être obtenues. En présence de NaCl, les spectres sont similaires, caractéristiques de mimes antiparallèles (Figure 110C). Par contre en présence de KCl, des différences importantes sont observables : tandis que le spectre des intermédiaires **45** et **46** possède une signature majoritairement parallèle, on observe ici des signaux différents. Ces derniers sont caractérisés par un maximum vers les 290nm avec plusieurs épaulements entre 280nm et 240nm et un minimum vers les 230nm (Figure 110D). Deux éléments ont pu être conclus à partir des derniers spectres CD observés : la présence du maximum à 290nm indique la présence d'un G-quadruplexe aux propriétés antiparallèles, contraint par les boucles. Par contre, les différents épaulements sur le spectre entre 280nm et 240nm sont révélateurs de produits non couplés pouvant être soit les intermédiaires **45** ou **46**, soit des produits résultant de monocouplages. Il est également possible dans le cas du « mime latéral » **47** que des couplages croisés aient eu lieu (Figure 110B).

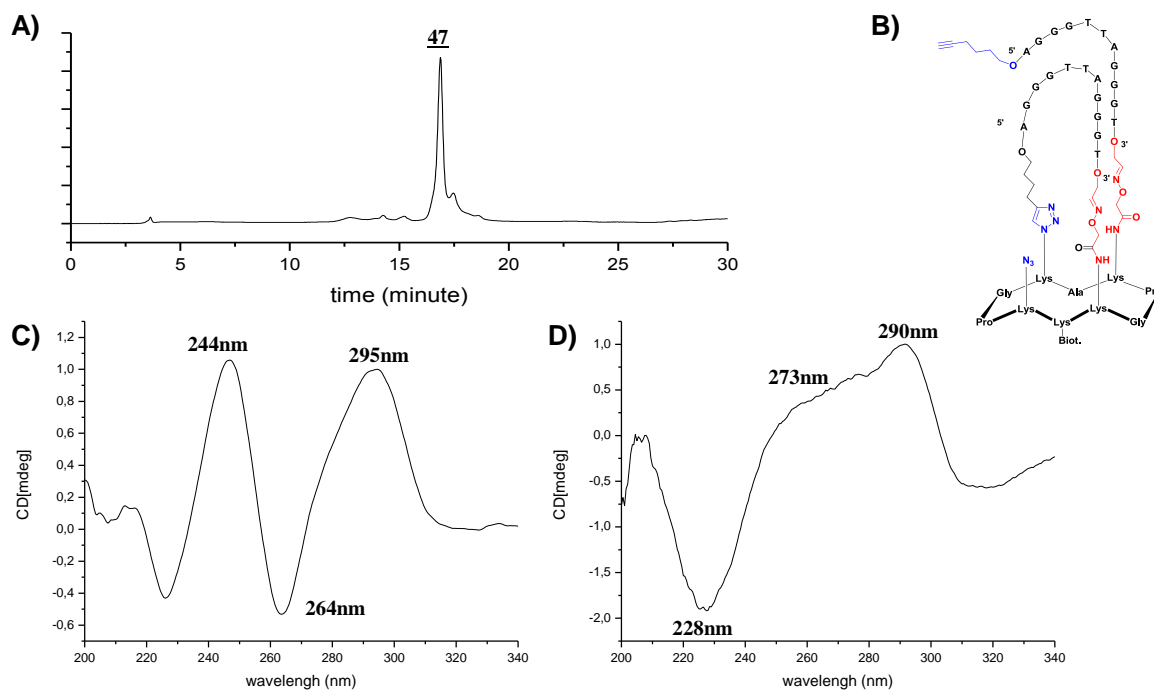


Figure 110 Chromatogramme RP-HPLC (A) et spectres CD dans Tris 10mM avec 100mM NaCl (C) ou 100mM KCl (D) du produit **47**.
B) Structure chimique d'un « édifice croisé »

En se basant sur le fait que chacun des produits contaminants devaient posséder au moins une fonction azoture libre, il a été décidé d'exploiter cette propriété pour réaliser une seconde réaction de CuAAC avec un alcyne à longue chaîne apolaire afin qu'il puisse réagir sur ces derniers (étape de « quenching »). Le couplage à la décynes changeant la polarité des sous-produits, les séparations des édifices par RP-HPLC a ainsi été possible. Après deux heures de couplage, deux produits se différencient par RP-HPLC, l'un correspondant à l'ajout de la décynes sur le gabarit peptidique par « quenching », l'autre au composé attendu (Figure 111A et B). Par ce biais les produits **47** et **48** ont pu être obtenus avec des rendements respectifs de 26% et 33%.

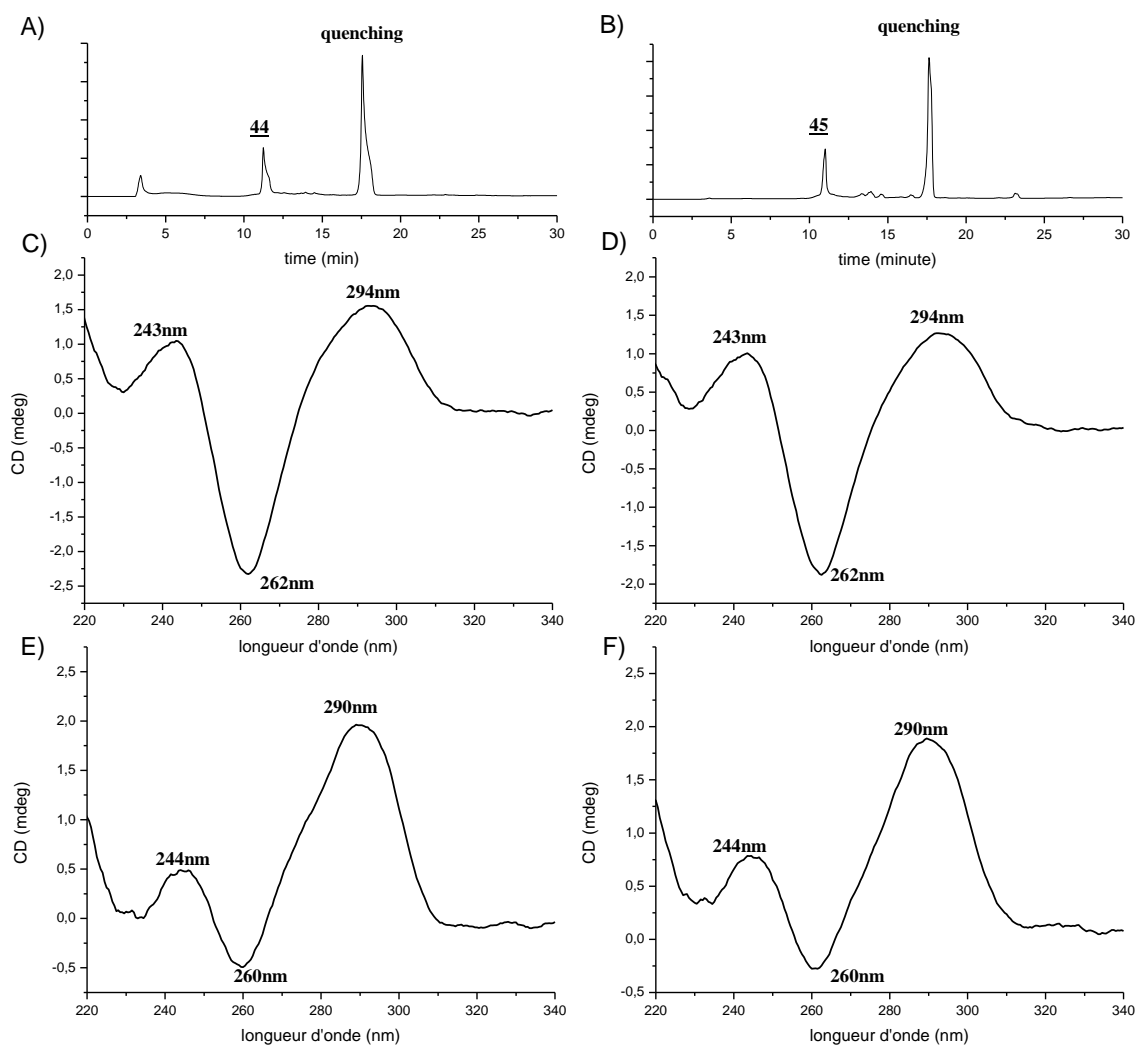


Figure 111 Chromatogrammes RP-HPLC des produits **47** (A) et **48** (B.) Spectres CD dans un tampon Tris 10mM avec 100mM NaCl (**47** :C et **48** :D) ou 100mM KCl (**47** :E ou **48** :F) après quenching par la décycne

Afin de s'assurer des structures adoptées par les produits synthétisés, des spectres par dichroïsme circulaire ont été également effectués (Figure 111). Cette fois-ci, en présence de KCl, les spectres présentent des propriétés de G-quadruplexe antiparallèle (maxima à 290nm et 244nm et minimum à 260nm) quand auparavant (intermédiaires précédents **45** et **46**), ils présentaient une signature de G-quadruplexe parallèle (maximum à 264nm et minimum à 241nm). Ceci peut être interprété comme une preuve de la présence de boucles uniquement latérales. En effet, si une boucle externe était présente, alors le spectre présenterait des signaux caractéristiques de G-quadruplexe parallèle (rappelons qu'une boucle externe ne peut se former qu'entre deux brins parallèles). Il faut remarquer que le fait de prolonger l'étape de « quenching » (sur une nuit) ne change pas l'allure des spectres obtenus.

IV.2. Synthèse d'édifices simplement couplés par lien triazole

Des travaux préliminaires ont été envisagés par la stratégie 2 en utilisant les gabarits peptidiques protégés **39** et **40**. Ceci a été effectué dans le but de mieux comprendre l'influence que pouvait avoir un monométhoxytrityle sur la stabilité des gabarits. Ainsi seule la première étape de CuAAC dans les conditions classiques a été mise en place. Dans le but d'obtenir de meilleur rendement, un excès de l'oligonucléotide fonctionnalisé en 5' et en 3' **43** (4Eq) a été ajouté sur les gabarits peptidiques **39** et **40**. Les produits **49** et **50** ont été obtenus avec des rendements de 42% et 32% et ont pu être caractérisés par spectrométrie de masse. Une étude préliminaire par dichroïsme circulaire sur ces composés a également pu être effectuée (Schéma 16).

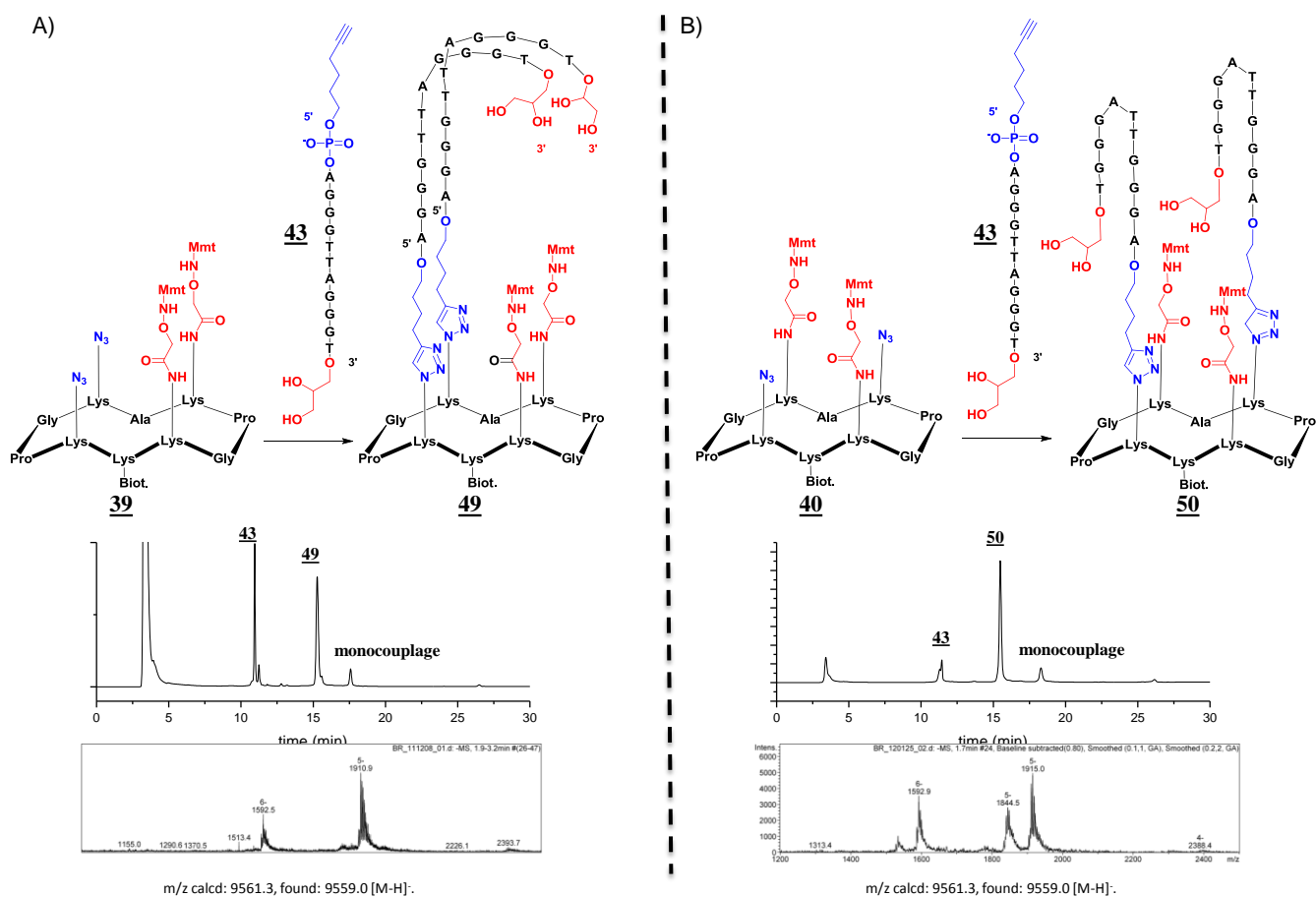


Schéma 16 Synthèse, chromatogramme RP-HPLC puis caractérisation ESI-MS des intermédiaires **49** (A) et **50** (B).

IV.3. Caractérisation des édifices à boucles par dichroïsme circulaire

Les études par dichroïsme circulaire ont été effectuées sur les intermédiaires présentant les oligonucléotides reliés uniquement en 3' - par la ligation oxime (composés **45** et **46**) ou en 5' par le lien triazole (composés **49** et **50**) puis sur les édifices finaux (composés **47** et **48**). Chacune des mesures a été effectuée dans un tampon Tris 10mM en présence de 100mM KCl ou 100mM NaCl à pH7,4.

3a. Etudes CD des intermédiaires **45** et **46** obtenus par la stratégie 1

Les spectres obtenus pour les différents intermédiaires (Figure 112) indiquent que les composés **45** et **46** adoptent une topologie parallèle en présence de potassium avec un maximum à 264nm pour chacune des deux molécules et un minimum proche de 240nm (242nm pour le composé **45** et 241nm pour le composé **46**). A l'inverse les structures adoptent des topologies antiparallèles en présence de sodium. Les spectres CD des deux intermédiaires présentent deux maxima à 294nm et à 242nm et un minimum à 262nm. Ces spectres obtenus sont en adéquation avec ce qui est rapporté dans la littérature²⁰⁴. Ainsi il est rapporté que la séquence 5'-TAGGGTTAGGGT-3' caractérisée par RMN, adopte une topologie antiparallèle en présence de NaCl et parallèle en présence de KCl. Il est intéressant de noter que la présence du gabarit ne semble pas contraindre le G-quadruplexe dans une topologie plutôt qu'une autre et que les structures adoptées dépendent du cation présent au sein du G-quadruplexe. Des études de dénaturation ont également été effectuées sur les molécules. Les composés **45** et **46** possèdent ainsi un T_m de 72°C ou 73°C en présence de potassium et un T_m de 54°C ou de 52°C en présence de sodium.

204 Phan, A. T.; Patel, D. J., Two-Repeat Human Telomeric d(TAGGGTTAGGGT) Sequence Forms Interconverting Parallel and Antiparallel G-Quadruplexes in Solution: Distinct Topologies, Thermodynamic Properties, and Folding/Unfolding Kinetics. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (49), 15021-15027.

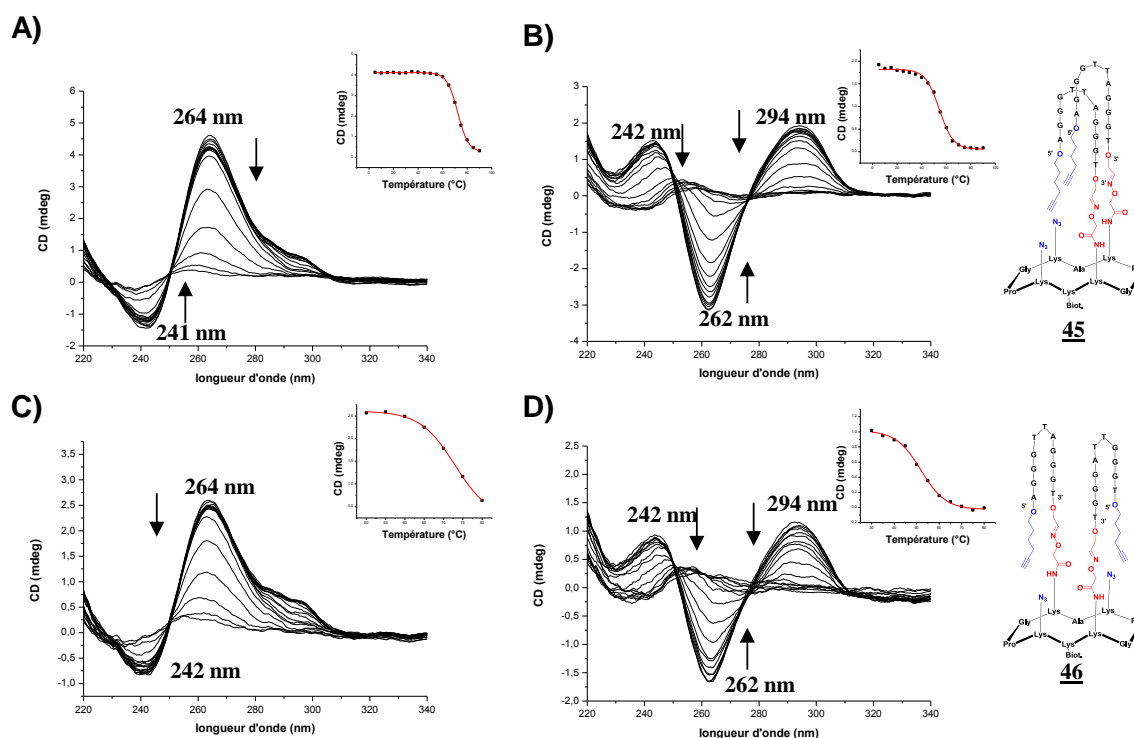


Figure 112 Spectres CD de dénaturation dans Tris 10mM pH 7,4 ou des intermédiaires **45** (A : 100mM KCl et B : 100mM NaCl) et **46** (C : 100mM KCl et D : 100mM NaCl). La courbe de dénaturation représentée est suivie sur la longueur d'onde maximum des spectres

3b. Etudes CD sur les intermédiaires **49** et **50** obtenus par la stratégie 2

Les intermédiaires **49** et **50**, possédant des oligonucléotides reliés sur gabarit uniquement par les liens triazoles ont également été étudiés par cette technique (Figure 113). Les spectres obtenus sont montrés ci-dessous et de nouveau ont une topologie parallèle en présence de potassium (maximum à 264nm et minimum à 242nm ou 241nm pour les mimes diagonal **50** et latéral **49** respectivement) et une topologie antiparallèle en présence de sodium (deux maxima à 294nm et 242nm et un minimum à 263nm pour les deux structures). Des études de dénaturation ont également été effectuées afin d'observer si la structure était plus stabilisée par rapport à l'intermédiaire relié uniquement par ses fonctions oxyamines. Toutefois contrairement aux structures sans boucles, la présence du monométhoxytrityle n'apporte aucune stabilisation. Les T_m sont similaires avec des valeurs proches de 53°C en présence sodium et de 72°C en présence de potassium.

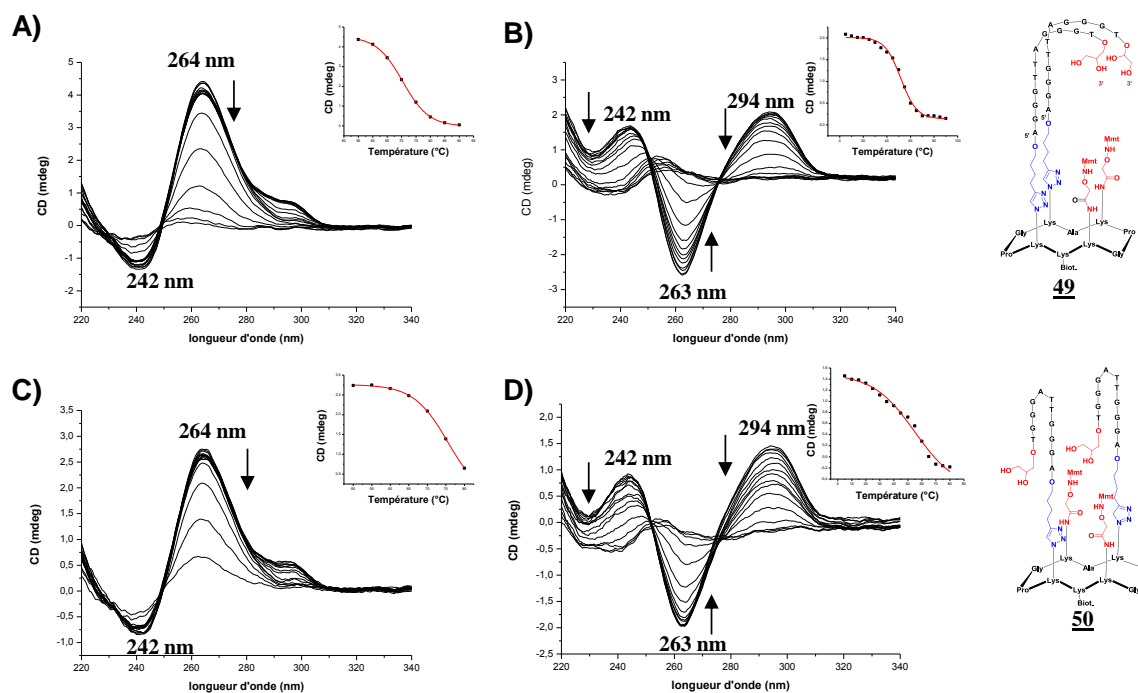


Figure 113 Spectres CD de dénaturation dans Tris 10mM pH7,4 ou des intermédiaires **49** (A : 100mM KCl et B : 100mM NaCl) et **50** (C : 100mM KCl et D : 100mM NaCl). La courbe de dénaturation représentée est suivie sur la longueur d'onde maximum des spectres

3c. Etude sur les G-quadruplexes finaux présentant des boucles **47** et **48**.

La caractérisation des composés **47** et **48** a été effectuée comme lors des études précédentes en comparant les topologies adoptées avec du potassium ou du sodium (Figure 114). Les résultats obtenus pour les édifices « diagonal » et « latéral » en présence de Na^+ indiquent que les édifices formés ont les mêmes caractéristiques de G-quadruplexe antiparallèle que les intermédiaires **45** et **46**. On retrouve ainsi sur les spectres CD deux maxima à 294nm et 243nm et un minimum à 262nm. Le fait de contraindre l'édifice ne change pas la signature CD du G-quadruplexe. Par contre, en présence d'ion K^+ , les spectres CD indiquent que la topologie de la structure est différente de celle des intermédiaires précédemment étudiés. Ainsi ces derniers possèdent deux maxima 290nm et 244nm et un minimum à 260nm, caractéristiques de la formation d'un édifice antiparallèle. Les différences de maxima et de minima entre les spectres CD obtenus avec des cations différents (Na^+ ou K^+) sont vraisemblablement dues à une hélicité différente de la molécule.

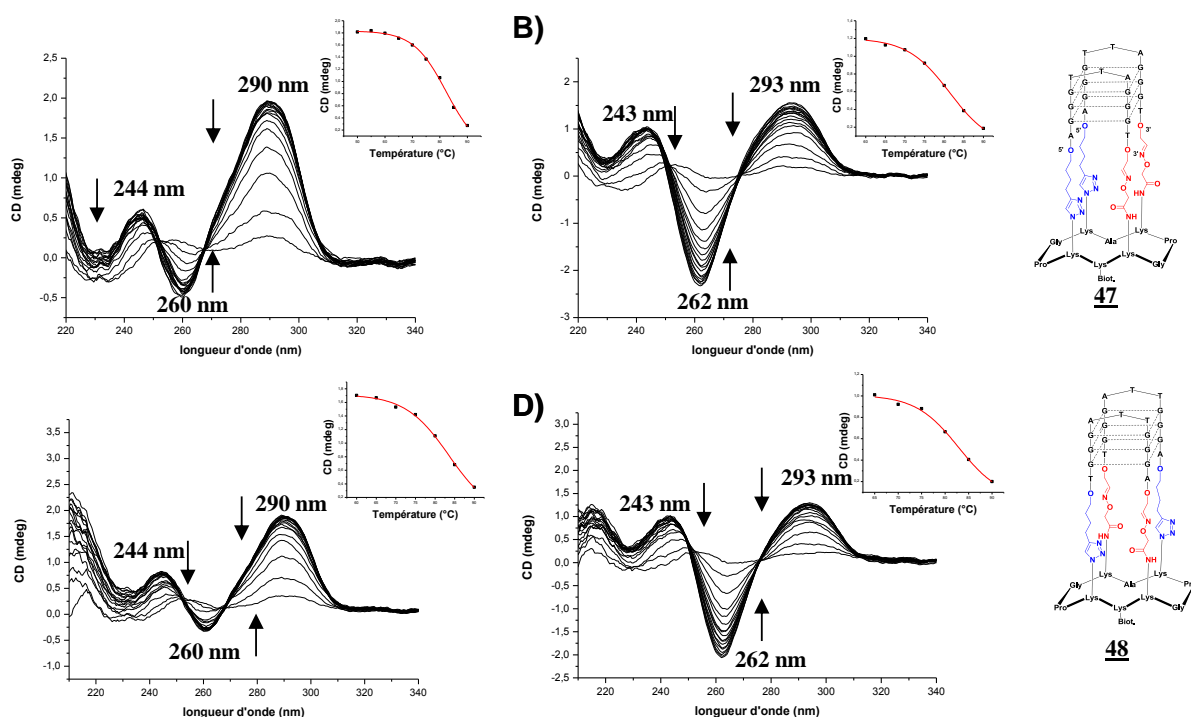


Figure 114 Spectres CD de dénaturation dans Tris 10mM pH7,4 ou des intermédiaires **47** (A : 100mM KCl et B : 100mM NaCl) et **48** (C : 100mM KCl et D : 100mM NaCl). La courbe de dénaturation représentée est suivie sur la longueur d'onde maximum des spectres

Les T_m mesurés lors des études de dénaturation des édifices **47** et **48** sont bien supérieurs à ceux obtenus avec les intermédiaires. Ainsi quel que soit le cation présent, on retrouve des valeurs de T_m proches de 82°C. Ceci correspond à un gain de stabilité de près de 30°C en présence de Na^+ et de 10°C avec K^+ par rapport aux intermédiaires **45** et **46**. Il est également intéressant de constater que ces T_m ne semblent plus dépendants du cation présent en solution contrairement aux études précédentes. Cependant les T_m se situent au niveau des températures limites mesurables (température élevées) et les valeurs obtenues peuvent manquer de précision.

3d. Etude des constantes thermodynamiques des édifices

Les constantes thermodynamiques qui régissent la formation des structures ont pu être obtenues à partir des courbes de dénaturation. En effet, nous pouvons considérer que la formation des édifices résulte de phénomènes intramoléculaires quelle que soit la molécule étudiée. Le modèle de Van't Hoff présenté peut donc être utilisé (Tableau 8).

Molécule	sel	T_m (°C)	ΔH° (kcal.mol ⁻¹)	ΔS° (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	ΔG° (kcal.mol ⁻¹)
Intermédiaire 45	KCl	73	-46	-131	-6,6
	NaCl	52	-35	-108	-2,8
Intermédiaire 46	KCl	72	-45	-130	-6,3
	NaCl	54	-35	-106	-3,0
Intermédiaire 49	KCl	71	-59	-172	-7,9
	NaCl	52	-17	-52	-1,6
Intermédiaire 50	KCl	74	-58	-167	-8,3
	NaCl	54	-17	-52	-1,1
Molécule finale 47	KCl	83	-48	-135	-7,8
	NaCl	82	-48	-136	-7,7
Molécule finale 48	KCl	83	-38	-108	-5,9
	NaCl	81	-45	-126	-7,0

Tableau 8 Données thermodynamique des édifices à boucles.

Plusieurs conclusions peuvent être déduites de ces résultats. La comparaison des constantes thermodynamiques des différents intermédiaires (composés **45**, **46**, **49** et **50**) selon le sel en présence semble indiquer que la formation est plus favorisée au niveau enthalpique en présence de potassium plutôt que de sodium. A l'inverse c'est en présence de Na⁺ que la formation de la structure est le moins défavorisée par phénomène entropique. Ceci est vraisemblablement dû à un plus grand degré de liberté de la structure en présence de sodium. De même si les températures de dénaturation sont similaires entre les édifices, quelques variations sont à observer entre ces intermédiaires reliés uniquement par un lien triazole (**49** et **50**) et ceux reliés par le lien éther d'oxime (**45** et **46**). Ainsi les premiers semblent légèrement favorisés par enthalpie et défavorisés par entropie par rapport aux seconds. Il est possible que la présence du groupement monométhoxytrityle soit à l'origine de ces différences.

Les composés **47** et **48**, dont les oligonucléotides sont reliés en 5' et en 3' sur le gabarit, possèdent les mêmes constantes thermodynamiques quel que soit le cation présent en solution. Ceci pourrait confirmer l'hypothèse selon laquelle la formation de l'édifice est régie par d'autres

phénomènes. Auparavant c'est sous l'influence du cation au sein de la tétrade que la structure adoptait une topologie tandis que dans ce cas-ci les contraintes sont imposées par le gabarit.

IV.4. Bilan intermédiaire

Les deux réactions chimiosélectives utilisées semblent permettre de former les édifices attendus toutefois des conditions optimales de couplages pour la seconde étape sont encore à trouver. Les spectres CD indiquent cependant que les structures obtenues adoptent les topologies attendues. Il en est donc possible de contraindre les G-quadruplexes, *via* l'utilisation du gabarit, à adopter une topologie de boucle. Des études complémentaires par d'autres moyens de caractérisation des G-quadruplexes sont toutefois nécessaires pour confirmer les résultats obtenus par CD. La spectrométrie UV (en particulier les analyses par « thermal difference spectra ») peut permettre d'obtenir rapidement des résultats. D'autres techniques, nécessitant plus de produit, comme la RMN ou la cristallographie peuvent être envisagées, toutefois, ceci ne peut se faire qu'avec le « mime latéral » car avec celui-ci, contrairement à son homologue « diagonal », une seule molécule est obtenue.

V. *Bilan*

Les travaux décrits lors de ce chapitre ont montré que le gabarit peptidique permettait de contraindre des ODNs à adopter des structures de quadruplexes. Ceci a pu se faire par l'utilisation conjointe de deux réactions chimiosélectives, à savoir la ligation oxime pour relier les oligonucléotides par leur extrémité 3' et la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par le Cu^{I} (CuAAC) pour les relier en 5'.

La preuve de ce concept a été apportée dans un premier temps par l'obtention du mime de i-motif **5**. Ce dernier a pu être obtenu par deux voies de synthèse différentes en faisant alterner l'ordre d'assemblage de l'édifice. La présence du gabarit a ainsi non seulement permis de former la structure mais également de la stabiliser dans une gamme de pH plus élevée laissant suggérer l'éventuelle présence d'effet similaire à celui « d'éponge à proton ». Des études plus approfondies sont nécessaires pour arriver à mieux comprendre les phénomènes qui régissent la formation de l'édifice.

Dans le cas des G-quadruplexes, deux éléments importants sont à noter. Tout d'abord l'utilisation du châssis permet de former des édifices antiparallèles de G-quadruplexes. Ceci a pu être illustré à travers l'obtention du « mime latéral » **21**. Il est important de noter que, si la chimie utilisée pour la formation de ces édifices semble simple et efficace, de nombreuses difficultés sont rencontrées lors de la purification et de la caractérisation des édifices. Des efforts sont encore nécessaires dans ces domaines. La synthèse de ce mime a également permis d'adapter la chimie des peptides pour la formation de conjugués possédant des oligonucléotides *via* la synthèse du « linker » oxyamine **36**. Le second élément important lors de ce travail est la possibilité de contraindre également l'édifice à adopter une topologie de boucle attendue. Ceci a pu être illustré à travers les exemples des boucles latérales en formant des édifices **47** et **48**. La synthèse de ces mimes a été facilitée grâce à l'utilisation d'un « quenching » qui a facilité la purification. Chacun des deux mimes obtenus présente également une meilleure stabilisation que les édifices libres.

VI. Article illustrant la synthèse du mime de *i*-motif 5

ChemComm

View Online / Journal Homepage / Table of Contents for this issue

Dynamic Article Links Cite this: *Chem. Commun.*, 2012, 48, 5992–5994

www.rsc.org/chemcomm

COMMUNICATION

Click–click chemistry on a peptidic sca old for easy access to tetrameric DNA structuresw

Romaric Bonnet, Pierre Murat, Nicolas Spinelli and Eric DeFranco*

Received 19th March 2012, Accepted 23rd April 2012

DOI: 10.1039/c2cc32010j

The use of a peptidic template and orthogonal oxime ligation and CuAAC reaction allows a stepwise approach for the design of antiparallel tetrameric DNA structure. As a proof of concept template assisted synthesis of *i*-motif DNA was achieved. As anticipated, a dramatic improvement in the stability of such a tetrameric structure was observed. More interestingly the formation of the *i*-motif was still observed at neutral pH, which could be attributed to the spatial proximity of the basic centers.

In 1953, Watson and Crick proposed the structure for DNA, in which two strands are held together in an anti-parallel double helix through canonical A/T and G/C base pairing.¹ However, DNA is not limited to the double helix form and can adopt a wide variety of topologies (hairpin, triplex, cruciform, tetraplex, etc.). In particular, C- and G-rich sequences are able to form tetrameric DNA architectures. During the last decade, G-quadruplex DNA comprising a four-stranded structure of stacked tetrads formed by the coplanar arrangement of four guanines held together by Hoogsteen bonds attracted increasing interest as sequences with the potential to form G-quadruplex structures have been reported throughout the genome, both at the chromosomal extremities (i.e. the telomeres) and the intra-chromosomal regions (e.g. oncogenic promoters).² The formation of quadruplex structures is hypothesized to have consequences at the cellular level, and such structures have been invoked in the control of the expression of certain genes involved in carcinogenesis ("c-Myc", "c-Kit", "K-ras", etc.) as well as in the perturbation of telomeric organization. G-quadruplexes exhibit extensive structural polymorphism, classified according to the strand orientation (i.e. parallel, antiparallel or hybrid forms).³ The existence of multiple conformations in equilibrium in solution emphasizes the need for easy access to individual conformations. Such a constraint would facilitate meaningful structure elucidation and ligand interaction studies.

In this context our group along with others have proposed the use of sca olds for designing the folded DNA structures.⁴ Our strategy is based on the use of a cyclic peptidic sca old as a topological template for directing the intramolecular assembly

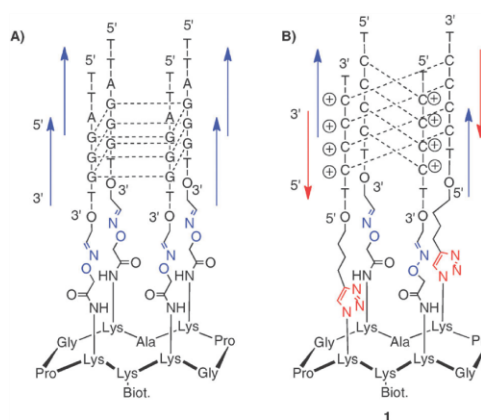
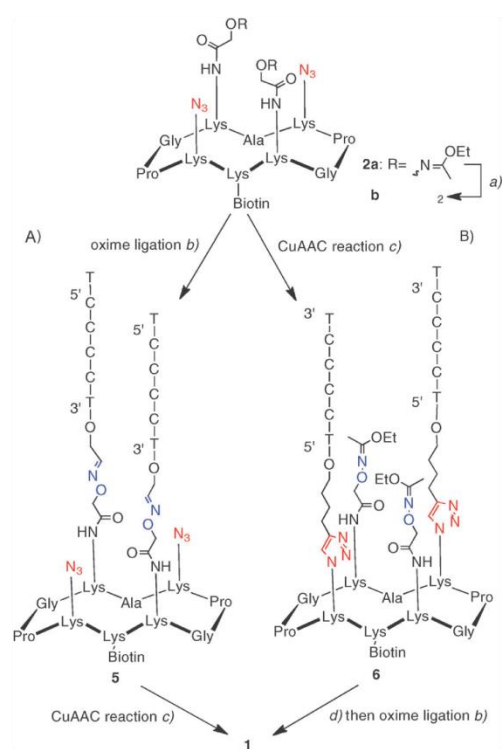


Fig. 1 Use of the peptidic sca old for (A) parallel-stranded tetrameric DNA conformation, and (B) antiparallel-stranded tetrameric DNA conformation.

of anchored oligonucleotides (ODNs) into a single G-quadruplex topology (Fig. 1A). It has been conclusively shown that the peptidic sca old allows for precise assembly of parallel-stranded conformation and provides increased stability to quadruplex structure. We were thus interested to expand the scope of this approach to anti-parallel tetrameric DNA. However, the preparation of such anti-parallel structure requires the attachment of two pairs of oligonucleotides through their 3' and 5' extremities, respectively. To achieve this aim, two successive coupling reactions between the peptidic sca old and the oligonucleotides were required. Therefore to construct these well-defined biomolecular assemblies, efficient and chemoselective ligations were optimised.

Herein we report on the use of orthogonal oxime bond formation and copper(I)-mediated cyclo-addition (CuAAC) in a stepwise approach for the synthesis of *i*-motif anti-parallel tetrameric DNA structure 1 as a proof of concept (Fig. 1B). C-rich sequences can form tetrameric structure called an *i*-motif in which two anti-parallel duplexes held together by hemiprotonated C-C+ base pairs are intercalated with each other.⁵ This DNA structure has been less studied and its biological function has not yet been clearly established although C-rich sequences are present throughout the genome and in particular in oncogenes.⁶ The compatibility of the two

Département de Chimie Moléculaire UMR CNRS 5250,
Université Joseph Fourier BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France.
E-mail: eric.defranco@ujf-grenoble.fr
wElectronic supplementary information (ESI) available. See DOI:
10.1039/c2cc32010j



Scheme 1 Synthesis of i-motif structure 1. (A) Oxime ligation first performed followed by CuAAC reaction and, (B) CuAAC reaction first performed followed by oxime ligation. (a) TFA/DCM/H₂O/TIS (50/45/2.5/2.5), (b) 0.4 M NH₄OAc buffer, 3, 55 °C, (c) 0.1 M HEPES buffer, 4, CuSO₄, THPTA, Na ascorbate, (d) 10% aq. TFA.

chemical ligations for conjugation has been recently demonstrated.⁷ Access to aldehyde containing ODN is easier compared to aminoxy containing ODN.⁸ Therefore for oxime bond formation, aldehyde containing ODN was preferred for the coupling reaction while aminoxy moieties were grafted on the peptidic scaffold. For the CuAAC reaction, the alkyne moiety was introduced onto the ODN and the complementary azido group onto the peptidic scaffold. This strategy was also chosen due to easier access to alkyne containing ODN.

The preparation of derivative 1 thus involves the synthesis of cyclodecapeptide 2a bearing four lysines on the upper face, two of them being functionalized on their side chains by a protected aminoxy moiety and two by an azido group (Scheme 1). A biotin residue was also introduced on the opposite face for further attachment to a streptavidin-coated support. Peptide 2a was prepared by using standard Fmoc/tBu solid-phase peptide synthesis (SPPS) on an acid-labile Sasrin⁵ resin and by head to tail cyclization in solution, adapted from the previously described procedures (see the ESI[†]).⁹ The azido moiety was introduced during SPPS using an azido-modified lysine building-block, which was obtained from N-Fmoc lysine through a diazo-transfer reaction.¹⁰ The azido group was found to be stable during SPPS. After deprotection of the side chain of the two lysine residues under acidic conditions, the aminoxy groups were introduced using NHS ester of 2-(1-ethoxyethylideneaminoxy)acetic acid.¹¹

ODN d(5'⁰TCCCCTX3'⁰) 3 (in which X represents the 3'-aldehyde linker) was synthesized as previously reported⁸ and ODN d(5'⁰YTCCCCT3'⁰) 4 (in which Y represents the 5'-hexynyl linker) was synthesized using standard conditions and commercially available alkyne phosphoramidite. Starting from the peptidic scaffold, two strategies (A) and (B) could be envisioned: oxime ligation could be first performed followed by CuAAC reaction or vice-versa.

For strategy (A), acidic deprotection of the aminoxy moieties was first performed providing intermediate 2b. The oxime coupling reaction was next carried out in an ammonium acetate buffer (pH 4.5) at 55 °C and in a slight excess of the aldehyde containing oligonucleotide 3. The reaction was monitored by RP-HPLC and proceeded to completion in 2 hours to yield intermediate 5 as the major product (see the ESI[†] for HPLC profiles). Subsequent CuAAC reaction was achieved using ODN 4 in the presence of CuSO₄, THPTA and sodium ascorbate in HEPES buffer (pH 7.4) at room temperature for 2 hours. EDTA was then added to trap copper ions and the crude mixture was pre-purified by size exclusion chromatography (SEC). Final purification was performed by anion exchange chromatography as it was noted that RP-HPLC was unsuitable and 1 was obtained with satisfactory yields (50%).

The reverse strategy (i.e. CuAAC reaction followed by oxime ligation) was also performed. In this case the protecting group had to be kept on the aminoxy moiety to preclude side reactions during the CuAAC reaction step. This latter step was carried out under the same conditions as above and intermediate 6 was purified by RP-HPLC. The protecting acetimide groups on aminoxy moieties were then removed under acidic conditions and the crude mixture was used for the subsequent step without further purification. The same protocol was applied for the oxime ligation (vide supra) and the final product 1 was purified by anion exchange chromatography.

Both strategies A and B gave nearly same yields (25% starting from 2). However way A is preferred due to the fact that for way B the acidic treatment for the cleavage of the protecting group of oxyamino moieties (step d in Scheme 1) is performed after the first incorporation of ODNs (via the Huisgen reaction). This might lead to some degradation (especially for guanine containing ODNs).

The different oligonucleotide conjugates 1, 5 and 6 were characterized by ESI-MS or MALDI-ToF MS analysis that showed excellent agreement between the experimentally determined molecular weight and the calculated value (see the ESI[†]).

The propensity of 1 to form an i-motif structure was further investigated by CD and NMR. Previous studies have shown that i-motif DNA can be associated with a specific CD signature.¹² CD studies were performed at different pH values as it is known that the formation of the i-motif is favored at acidic pH.¹³ CD spectra of biomolecular assembly 1 displayed a positive peak at 286 nm and a negative peak at 262 nm, characteristic of the formation of i-motif topology. For comparison, CD spectra of the i-motif formed by the intermolecular association of four strands of sequence d(5'⁰TCCCCT3'⁰) 7 were also recorded and showed similar peaks (Fig. 2A displays the CD spectra at pH = 4). By varying the pH from 4 to 8 the shape of the signal changed with the appearance of a positive peak around 270 nm which could be attributed to the "unstructured" ODN motif (see Fig. S34 in the ESI[†]).¹⁴ Interestingly, the

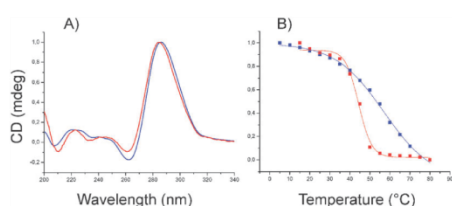
[View Online](#)

Fig. 2 (A) CD spectra of biomolecular assembly 1 (blue line) and intermolecular i-motif using 7 (red line) at pH 4; (B) melting temperature (T_m) measurements of 1 (blue line) and intermolecular i-motif using 7 (red line) at pH 4.

antiparallel-stranded i-motif structure 1 was still observed at pH 6 whereas the intermolecular i-motif (from 7) is observed only at pH 4 and 5.

The thermal stability of i-motif conformation was evaluated by CD denaturation studies. The samples were incubated at each temperature to achieve equilibrium before recording the CD signal. As anticipated, a dramatic stabilisation was observed for 1 in comparison with the intermolecular i-motif (Fig. 2B, see also Table 1 and Fig. S26–S33 in the ESI \dagger). In fact, a melting temperature (T_m) of 57 $^{\circ}\text{C}$ was measured at pH 4 for templated system 1 whereas the intermolecular i-motif (d(5 $^{\prime}$ TCCCCT3 $^{\prime}$) $\ddot{\text{A}}$ 4) showed a T_m of 44 $^{\circ}\text{C}$ under the same conditions. The use of the sca old thus significantly improves the thermal stability of the antiparallel structure by maintaining the four oligonucleotides bounded together. Preliminary NMR studies were performed in water solution and the presence of imino protons of around 15 ppm unambiguously confirmed the formation of i-motif (see the ESI \dagger).

In conclusion, we demonstrated that the use of orthogonal oxime bond formation and CuAAC reaction for the stepwise attachment of ODNs with different strand orientation on a peptidic template allows the formation of very stable antiparallel tetrameric structure. As a proof of concept i-motif DNA conformation 1 has been prepared and an enhancement of the stability was observed. Very interestingly, i-motif structure was still observed even at neutral pH. This could be attributed to the spatial interaction of the basic centers (i.e. nitrogens at position N3 of the cytidine nucleobases), which are in close proximity due to the sca old.¹⁵ The observation of i-motif for 1 not only at acidic pH but also at neutral pH is particularly relevant in the biological context. In fact, due to the acidic conditions required for the formation of i-motif, its existence in biological media is still under debate. However recent studies reported that i-motif structure can be formed even at neutral pH due to molecular crowding, conditions which are similar to the intracellular environment.¹⁶ The present preliminary results should also corroborate the formation of i-motif in the biological context and further studies are in progress for a better comprehension of this phenomenon. Furthermore biomolecular system 1 can be anchored on surfaces for SPR studies via the

biotin residue on the lower face of the peptidic sca old. This technique in conjunction with the use of 1 should permit the analysis of molecular interactions of various i-motif ligands. The possibility of extending the use of this method to the formation of other antiparallel DNA conformations, in particular antiparallel G-quadruplex, is under investigation.

The authors thank the "Région Rhône-Alpes" for financial support and NanoBio program for the facilities of the Synthesis platform. F. Morvan and A. Meyer from University of Montpellier are also acknowledged for MALDI analysis.

Notes and references

- J. D. Watson and F. H. Crick, *Nature*, 1953, 171(4356), 737–738.
- (a) S. Balasubramanian, L. H. Hurley and S. Neidle, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2011, 10, 261–275; (b) S. L. B. König, A. C. Evans and J. L. Huppert, *Biomol. Concepts*, 2010, 1, 197–213.
- J. L. Huppert, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37, 1375–1384.
- (a) P. Murat, D. Cressend, N. Spinelli, A. Van der Heyden, P. Labbé, P. Dumy and E. Defranco, *ChemBioChem*, 2008, 9, 2588–2591; (b) P. Murat, R. Bonnet, A. Van der Heyden, N. Spinelli, P. Labbé, D. Monchaud, M.-P. Taulade-Fichou, P. Dumy and E. Defranco, *Chem.–Eur. J.*, 2010, 16, 6106–6114; (c) P. Murat, B. Gennaro, J. Garcia, N. Spinelli, P. Dumy and E. Defranco, *Chem.–Eur. J.*, 2011, 50, 5791–5795; (d) M. Nikan and J. C. Sherman, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, 47, 4900–4902; (e) M. Nikan and J. C. Sherman, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 5211–5218; (f) G. Oliviero, J. Amato, N. Borbone, A. Galeone, L. Petraccone, M. Varra, G. Piccialli and L. Mayol, *Bioconjugate Chem.*, 2006, 17, 889–898; (g) F. W. Kotch, V. Sidorov, Y. F. Lam, K. J. Kayser, H. Li, M. S. Kaucher and J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 15140–15150.
- K. Gehring, J.-L. Leroy and M. Gueron, *Nature*, 1993, 363, 561–565.
- T. A. Brooks, S. Kendrick and L. Hurley, *FEBS J.*, 2010, 277, 3459–3469.
- (a) A. Meyer, N. Spinelli, P. Dumy, J.-J. Vasseur, F. Morvan and E. Defranco, *J. Org. Chem.*, 2010, 75, 3927–3930; (b) M. Karskela, M. Heikero, P. Virta and H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.*, 2010, 21, 748–755.
- O. P. Edupuganti, Y. Singh, E. Defranco and P. Dumy, *Chem.–Eur. J.*, 2004, 10, 5988–5995.
- E. Garanger, D. Boturyn, O. Renaudet, E. Defranco and P. Dumy, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 2402–2410.
- E. D. Goddard-Borger and R. V. Stick, *Org. Lett.*, 2007, 9, 3797–3800.
- S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn and P. Dumy, *J. Org. Chem.*, 2008, 73, 983–991.
- J. Kypr, I. Kejnovska, D. Rencuk and M. Vorlickova, *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, 1713–1725.
- (a) D. Liu and S. Balasubramanian, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, 42, 5734–5736; (b) K. S. Jin, S. R. Shin, B. Ahn, Y. Rho, S. J. Kim and M. Ree, *J. Phys. Chem. B*, 2009, 113, 1852–1856.
- It should be noted that the exact quantification of i-motif versus unstructured ODNs is not possible due to the overlapping of both CD signals.
- See the following references for this spatial effect on basicity of amines: (a) H. A. Staab and T. Saupe, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1988, 27, 865–879; (b) R. W. Alder, *Chem. Rev.*, 1989, 89, 1215–1223.
- (a) J. Choi, S. Kim, T. Tachikawa, M. Fujitsuka and T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 16146–16153; (b) A. Rajendran, S. Nakano and N. Sugimoto, *Chem. Commun.*, 2010, 46, 1299–1301.

VII. Partie expérimentale

VII.1. Materials and equipment

Protected amino acids were obtained from Activotec (Cambridge, UK), Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), France Biochem SA (Meudon, France), Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) or Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences - VWR, Limonest, France). PyBOP[®] was purchased from Calbiochem-Novabiochem. Other reagents were obtained from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Acros (Noisy-le-Grand, France) and Eurogentec (Angers, France).

Electron spray ionization mass spectra (ESI-MS) were obtained on an Esquire 3000 (Bruker). The multiply charged data produced by the mass spectrometer on the m/z scale were converted to the molecular weight. MALDI ToF mass spectra were performed on Voyager DE mass spectrometer (Perceptive Biosystems) equipped with an N₂ laser (337 nm). Analyses were operated in THAP matrix in presence of ammonium citrate after a treatment with DOWEX 50 W X8 resin (ammonium form). Water was of Milli-Q quality and was obtained after filtration of distilled water through a Milli-Q[®] cartridge system. CH₃CN and TFA were HPLC quality. NMR spectra were recorded on BRUKER Advance 400 spectrometer. Chemical shifts were expressed in ppm and calculated taking the solvent peak as an internal reference.

VII.2. General procedure for peptide synthesis:

The course of reactions were monitored on RP-HPLC on a Nucleosil C18 column (300 Å, 125 x 3 mm, 5 µm) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm. A 1 mL/min flow linear gradient from 95% solvent A (0.1% TFA in water) and 5% solvent B (0.1 % TFA in acetonitrile/water: 9/1) to 100% B for 20 minutes was applied (Gradient I). RP-HPLC purifications were performed on a Nucleosil C18 column (300 Å, 250 x 21mm, 7 µm) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm using a 22 mL/min flow linear gradient from 95% solvent A and 5% solvent B to 100% solvent B for 30 min. In case of product **41**, **42**, **49** and **50** purification without trifluoroacetic acid another gradient was used from 95% water to 100% acetonitrile.

2a. Syntheses of linear protected peptides by SPPS

All peptides were synthesized using the Fmoc-tBu protocol using Fmoc-Gly-SASRIN[®] (loading of 0.8 mmol/g) in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass previously treated overnight with (CH₃)₂SiCl₂ as lubricant. The following protocol was used for each amino acid coupling: Fmoc protecting group was first removed using three washing (for 10, 5 and 5 min) with 20% piperidine in DMF (10 mL). The resin loading was monitored by quantification of free dibenzofulvene using UV absorbance at 299 nm. Each coupling reaction was operated using the classical protocol with amino acid (2 eq) in DMF (10mL) with PyBOP (2 eq) as activator. pH was adjusted to 8-9 with DIEA. The completion of the coupling reaction was analysed using TNBS test after washing the resin with DMF (2 x 10 mL) and dichloromethane (10 mL). Deprotections and coupling reactions were performed until obtaining the supported NH₂- free peptide. The resin was washed with a 1% TFA in dichloromethane solution (10 x 20 mL) for cleaving the peptide

from the resin. Each fraction was collected and neutralized with DIEA. The solution was evaporated under vacuum and the peptides were precipitated with ether to obtain a yellow powder.

2b. Procedure for cyclization reactions

Peptides were dissolved in DMF to reach a 10^{-3} M concentration and 1.5 eq of PyBOP was added. The pH was adjusted to 8-9 using DIEA and the solution was stirred at room temperature until the complete peptide cyclisation (RP-HPLC monitoring). The solvent was evaporated under vacuum then the crude peptides were precipitated with ether to obtain a yellow powder.

2c. General procedure for N- ϵ Boc lysine deprotection

Peptides were treated a TFA/DCM/H₂O/TIS (50/45/2.5/2.5, v/v/v/v) solution and stirred at room temperature (2h). The solvent was evaporated under vacuum and the crude peptides were precipitated with ether to obtain a yellow powder.

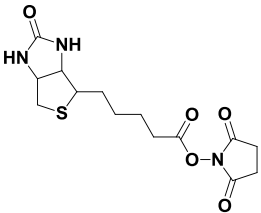
2d. General procedure for coupling protected aminoxy linker on peptidic scaffolds

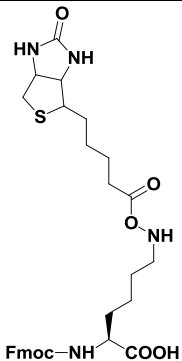
NH₂- ϵ -free peptides were dissolved in anhydrous DMF with 1.2Eq of aminoxy linker **9**, **10b**, **34** or **36**. pH was adjusted to 8-9 with DIEA. The solution was stirred at room temperature and monitored by RP-HPLC until the completion of the reaction (overnight). The solvent was evaporated and the peptide was precipitated with ether. The products were purified on RP-HPLC and freeze-dried to obtain a white powder.

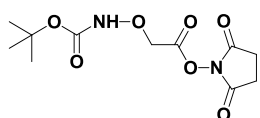
2e. General procedure oxyamine deprotection

Peptide was dissolved in a TFA/DCM/H₂O/TIS (50/45/2.5/2.5, v/v/v/v) solution (50 mL) and the reaction was stirred for one hour at room temperature. Each peptide was next precipitated with ether and finally, it was purified on RP-HPLC and freeze dried. Peptide was obtained as a white powder

2f. Experiment Procedure

Biotin succinimidyl ester <u>7</u>	
	<p>To a solution of biotin (5g, 20 mmol) in DMF (50mL) was added <i>N</i>-hydroxysuccinimide (2.6g 22 mmol) and DCC (4.68g 22 mmol). The solution is warmed until the complete dilution of product and the melange was stirred for 30h at room temperature. The mixture was filtrated using cellite in order to eliminate the DCU then the solvent was evaporated and the crude product is tritured in ether. After filtration the product was obtained as a white solid (7.30 g, 21 mmol, yield: 97%)</p>
ESI MS(+) m/z calcd: 342.4, found: 342.2 [M+H] ⁺ .	

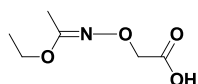
Fmoc-lysine-(biotin)-OH <u>8</u>	
	<p>To a solution of Fmoc-lysine-OH (2.28 g, 6.2 mmol) was added <u>7</u> (2.42 g, 7 mmol). The pH was adjusted to 8-9 using DIEA and the melange was stirred for 4h. The pH was reduced to 1 using a 2M Hydrochloric acid solution and the white precipitate is filtrated and washed with cooled water. The product was freeze-dried with ether and was obtained as a white solid (3.05 g, 5,1 mmol yield: 82%).</p>
ESI MS(+) m/z calcd: 595.7, found: 595.8 [M+H] ⁺ .	

N-hydroxysuccinimidyl *N*-Boc-aminoxyacetate **9**¹⁸⁵

To a stirred solution of *N*-Boc-aminoxyacetic acid (1g, 5.2mmol) in 100mL ethyl acetate/dioxane (1:1) cooled on an ice bath were added *N*-hydroxysuccinimide (662mg, 5.7mmol) and DCC (1.1 eq). The resulting mixture was stirred at RT for 5 h and was then filtered through a pad of celite, and the filtrate was concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate and washed with 5% aqueous NaHCO₃, water and brine. The organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated in vacuum. The crude solid was re-crystallized from CH₂Cl₂/Et₂O/pentane, thereby providing pure compound as a white solid (1.30g, 4.5mmol, yield: 87%).

ESI MS(+) *m/z* calcd: 288.1, found: 288.7 [M+H]⁺.

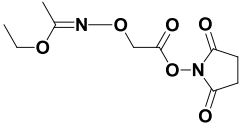
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.66 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 2.87 (s, 4H), 1.49 (s, 9H)

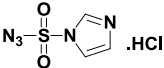
2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetic Acid **10a**¹⁸⁵

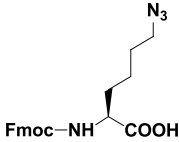
To a stirred solution of iodoacetic acid (9.00 g, 48.4 mmol) in water (19 mL) at 0 °C was added aqueous NaOH (3.0 mL, 40% w/w). The resulting solution was allowed to heat to room temperature, after ethyl *N*-hydroxyacetimidate (6.0 g, 58.3 mmol) was added followed by aqueous NaOH (4.5 mL, 40% w/w) and water (19 mL) (pH of solution >12). After 4.5 h of stirring at 80°C and cooling to room temperature, water was added (70 mL) and the aqueous mixture was washed with DCM (3 x M hydrochloride solution). The acidified water phase was then extracted with EtOAc (4 x 50 mL) (NB: After each extraction the pH was adjusted to 2-3 with a 1 M hydrochloride solution), and the combined organic phases from this last extraction was washed with brine (50 mL), dried over MgSO₄, and concentrated in vacuum, providing compound as a colorless oil (5.69 g, 35.3 mmol, yield: 73%).

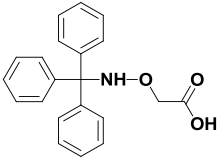
(ESI MS(+) *m/z* calcd: 161.2, found: 161.0 [M+H]⁺)

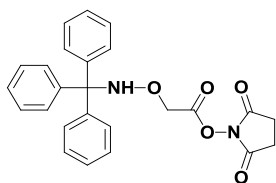
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.48 (2H, s), 4.00 (2H, q, J = 7.2 Hz), 2.01 (3H, s), 1.27 (3H, t, J = 7.2 Hz)

N-Hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate 10b ¹⁸⁵	
	<p>To a stirred solution of 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetic acid 10a (5.69 g, 35.3 mmol) and <i>N</i>-hydroxysuccinimide (4.06 g, 35.3 mmol) in ethyl acetate/ dioxane (120 mL, 1:1) at 0 °C was added DCC (7.28 g, 35.3 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred at room temperature for 5 h. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (300 mL), and the solution was washed with 5% aqueous NaHCO₃ (2 x75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic solution was dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum (8.69 g, 33.7 mmol) which affording 10b without further purification.</p>
<p>ESI MS(+) m/z calcd: 258,1, found: 258.3 [M+H]⁺</p> <p>¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.78 (2H, s), 4.01 (2H, q, J = 7.2 Hz), 2.84 (4H, s), 1.98 (3H, s), 1.28 (3H, t, J = 7.2 Hz)</p>	

imidazole-1-sulfonyl azoture 11 ¹⁸⁷	
	<p>5g of sodium azide (76mmol, 1eq) were dissolved in 80mL of MeCN. Then sulfonyl chloride (6.1mL, 76mmol, 1eq) were added dropwise and the solution was stirred for 16h at room temperature. Imidazole (9.8g, 144mmol, 1.9eq) was slowly added at 0°C and the reaction was stirred at room temperature. After 3h ethyl acetate (150mL) was added and the product was washed twice with water (150mL) then twice with saturated NaHCO₃ solution. The product was dried over MgSO₄ and filtrated. Hydrochloric acid in EtOH (8.1mL d'AcCl in 29mL of anhydrous ethanol) was added dropwise in the filtrate in order to obtain the crystallisation of the product firstly at room temperature then in ice-cooled bath. After filtration the product was washed with ethyl acetate (3x 40mL). The product was obtained as white crystals (9.38g, yield: 72%).</p>
<p>ESI MS(+) m/z calcd: 173.2, found: 173.9 [M+H]⁺.</p> <p>NMR ¹H (400 MHz, D₂O): δ (ppm): 9.53 (1 H, dd, J = 1.3, 1.6 Hz), 8.09 (1 H, dd, J = 1.6, 2.2 Hz), 7.68 (1H, dd, , J = 1.3, 2.2 Hz)</p>	

Fmoc-azidonorleucine 12 ¹⁸⁶	
	<p>Fmoc-Lys-OH.HCl (2.6g, 12.4mmol, 1.2eq) and ZnCl₂ (0.025g, 0.25mmol, catalytic) were dissolved in methanol (50mL) and water (50mL). pH 8 was adjusted using DIEA and imidazole-1-sulfuryl azoture 11 (2.6g, 12.44mmol, 1.2eq) was added. The white mixture was stirred for 16h at rt. pH was adjusted to pH 8 with DIEA and the reaction was followed by RP-HPLC. Methanol was then evaporated and the solution was adjusted to pH 1 using a 3M hydrochloric acid solution. The solution was extracted with ethyl acetate (4x75mL) and organic phases were washed with brine and dried by MgSO₄. The yellow oil obtained was freeze-dried until the formation of the Fmoc azidonorleucine as yellow solid. The yield was considered as quantitative.</p>
<p>ESI MS(+) m/z calcd: 395.2, found: 395.1 [M+H]⁺.</p> <p>¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.75 (2H, d, <i>J</i> = 7.4 Hz), 7.60 (2H, d, <i>J</i> = 7.4 Hz), 7.38 (2H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz), 7.29 (2H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz), 5.3 (1H, d), 4.2 (2H, d), 4.12 (1H, t, <i>J</i> = 6.9 Hz), 3.8 (1H, m), 3.2 (2H, t), 1.9-1.1 (6H, m)</p>	

<i>N</i> -Trityl-aminoxyacetic acid 33 ²⁰²	
	<p>A mixture of (aminoxy)acetic acid hemihydrochloride (1.64g, 15 nmol), triethylamine (4.20 mL, 30 mmol) and trityl chloride (5.00 g, 18 nmol) in pyridine (100 mL) was stirred at room temperature for 24h. EtOH (10mL) was added to the mixture and the whole was concentrated in vacuum. The residue was dissolved in AcOEt (200 mL) and washed with water (3 x 100 mL), brine and dried with Na₂SO₄. then the solvent was evaporated and the product was purified by silica gel chromatography (3% EtOH in CH₃Cl₃) to obtained 33 as a white powder (2.61 mg, 7.8 mmol, yield: 53%)</p>
<p>ESI MS(-) m/z calcd: 332.4, found: 332.1 [M-H]⁻.</p> <p>¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ (ppm): 7.65 (s, 1H, NH), 7.22-7.33 (m, 15H, Tr), 4.11 (s, 2H, CH₂)</p> <p>¹³C NMR (101 MHz, DMSO-<i>d</i>₆) δ (ppm): 172.1, 144.7, 129.2, 128.1, 127.2, 73.4, 71.1</p>	

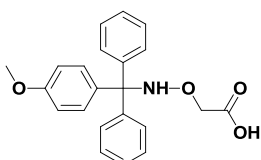
N-hydroxysuccinimidyl *N*-trityl-aminoxyacetate **34**

To a stirred solution of *N*-Trt-aminoxyacetic acid **33** (1 g, 30 mmol) in 50 mL ethyl acetate/dioxane (1:1) solution and cooled with an ice bath were added *N*-hydroxysuccinimide (382 mg, 3.3 mmol) and DCC (681 mg, 3.3 mmol). The resulting mixture was stirred at RT for 5 h and was then filtered through a pad of celite, and the filtrate was concentrated under vacuum. The residue was redissolved in ethyl acetate (50 mL) and washed with 5% aqueous NaHCO₃ (50 mL), water (50 mL) and brine (50 mL). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and evaporated in vacuum. The crude solid was re-crystallized from CH₂Cl₂/Et₂O/pentane, thereby providing pure compound as a white solid (1.09 g, 2.5 mmol, yield 76%)

ESI MS(+) *m/z* calcd: 431.5, found: 453.3 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.33-7.28(m, 15H, Tr), 4.55 (s, 2H, CH₂), 2.87 (s, 4H, CH₂)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 170.5, 168.0, 146.5, 129.3, 128.2, 127.3, 74.0, 71.3, 26.0

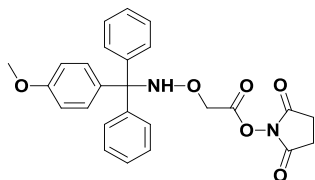
N-monomethoxytrityl-aminoxyacetic acid **35**

The same procedure than for molecule **33** was applied using monomethoxytrityl chloride (1.4g, 4.6 mmol) instead of trityl chloride using (aminoxy)acetic acid hemihydrochloride (0.5 g, 3.8 mmol) and triethylamine (1.1 mL, 7.9 mmol) in pyridine (50 mL). The product was obtained as a white powder. (578 mg, 1.59 mmol, yield 42%).

ESI MS(-) *m/z* calcd: 362.4, found: 362.0 [M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 7.34-7.22 (m, 12H, Mmt), 6.84-7.680 (m, 2H, Mmt), 4.23 (s, 2H, CH₂)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 173.0, 162.0, 144.2, 136.9, 130.4, 129.1, 127.3, 127.0, 113.4, 79.1, 71.5, 55.4

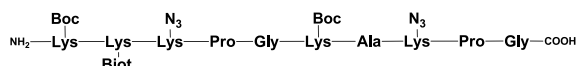
***N*-hydroxysuccinimidyl *N*-monomethoxytrityl-aminoxyacetate 36**

To a stirred solution of *N*-Mmt-aminoxyacetic acid (200 mg, 552 μmol) in 50 mL ethyl acetate/dioxane (1:1) and cooled with an ice bath were added *N*-hydroxysuccinimide (70 mg, 607 μmol) and DCC (125 mg, 607 μmol). The resulting mixture was stirred at RT for 5 h and was then filtered through a pad of celite, and the filtrate was concentrated under vacuum. The obtained residue was redissolved in ethyl acetate (50 mL) and washed with 5% aqueous NaHCO_3 (50 mL), water (50 mL) and brine (50 mL). The organic phase was dried over Na_2SO_4 and evaporated in vacuo. The crude solid was recrystallized from $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Et}_2\text{O}/\text{pentane}$, thereby providing pure compound as a white solid (208 μg , 454 μg , yield 82%).

ESI MS(+) m/z calcd: 461.5, found: 461.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 7.32-7.24 (m, 12H, Mmt), 6.90-6.84(m, 2H, Tr), 4.54 (s, 2H, CH_2), 2.83 (s, 4H, CH_2)

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ (ppm): 170.6, 166.5, 158.4, 144.6, 137.3, 130.5, 129.2, 128.1, 127.2, 113.5, 73.6, 69.1, 26.0

Linear peptide 13

The linear decapeptide was assembled using the general procedure 2.a and modified amino acid 12 and 8 using Fmoc-Gly SASRIN[®] (625 mg, 0.5 mmol). After precipitation in ether, the product was obtained as a yellow powder. The crude product was used without any further purification. The yield was considered as quantitative.

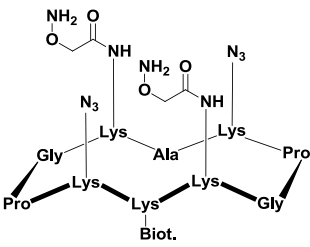
$t_r = 13.6$ min (Gradient I)

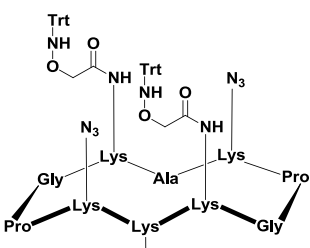
ESI MS(+) m/z calcd: 1517.8, found: 1517.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

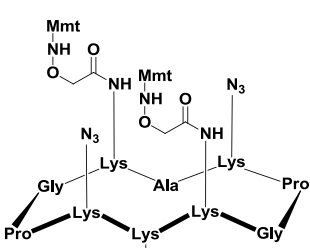
Cyclic peptide 14	
	<p>The cyclisation was carried out using the general method 2.b using peptide 13 (0.5 mmol, 760 mg). After precipitation the product was used without any further purification. The crude material was used without any further purification. The yield was considered as quantitative.</p>
<p>$t_r = 12.6$ min (Gradient I).</p> <p>ESI MS(+) m/z calcd: 1499.8, found: 1499.0 [M+H]⁺.</p>	

<i>NH</i> ₂ - ϵ -free cyclic peptide 15	
	<p>The deprotection was carried out using the general method 2.c using peptide 14 (0.5 mmol, 750 mg). After precipitation in ether the product was used without any further purification. The yield was considered as quantitative.</p>
<p>$t_r = 9.6$ min (Gradient I).</p> <p>ESI MS(+) m/z calcd: 1299.6, found: 1299.8 [M+H]⁺</p>	

<i>N</i> -1-Ethoxyethylidene aminoxy peptide 6b	
	<p>Functionalization of <i>NH</i>₂-ϵ-free peptide 15 (0.2 mmol, 260 mg) was performed the classical protocol 2.d using <i>N</i>-hydroxysuccinimidyl 2-(1-ethoxyethylideneaminoxy)acetate 10 (0.5 mmol, 130 mg). The product was purified by RP-HLPC to afford a white solid (82 mmol, 130 mg, yield: 41%).</p>
<p>$t_r = 13.3$ min (Gradient I).</p> <p>ESI MS(+) m/z calcd: 1585.9, found: 1586.1 [M+H]⁺</p>	

aminooxy peptide 6a	
	<p>The aminoxy peptide (12 μmol, 20 mg), was obtained using general deprotection conditions 2.e on the 1-ethoxyethylidene protected aminoxy peptide 6b. The peptide was purified on RP-HPLC and immediately freeze-dried to be obtained as a white powder (4.8 μmol, 8 mg, yield 39%).</p>
<p>$t_r = 9.4$ min (Gradient I).</p> <p>ESI MS(+) m/z calcd: 1445.7, found: 1445.9 [M+H]⁺.</p>	

N-trityl aminoxy peptide 38	
	<p>Functionalization of NH_2-ε-free peptide 15 (50 μmol, 65 mg) was performed the classical protocol 2.d using Tr-aminoxy-protected linker 34 (0.125 mmol, 54 mg). The product was purified on RP-HPLC using the protocol without trifluoroacetic acid in solvents and was freeze-dried to give a white solid (19.5 μmol, 37 mg, yield 39%).</p>
<p>$t_r = 19.4$ min (Gradient I).</p> <p>ESI MS(+) m/z calcd: 1929.8, found: 1929.9 [M+H]⁺.</p>	

N-Monomethoxytrityl-aminoxy peptide 40	
	<p>Functionalization of NH_2-ε-free peptide 15 (50 μmol, 65 mg) was performed the classical protocol 2.d using MMTr-aminoxy-protected linker 36 (0.125 mmol, 58 mg). The product was purified on RP-HPLC using the protocol without Trifluoroacetic acid in solvents and was freeze-dried to give a white solid (11.5 μmol, 22 mg, yield 23%).</p>
<p>$t_r = 18.2$ min (Gradient I).</p> <p>ESI MS(+) m/z calcd: 1990.4, found: 1990.5 [M+H]⁺.</p>	

Linear peptide 26	
	<p>The linear decapeptide was assembled using the general procedure 2.a and modified amino acid 8 and 12 using Fmoc-Gly SASRIN[®] (625 mg, 0.5 mmol). After precipitation in ether, the product was obtained as a yellow powder. The crude product was used without any further purification. The yield was considered as quantitative.</p>
<p>$t_r = 13.6$ min (Gradient I).</p> <p>ESI MS(+) m/z calcd: 1517.8, found: 1517.8 [M+H]⁺.</p>	

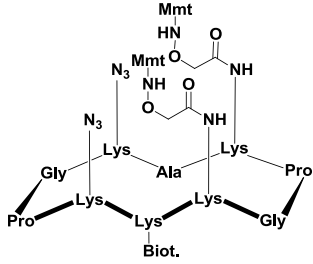
Cyclic peptide 27	
	<p>The cyclisation was carried out using the general method 2.b using peptide 26 (0.5 mmol, 760 mg). After precipitation the product was used without any further purification.. The yield was considered as quantitative.</p>
<p>$t_r = 12.6$ min (Gradient I).</p> <p>ESI MS(+) m/z calcd: 1499.8, found: 1499.0 [M+H]⁺.</p>	

<i>N</i> - ϵ -free cyclic peptide 28	
	<p>The deprotection was carried out using the general method 2.c using peptide 27 (0.5 mmol, 750 mg). After precipitation in ether the product was used without any further purification.</p>
<p>$t_r = 9.6$ min (Gradient I).</p> <p>ESI MS(+) m/z calcd: 1299.6, found: 1299.8 [M+H]⁺</p>	

<i>N</i> -Boc-aminoxy peptide 29	
	<p>Functionalization of NH_2-ϵ-free peptide 28 (0.2 mmol, 260 mg) was performed the classical protocol 2.d using boc-aminoxy-protected linker 9 (0.5 mmol, 144 mg). The yield was considered as quantitative.</p>
$t_r = 12.6$ min (Gradient I). ESI MS(+) m/z calcd: 1646.0, found: 1646.0 $[M+H]^+$.	

Aminoxy Peptide 30	
	<p>The aminoxy peptide 30 (12 μmol, 20 mg) was obtained using general deprotection conditions 2.e on the Boc protected aminoxy peptide 29. The peptide was purified on RP-HPLC and immediately freeze-dried to be obtained as a white powder (4.8 μmol, 7 mg, yield 40%).</p>
$t_r = 9.4$ min (Gradient I). ESI MS(+) m/z calcd: 1445.7, found: 1445.9 $[M+H]^+$.	

<i>N</i> -Trityl-aminoxy peptide 37	
	<p>Functionalization of NH_2-ϵ-free peptide 28 (0.05 mmol, 65 mg) was performed using the classical protocol 2.d using Trt-aminoxy-protected linker 34 (0.125 mmol, 54 mg). The product was purified on RP-HPLC using the protocol without trifluoroacetic acid in solvents and was freeze-dried to give a white solid (18 μmol, 34 mg, yield 36%).</p>
$t_r = 19.4$ min (Gradient I). ESI MS(+) m/z calcd: 1929.8, found: 1929.9 $[M+H]^+$.	

<i>N</i> -Trityl-aminoxy peptide 39	
	Functionalization of <i>NH</i> ₂ - ϵ -free peptide 28 (0.05 mmol, 65 mg) was performed using the classical protocol 2.d using Mmt-aminoxy-protected linker 36 (0.125 mmol, 58 mg). The product was purified on RP-HPLC using the protocol without trifluoroacetic acid in solvents and was freeze-dried to give a white solid (9.0 μ mol, 18 mg, yield 18%).
$t_r = 18.2$ min (Gradient I).	
ESI MS(+) <i>m/z</i> calcd: 1990.4, found: 1990.5 [M+H] ⁺ .	

VII.3. *General procedure for Oligonucleotides synthesis:*

Oligonucleotides were synthesized using β -cyanoethylphosphoramidite chemistry on a 3400DNA synthesizer at 1 μ mol scale.

RP-HPLC analysis were performed on a HPLC system using C18 Nucleosil column (Macherey-Nagel, 250 x 4.6 mm, 100 Å, 5 μ m) with 1 mL/min flow linear gradients of solvent A' (50 mM triethylammonium acetate buffer with 5% acetonitrile) and solvent B' (acetonitrile with 5% water) with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm. Two gradients were used depend on the product.

Gradient II starts from 100% solvent A' to 30% B' for 20 minutes.

Gradient III starts from 100% solvent A' to 100% B' for 30 minutes.

Oligonucleotides RP-HPLC purifications were performed on Nucleosil C-18 column (250 mm x 10 mm, 100 Å, 7 μ m) using 4 mL/min flow linear gradients with solvent A' and B' with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm.

Two ways were used to perform Strong Anion Exchange HPLC (SAX-HPLC) analyses and purifications. Either a Nucleogel anion exchange column (SAX 50 x 4.6 mm, 1000 Å, 8 μ m) was used nor it was a Dionex column (DNAPac PA-100, 9 x 250 mm). Analyses and purifications were performed with monitoring at 260 nm and 280 nm with linear gradient of solvent A'' (Tris buffer 25 mM pH 8 with 10% methanol) and solvent B'' (Tris buffer 25 mM, 1.5 M NaCl with 10% methanol).

Gradient IV starts from 100% solvent A'' to 60% solvent B'' for 20 minutes with a 1 mL/min flow using SAX column.

Gradient V starts from 5% solvent B'' to 60% in solvent A'' for 25 minutes with a 2 mL/min flow at 60°C using Dionex column.

Desalting of oligonucleotide was performed by SEC on NAP 25 cartridge using the recommended protocol and quantifications of oligonucleotides was performed at 260 nm (Molar extinction $\epsilon_{260\text{nm}}$ was estimated according to the nearest neighbour model).

3a. 3'-Diol oligonucleotide synthesis

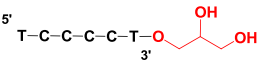
Oligonucleotides were obtained from automated synthesis on a 3'-glyceryl CPG resin at 1 μ mol scale. After synthesis cyanoethyl protecting groups were removed using 20% piperidine in acetonitrile. Cleavage from the resin and deprotections was performed in 28% NH_4OH for 16h at 55°C. The product was purified on RP-HPLC with a gradient from 0% to 45% solvent B' in solvent A' for 20 min. 5'-DMT group was then removed using 80% aqueous acetic acid solution for 45 min at room temperature. After freeze-drying, the residue was diluted in water and washed 5 times with diethyl ether.

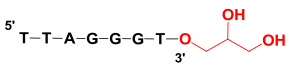
3b. General procedure for 5'-alkyne oligonucleotide synthesis

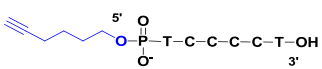
Oligonucleotides were obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl (β -cyanoethyl) phosphoramidite at 1 μ mol scale. Cleavage from the resin and subsequent deprotection were performed in 28% ammoniac solution for 16h at 55°C. The crude was purified on RP-HPLC with a gradient from 0% to 45% solvent B' in solvent A' for 20 min.

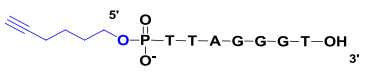
3c. General procedure of 3'-diol oligonucleotide oxidation


20 Eq of sodium metaperiodate were added to a solution of 3'-diol oligonucleotide in water to obtain a final concentration of 10^{-3} M. The mixture was stirred for 1h at room temperature in dark conditions. Excess of NaIO_4 was then removed by SEC. Crude oligonucleotide was used for oxime ligation without further purification.

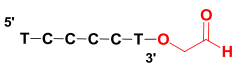
3'-diol-oligonucleotide 16	
	<p>The oligonucleotide was obtained using the classical protocol 3.a and was quantified by UV-visible (784 nmol, yield: 78%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 45600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).</p>
<p>$t_r = 13.7$ min (Gradient II)</p> <p>ESI MS (-) m/z calcd: 1855.3, found: 1855.0 [M-H]⁻</p>	


3'-diol-oligonucleotide 23	
	<p>The oligonucleotide was obtained using the classical protocol 3.a and was quantified by UV-visible (621 nmol, yield: 62%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 69200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).</p>
<p>$t_r = 14.1$ min (Gradient II)</p> <p>ESI MS (-) m/z calcd: 2304.4, found: 2303.9 [M-H]⁻</p>	

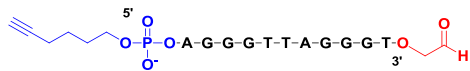
5'-alkyne oligonucleotide 18	
	<p>The oligonucleotide was obtained using the classical protocol 3.b and was quantified by UV-visible (851 nmol, yield: 85%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 45600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).</p>
<p>$t_r = 15.3$ min (Gradient II)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 1861.3, found: 1861.2 [M-H]⁻.</p>	

5'-alkyne oligonucleotide 25	
	<p>The oligonucleotide was obtained using the classical protocol 3.b and was quantified by UV-visible (721 nmol, yield: 72%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 69200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).</p>
<p>$t_r = 15.2 \text{ min}$ (Gradient II)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 2310.6, found: 2310.4 [M-H]⁻.</p>	

3'-diol 5'-alkyne oligonucleotide 43	
	<p>The oligonucleotide was obtained using the classical protocol of diol synthesis 3.a using 5'-hexynyl phosphoramidite during the last coupling. It was quantified by UV-visible (721 nmol, yield: 72%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 114800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).</p>
<p>$t_r = 13.9 \text{ min}$ (Gradient II)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 3765.5, found: 3764.4 [M-H]⁻.</p>	

3'-diol-oligonucleotide 17	
	<p>The oxidation procedure 3.c was applied on oligonucleotide 16 (200 nmol). After desalting the product (172 nmol, yield: 86%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 45600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) was used without any further purification.</p>
<p>$t_r = 13.7 \text{ min}$ (Gradient II)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 1824.2, found: 1823.2 [M-H]⁻.</p>	

3'-diol-oligonucleotide 24	
	<p>The oxidation procedure 3.c was applied on oligonucleotide 23 (250 nmol). After desalting the product (242 nmol, yield: 97%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 69200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) was used without any further purification.</p>
<p>$t_r = 14.1 \text{ min}$ (Gradient II)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 2272.5, found: 2272.7 [M-H]⁻.</p>	

3'-aldehyde 5'-alkyne oligonucleotide **44**

The oxidation procedure 3.c was applied on oligonucleotide **43** (220 nmol). After desalting the product (203 nmol, yield 92%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 114800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) was used without any further purification

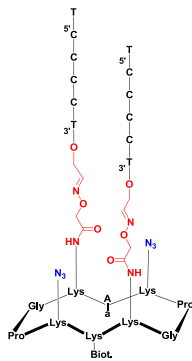
$t_r = 13.9 \text{ min}$ (Gradient II)

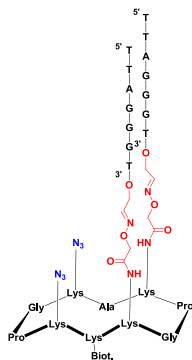
ESI MS(-) m/z calcd: 3733.5, found: 3732.5 [M-H]⁻.

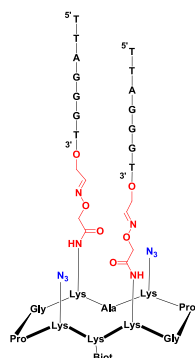
VII.4. General procedure for conjugate synthesis

4a. General procedure for oxime ligation in the first step

Aldehyde Oligonucleotide (1 to 1.5 eq by oxyamine function) was dissolved in 0.4 M ammonium acetate buffer (pH 4.5, concentration 10^{-3} M) and free aminoxy peptide (1Eq) was added. The solution was stirred at 55°C for 2h then the crude was purified on RP-HPLC with a gradient from 0% to 45% solvent B' in solvent A' for 20 min.

conjugate 19	
	<p>The oxime ligation was carried out with aldehyde 17 (172 nmol) and free aminoxy peptide 6a (72nmol) according general procedure 4.a. After RP-HPLC purification the conjugate was freeze-dried. Quantification was performed by UV-spectrometry (42 nmol, yield 59%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 91200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).</p>
<p>$t_r = 19.8 \text{ min}$ (Gradient II)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 5060.1, found: 5057.4 [M-H]⁻.</p>	

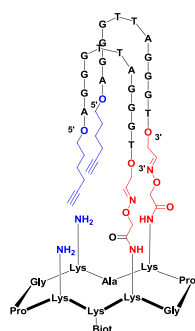
Conjugate 31	
	<p>The oxime ligation was carried out with aldehyde 24 (120 nmol) and free aminoxy peptide 30 (60nmol) according general procedure 4.a. After RP-HPLC purification the conjugate was freeze-dried. Quantification was performed by UV-spectrometry (29 nmol, yield: 48%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 138400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).</p>
<p>$t_r = 17.8 \text{ min}$ (Gradient II)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 5954.6, found: 5954.0 [M-H]⁻.</p>	

Conjugate **32**

The oxime ligation was carried out with aldehyde **24** (120 nmol) and free aminoxy peptide **6a** (60nmol) according general procedure 4.a. After RP-HPLC purification the conjugate was freeze-dried. Quantification was performed by UV-spectrometry (32 nmol, yield: 53%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 138400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

$t_r = 17.8 \text{ min}$ (Gradient II)

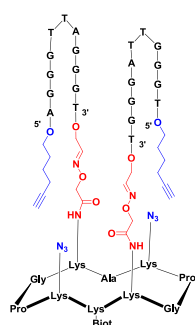
ESI MS(-) m/z calcd: 5954.6, found: 5954.0 [M-H]⁻

Conjugate **42**

The oxime ligation was carried out with aldehyde **44** (150 nmol) and free aminoxy peptide **30** (50nmol) according general procedure 4.a. After RP-HPLC purification the conjugate was freeze-dried. Quantification was performed by UV-spectrometry (16 nmol, yield: 32%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 229600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

$t_r = 17.6 \text{ min}$ (Gradient II)

ESI MS(-) m/z calcd: 8876.5, found: 8877.9 [M-H]⁻.

Conjugate **43**

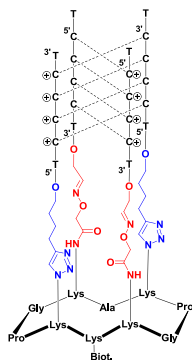
The oxime ligation was carried out with aldehyde **44** (150 nmol) and free aminoxy peptide **6a** (50nmol) according general procedure 4.a. After RP-HPLC purification the conjugate was freeze-dried. Quantification was performed by UV-spectrometry (18 nmol, yield: 36%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 229600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

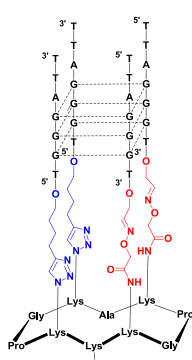
$t_r = 17.6 \text{ min}$ (Gradient II)

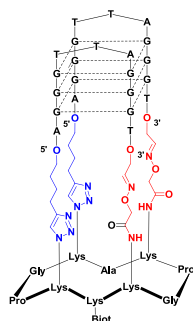
ESI MS(-) m/z calcd: 8876.5, found: 8877.9 [M-H]⁻.

4b. General procedure for CuAAC ligation in the second step

To a solution of alkyne oligonucleotide (2eq by azide function) and oxime coupled conjugate (1eq) in 100 mM HEPES buffer (pH 7.4, 100 μ L) solution was added CuSO₄ (2eq by azido function), THPTA (5eq by azido function) and sodium ascorbate (10eq by azido function). The reaction was stirred at room temperature for 2h. Excess of 0.5 M EDTA solution (pH 8, 200 μ L) was added and after 30 min the solution was desalted by SEC. The product was then purified.

i-motif <u>5</u>	
	<p>The i-motif final was obtained using oxime conjugate 19 (40nmol) with alkyne oligonucleotide 18 (160 nmol) using the described protocol 4.b. Analyse and purification were operated using SAX column. The quantification was operated using UV spectrometry (16 nmol, yield 45%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 182400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)</p>
<p>$t_r = 14.6 \text{ min}$ (Gradient IV)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd.: 8786.6, found: 8788.1</p>	

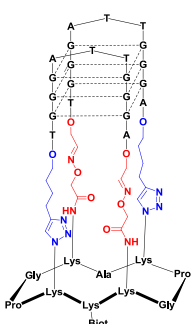
Lateral mimic <u>21</u>	
	<p>The antiparallel mimic using oxime conjugate 31 (15nmol) with alkyne oligonucleotide 25 (40 nmol) using the described protocol 4.b. Analyses and purification were operated using Dionex column. The quantification was operated using UV spectrometry (7 nmol, yield: 46%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 276800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.)</p>
<p>$t_r = 18.0 \text{ min}$ (Gradient V)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 10554.8, found: 10664.8 [M-H]⁻.</p>	

Mimic **47**

Protocol 4.b was applied to conjugate **45** (15nmol). Then decyne (50 μ L, 39 μ g, 285 nmol) was added to the reaction and the mixture was stirred for 2 supplementary hours. Excess of 0.5 M EDTA solution (pH 8, 200 μ L) was added and after 30 min the solution was desalted by SEC. The product was then purified by using RP-HPLC purification using a gradient from 0% to 80% solvent B' in solvent A' for 30 min. the product was desalted (5nmol, yield: 33%, $\epsilon_{260nm} = 229600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

$t_r = 11.0 \text{ min (program2)}$

ESI MS(-) m/z calcd: 8876.5, found: 8877.9 [M-H]⁻.

Mimic **48**

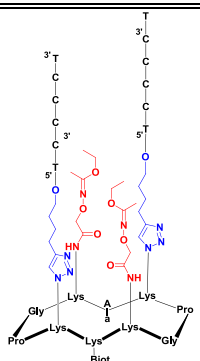
Protocol 4.b was applied to conjugate conjugate **46** (15nmol) Then decyne (50 μ L, 39 μ g, 285 nmol) was added to the reaction and the mixture was stirred for 2 supplementary hours. Excess of 0.5 M EDTA solution (pH 8, 200 μ L) was added and after 30 min the solution was desalted by SEC. The product was then purified by using RP-HPLC purification using a gradient from 0% to 80% solvent B' in solvent A' for 30 min. the product was desalted (4nmol, yield: 26%, $\epsilon_{260nm} = 229600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

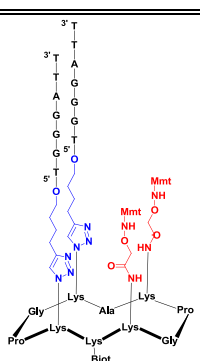
$t_r = 11.0 \text{ min (program2)}$

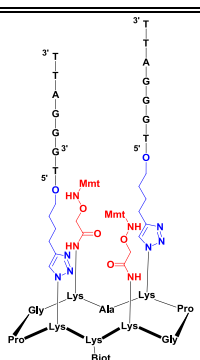
ESI MS(-) m/z calcd: 8876.5, found: 8877.9 [M-H]⁻.

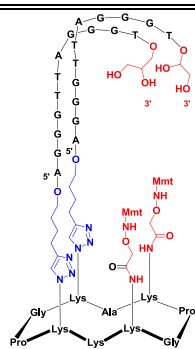
4c. General procedure for CuAAC ligation in the first step

To a solution of oligonucleotide and protected aminoxy peptide in HEPES buffer (pH 7.4, 100 μ L) were added 2eq of CuSO₄, 5eq of THPTA and 10eq of sodium ascorbate. The mixture was stirred at room temperature for 1h. Excess of EDTA (0.5 M, pH8, 200 μ L) solution was added and after 30 min the solution was desalted by SEC. Conjugate was purified on RP-HPLC with a gradient from 0% to 80% solvent B' in solvent A' for 30 min.

Conjugate 20	
	<p>Protocol 4.c was performed with protected aminoxy peptide 6b (119μg, 75 nmol) with alkyne oligonucleotide 18 (150 nmol). After RP-HPLC purification; quantification was carried out using UV-visible spectrometry (43 nmol, yield: 63%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 138400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).</p>
<p>$t_r = 21.1 \text{ min}$ (Gradient II)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 5312.5, found: 5311.3 [M-H]⁻</p>	

Conjugate 41	
	<p>Protocol 4.c was performed with protected aminoxy peptide 39 (150μg, 75 nmol) with alkyne oligonucleotide 25 (150 nmol). After RP-HPLC purification; quantification was carried out using UV-visible spectrometry (32 nmol, yield: 42%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 138400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).</p>
<p>$t_r = 15.9 \text{ min}$ (Gradient III)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 6647.6, found: 6647.7 [M-H]⁻.</p>	

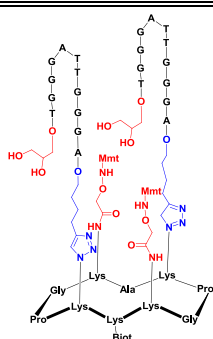
Conjugate 42	
	<p>Protocol 4.c was performed with protected aminoxy peptide 40 (150μg, 75 nmol) with alkyne oligonucleotide 25 (150 nmol). After RP-HPLC purification; quantification was carried out using UV-visible spectrometry (39 nmol, yield: 52%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 138400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).</p>
<p>$t_r = 15.9 \text{ min}$ (Gradient III)</p> <p>ESI MS(-) m/z calcd: 6647.6, found: 6647.7 [M-H]⁻.</p>	

Conjugate **49**

Protocol 4.c was performed with protected aminoxy peptide **39** (100 μ g, 50 nmol) with oligonucleotide **43** (200 nmol). After RP-HPLC purification; quantification was carried out using UV-visible spectrometry (18 nmol, yield: 36%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 229600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

$t_r = 15.5 \text{ min}$ (Gradient III)

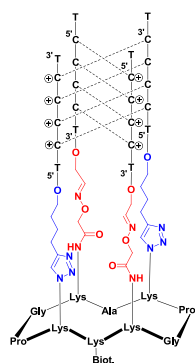
ESI MS(-) m/z calcd: 9461.3, found: 9559.0 [M-H]⁻.

Conjugate **50**

Protocol 4.c was performed with protected aminoxy peptide **40** (100 μ g, 50 nmol) with oligonucleotide **43** (200 nmol). After RP-HPLC purification; quantification was carried out using UV-visible spectrometry (17 nmol, yield: 34%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 229600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

$t_r = 15.5 \text{ min}$ (Gradient III)

ESI MS(-) m/z calcd: 9561.3, found: 9559.0 [M-H]⁻.

4d. General procedure for oxime ligation in the second stepi-motif **5**

Conjugate **20** (40 nmol) was dissolved in 10% TFA aqueous solution (100 μ L) and the solution was stirred for 30 minutes for oxyamine deprotection. The product was freeze dried. Oligonucleotide **17** (160 nmol) in 0.4 M ammonium acetate buffer (pH 4.5, 100 μ L) was next added. The solution was stirred at 55 $^{\circ}$ C for 2h and purified by SAX-HPLC(15 nmol, yield: 39%, $\epsilon_{260\text{nm}} = 182400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

$t_r = 14.6 \text{ min}$ (Gradient IV)

ESI MS(-) m/z calcd.: 8786.6, found: 8788.1

VII.5. Circular Dichroism studies:

Spectra were recorded on a Jasco J-810 circular dichroism spectropolarimeter coupled with a Peltier controller temperature using either 0.1 mm or 1 cm length quartz cuvette. Spectra were recorded every 5°C in a range from 5 to 80°C with a wavelength range from 200 to 340 nm. For each temperature, the spectrum was an average of three scans with a 0.5 s response time, a 1 nm data pitch, a 4 nm bandwidth and a 200 nm.min⁻¹ scanning speed. Blank spectra of buffer were subtracted of each measure. Melting temperatures were obtained using Boltzmann fit on Origin software. Each curve fit was only accepted with a $r_{\text{value}} > 0.99$. Compounds were preliminary annealed by heating at 90°C for 5 min in appropriate buffer and cooling slowly at room temperature overnight.

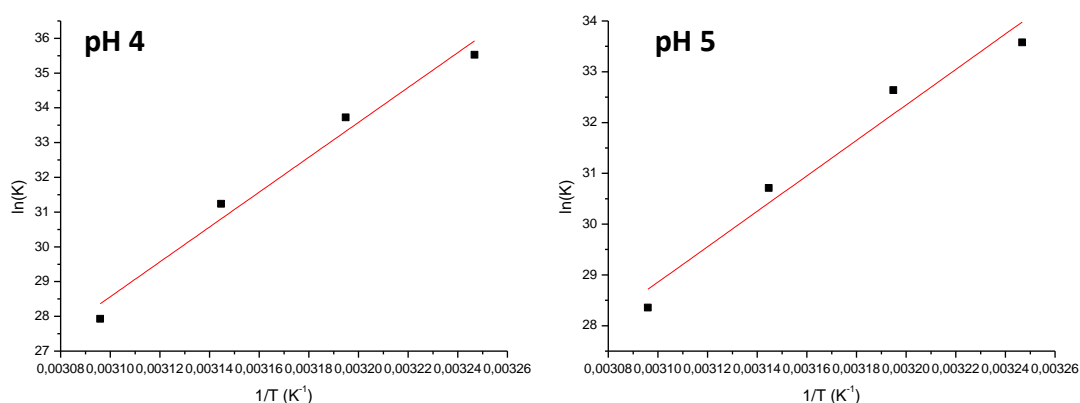


Figure 115 Variation de $\ln K=f(1/T)$ pour le complexe $d[\text{TCCCCT}]_4$ selon le pH

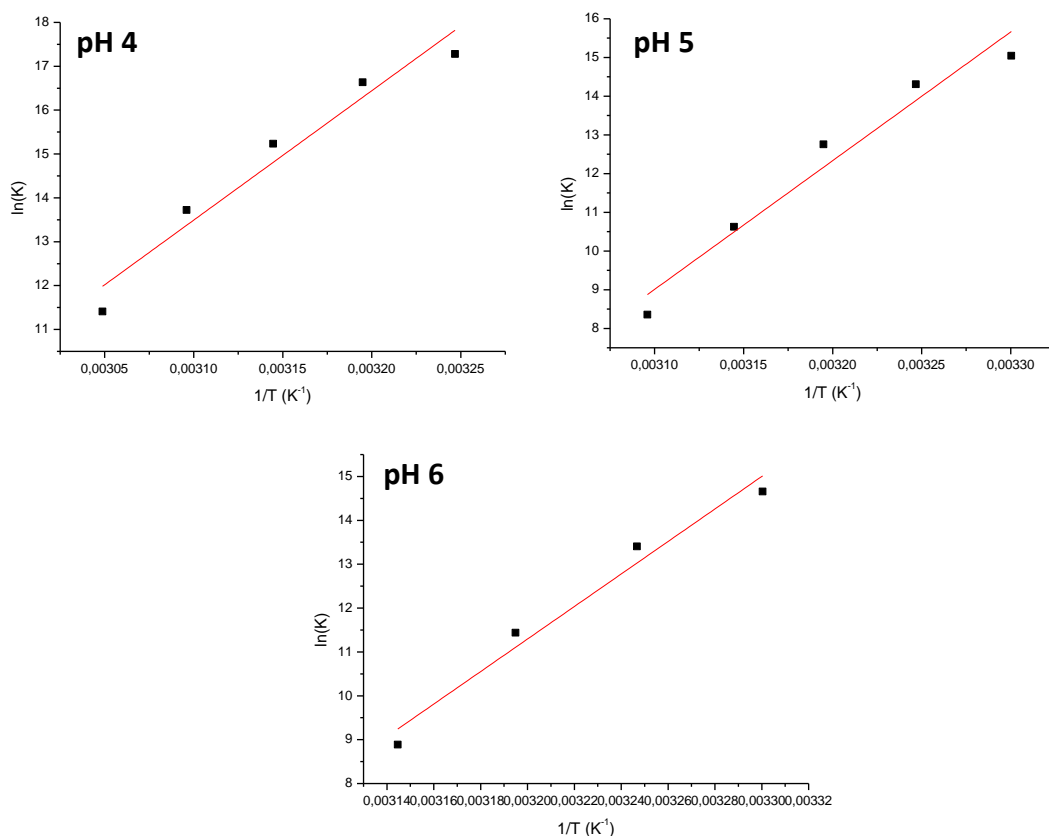


Figure 116 Variation de $\ln K=f(1/T)$ pour le composé 19 selon le pH

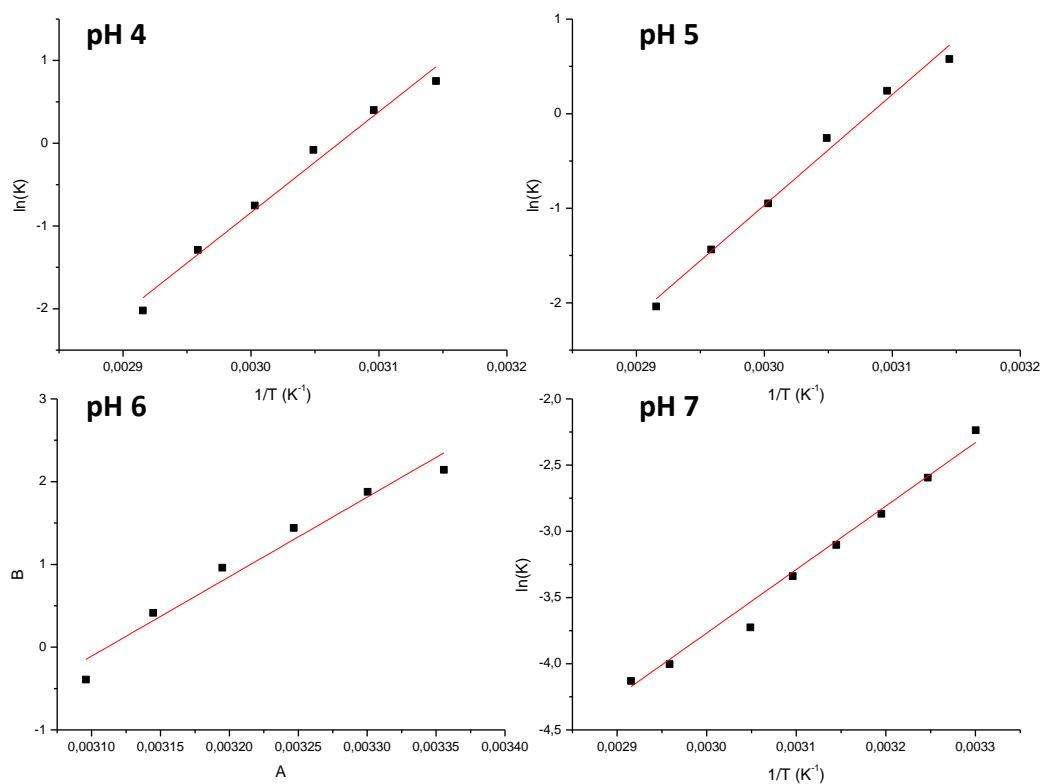


Figure 117 Variation de $\ln K=f(1/T)$ pour le composé 5 selon le pH

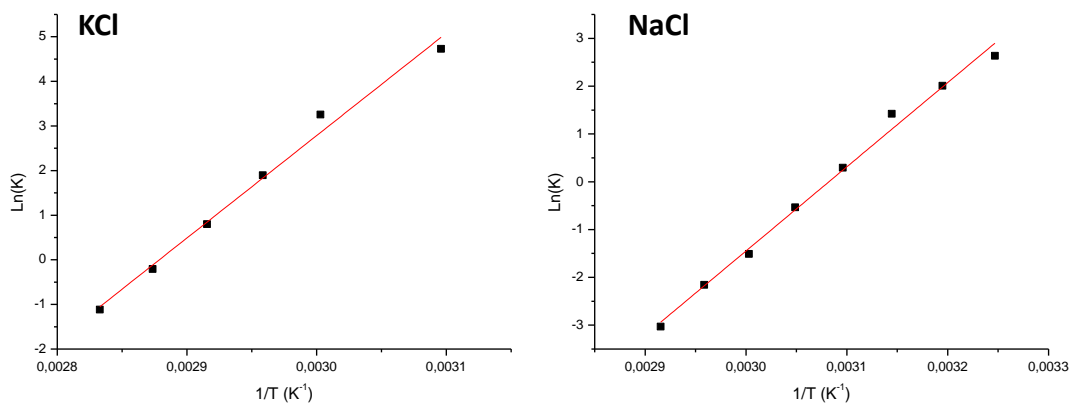


Figure 118 Variation de $\ln K=f(1/T)$ pour le composé 45

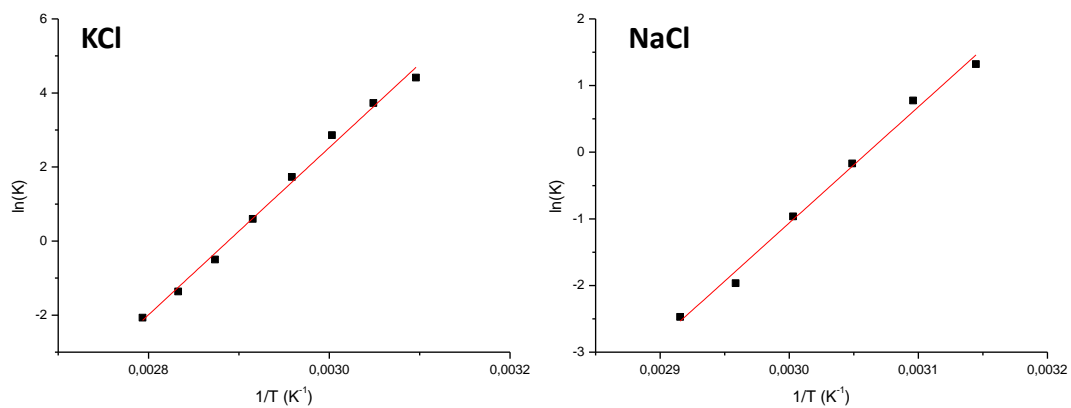


Figure 119 Variation de $\ln K=f(1/T)$ pour le composé **46**

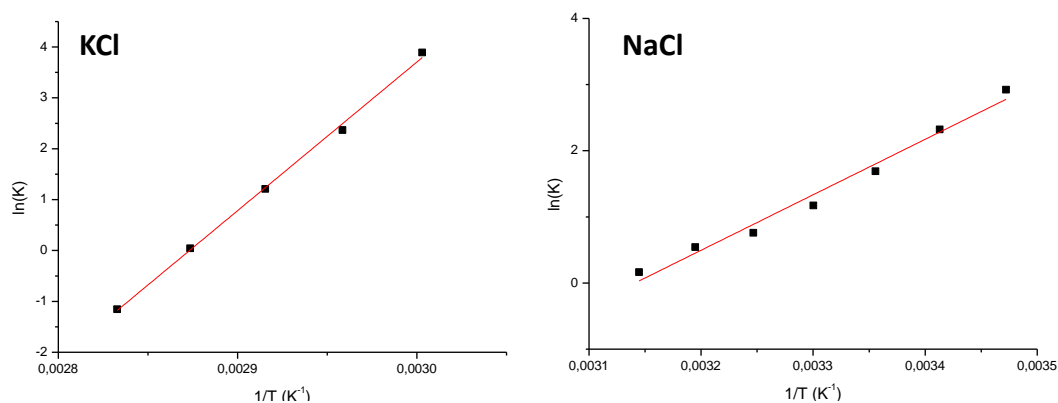


Figure 120 Variation de $\ln K=f(1/T)$ pour le composé **49**

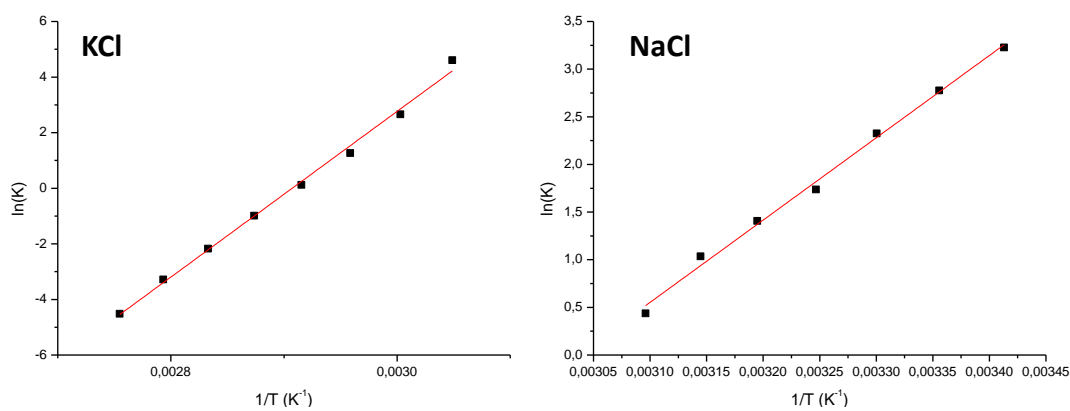


Figure 121 Variation de $\ln K=f(1/T)$ pour le composé **50**

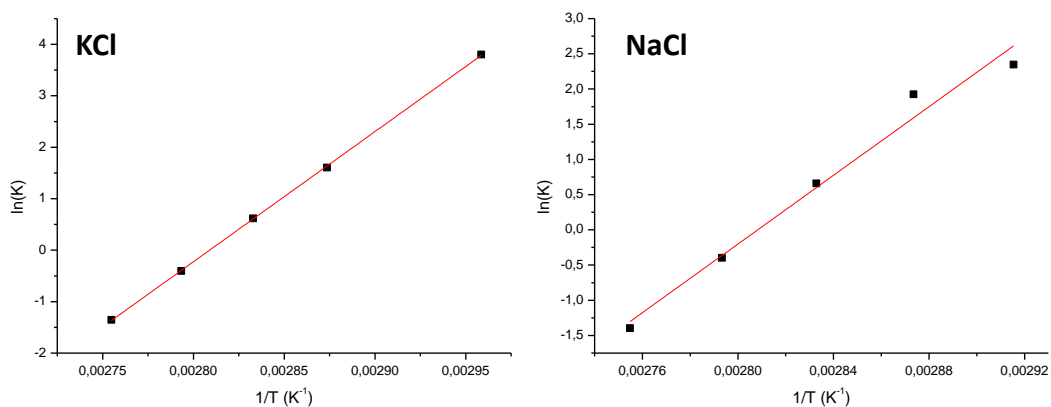


Figure 122 Variation de $\ln K=f(1/T)$ pour le composé **47**

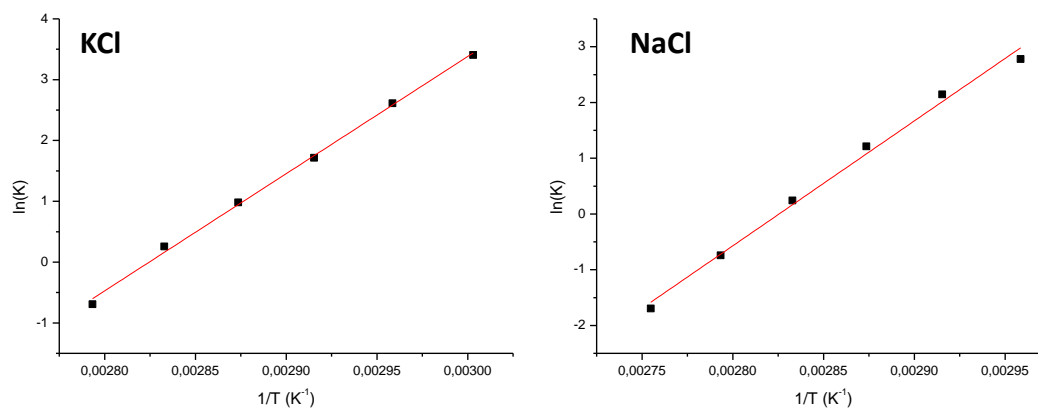


Figure 123 Variation de $\ln K=f(1/T)$ pour le composé 48

Conclusion générale

Les travaux présentés dans cette thèse ont été consacrés à l'utilisation de mimes de G-quadruplexes obtenus grâce à l'utilisation d'un gabarit cyclodecapeptidique. Ce dernier a été utilisé dans notre laboratoire pour diverses applications dont notamment la vectorisation reposant sur le principe de la multimétrie. Ceci peut être appliqué en utilisant des composés saccharidiques, peptidiques ou bien encore des molécules organiques. Une seconde application principale de ce châssis réside dans sa capacité à contrôler la formation d'édifices complexes que ce soit des composés peptidiques ou nucléotiques. Dans ce dernier cas, ceci a pu être appliqué pour la stabilisation de tétrades de guanines ou de G-quadruplexes. De plus, la capacité du gabarit à pouvoir être fonctionnalisé sur deux faces a permis d'effectuer des études de surface par SPR.

Le premier chapitre de ce manuscrit fait suite aux travaux réalisés lors de la thèse du Dr. P. Murat qui a permis de développer un mime contraint de G-quadruplexe parallèle **1**. Le principe repose sur l'utilisation d'une ligation chimiosélective, la ligation éther d'oxime, qui permet de relier les oligonucléotides par leur extrémité 3' au gabarit. L'utilisation de ce type de réaction permet en effet de s'affranchir de différentes contraintes de compatibilité rencontrées entre la chimie du peptide et celle des oligonucléotides. Le gabarit ainsi obtenu, grâce à la biotine, a pu également être utilisé pour effectuer des études SPR. L'intérêt de ce test est d'utiliser le gabarit **1** comme modèle simplifié afin de mieux comprendre le mode d'interaction de ligands de G-quadruplexe, ceci en comparant les interactions obtenues avec un autre G-quadruplexe (composé **3**). Ce test permet également de déterminer l'affinité de ligands pour un duplexe **2**. Dans le cadre de cette thèse, deux familles de complexes métalliques ont été testées.

Dans le premier cas, les études se sont portées sur différents complexes métalliques dérivés de la porphyrine TMPyP4. Ceci a notamment permis de déterminer un gain important de sélectivité pour le G-quadruplexe lorsque des ligands axiaux (molécule d'eau) sont présents sur les complexes porphyriniques. En contrepartie, il en résulte une perte d'affinité de ces complexes. Il faut remarquer que l'utilisation conjointe des gabarits **1** et **3** met également en avant un mode d'interaction différent de ces molécules par rapport au ligand porphyrinique de référence (la TMPyP4) et des complexes à la géométrie plane. Lors de l'étude sur les complexes de type Salphen, deux molécules ont été testées, l'une complexant le cuivre et l'autre le nickel. Si ces molécules présentent des affinités honorables, leur sélectivité pour le motif G-quadruplexe semble relativement importante. Il est intéressant de noter qu'elles présentent un mode d'interaction différents des autres complexes salphen étudiés sur un G-quadruplexe parallèle. Ceci peut être intéressant pour des études futures sur d'autres G-quadruplexes

La seconde partie de ce manuscrit a traité de la formation de quadruplexes antiparallèles contraint sur le gabarit peptidique. L'intérêt de développer de tels édifices est nécessaire car les G-quadruplexes sont des structures extrêmement polymorphes. Ceci a nécessité d'utiliser ainsi une deuxième réaction chimiosélective compatible avec la ligation oxime pour relier cette fois-ci les oligonucléotides par leur extrémité 5' sur le gabarit. Le choix s'est porté sur la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par le Cu^I. Ainsi l'utilisation de ces deux réactions chimiosélectives pour former un édifice antiparallèle a été montrée à travers le développement d'un mime de i-motif **5**. Ce dernier a été obtenu par deux voies de synthèse différentes reposant sur l'ordre dans lequel les couplages des oligonucléotides sur le châssis sont effectués. La caractérisation du mime de i-motif a permis de mettre en avant sa capacité à stabiliser la structure de i-motif dans une gamme de pH beaucoup plus étendue. Toutefois une étude physico-chimique de la structure serait nécessaire pour comprendre les phénomènes qui régissent la stabilité de la structure. Il peut être également intéressant de développer un test de SPR sur le même principe que celui appliqué avec le mime parallèle **1**. En effet, trouver des ligands spécifiques au i-motif pourrait permettre d'aider à déterminer si cette structure de quadruplexe joue effectivement un rôle dans la cellule sur le même principe qu'avec le G-quadruplexe. Lors de ce test il peut être également intéressant de comparer la structure à un duplexe ainsi qu'au G-quadruplexe afin de s'assurer de la spécificité de la structure.

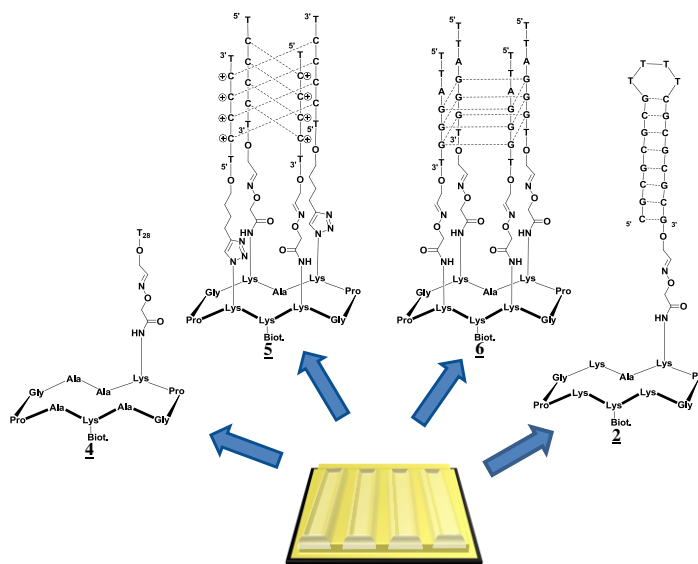


Figure 124 Représentation schématique d'un test de SPR utilisant le mime de i-motif **5**.

La preuve que le gabarit peptidique peut également contraindre les G-quadruplexes en antiparallèle a également été apportée lors de ce travail de thèse (mime **21**). Toutefois les difficultés rencontrées lors ce travail de synthèse tant au niveau de la caractérisation que de la

purification n'ont permis d'obtenir qu'un seul édifice. Celui-ci présente des caractéristiques de G-quadruplexe antiparallèle à basse température et les études à températures plus élevées indiquent la présence de phénomènes d'interactions intermoléculaires entre les édifices. Il est important de finir les synthèses de ces mimes en effectuant le « mime diagonal » **22** ainsi qu'en développant une structure hybride qui possède peut être une relevance plus importante au niveau biologique. La seconde stratégie développée lors de cette thèse peut également permettre d'arriver à ce but.

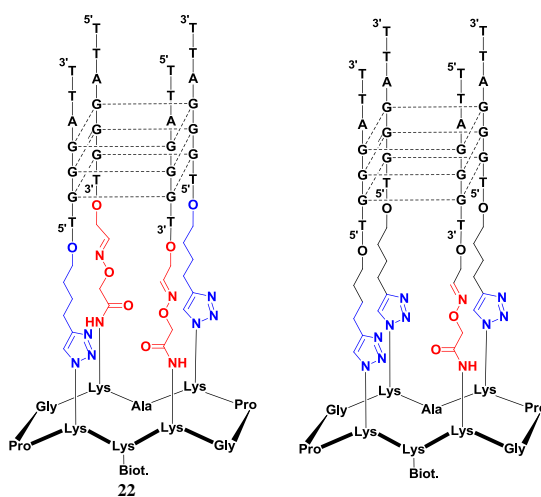


Figure 125 Structure chimique de « mime diagonal » et « hybride » de G-quadruplexe

Enfin, il a également été montré qu'il était possible d'utiliser le gabarit peptidique pour contraindre un G-quadruplexe à adopter un type de boucle. Deux édifices ont ainsi pu être obtenus présentant chacun des boucles latérales contraintes. Lors de la caractérisation de ces édifices, il est apparu que les structures G-quadruplexes formées étaient beaucoup plus stables quelques soient les conditions adoptées. Toutefois d'autres types de boucles existent et il peut également être pertinent d'arriver à les obtenir. Dans le cas de la synthèse d'un édifice présentant une boucle diagonale, l'utilisation d'un oligonucléotide fonctionnalisé en 5' et en 3' par des fonctions aldéhydes peut être envisagée. Ainsi après un couplage par ligation oxime, une réaction de CuAAC avec les oligonucléotides **25** peut conduire à la structure de G-quadruplexe. Par contre la formation d'une boucle externe peut s'avérer légèrement plus complexe. Ceci nécessite en effet de fonctionnaliser un oligonucléotide par une fonction adaptée aux ligations chimiosélectives en milieu de séquence. Différentes possibilités ont été décrites pour obtenir un tel résultat. La formation d'un azoture par diazotransfert est une des solutions envisageables car elle est facilement accessible. Un oligonucléotide présentant sur un de ses phosphates une amine peut

ainsi être traité²⁰⁵. Il est nécessaire par contre que des fonctions alcynes soit présentes sur le gabarit. La propargylglycine peut être utilisée dans ce cas. Si l'oligonucléotide présente en 5' ou en 3' une fonction aldéhyde, alors il est possible de former la boucle en formant dans un premier temps la ligation oxime puis la CuAAC.

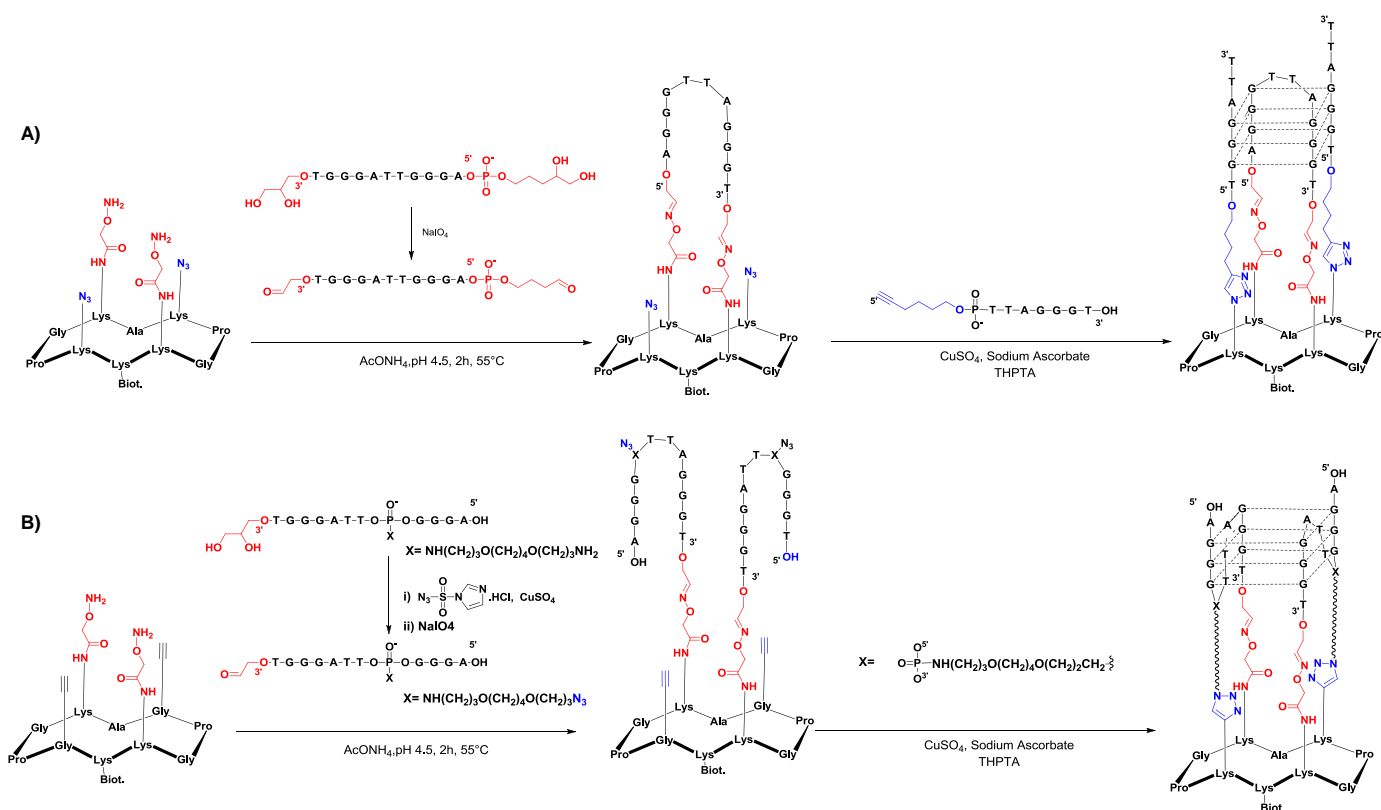


Schéma 17 Synthèse de mimes de G-quadruplexes présentant une boucle diagonales (A) ou des boucles externes (B)

Il existe un intérêt certain à développer une diversité de mimes de G-quadruplexes présentant des structures diverses et contrôlées. En effet, lors de nombreuses études, le mode d'interaction des ligands est peu connu. L'utilisation de tels outils peut ainsi permettre de comprendre plus en détail la spécificité de chaque molécule pour le G-quadruplexe. De plus ils peuvent contribuer au développement de ligands spécifiques d'une seule topologie de G-quadruplexe et peut être des éléments de reconnaissance caractéristiques d'un G-quadruplexe particulier (disposition des sillons, particularité d'une boucle). Ceci s'applique en particulier pour la stratégie ciblant les G-quadruplexes situés au niveau des promoteurs de gènes.

205 Lartia, R.; Murat, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., Versatile Introduction of Azido Moiety into Oligonucleotides through Diazo Transfer Reaction. *Org Lett* **2011**, *13* (20), 5672-5675.

Références Bibliographiques

- 1 Blackburn, G. M.; Gait, M. J., *Nucleic acids in chemistry and biology*. second Ed ed.; Oxford University Press: 1996.
- 2 Watson, J. D.; Crick, F. H. C., Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737-738.
- 3 Franklin, R. E.; Gosling, R. G., Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature* **1953**, *171* (4356), 740-741.
- 4 Wing, R.; Drew, H.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson, R. E., Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature* **1980**, *287* (5784), 755-758.
- 5 Dickerson, R. E.; Drew, H. R.; Conner, B. N.; Wing, R. M.; Fratini, A. V.; Kopka, M. L., The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. *Science* **1982**, *216* (4545), 475-485.
- 6 Macgregor Jr, R. B.; Poon, G. M. K., The DNA double helix fifty years on. *Comput Biol Chem* **2003**, *27* (4-5), 461-467.
- 7 Wang, A. H.; Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J. L.; van Boom, J. H.; van der Marel, G.; Rich, A., Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* **1979**, *282* (5740), 680-686.
- 8 Hudec, P. P.; Sonnenfeld, P., Hot Brines on Los Roques, Venezuela. *Science* **1974**, *185* (4149), 440-442.
- 9 Hammann, C.; Luptak, A.; Perreault, J.; de la Peña, M., The ubiquitous hammerhead ribozyme. *RNA* **2012**, *18* (5), 871-885.
- 10 Müller, S.; Appel, B.; Krellenberg, T.; Petkovic, S., The many faces of the hairpin ribozyme: Structural and functional variants of a small catalytic RNA. *IUBMB Life* **2012**, *64* (1), 36-47.
- 11 Fu, T.-J.; Tse-Dinh, Y.-C.; Seeman, N. C., Holliday Junction Crossover Topology. *J Mol Biol* **1994**, *236* (1), 91-105.
- 12 Hoogsteen, K., The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallogr* **1963**, *16* (9), 907-916.
- 13 Frank-Kamenetskii, M. D.; Mirkin, S. M., Triplex DNA Structures. *Annu Rev Biochem* **1995**, *64* (1), 65-95.
- 14 Crick, F. H. C., Codon—anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J Mol Biol* **1966**, *19* (2), 548-555.
- 15 Agris, P. F.; Vendeix, F. A. P.; Graham, W. D., tRNA's Wobble Decoding of the Genome: 40 Years of Modification. *J Mol Biol* **2007**, *366* (1), 1-13.
- 16 Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R., Helix formation by guanilic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1962**, *48* (12), 2013-2018.
- 17 Pinnavaia, T. J.; Marshall, C. L.; Mettler, C. M.; Fisk, C. L.; Miles, H. T.; Becker, E. D., Alkali metal ion specificity in the solution ordering of a nucleotide, 5'-guanosine monophosphate. *J Am Chem Soc* **1978**, *100* (11), 3625-3627.
- 18 Eimer, W.; Dorfmueller, T., Self-aggregation of guanosine 5'-monophosphate, studied by dynamic light scattering techniques. *The Journal of Physical Chemistry* **1992**, *96* (16), 6790-6800.
- 19 Niedle, S.; Balasubramanian, S., *Quadruplex Nucleic Acids*. Royal Society of Chemistry: 2006.
- 20 Collie, G. W.; Parkinson, G. N., The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (12), 5867-5892.

- 21 Webba da Silva, M., Geometric Formalism for DNA Quadruplex Folding. *Chem Eur J* **2007**, *13* (35), 9738-9745.
- 22 Karsisiotis, A. I.; Hessari, N. M. a.; Novellino, E.; Spada, G. P.; Randazzo, A.; Webba da Silva, M., Topological Characterization of Nucleic Acid G-Quadruplexes by UV Absorption and Circular Dichroism. *Angew Chem* **2011**, *123* (45), 10833-10836.
- 23 Masiero, S.; Trotta, R.; Pieraccini, S.; De Tito, S.; Perone, R.; Randazzo, A.; Spada, G. P., A non-empirical chromophoric interpretation of CD spectra of DNA G-quadruplex structures. *Org Biomol Chem* **2010**, *8* (12), 2683-2692.
- 24 Webba da Silva, M.; Trajkovski, M.; Sannohe, Y.; Ma'ani Hessari, N.; Sugiyama, H.; Plavec, J., Design of a G-Quadruplex Topology through Glycosidic Bond Angles. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48* (48), 9167-9170.
- 25 (a) Guédin, A.; De Cian, A.; Gros, J.; Lacroix, L.; Mergny, J.-L., Sequence effects in single-base loops for quadruplexes. *Biochimie* **2008**, *90* (5), 686-696; (b) Risitano, A.; Fox, K. R., Influence of loop size on the stability of intramolecular DNA quadruplexes. *Nucleic Acids Res* **2004**, *32* (8), 2598-2606.
- 26 Palumbo, S. L.; Ebbinghaus, S. W.; Hurley, L. H., Formation of a Unique End-to-End Stacked Pair of G-Quadruplexes in the hTERT Core Promoter with Implications for Inhibition of Telomerase by G-Quadruplex-Interactive Ligands. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (31), 10878-10891.
- 27 Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Burge, S.; Neidle, S.; Patel, D. J., Structure of an Unprecedented G-Quadruplex Scaffold in the Human c-kit Promoter. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (14), 4386-4392.
- 28 Hardin, C. C.; Watson, T.; Corregan, M.; Bailey, C., Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d(CGCG3GCG). *Biochemistry (Mosc)* **1992**, *31* (3), 833-841.
- 29 Wang, Y.; Patel, D. J., Solution structure of a parallel-stranded G-quadruplex DNA. *J Mol Biol* **1993**, *234* (4), 1171-1183.
- 30 Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S., Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* **2002**, *417* (6891), 876-880.
- 31 Li, J.; Correia, J. J.; Wang, L.; Trent, J. O.; Chaires, J. B., Not so crystal clear: the structure of the human telomere G-quadruplex in solution differs from that present in a crystal. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33* (14), 4649-4659.
- 32 Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Bialis, T.; Jones, R. A.; Yang, D., Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34* (9), 2723-2735.
- 33 Petraccone, L.; Malafrente, A.; Amato, J.; Giancola, C., G-Quadruplexes from Human Telomeric DNA: How Many Conformations in PEG Containing Solutions? *J Phys Chem B* **2012**, *116* (7), 2294-2305.
- 34 Xue, Y.; Kan, Z.-y.; Wang, Q.; Yao, Y.; Liu, J.; Hao, Y.-h.; Tan, Z., Human Telomeric DNA Forms Parallel-Stranded Intramolecular G-Quadruplex in K⁺ Solution under Molecular Crowding Condition. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (36), 11185-11191.
- 35 Dai, J.; Carver, M.; Yang, D., Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1172-1183.
- 36 Dai, J.; Carver, M.; Punchihewa, C.; Jones, R. A.; Yang, D., Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35* (15), 4927-4940.

- 37 Dai, J.; Punchihewa, C.; Ambrus, A.; Chen, D.; Jones, R. A.; Yang, D., Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35* (7), 2440-2450.
- 38 (a) Schonhofs, J. D.; Bajracharya, R.; Dhakal, S.; Yu, Z.; Mao, H.; Basu, S., Direct experimental evidence for quadruplex–quadruplex interaction within the human ILPR. *Nucleic Acids Res* **2009**, *37* (10), 3310-3320; (b) Collie, G. W.; Parkinson, G. N.; Neidle, S.; Rosu, F. d. r.; De Pauw, E.; Gabelica, V., Electrospray Mass Spectrometry of Telomeric RNA (TERRA) Reveals the Formation of Stable Multimeric G-Quadruplex Structures. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (27), 9328-9334; (c) Smargiasso, N.; Rosu, F. d. r.; Hsia, W.; Colson, P.; Baker, E. S.; Bowers, M. T.; De Pauw, E.; Gabelica, V., G-Quadruplex DNA Assemblies: Loop Length, Cation Identity, and Multimer Formation†. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (31), 10208-10216; (d) Pedroso, I. M.; Duarte, L. F.; Yanez, G.; Burkewitz, K.; Fletcher, T. M., Sequence specificity of inter- and intramolecular G-quadruplex formation by human telomeric DNA. *Biopolymers* **2007**, *87* (1), 74-84; (e) Bauer, L.; Tlučková, K.; Tóthová, P.; Viglaský, V., G-Quadruplex Motifs Arranged in Tandem Occurring in Telomeric Repeats and the Insulin-Linked Polymorphic Region. *Biochemistry (Mosc)* **2011**, *50* (35), 7484-7492; (f) Yu, H.-Q.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N., Characterization of Structure and Stability of Long Telomeric DNA G-Quadruplexes. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (48), 15461-15468.
- 39 (a) Zhang, D.-H.; Fujimoto, T.; Saxena, S.; Yu, H.-Q.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N., Monomorphic RNA G-Quadruplex and Polymorphic DNA G-Quadruplex Structures Responding to Cellular Environmental Factors. *Biochemistry (Mosc)* **2010**, *49* (21), 4554-4563; (b) Martadinata, H.; Phan, A. T. n., Structure of Propeller-Type Parallel-Stranded RNA G-Quadruplexes, Formed by Human Telomeric RNA Sequences in K⁺ Solution. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (7), 2570-2578.
- 40 Zhang, D.-H.; Zhi, G.-Y., Structure monomorphism of RNA G-quadruplex that is independent of surrounding condition. *J Biotechnol* **2010**, *150* (1), 6-10.
- 41 Guéron, M.; Leroy, J.-L., The i-motif in nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol* **2000**, *10* (3), 326-331.
- 42 Gehring, K.; Leroy, J.-L.; Gueron, M., A tetrameric DNA structure with protonated cytosine-cytosine base pairs. *Nature* **1993**, *363* (6429), 561-565.
- 43 Lieblein, A. L.; Buck, J.; Schlepckow, K.; Fürtig, B.; Schwalbe, H., Time-Resolved NMR Spectroscopic Studies of DNA i-Motif Folding Reveal Kinetic Partitioning. *Angew Chem Int Ed* **2012**, *51* (1), 250-253.
- 44 (a) Jin, K. S.; Shin, S. R.; Ahn, B.; Rho, Y.; Kim, S. J.; Ree, M., pH-Dependent Structures of an i-Motif DNA in Solution. *J Phys Chem B* **2009**, *113* (7), 1852-1856; (b) Leroy, J.-L.; Guéron, M.; Mergny, J.-L.; Hélène, C., Intramolecular folding of a fragment of the cytosine-rich strand of telomeric DNA into an i-motif. *Nucleic Acids Res* **1994**, *22* (9), 1600-1606.
- 45 Rajendran, A.; Nakano, S.-i.; Sugimoto, N., Molecular crowding of the cosolutes induces an intramolecular i-motif structure of triplet repeat DNA oligomers at neutral pH. *Chem Commun* **2010**, *46* (8), 1299-1301.
- 46 Huppert, J. L.; Balasubramanian, S., Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33* (9), 2908-2916.
- 47 (a) Dunnick, W.; Hertz, G. Z.; Scappino, L.; Gritzmacher, C., DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res* **1993**, *21* (3), 365-372; (b) Sen, D.; Gilbert, W., Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* **1988**, *334* (6180), 364-366; (c) Ou, T.-M.; Lu, Y.-

- J.; Tan, J.-H.; Huang, Z.-S.; Wong, K.-Y.; Gu, L.-Q., G-Quadruplexes: Targets in Anticancer Drug Design. *ChemMedChem* **2008**, 3 (5), 690-713.
- 48 Wu, Y.; Brosh, R. M., G-quadruplex nucleic acids and human disease. *FEBS J* **2010**, 277 (17), 3470-3488.
- 49 (a) Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Plückthun, A., In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, 98 (15), 8572-8577; (b) Lipps, H. J.; Rhodes, D., G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol* **2009**, 19 (8), 414-422.
- 50 (a) Mergny, J.-L., Alternative DNA structures: G4 DNA in cells: itae missa est? *Nat Chem Biol* **2012**, 8 (3), 225-226; (b) Rodriguez, R.; Miller, K. M.; Forment, J. V.; Bradshaw, C. R.; Nikan, M.; Britton, S.; Oelschlaegel, T.; Xhemalce, B.; Balasubramanian, S.; Jackson, S. P., Small-molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. *Nat Chem Biol* **2012**, 8 (3), 301-310.
- 51 McClintock, B., The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1939**, 25 (8), 405-416.
- 52 Hahn, W. C., Role of Telomeres and Telomerase in the Pathogenesis of Human Cancer. *J Clin Oncol* **2003**, 21 (10), 2034-2043.
- 53 Blackburn, E. H., Switching and Signaling at the Telomere. *Cell* **2001**, 106 (6), 661-673.
- 54 Cifuentes-Rojas, C.; Shippen, D. E., Telomerase regulation. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mugag* **2012**, 730 (1-2), 20-27.
- 55 Ruden, M.; Puri, N., Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev* **2012**.
- 56 Zahler, A. M.; Williamson, J. R.; Cech, T. R.; Prescott, D. M., Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* **1991**, 350 (6320), 718-720.
- 57 Neidle, S., Human telomeric G-quadruplex: The current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *FEBS J* **2010**, 277 (5), 1118-1125.
- 58 Balasubramanian, S.; Hurley, L. H.; Neidle, S., Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat Rev Drug Discov* **2011**, 10 (4), 261-275.
- 59 Brooks, T. A.; Hurley, L. H., Targeting MYC Expression through G-Quadruplexes. *Genes Cancer* **2010**, 1 (6), 641-649.
- 60 (a) Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Jones, R. A.; Yang, D., Solution Structure of the Biologically Relevant G-Quadruplex Element in the Human c-MYC Promoter. Implications for G-Quadruplex Stabilization†. *Biochemistry (Mosc)* **2005**, 44 (6), 2048-2058; (b) Phan, A. T.; Modi, Y. S.; Patel, D. J., Propeller-Type Parallel-Stranded G-Quadruplexes in the Human c-myc Promoter. *J Am Chem Soc* **2004**, 126 (28), 8710-8716.
- 61 Siddiqui-Jain, A.; Grand, C. L.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H., Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99 (18), 11593-11598.
- 62 Cogo, S.; Paramasivam, M.; Filichev, V.; Géci, I.; Pedersen, E. B.; Xodo, L. E., Identification of a New G-Quadruplex Motif in the KRAS Promoter and Design of Pyrene-Modified G4-Decoys with Antiproliferative Activity in Pancreatic Cancer Cells. *J Med Chem* **2008**, 52 (2), 564-568.

- 63 Huppert, J. L.; Bugaut, A.; Kumari, S.; Balasubramanian, S., G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (19), 6260-6268.
- 64 Kumari, S.; Bugaut, A.; Huppert, J. L.; Balasubramanian, S., An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat Chem Biol* **2007**, *3* (4), 218-221.
- 65 Arora, A.; Dutkiewicz, M.; Scaria, V.; Hariharan, M.; Maiti, S.; Kurreck, J., Inhibition of translation in living eukaryotic cells by an RNA G-quadruplex motif. *RNA* **2008**, *14* (7), 1290-1296.
- 66 Bonnal, S.; Schaeffer, C.; Créancier, L.; Clamens, S.; Moine, H.; Prats, A.-C.; Vagner, S., A Single Internal Ribosome Entry Site Containing a G Quartet RNA Structure Drives Fibroblast Growth Factor 2 Gene Expression at Four Alternative Translation Initiation Codons. *J Biol Chem* **2003**, *278* (41), 39330-39336.
- 67 Morris, M. J.; Negishi, Y.; Pázsint, C.; Schonhoft, J. D.; Basu, S., An RNA G-Quadruplex Is Essential for Cap-Independent Translation Initiation in Human VEGF IRES. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (50), 17831-17839.
- 68 Melko, M.; Bardoni, B., The role of G-quadruplex in RNA metabolism: Involvement of FMRP and FMR2P. *Biochimie* **2010**, *92* (8), 919-926.
- 69 Wang, T.; Bray, S. M.; Warren, S. T., New perspectives on the biology of fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev* **2012**, *22* (3), 256-263.
- 70 Lin, S.; Li, S.; Chen, Z.; He, X.; Zhang, Y.; Xu, X.; Xu, M.; Yuan, G., Formation, recognition and bioactivities of a novel G-quadruplex in the STAT3 gene. *Bioorg Med Chem Lett* **2011**, *21* (19), 5987-5991.
- 71 Huijbregts, L.; Roze, C.; Bonafe, G.; Houang, M.; Le Bouc, Y.; Carel, J.-C.; Leger, J.; Alberti, P.; de Roux, N., DNA polymorphisms of the KiSS1 3' Untranslated region interfere with the folding of a G-rich sequence into G-quadruplex. *Mol Cell Endocrinol* **2012**, *351* (2), 239-248.
- 72 Subramanian, M.; Rage, F.; Tabet, R.; Flatter, E.; Mandel, J.-L.; Moine, H., G-quadruplex RNA structure as a signal for neurite mRNA targeting. *EMBO Rep* **2011**, *12* (7), 697-704.
- 73 (a) Amrane, S.; Adrian, M.; Heddi, B.; Serero, A.; Nicolas, A.; Mergny, J.-L.; Phan, A. T., Formation of Pearl-Necklace Monomorphic G-Quadruplexes in the Human CEB25 Minisatellite. *J Am Chem Soc* **2012**, *134* (13), 5807-5816; (b) Ribeyre, C.; Lopes, J.; Boulé, J.-B.; Piazza, A.; Guédin, A.; Zakian, V. A.; Mergny, J.-L.; Nicolas, A., The Yeast Pif1 Helicase Prevents Genomic Instability Caused by G-Quadruplex-Forming CEB1 Sequences In Vivo. *PLoS Genet* **2009**, *5* (5), e1000475.
- 74 Schonhoft, J. D.; Das, A.; Achamyeh, F.; Samdani, S.; Sewell, A.; Mao, H.; Basu, S., ILPR repeats adopt diverse G-quadruplex conformations that determine insulin binding. *Biopolymers* **2010**, *93* (1), 21-31.
- 75 Azzalin, C. M.; Reichenbach, P.; Khoriantouli, L.; Giulotto, E.; Lingner, J., Telomeric Repeat-Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science* **2007**, *318* (5851), 798-801.
- 76 Xu, Y.; Komiyama, M., Structure, function and targeting of human telomere RNA. *Methods* **2012**, *57* (1), 100-105.
- 77 (a) Li, J.-L.; Harrison, R. J.; Reszka, A. P.; Brosh, R. M.; Bohr, V. A.; Neidle, S.; Hickson, I. D., Inhibition of the Bloom's and Werner's Syndrome Helicases by G-Quadruplex Interacting Ligands†. *Biochemistry (Mosc)* **2001**, *40* (50), 15194-15202; (b) Sissi, C.; Gatto, B.; Palumbo,

- M., The evolving world of protein-G-quadruplex recognition: A medicinal chemist's perspective. *Biochimie* **2011**, *93* (8), 1219-1230.
- 78 Phan, A. T.; Mergny, J. L., Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson–Crick double helix. *Nucleic Acids Res* **2002**, *30* (21), 4618-4625.
- 79 Dhakal, S.; Schonhoft, J. D.; Koirala, D.; Yu, Z.; Basu, S.; Mao, H., Coexistence of an ILPR i-Motif and a Partially Folded Structure with Comparable Mechanical Stability Revealed at the Single-Molecule Level. *J Am Chem Soc* **2010**, *132* (26), 8991-8997.
- 80 Gallego, J.; Chou, S.-H.; Reid, B. R., Centromeric pyrimidine strands fold into an intercalated motif by forming a double hairpin with a Novel T:G:G:T tetrad: solution structure of the d(TCCCGTTTCCA) dimer. *J Mol Biol* **1997**, *273* (4), 840-856.
- 81 Brooks, T. A.; Kendrick, S.; Hurley, L., Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters. *FEBS J* **2010**, *277* (17), 3459-3469.
- 82 Fajkus, J., Detection of telomerase activity by the TRAP assay and its variants and alternatives. *Clin Chim Acta* **2006**, *371* (1–2), 25-31.
- 83 Reed, J.; Gunaratnam, M.; Beltran, M.; Reszka, A. P.; Vilar, R.; Neidle, S., TRAP–LIG, a modified telomere repeat amplification protocol assay to quantitate telomerase inhibition by small molecules. *Anal Biochem* **2008**, *380* (1), 99-105.
- 84 Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P., A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org Biomol Chem* **2008**, *6* (4), 627-636.
- 85 Huang, H.-S.; Huang, K.-F.; Li, C.-L.; Huang, Y.-Y.; Chiang, Y.-H.; Huang, F.-C.; Lin, J.-J., Synthesis, human telomerase inhibition and anti-proliferative studies of a series of 2,7-bis-substituted amido-anthraquinone derivatives. *Biorg Med Chem* **2008**, *16* (14), 6976-6986.
- 86 Read, M. A.; Wood, A. A.; Harrison, J. R.; Gowan, S. M.; Kelland, L. R.; Dosanjh, H. S.; Neidle, S., Molecular Modeling Studies on G-Quadruplex Complexes of Telomerase Inhibitors: Structure–Activity Relationships. *J Med Chem* **1999**, *42* (22), 4538-4546.
- 87 Harrison, R. J.; Cuesta, J.; Chessari, G.; Read, M. A.; Basra, S. K.; Reszka, A. P.; Morrell, J.; Gowan, S. M.; Incles, C. M.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S., Trisubstituted Acridine Derivatives as Potent and Selective Telomerase Inhibitors. *J Med Chem* **2003**, *46* (21), 4463-4476.
- 88 Burger, A. M.; Dai, F.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J.; Double, J. A.; Neidle, S., The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function. *Cancer Res* **2005**, *65* (4), 1489-1496.
- 89 Collie, G.; Reszka, A. P.; Haider, S. M.; Gabelica, V.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Selectivity in small molecule binding to human telomeric RNA and DNA quadruplexes. *Chem Commun* **2009**, (48), 7482-7484.
- 90 Stanslas, J.; Hagan, D. J.; Ellis, M. J.; Turner, C.; Carmichael, J.; Ward, W.; Hammonds, T. R.; Stevens, M. F. G., Antitumor Polycyclic Acridines. 7.1 Synthesis and Biological Properties of DNA Affinic Tetra- and Pentacyclic Acridines. *J Med Chem* **2000**, *43* (8), 1563-1572.
- 91 (a) Phatak, P.; Cookson, J. C.; Dai, F.; Smith, V.; Gartenhaus, R. B.; Stevens, M. F. G.; Burger, A. M., Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth in vitro and in vivo consistent with a cancer stem cell targeting mechanism. *Br J Cancer* **2007**, *96* (8), 1223-1233; (b) Salvati, E.; Scarsella, M.; Porru, M.; Rizzo, A.; Iachettini, S.; Tentori, L.; Graziani, G.; D'Incalci, M.; Stevens, M. F. G.; Orlandi, A.; Passeri, D.; Gilson, E.;

Zupi, G.; Leonetti, C.; Biroccio, A., PARP1 is activated at telomeres upon G4 stabilization: possible target for telomere-based therapy. *Oncogene* **2010**, *29* (47), 6280-6293.

92 Bejugam, M.; Sewitz, S.; Shirude, P. S.; Rodriguez, R.; Shahid, R.; Balasubramanian, S., Trisubstituted Isoalloxazines as a New Class of G-Quadruplex Binding Ligands: Small Molecule Regulation of c-kit Oncogene Expression. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (43), 12926-12927.

93 (a) De Cian, A.; DeLemos, E.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Monchaud, D., Highly Efficient G-Quadruplex Recognition by Bisquinolinium Compounds. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (7), 1856-1857; (b) De Cian, A.; Cristofari, G.; Reichenbach, P.; De Lemos, E.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P.; Shin-ya, K.; Lacroix, L.; Lingner, J.; Mergny, J.-L., Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (44), 17347-17352.

94 Rodriguez, R. I.; Müller, S.; Yeoman, J. A.; Trentesaux, C.; Riou, J.-F. o.; Balasubramanian, S., A Novel Small Molecule That Alters Shelterin Integrity and Triggers a DNA-Damage Response at Telomeres. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (47), 15758-15759.

95 Riou, J. F.; Guittat, L.; Mailliet, P.; Laoui, A.; Renou, E.; Petitgenet, O.; Mégnin-Chanet, F.; Hélène, C.; Mergny, J. L., Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, *99* (5), 2672-2677.

96 (a) Franceschin, M.; Pascucci, E.; Alvino, A.; D'Ambrosio, D.; Bianco, A.; Ortaggi, G.; Savino, M., New highly hydrosoluble and not self-aggregated perylene derivatives with three and four polar side-chains as G-quadruplex telomere targeting agents and telomerase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17* (9), 2515-2522; (b) Han, H.; Cliff, C. L.; Hurley, L. H., Accelerated Assembly of G-Quadruplex Structures by a Small Molecule†. *Biochemistry (Mosc)* **1999**, *38* (22), 6981-6986.

97 Franceschin, M.; Alvino, A.; Casagrande, V.; Mauriello, C.; Pascucci, E.; Savino, M.; Ortaggi, G.; Bianco, A., Specific interactions with intra- and intermolecular G-quadruplex DNA structures by hydrosoluble coronene derivatives: A new class of telomerase inhibitors. *Biorg Med Chem* **2007**, *15* (4), 1848-1858.

98 Drygin, D.; Siddiqui-Jain, A.; O'Brien, S.; Schwaebe, M.; Lin, A.; Bliesath, J.; Ho, C. B.; Proffitt, C.; Trent, K.; Whitten, J. P.; Lim, J. K. C.; Von Hoff, D.; Anderes, K.; Rice, W. G., Anticancer Activity of CX-3543: A Direct Inhibitor of rRNA Biogenesis. *Cancer Res* **2009**, *69* (19), 7653-7661.

99 (a) Liu, J. N.; Deng, R.; Guo, J. F.; Zhou, J. M.; Feng, G. K.; Huang, Z. S.; Gu, L. Q.; Zeng, Y. X.; Zhu, X. F., Inhibition of myc promoter and telomerase activity and induction of delayed apoptosis by SYUIQ-5, a novel G-quadruplex interactive agent in leukemia cells. *Leukemia* **2007**, *21* (6), 1300-1302; (b) Zhou, J. M.; Zhu, X. F.; Lu, Y. J.; Deng, R.; Huang, Z. S.; Mei, Y. P.; Wang, Y.; Huang, W. L.; Liu, Z. C.; Gu, L. Q.; Zeng, Y. X., Senescence and telomere shortening induced by novel potent G-quadruplex interactive agents, quindoline derivatives, in human cancer cell lines. *Oncogene* **2005**, *25* (4), 503-511.

100 (a) Hounsou, C.; Guittat, L.; Monchaud, D.; Jourdan, M.; Saettel, N.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P., G-Quadruplex Recognition by Quinacridines: a SAR, NMR, and Biological Study. *ChemMedChem* **2007**, *2* (5), 655-666; (b) Mergny, J.-L.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Hounsou, C.; Guittat, L.; Hoarau, M.; Arimondo, P. B.; Vigneron, J.-P.; Lehn, J.-M.; Riou, J.-F.; Garestier, T.; Hélène, C., Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (6), 3062-3067.

- 101 Teulade-Fichou, M.-P.; Carrasco, C.; Guittat, L.; Bailly, C.; Alberti, P.; Mergny, J.-L.; David, A.; Lehn, J.-M.; Wilson, W. D., Selective Recognition of G-Quadruplex Telomeric DNA by a Bis(quinacridine) Macrocyclic. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (16), 4732-4740.
- 102 Monchaud, D.; Granzhan, A.; Saettel, N.; Gu; #233; din, A.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P., "One Ring to Bind Them All" Part I: The Efficiency of the Macrocyclic Scaffold for G-Quadruplex DNA Recognition. *J Nucleic Acids* **2010**, *2010*.
- 103 Wheelhouse, R. T.; Sun, D.; Han, H.; Han, F. X.; Hurley, L. H., Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphine with Quadruplex DNA. *J Am Chem Soc* **1998**, *120* (13), 3261-3262.
- 104 Martino, L.; Pagano, B.; Fotticchia, I.; Neidle, S.; Giancola, C., Shedding Light on the Interaction between TMPyP4 and Human Telomeric Quadruplexes. *J Phys Chem B* **2009**, *113* (44), 14779-14786.
- 105 Ren, J.; Chaires, J. B., Sequence and Structural Selectivity of Nucleic Acid Binding Ligands†. *Biochemistry (Mosc)* **1999**, *38* (49), 16067-16075.
- 106 Seenisamy, J.; Bashyam, S.; Gokhale, V.; Vankayalapati, H.; Sun, D.; Siddiqui-Jain, A.; Streiner, N.; Shin-ya, K.; White, E.; Wilson, W. D.; Hurley, L. H., Design and Synthesis of an Expanded Porphyrin That Has Selectivity for the c-MYC G-Quadruplex Structure. *J Am Chem Soc* **2005**, *127* (9), 2944-2959.
- 107 (a) Kim, M.-Y.; Vankayalapati, H.; Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Hurley, L. H., Telomestatin, a Potent Telomerase Inhibitor That Interacts Quite Specifically with the Human Telomeric Intramolecular G-Quadruplex. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (10), 2098-2099; (b) Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Matsuo, K.-i.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H., Telomestatin, a Novel Telomerase Inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J Am Chem Soc* **2001**, *123* (6), 1262-1263.
- 108 Minhas, G. S.; Pilch, D. S.; Kerrigan, J. E.; LaVoie, E. J.; Rice, J. E., Synthesis and G-quadruplex stabilizing properties of a series of oxazole-containing macrocycles. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16* (15), 3891-3895.
- 109 Tera, M.; Iida, K.; Ishizuka, H.; Takagi, M.; Suganuma, M.; Doi, T.; Shin-ya, K.; Nagasawa, K., Synthesis of a Potent G-Quadruplex-Binding Macrocyclic Hepta-oxazole. *ChemBioChem* **2009**, *10* (3), 431-435.
- 110 Jantos, K.; Rodriguez, R.; Ladame, S.; Shirude, P. S.; Balasubramanian, S., Oxazole-Based Peptide Macrocycles: A New Class of G-Quadruplex Binding Ligands. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (42), 13662-13663.
- 111 Chakraborty, T. K.; Arora, A.; Roy, S.; Kumar, N.; Maiti, S., Furan Based Cyclic Oligopeptides Selectively Target G-Quadruplex. *J Med Chem* **2007**, *50* (23), 5539-5542.
- 112 Shirude, P. S.; Gillies, E. R.; Ladame, S.; Godde, F.; Shin-ya, K.; Huc, I.; Balasubramanian, S., Macrocyclic and Helical Oligoamides as a New Class of G-Quadruplex Ligands. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (39), 11890-11891.
- 113 Jain, A. K.; Bhattacharya, S., Interaction of G-Quadruplexes with Nonintercalating Duplex-DNA Minor Groove Binding Ligands. *Bioconjugate Chem* **2011**, *22* (12), 2355-2368.
- 114 Maiti, S.; Chaudhury, N. K.; Chowdhury, S., Hoechst 33258 binds to G-quadruplex in the promoter region of human c-myc. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, *310* (2), 505-512.

- 115 Chen, Z.; Zheng, K.-w.; Hao, Y.-h.; Tan, Z., Reduced or Diminished Stabilization of the Telomere G-Quadruplex and Inhibition of Telomerase by Small Chemical Ligands under Molecular Crowding Condition. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (30), 10430-10438.
- 116 Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Gaw, H. Y.; Patel, D. J., Small-molecule interaction with a five-guanine-tract G-quadruplex structure from the human MYC promoter. *Nat Chem Biol* **2005**, *1* (3), 167-173.
- 117 Li, G.; Huang, J.; Zhang, M.; Zhou, Y.; Zhang, D.; Wu, Z.; Wang, S.; Weng, X.; Zhou, X.; Yang, G., Bis(benzimidazole)pyridine derivative as a new class of G-quadruplex inducing and stabilizing ligand. *Chem Commun* **2008**, (38), 4564-4566.
- 118 (a) Randazzo, A.; Galeone, A.; Esposito, V.; Varra, M.; Mayol, L., Interaction of distamycin A and netropsin with quadruplex and duplex structures: a comparative ¹H-NMR study. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2002**, *21* (8-9), 535-545; (b) Randazzo, A.; Galeone, A.; Mayol, L., H-NMR study of the interaction of distamycin A and netropsin with the parallel stranded tetraplex [d(TGGGGT)]. *Chem Commun* **2001**, (11), 1030-1031.
- 119 Zaffaroni, N.; Lualdi, S.; Villa, R.; Bellarosa, D.; Cermele, C.; Felicetti, P.; Rossi, C.; Orlandi, L.; Daidone, M. G., Inhibition of telomerase activity by a distamycin derivative: effects on cell proliferation and induction of apoptosis in human cancer cells. *Eur J Cancer* **2002**, *38* (13), 1792-1801.
- 120 (a) Chen, Q.; Kuntz, I. D.; Shafer, R. H., Spectroscopic recognition of guanine dimeric hairpin quadruplexes by a carbocyanine dye. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93* (7), 2635-2639; (b) Paramasivan, S.; Bolton, P. H., Mix and measure fluorescence screening for selective quadruplex binders. *Nucleic Acids Res* **2008**, *36* (17), e106; (c) Yang, Q.; Xiang, J.; Yang, S.; Zhou, Q.; Li, Q.; Tang, Y.; Xu, G., Verification of specific G-quadruplex structure by using a novel cyanine dye supramolecular assembly: I. Recognizing mixed G-quadruplex in human telomeres. *Chem Commun* **2009**, (9), 1103-1105.
- 121 Ren, J.; Chaires, J. B., Preferential Binding of 3,3'-Diethyloxadycarbocyanine to Triplex DNA. *J Am Chem Soc* **1999**, *122* (2), 424-425.
- 122 Kaiser, M.; De Cian, A.; Sainlos, M.; Renner, C.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P., Neomycin-capped aromatic platforms: quadruplex DNA recognition and telomerase inhibition. *Org Biomol Chem* **2006**, *4* (6), 1049-1057.
- 123 Hamon, F.; Largy, E.; Guédin-Beaurepaire, A.; Rouchon-Dagois, M.; Sidibe, A.; Monchaud, D.; Mergny, J.-L.; Riou, J.-F.; Nguyen, C.-H.; Teulade-Fichou, M.-P., An Acyclic Oligoheteroaryle That Discriminates Strongly between Diverse G-Quadruplex Topologies. *Angew Chem* **2011**, *123* (37), 8904-8908.
- 124 Collie, G. W.; Sparapani, S.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Structural Basis of Telomeric RNA Quadruplex-Acridine Ligand Recognition. *J Am Chem Soc* **2011**, *133* (8), 2721-2728.
- 125 Fedoroff, O. Y.; Rangan, A.; Chemeris, V. V.; Hurley, L. H., Cationic Porphyrins Promote the Formation of i-Motif DNA and Bind Peripherally by a Nonintercalative Mechanism†. *Biochemistry (Mosc)* **2000**, *39* (49), 15083-15090.
- 126 Fernández, S.; Eritja, R.; Aviñó, A.; Jaumot, J.; Gargallo, R., Influence of pH, temperature and the cationic porphyrin TMPyP4 on the stability of the i-motif formed by the 5'-(C3TA2)4-3' sequence of the human telomere. *Int J Biol Macromol* **2011**, *49* (4), 729-736.
- 127 Li, X.; Peng, Y.; Ren, J.; Qu, X., Carboxyl-modified single-walled carbon nanotubes selectively induce human telomeric i-motif formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103* (52), 19658-19663.

- 128 Nikan, M.; Sherman, J. C., Template-Assembled Synthetic G-Quartets (TASQs). *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47* (26), 4900-4902.
- 129 Kotch, F. W.; Sidorov, V.; Lam, Y.-F.; Kayser, K. J.; Li, H.; Kaucher, M. S.; Davis, J. T., Water-Mediated Association Provides an Ion Pair Receptor. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (49), 15140-15150.
- 130 (a) Mutter, M.; Altmann, K. H.; Tuchscherer, G.; Vuilleumier, S., Template assembled synthetic proteins. 1989; (b) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G., Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angew Chem Int Ed* **1996**, *35* (13-14), 1482-1485.
- 131 Nikan, M.; Patrick, B. O.; Sherman, J. C., Crystal Structure of a Template-Assembled Synthetic G-Quadruplex. *ChemBioChem* **2012**, *13* (10), 1413-1415.
- 132 Stefan, L.; Guedin, A.; Amrane, S.; Smith, N.; Denat, F.; Mergny, J.-L.; Monchaud, D., DOTASQ as a prototype of nature-inspired G-quadruplex ligand. *Chem Commun* **2011**, *47* (17), 4992-4994.
- 133 Xu, H.-J.; Stefan, L.; Haudecoeur, R.; Vuong, S.; Richard, P.; Denat, F.; Barbe, J.-M.; Gros, C. P.; Monchaud, D., Porphyrin-templated synthetic G-quartet (PorphySQ): a second prototype of G-quartet-based G-quadruplex ligand. *Org Biomol Chem* **2012**, *10* (27), 5212-5218.
- 134 Murat, P.; Gennaro, B.; Garcia, J.; Spinelli, N.; Dumy, P.; Defrancq, E., The Use of a Peptidic Scaffold for the Formation of Stable Guanine Tetrads: Control of a H-bonded Pattern in Water. *Chem Eur J* **2011**, *17* (21), 5791-5795.
- 135 Murat, P.; Cressend, D.; Spinelli, N.; Van der Heyden, A.; Labbé, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., A Novel Conformationally Constrained Parallel G Quadruplex. *ChemBioChem* **2008**, *9* (16), 2588-2591.
- 136 Murat, P.; Bonnet, R.; Van der Heyden, A.; Spinelli, N.; Labbé, P.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P.; Dumy, P.; Defrancq, E., Template-Assembled Synthetic G-Quadruplex (TASQ): A Useful System for Investigating the Interactions of Ligands with Constrained Quadruplex Topologies. *Chem Eur J* **2010**, *16* (20), 6106-6114.
- 137 Georgiades, S. N.; Abd Karim, N. H.; Suntharalingam, K.; Vilar, R., Interaction of Metal Complexes with G-Quadruplex DNA. *Angew Chem Int Ed* **2010**, *49* (24), 4020-4034.
- 138 (a) Shi, D.-F.; Wheelhouse, R. T.; Sun, D.; Hurley, L. H., Quadruplex-Interactive Agents as Telomerase Inhibitors: Synthesis of Porphyrins and Structure–Activity Relationship for the Inhibition of Telomerase. *J Med Chem* **2001**, *44* (26), 4509-4523; (b) Izbicka, E.; Wheelhouse, R. T.; Raymond, E.; Davidson, K. K.; Lawrence, R. A.; Sun, D.; Windle, B. E.; Hurley, L. H.; Von Hoff, D. D., Effects of Cationic Porphyrins as G-Quadruplex Interactive Agents in Human Tumor Cells. *Cancer Res* **1999**, *59* (3), 639-644.
- 139 Bhattacharjee, A. J.; Ahluwalia, K.; Taylor, S.; Jin, O.; Nicoludis, J. M.; Buscaglia, R.; Brad Chaires, J.; Kornfilt, D. J. P.; Marquardt, D. G. S.; Yatsunyk, L. A., Induction of G-quadruplex DNA structure by Zn(II) 5,10,15,20-tetrakis(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin. *Biochimie* **2011**, *93* (8), 1297-1309.
- 140 Dixon, I. M.; Lopez, F.; Estève, J.-P.; Tejera, A. M.; Blasco, M. A.; Pratviel, G.; Meunier, B., Porphyrin Derivatives for Telomere Binding and Telomerase Inhibition. *ChemBioChem* **2005**, *6* (1), 123-132.
- 141 Dixon, I. M.; Lopez, F.; Tejera, A. M.; Estève, J.-P.; Blasco, M. A.; Pratviel, G.; Meunier, B., A G-Quadruplex Ligand with 10000-Fold Selectivity over Duplex DNA. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (6), 1502-1503.

- 142 Yaku, H.; Fujimoto, T.; Murashima, T.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N., Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications. *Chem Commun* **2012**, 48 (50), 6203-6216.
- 143 Zhang, L.; Huang, J.; Ren, L.; Bai, M.; Wu, L.; Zhai, B.; Zhou, X., Synthesis and evaluation of cationic phthalocyanine derivatives as potential inhibitors of telomerase. *Biorg Med Chem* **2008**, 16 (1), 303-312.
- 144 Alzeer, J.; Luedtke, N. W., pH-Mediated Fluorescence and G-Quadruplex Binding of Amido Phthalocyanines. *Biochemistry (Mosc)* **2010**, 49 (20), 4339-4348.
- 145 Alzeer, J.; Vummidi, B. R.; Roth, P. J. C.; Luedtke, N. W., Guanidinium-Modified Phthalocyanines as High-Affinity G-Quadruplex Fluorescent Probes and Transcriptional Regulators. *Angew Chem Int Ed* **2009**, 48 (49), 9362-9365.
- 146 Yaku, H.; Murashima, T.; Miyoshi, D.; Sugimoto, N., Anionic phthalocyanines targeting G-quadruplexes and inhibiting telomerase activity in the presence of excessive DNA duplexes. *Chem Commun* **2010**, 46 (31), 5740-5742.
- 147 Goncalves, D. P. N.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S.; Sanders, J. K. M., Tetramethylpyridiniumporphyrazines-a new class of G-quadruplex inducing and stabilising ligands. *Chem Commun* **2006**, (45), 4685-4687.
- 148 Fu, B.; Zhang, D.; Weng, X.; Zhang, M.; Ma, H.; Ma, Y.; Zhou, X., Cationic Metal–Corrole Complexes: Design, Synthesis, and Properties of Guanine-Quadruplex Stabilizers. *Chem Eur J* **2008**, 14 (30), 9431-9441.
- 149 Gershman, Z.; Goldberg, I.; Gross, Z., DNA Binding and Catalytic Properties of Positively Charged Corroles. *Angew Chem Int Ed* **2007**, 46 (23), 4320-4324.
- 150 Monchaud, D.; Yang, P.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Mergny, J.-L., A Metal-Mediated Conformational Switch Controls G-Quadruplex Binding Affinity. *Angew Chem* **2008**, 120 (26), 4936-4939.
- 151 Reed, J. E.; White, A. J. P.; Neidle, S.; Vilar, R., Effect of metal coordination on the interaction of substituted phenanthroline and pyridine ligands with quadruplex DNA. *Dalton Trans* **2009**, (14), 2558-2568.
- 152 Reed, J. E.; Arnal, A. A.; Neidle, S.; Vilar, R., Stabilization of G-Quadruplex DNA and Inhibition of Telomerase Activity by Square-Planar Nickel(II) Complexes. *J Am Chem Soc* **2006**, 128 (18), 5992-5993.
- 153 Arola-Arnal, A.; Benet-Buchholz, J.; Neidle, S.; Vilar, R. n., Effects of Metal Coordination Geometry on Stabilization of Human Telomeric Quadruplex DNA by Square-Planar and Square-Pyramidal Metal Complexes. *Inorg Chem* **2008**, 47 (24), 11910-11919.
- 154 Wu, P.; Ma, D.-L.; Leung, C.-H.; Yan, S.-C.; Zhu, N.; Abagyan, R.; Che, C.-M., Stabilization of G-Quadruplex DNA with Platinum(II) Schiff Base Complexes: Luminescent Probe and Down-Regulation of c-myc Oncogene Expression. *Chem Eur J* **2009**, 15 (47), 13008-13021.
- 155 Bertrand, H.; Monchaud, D.; De Cian, A.; Guillot, R.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P., The importance of metal geometry in the recognition of G-quadruplex-DNA by metal-terpyridine complexes. *Org Biomol Chem* **2007**, 5 (16), 2555-2559.
- 156 Suntharalingam, K.; White, A. J. P.; Vilar, R., Synthesis, Structural Characterization, and Quadruplex DNA Binding Studies of Platinum(II)-Terpyridine Complexes. *Inorg Chem* **2009**, 48 (19), 9427-9435.

- 157 Suntharalingam, K.; White, A. J. P.; Vilar, R., Two Metals Are Better than One: Investigations on the Interactions between Dinuclear Metal Complexes and Quadruplex DNA. *Inorg Chem* **2010**, *49* (18), 8371-8380.
- 158 (a) Wang, J.-T.; Zheng, X.-H.; Xia, Q.; Mao, Z.-W.; Ji, L.-N.; Wang, K., 1,10-Phenanthroline platinum(II) complex: a simple molecule for efficient G-quadruplex stabilization. *Dalton Trans* **2010**, *39* (31), 7214-7216; (b) Reed, J. E.; Neidle, S.; Vilar, R., Stabilisation of human telomeric quadruplex DNA and inhibition of telomerase by a platinum-phenanthroline complex. *Chem Commun* **2007**, (42), 4366-4368.
- 159 Kieltyka, R.; Fakhoury, J.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F., Platinum Phenanthroimidazole Complexes as G-Quadruplex DNA Selective Binders. *Chem Eur J* **2008**, *14* (4), 1145-1154.
- 160 Ma, D.-L.; Che, C.-M.; Yan, S.-C., Platinum(II) Complexes with Dipyridophenazine Ligands as Human Telomerase Inhibitors and Luminescent Probes for G-Quadruplex DNA. *J Am Chem Soc* **2008**, *131* (5), 1835-1846.
- 161 Barry, N. P. E.; Abd Karim, N. H.; Vilar, R.; Therrien, B., Interactions of ruthenium coordination cubes with DNA. *Dalton Trans* **2009**, (48), 10717-10719.
- 162 Kieltyka, R.; Englebienne, P.; Fakhoury, J.; Autexier, C.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F., A Platinum Supramolecular Square as an Effective G-Quadruplex Binder and Telomerase Inhibitor. *J Am Chem Soc* **2008**, *130* (31), 10040-10041.
- 163 (a) Jaumot, J.; Gargallo, R., Experimental Methods for Studying the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands. *Curr Pharm Des* *18* (14), 1900-1916; (b) Murat, P.; Singh, Y.; Defrancq, E., Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chem Soc Rev* **2011**, *40* (11), 5293-5307.
- 164 Redman, J. E., Surface plasmon resonance for probing quadruplex folding and interactions with proteins and small molecules. *Methods* **2007**, *43* (4), 302-312.
- 165 Pockrand, I.; Raether, H., Surface plasma oscillations at sinusoidal silver surfaces. *Appl Opt* **1977**, *16* (7), 1784-1786.
- 166 (a) Rich, R. L.; Myszka, D. G., Grading the commercial optical biosensor literature—Class of 2008: ‘The Mighty Binders’. *J Mol Recognit* **2010**, *23* (1), 1-64; (b) Wilson, W. D., Analyzing Biomolecular Interactions. *Science* **2002**, *295* (5562), 2103-2105; (c) Cooper, M. A., Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1* (7), 515-528.
- 167 Mita, H.; Ohyama, T.; Tanaka, Y.; Yamamoto, Y., Formation of a Complex of 5,10,15,20-Tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)-21H,23H-porphyrin with G-Quadruplex DNA†. *Biochemistry (Mosc)* **2006**, *45* (22), 6765-6772.
- 168 Romera, C.; Bombarde, O.; Bonnet, R.; Gomez, D.; Dumy, P.; Calsou, P.; Gwan, J.-F.; Lin, J.-H.; Defrancq, E.; Pratviel, G., Improvement of porphyrins for G-quadruplex DNA targeting. *Biochimie* **2011**, *93* (8), 1310-1317.
- 169 (a) Oliviero, G.; Amato, J.; Borbone, N.; Galeone, A.; Petraccone, L.; Varra, M.; Piccialli, G.; Mayol, L., Synthesis and Characterization of Monomolecular DNA G-Quadruplexes Formed by Tetra-End-Linked Oligonucleotides. *Bioconjugate Chem* **2006**, *17* (4), 889-898; (b) Oliviero, G.; Borbone, N.; Amato, J.; D'Errico, S.; Galeone, A.; Piccialli, G.; Varra, M.; Mayol, L., Synthesis of quadruplex-forming tetra-end-linked oligonucleotides: Effects of the linker size on quadruplex topology and stability. *Biopolymers* **2009**, *91* (6), 466-477.
- 170 Ferreira, R.; Alvira, M.; Aviñó, A.; Gómez-Pinto, I.; González, C.; Gabelica, V.; Eritja, R., Synthesis and Structural Characterization of Stable Branched DNA G-Quadruplexes Using the Trebler Phosphoramidite. *ChemistryOpen* **2012**, *1* (2), 106-114.

- 171 Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed* **2001**, *40* (11), 2004-2021.
- 172 Jencks, W. P., Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation. *J Am Chem Soc* **1959**, *81* (2), 475-481.
- 173 Rose, K., Facile synthesis of homogeneous artificial proteins. *J Am Chem Soc* **1994**, *116* (1), 30-33.
- 174 Kalia, J.; Raines, R. T., Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew Chem Int Ed* **2008**, *47* (39), 7523-7526.
- 175 Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E., Nucleophilic Catalysis of Oxime Ligation. *Angew Chem Int Ed* **2006**, *45* (45), 7581-7584.
- 176 (a) Singh, Y.; Murat, P.; Defrancq, E., Recent developments in oligonucleotide conjugation. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (6), 2054-2070; (b) Lu, K.; Duan, Q.-P.; Ma, L.; Zhao, D.-X., Chemical Strategies for the Synthesis of Peptide–Oligonucleotide Conjugates. *Bioconjugate Chem* **2009**, *21* (2), 187-202.
- 177 Huisgen, R., Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew Chem Int Ed* **1963**, *2* (11), 633-645.
- 178 (a) Amblard, F.; Cho, J. H.; Schinazi, R. F., Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide–Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry. *Chem Rev* **2009**, *109* (9), 4207-4220; (b) El-Sagheer, A. H.; Brown, T., Click chemistry with DNA. *Chem Soc Rev* **2010**, *39* (4), 1388-1405.
- 179 (a) Galibert, M.; Dumy, P.; Boturyn, D., One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations. *Angew Chem Int Ed* **2009**, *48* (14), 2576-2579; (b) Galibert, M.; Sancey, L.; Renaudet, O.; Coll, J.-L.; Dumy, P.; Boturyn, D., Application of click-click chemistry to the synthesis of new multivalent RGD conjugates. *Org Biomol Chem* **2010**, *8* (22), 5133-5138.
- 180 Thomas, B.; Fiore, M.; Bossu, I.; Dumy, P.; Renaudet, O., Synthesis of heteroglycoclusters by using orthogonal chemoselective ligations. *Beilstein J Org Chem* **2012**, *8*, 421-427.
- 181 Meyer, A.; Spinelli, N.; Dumy, P.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F.; Defrancq, E., Oligonucleotide Sequential Bis-Conjugation via Click–Oxime and Click–Huisgen Procedures. *J Org Chem* **2010**, *75* (11), 3927-3930.
- 182 Karskela, M.; Helkearo, M.; Virta, P.; Lönnberg, H., Synthesis of Oligonucleotide Glycoconjugates Using Sequential Click and Oximation Ligations. *Bioconjugate Chem* **2010**, *21* (4), 748-755.
- 183 Bonnet, R.; Murat, P.; Spinelli, N.; Defrancq, E., Click-click chemistry on a peptidic scaffold for easy access to tetrameric DNA structures. *Chem Commun* **2012**, *48* (48), 5992-5994.
- 184 Merrifield, R. B., Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc* **1963**, *85* (14), 2149-2154.
- 185 Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P., 1-Ethoxyethylidene, a New Group for the Stepwise SPPS of Aminoxyacetic Acid Containing Peptides. *J Org Chem* **2008**, *73* (3), 983-991.
- 186 Nyffeler, P. T.; Liang, C.-H.; Koeller, K. M.; Wong, C.-H., The Chemistry of Amine–Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (36), 10773-10778.

- 187 Goddard-Borger, E. D.; Stick, R. V., An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride. *Org Lett* **2007**, *9* (19), 3797-3800.
- 188 Matteucci, M. D.; Caruthers, M. H., Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J Am Chem Soc* **1981**, *103* (11), 3185-3191.
- 189 Laurent, A.; de Lambert, B.; Charreyre, M.-T.; Mandrand, B.; Chaix, C., A one step derivatization of controlled pore glass for oligonucleotide solid-phase synthesis. *Tetrahedron Lett* **2004**, *45* (48), 8883-8887.
- 190 Forget, D.; Renaudet, O.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Dumy, P., 3'-Oligonucleotides conjugation via chemoselective oxime bond formation. *Tetrahedron Lett* **2001**, *42* (52), 9171-9174.
- 191 Sigman, D. S.; Graham, D. R.; D'Aurora, V.; Stern, A. M., Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline . cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. *J Biol Chem* **1979**, *254* (24), 12269-72.
- 192 (a) Rodionov, V. O.; Presolski, S. I.; Gardinier, S.; Lim, Y.-H.; Finn, M. G., Benzimidazole and Related Ligands for Cu-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition. *J Am Chem Soc* **2007**, *129* (42), 12696-12704; (b) Lallana, E.; Riguera, R.; Fernandez-Megia, E., Reliable and Efficient Procedures for the Conjugation of Biomolecules through Huisgen Azide-Alkyne Cycloadditions. *Angew Chem Int Ed* **2011**, *50* (38), 8794-8804.
- 193 Rosu, F.; De Pauw, E.; Gabelica, V., Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. *Biochimie* **2008**, *90* (7), 1074-1087.
- 194 Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčiuk, D.; Vorlíčková, M., Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res* **2009**, *37* (6), 1713-1725.
- 195 Mergny, J. L.; Lacroix, L., Analysis of thermal melting curves. *Oligonucleotides* **2003**, *13* (6), 515-37.
- 196 Alder, R. W.; Bowman, P. S.; Steele, W. R. S.; Winterman, D. R., The remarkable basicity of 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene. *Chem Commun* **1968**, (13), 723-724.
- 197 Dai, J.; Ambrus, A.; Hurley, L. H.; Yang, D., A Direct and Nondestructive Approach To Determine the Folding Structure of the I-Motif DNA Secondary Structure by NMR. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (17), 6102-6104.
- 198 Paramasivan, S.; Rujan, I.; Bolton, P. H., Circular dichroism of quadruplex DNAs: Applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods* **2007**, *43* (4), 324-331.
- 199 Esposito, V.; Randazzo, A.; Piccialli, G.; Petraccone, L.; Giancola, C.; Mayol, L., Effects of an 8-bromodeoxyguanosine incorporation on the parallel quadruplex structure [d(TGGGT)]₄. *Org Biomol Chem* **2004**, *2* (3), 313-318.
- 200 (a) Yuan, G.; Zhang, Q.; Zhou, J.; Li, H., Mass spectrometry of G-quadruplex DNA: Formation, recognition, property, conversion, and conformation. *Mass Spectrom Rev* **2011**, *30* (6), 1121-1142; (b) Rosu, F.; Gabelica, V.; Poncelet, H.; De Pauw, E., Tetramolecular G-quadruplex formation pathways studied by electrospray mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* **2010**, *38* (15), 5217-5225.
- 201 Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P., Highly Efficient Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates: Chemoselective Oxime and Thiazolidine Formation. *Chem Eur J* **2001**, *7* (18), 3976-3984.

202 Kojima, N.; Takebayashi, T.; Mikami, A.; Ohtsuka, E.; Komatsu, Y., Construction of Highly Reactive Probes for Abasic Site Detection by Introduction of an Aromatic and a Guanidine Residue into an Aminoxy Group. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (37), 13208-13209.

203 Campbell, N. H.; Patel, M.; Tofa, A. B.; Ghosh, R.; Parkinson, G. N.; Neidle, S., Selectivity in Ligand Recognition of G-Quadruplex Loops†. *Biochemistry (Mosc)* **2009**, *48* (8), 1675-1680.

204 Phan, A. T.; Patel, D. J., Two-Repeat Human Telomeric d(TAGGGTTAGGGT) Sequence Forms Interconverting Parallel and Antiparallel G-Quadruplexes in Solution: Distinct Topologies, Thermodynamic Properties, and Folding/Unfolding Kinetics. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (49), 15021-15027.

205 Lartia, R.; Murat, P.; Dumy, P.; Defrancq, E., Versatile Introduction of Azido Moiety into Oligonucleotides through Diazo Transfer Reaction. *Org Lett* **2011**, *13* (20), 5672-5675.