

Sondes fluorescentes pour l'ADN : marquages covalent et non-covalent.

Clémence Allain

▶ **To cite this version:**

Clémence Allain. Sondes fluorescentes pour l'ADN : marquages covalent et non-covalent.. Autre. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT : . tel-00202422

HAL Id: tel-00202422

https://theses.hal.science/tel-00202422

Submitted on 6 Jan 2008

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité

Chimie Organique

Présentée par

Clémence ALLAIN

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de la thèse :

SONDES FLUORESCENTES POUR L'ADN : MARQUAGES COVALENT ET NON-COVALENTS.

Soutenue le 10 novembre 2006

Devant le jury composé de :

Pr. Jacques DELAIRE	Examinateur
Dr. Martine DEMEUNYNCK	Rapporteur
Pr. Louis FENSTERBANK	Examinateur
Dr. Céline FIORINI-DEBUISSCHERT	Examinateur invitée
Pr Jean-Marie LEHN	Examinateur
Dr Jean-Louis MERGNY	Rapporteur
Dr Marie-Paule TEULADE-FICHOU	Directeur de thèse

Table des matières

Remerciements. . . . . . **p 7**

Abréviations utilisées. . . . . . **p 9**

Introduction générale. . . . . . **p 11**

Partie I. Marquage non covalent par reconnaissance structurale. Exemple de l'ADN quadruplexe. . . . . . **p 21**

Chapitre 1 : l'ADN quadruplexe. Eléments bibliographiques. . . **p 23**

I. L'ADN quadruplexe – structure. . . . . p 23
A. Tétrades de guanines et ADN quadruplexe. . . . . *p 23*
B. Une grande diversité structurale. . . . . . *p 24*
II. Rôles biologiques. . . . . p 27
A. Existence in vivo. . . . . . *p 27*
B. Implications dans la structure des télomères. . . . . *p 28*
C. Autres rôles biologiques supposés. . . . . . *p 30*
III. Ligands d'ADN quadruplexe. Méthodes biophysiques d'étude. . . p 31
A. Principaux ligands d'ADN quadruplexe. . . . . . *p 31*
B. Comment évaluer l'affinité d'un ligand pour l'ADN quadruplexe ? . *p 34*
C. Comment évaluer la sélectivité d'un ligand pour l'ADN quadruplexe ? . *p 38*
IV. Marquage d'ADN quadruplexe par des fluorophores. Etat de l'art. . . p 39
V. Objectifs. . . . . p 41

Chapitre 2 : Conception de ligands fluorescents d'ADN quadruplexe. . **p 43**

I. Conception structurale. . . . . p 43
II. Synthèse. . . . . p 44
A. Synthèse du noyau quinacridine. . . . . . *p 45*
B. Synthèse de la partie fluorescente – cas du Bodipy. . . . . *p 47*
C. Synthèse des conjugués. . . . . . *p 49*
III. Propriétés de fluorescence et d'interaction avec l'ADN. . . . p 53
*A. Conjugués quinacridine-dansyle **1** et quinacridine-MANT **22**.* . . *p 53*
*B. Conjugués quinacridines-Bodipy **23**, **24**, **25**.* . . . . *p 55*
IV. Conclusions et perspectives. . . . . p 57

Chapitre 3 : Mise au point d'un test FID (Fluorescent Intercalator Displacement) pour l'ADN quadruplexe. . . . . . **p 59**

I. Interaction Thiazole Orange / ADN quadruplexe. . . . . p 59
A. Le Thiazole Orange : propriétés de fluorescence, interaction avec l'ADN. *p 59*
B. Thiazole Orange et ADN quadruplexe. . . . . . *p 60*
II. Principe du FID. Eléments bibliographiques. . . . . p 63
III. Le test G4-FID.
Evaluation de l'affinité de ligands potentiels d'ADN quadruplexe. . . p 65
A. Conception du test. . . . . . *p 65*
B. Résultats obtenus. . . . . . *p 66*

IV. « FID Comparatif ». Evaluation de la sélectivité quadruplexe *Vs* duplexe. . p 69
A. Conception du test. . . . . . *p 69*
B. Validation par des ligands connus. . . . . . *p 69*
V. Conclusions et perspectives. . . . . p 71
A. Avantages et limites du test. . . . . . *p 71*
B. Perspectives. . . . . . *p 71*

Chapitre 4 : Un système FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) spécifique de l'ADN quadruplexe. . . . . p 73
I. Le phénomène de FRET. . . . . p 73
A. Principe du FRET. . . . . . *p 73*
B. FRET et ADN. Eléments bibliographiques. . . . . *p 75*
II. Une paire FRET sélective de l'ADN quadruplexe. . . . . p 77
A. Choix du système de chromophores. . . . . . *p 77*
B. Phénomène de FRET résultant du complexe ternaire ***BOQ*$_1$*/TO**/22AG.* . *p 78*
C. Vers une signature de l'ADN quadruplexe ? . . . . *p 80*
III. Conclusions et perspectives. . . . . p 83

Partie II. Synthèse et étude de fluorophores à deux photons pour le marquage covalent d'ADNs natifs. . . . . p 85

Chapitre 1 : La fluorescence excitée à deux photons. . . . p 87
I. Principe de la fluorescence sous excitation biphotonique. . . . p 87
A. Principe de l'absorption biphotonique. . . . . . *p 87*
B. Section efficace d'absorption à deux photons. . . . . *p 88*
C. Fluorescence excitée à deux photons. . . . . . *p 90*
II. La microscopie de fluorescence à deux photons. . . . . p 91
A. La microscopie de fluorescence : bref rappel. . . . . *p 91*
B. Le microscope de fluorescence à deux photons. . . . . *p 92*
III. Fluorophores optimisés pour l'absorption à deux photons. Relations structure / propriétés. . . . . p 96
A. Structures quadrupolaires. . . . . . *p 97*
B. Structures octupolaires. . . . . . *p 99*
C. Systèmes divers. . . . . . *p 102*
D. Applications à la biologie. . . . . . *p 103*
IV. Objectifs. . . . . p 105

Chapitre 2 : Synthèse de fluorophores dérivatisables optimisés pour la fluorescence à deux photons. . . . . p 107
I. Stratégies de synthèse envisagées. . . . . p 107
II. Synthèse des triphénylamines de type **46**, **47**. . . . . p 108
A. Réactions d'amination arylique. . . . . . *p 108*
B. Réactions d'halogénation. . . . . . *p 111*
C. Obtention des intermédiaires aldéhydes. . . . . *p 113*
III. Fonctionnalisation par des groupes électroattracteurs.. . . . p 118
A. A partir des intermédiaires halogénés. . . . . . *p 118*
B. A partir des intermédiaires aldéhydes. . . . . . *p 120*
C. Groupements électroattracteurs chargés. . . . . *p 123*
IV. Obtention d'un linker fonctionnel pour le couplage à des biomolécules. . p 125

A. Réaction de couplage peptidique. . . . . . *p 125*
B. A partir de l'intermédiaire méthoxy. . . . . . *p 127*
V. Conclusions et perspectives. . . . . p 129

Chapitre 3 : Propriétés des composés obtenus. . . . . p 131
I. Stabilité et solubilité en milieu aqueux. . . . . p 131
A. Stabilité. . . . . . *p 131*
B. Solubilité. . . . . . *p 132*
II. Propriétés optiques linéaires. . . . . p 133
A. Dérivés neutres. . . . . . *p 133*
B. Dérivés cationiques. . . . . . *p 139*
III. Absorption à deux photons des composés obtenus. . . . . p 142
A. Mesure de fluorescence excitée à deux photons : montage expérimental. *p 142*
B. Résultats obtenus. . . . . . *p 143*
IV. Marquage d'ADN par les dérivés vinylpyridinium. . . . . p 149
A. Etudes in vitro. . . . . . *p 149*
B. Etudes en microscopie. . . . . . *p 152*
V. Conclusions et perspectives. . . . . p 154

Conclusions et perspectives. . . . . p 157

Références bibliographiques. p 159

Publications. p 167

Partie expérimentale. p 169

Annexe A : Récapitulatif des composés testés. p 227

Annexe B : Spectres de fluorescence des composés testés. p 231

Annexe C : Mesure des sections efficaces d'absorption à deux photons. p 233

Annexe D : ADNs immobilisés sur des surfaces. p 239

Annexe E. p 249

Remerciements

Ce travail a été effectué pour la plus grande part au Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires, au Collège de France. Je remercie le Pr. Jean-Marie Lehn de m'y avoir accueillie. Je le remercie également d'avoir accepté de juger mon travail.

Je remercie aussi le CNRS et le CEA pour le financement de ma bourse de thèse.

Je remercie les Dr. Martine Demeunynck et Jean-Louis Mergny d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteurs et les Pr. Jacques Delaire et Louis Fensterbank d'avoir accepté de juger mon travail.

Les résultats présentés dans ce manuscrit sont le fruit d'un travail d'équipe et je souhaite remercier tout particulièrement les personnes qui y ont contribué directement. Tout d'abord Marie-Paule Teulade-Fichou, qui a dirigé cette thèse. Je la remercie vivement pour m'avoir toujours encouragé à travailler à l'interface entre la chimie, la biologie et la physique et ainsi permis de beaucoup apprendre. Je la remercie aussi pour son enthousiasme tout au long de ce travail, et pour la confiance qu'elle m'a témoignée, sans lesquels le travail sur les triphénylamines, qui a débuté avec ma thèse, n'aurait probablement pas donné de résultats. La liberté qu'elle m'a laissée pour mener ces travaux a constitué une formation très précieuse pour moi. Je remercie aussi Fabrice Charra, qui m'a accueillie au sein du Groupe Nanophotonique, au SPCSI, CEA Saclay. J'ai beaucoup apprécié sa rigueur scientifique et aussi son enthousiasme et sa gentillesse. J'adresse un grand merci à Céline Fiorini, avec qui j'ai effectué les mesures d'absorption à deux photons. Elle m'a toujours témoigné une très grande disponibilité et gentillesse, aussi bien pour les mesures en elles-mêmes que pour les discussions sur la thèse et sur la suite. Je remercie vivement David Monchaud, qui a beaucoup contribué aux expériences de fluorescence sur l'ADN quadruplexe et qui a su partager avec moi ses grandes connaissances bibliographiques sur l'ADN quadruplexe, avec un enthousiasme communicatif et une grande gentillesse. Toutes nos discussions, sur ce sujet et sur d'autres, m'ont été d'une aide précieuse. Je le remercie aussi pour avoir passé une partie de son congé de paternité à relire ce manuscrit. Je remercie Markus Kaiser, qui a synthétisé deux des conjugués quinacridines-fluorophores testés lors de ce travail. Sa capacité à faire de la chimie à l'échelle du milligramme s'est révélée ici un atout précieux. Rémy Lartia a beaucoup contribué à la synthèse des triphénylamines. Les molécules qu'il a synthétisées constituent une part importante des composés testés lors de ce travail, et toutes les discussions que nous avons eues m'ont beaucoup appris et m'ont grandement aidée dans ce travail de

synthèse organique. Merci beaucoup ! Je remercie aussi Guillaume Bordeau, qui a effectué son stage de master sur le projet « triphénylamines » et qui a lui aussi beaucoup contribué aux résultats obtenus sur ce projet. Je remercie Falk Schmidt, qui a marqué des cellules avec les dérivés de triphénylamines et réalisé les images de microscopie, et a aussi synthétisé quelques une des molécules testées lors de ce travail.

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes croisées au Collège et à Saclay pour leur aide plus ou moins directe et pour l'ambiance extrêmement sympathique dans laquelle se sont déroulées ces quatre années : Béatrice Lehoux dont j'ai pu apprécier la rapidité et l'efficacité face aux problèmes administratifs, Josée Brienne, « voisine » de labo dont j'ai pu grandement apprécier l'organisation et qui s'est toujours montré très disponible pour répondre à mes questions, Nicolas Saettel, notamment pour toutes les solutions informatiques apportées au labo, Hélène Bertrand et Lucie Vandromme qui ont eu le courage de relire la partie expérimentale de ce manuscrit, Elsa DeLemos, Peng Yang, Sadia Bouteite que j'ai eu la chance d'encadrer pendant son stage technicien, Guillaume Schull, Ludovic Douillard, Jean-Pierre Vigneron, Valérie Marchi-Artzner, Philippe Fedel, Jacqueline Soupault, Michel Dhaenens, Robert Méric, Candide Hounsou, Ben Martin, Matthieu Sainlos.

Enfin je remercie mon mari, Jean-Marc, qui m'a soutenue tout au long de cette thèse.

Abréviations utilisées :

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messager

AFM : microscopie à force atomique (ou Atomic Force Microscopy)

BET : Bromure d'Ethidium

BINAP : 2,2'-bis(diphénylphosphino)-1,1'-binaphtyle.

Boc : *tert*butoxycarbonyle

BODIPY : complexe difluoroboronique de dipyrrométhène

bp : base pair / paire de base

Bu : butyle ^{t}Bu : *tert*-butyle

C : cytosine

CI : Ionisation Chimique ou Chemical Ionisation

Da : Dalton

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DC_{50} : concentration nécessaire pour déplacer 50 % d'une sonde fluorescente d'un ADN

DMF : N,N-diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DO : densité optique

EDCI : hydrochlorure de *N*-(-3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide

éq. : équivalent

ESI-MS : Spectrométrie de Masse par Ionisation Electrospray

FAB : Fast Atomic Bombardment

FID : Fluorescent Intercalator Displacement

FLIM : imagerie de temps de vie de fluorescence ou Fluorescence Life Time Imaging

FRAP : réapparition de la fluorescence après photoblanchiment ou Fluorescence Recovery After Photobleaching

FRET : Fluorescence ou Förster Resonance Energy Transfert

G : guanine

GM : Göppert-Mayer (unité de mesure des sections efficaces d'absorption à deux photons)

Hex : hexyle

HIV : Virus de l'Immunodéficience Humaine

HOAt : 1-hydroxy-7-azabenzotriazole

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Pression ou High Pressure Liquid Chromatography

hTERT : human Telomerase Reverse Transcriptase

hTR : human Telomerase RNA

HWE : Horner Wadsworth Emmons (reaction de)

Kb : kilobase

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization –Time of Flight

MANT : N-méthyl anthranilamide

mp : melting point ou point de fusion

MS : mass spectroscopy ou spectrométrie de masse

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

NBS : N-Bromosuccinimide

NHS : N-Hydroxysuccinimide

Non : noyle

Oct : octyle

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : polyéthylène glycol

PNA : Peptid Nucleic Acid

RMN : résonance magnétique nucléaire

RX : rayons X

rt : room temperature ou température ambiante

SPR : résonance de plasmon de surface ou Surface Plasmon Resonance

STM : microscopie à effet tunnel ou Scanning Tunnelling Microscopy

T : thymine

TBA : Thrombin Binding Aptamer

TEA : tampon tris-EDTA

TFA : acide trifluoroacétique

TFO : ADN simple brin pouvant former une structure triplexe par liaison à un duplexe

THF : tétrahydrofuranne

TLC : Thin Layer Chromatography

TO : Thiazole Orange

YO : Oxazole Yellow

UV-Vis : Ultraviolet - Visible

Introduction générale

I. La fluorescence : une technique incontournable en biologie.

A. Le principe de l'émission de fluorescence.

Le terme *luminescence* désigne l'émission d'un photon par une espèce dans un état électronique excité. La *fluorescence* et la *phosphorescence* sont deux cas particuliers de luminescence, pour lesquels le mode d'excitation est l'absorption d'un photon. Le diagramme de Jablonski, représenté sur la figure 1, illustre l'absorption et l'émission de photons par une molécule. La fluorescence est l'émission de photons qui se produit lors de la transition de la molécule de l'état excité S_1 vers l'état fondamental S_0. La durée de vie de l'état excité S_1 varie typiquement de quelques dizaines de picosecondes à quelques nanosecondes. Dans le cas de la phosphorescence, processus que nous ne décrirons pas ici en détail, l'émission a lieu depuis le premier état excité triplet. Les durées de vies de cet état s'échelonnent de quelques centaines de microsecondes à quelques secondes. Ces deux processus sont aussi en compétition avec plusieurs processus de désexcitation non radiative. On peut citer à titre d'exemple des phénomènes de retour à l'état fondamental sans émission de photons, des changements de conformation, des transferts d'électrons ou de protons photoinduits ou des transferts d'énergie à une autre molécule…[1,2]

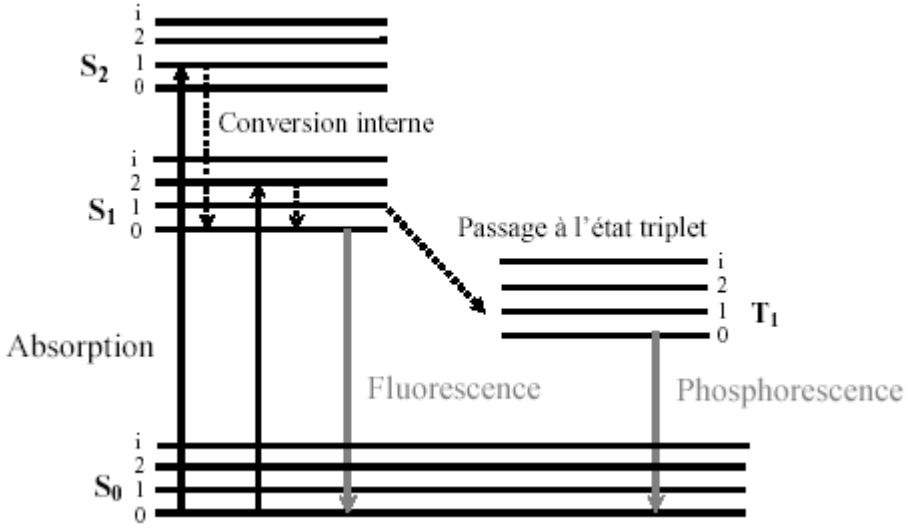


Figure 1 : diagramme de Jablonski. S_0, S_1 et S_2 désignent respectivement l'état fondamental singulet, le premier et le deuxième état excité singulet, T_1 est le premier état triplet. Pour chacun de ces états, plusieurs états vibrationnels notés 0,1,2…existent. Figure extraite de Guiot, E.[2]

Les conversions internes ayant lieu entre les phénomènes d'absorption et d'émission de fluorescence entraînent des pertes d'énergie. De ce fait, la longueur d'onde maximale d'émission $\lambda_{ém}$ est toujours supérieure à la longueur d'onde maximale d'absorption λ_{abs}. Le déplacement de Stokes est défini comme l'écart entre ces deux longueurs d'onde. Par ailleurs, le rendement quantique de fluorescence est défini comme le rapport Φ_F entre le nombre de photons de fluorescence émis par la molécule et le nombre de photons absorbés.

La fluorescence est une technique d'analyse qui connaît un grand succès pour l'étude de la structure et de la dynamique de systèmes complexes, vivants ou non. Ce succès provient de la grande sensibilité de cette technique (détection de composés à des concentrations nanomolaires), de sa capacité à apporter des informations spatiales et temporelles sur le phénomène étudié, de sa relative simplicité de mise en œuvre (comparé par exemple à l'utilisation de traceurs radioactifs) et de la sensibilité à l'environnement de la sonde fluorescente.[1]

B. Applications à la biologie : des avancées instrumentales considérables.

Les phénomènes biologiques à l'origine du fonctionnement des organismes vivants ont pour point commun d'être contrôlés par des interactions intermoléculaires. Ces interactions ont souvent lieu au sein d'assemblages dynamiques de différentes macromolécules (acides nucléiques, protéines). Les systèmes impliqués dans la réplication de l'ADN, sa réparation, sa transcription en ARN… ne sont que quelques exemples de tels assemblages dynamiques. L'étude de ces assemblages supramoléculaires requiert l'identification des différentes macromolécules impliquées ainsi que l'analyse de la dynamique et de la régulation de leurs interactions. Une telle étude est essentielle pour la compréhension des mécanismes régissant les différentes fonctions cellulaires et de leurs dérèglements dans différentes pathologies.

Plusieurs techniques appartenant au domaine de la photonique peuvent être appliquées à de telles problématiques, par exemple la microscopie en champ proche (AFM, STM) ou différentes techniques utilisant la spectroscopie ou la microscopie de fluorescence. Ces techniques ont connu des avancées remarquables, allant de pair avec une meilleure compréhension de phénomènes biologiques variés.

Parmi les avancées de la spectroscopie de fluorescence, on peut citer les développements de la fluorescence résolue en temps, qui permettent l'étude de phénomènes à l'échelle de la femtoseconde, par exemple des transferts de charge.[1] Les études à l'échelle de la molécule unique ont elles aussi connu un développement considérable.[3] Enfin et pour se limiter à

quelques exemples, on peut citer les nombreuses applications du FRET (pour Förster ou Fluorescent Resonant Energy Transfert),[4] utilisé dans certains cas à l'échelle de la molécule unique. Dans le domaine des acides nucléiques, le FRET à l'échelle de la molécule unique a ainsi été utilisé pour étudier le repliement de différentes structures d'ARN,[3] ou encore pour étudier les différentes conformations d'un ADN quadruplexe.[5]

En ce qui concerne les développements de la microscopie de fluorescence, outre les améliorations considérables obtenues en traçage optique grâce à l'utilisation de la microscopie confocale et de la microscopie sous excitation biphotonique, on peut citer, toujours sans chercher à être exhaustif, les méthodes basées sur le FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching ou Réapparition de la Fluorescence Après Photoblanchiment) permettant d'étudier la diffusion de molécules dans un milieu complexe, ou encore les études de FLIM (Fluorescence Life Time Imaging ou Imagerie par Temps de Vie de Fluorescence).

Ces techniques peuvent *a priori* être utilisées avec des fluorophores endogènes, tels le tryptophane ou le NADH. Cependant, leur potentiel est grandement élargi par l'utilisation de sondes fluorescentes exogènes, adaptées à l'application visée. Le développement de nouvelles sondes fluorescentes optimisées pour une technique va donc de pair avec le développement de l'instrumentation.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au cours de cette thèse à différentes sondes fluorescentes pour le marquage d'ADN, en développant deux axes de travail principaux. Le premier concerne la synthèse et l'étude de sondes pour le marquage non covalent d'ADN par reconnaissance structurale : nous avons pris pour cible l'ADN quadruplexe et tenté de concevoir des systèmes fluorescents spécifiques de cette structure. Le deuxième axe concerne le développement de fluorophores optimisés pour la microscopie multiphotonique et destinés au marquage d'ADN. Deux séries de marqueurs ont été synthétisées. L'une, cationique, permet un marquage non covalent de l'ADN. L'autre, neutre, est constituée de composés dérivatisables permettant un marquage covalent. Enfin, nous avions projeté d'étudier les processus de transfert de charge dans des oligonucléotides modifiés par des fluorophores, *via* des études de microscopie à effet tunnel (STM). Cette partie, qui nécessitait dans un premier temps l'immobilisation des oligonucléotides sur des surfaces, s'est avérée plus délicate techniquement et n'a pas pu être développée à la hauteur des deux autres. Elle sera présentée en annexe. En ayant pour ligne directrice le marquage d'ADN, nous avons ainsi été amenés à aborder des domaines très divers. De ce fait, le contexte scientifique afférent à chacun de ces domaines sera présenté au début de chaque

partie. Nous présentons ici brièvement les différentes stratégies existantes pour marquer l'ADN.

II. Marquage d'ADN par des sondes fluorescentes.

A. Structure de l'ADN : bref rappel.

L'unité de base de la molécule d'ADN est le nucléotide, composé d'une base, d'un sucre et d'un groupement phosphate. Le sucre présent dans l'ADN est le D-déoxyribose, les quatre bases sont l'adénine (A), la guanine (G), la cytosine (C) et la thymine (T) (figure 2). Les bases sont reliées au sucre par une liaison N-glycosidique impliquant le C1' du sucre et l'azote N9 pour les purines (A et G) et N1 pour les pyrimidines (C et T).

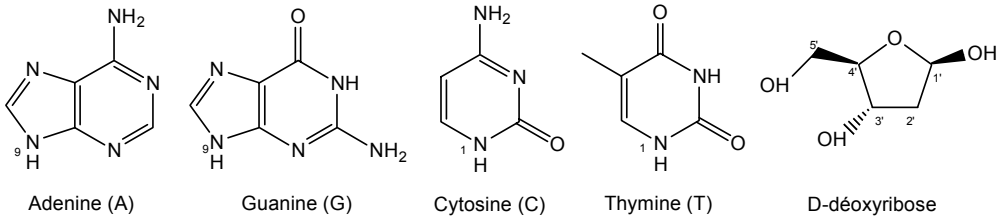


Figure 2 : bases et sucre présents dans l'ADN.

Un brin d'ADN est formé de nucléotides liés par une liaison phosphodiester entre le phosphate en 5' d'un nucléotide et le OH en 3' du nucléotide suivant. La double hélice d'ADN se forme par appariement de deux bases (paires CG ou AT) par liaison hydrogène de type Watson-Crick (figure 3), les interactions de π-stacking entre les doublets de bases stabilisant cette structure.[6]



Figure 3 : liaisons hydrogène de type Watson-Crick entre les bases de l'ADN.

Depuis la découverte, en 1953, de la structure en double hélice de l'ADN par Watson et Crick, de nombreuses études ont montré que l'ADN pouvait former des hélices d'ordre supérieur, à trois ou quatre brins.[6] Les structures d'ADN en triple hélices sont connues depuis 1957.[7] Leur formation repose sur la mise en place de liaisons hydrogène, appelées liaisons Hoogsteen, entre les bases d'un troisième brin et celles de l'un des deux brins d'une double hélice d'ADN (figure 4). Elles sont donc constituées d'empilements de triplets de base. Ces structures en triple hélice ont suscité un grand intérêt depuis les années 1980 en raison de

leurs applications potentielles pour le contrôle de l'expression d'une séquence donnée. Les quadruplexes de guanine (figure 4), résultant de l'empilement de quartets de guanine, sont eux connus depuis 1962. Ils sont actuellement l'objet d'un intérêt considérable en raison de leur formation potentielle dans des zones stratégiques du génome.

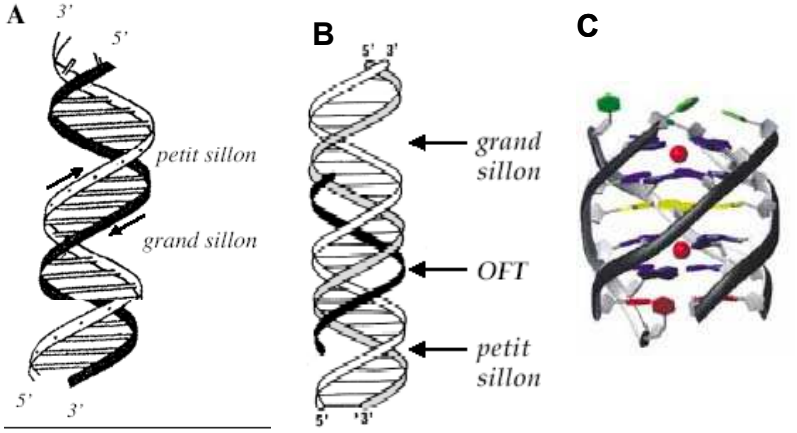


Figure 4 : **A.** double **B.** triple et **C.** quadruple hélices d'ADN. (images extraites de Géron-Landre B.[8] pour A et B et de Searle *et al.* [9] pour C).

B. Marquage non covalent d'ADN.

On distingue deux grands modes de fixation dans l'ADN pour les petites molécules : la fixation dans les sillons, par interaction électrostatique et liaisons H avec les bases et les phosphates du squelette et l'intercalation, c'est-à-dire l'insertion entre deux paires de bases par interaction de stacking aromatique.

Ces deux modes de fixation ont été mis à profit pour concevoir des fluorophores spécifiques de l'ADN duplexe. Parmi les intercalants (figure 5), on peut citer les dérivés d'éthidium, le pyrène, les acridines, des cyanines monométhines, tels le **TO** (Thiazole Orange) et le **YO** (Oxazole Yellow)… Parmi les ligands de sillons (figure 5), on peut citer le dérivé de benzimidazole **Hoescht 33258** et le 4',6-diamidino-2-phenylindole (**DAPI**). Les marqueurs les plus performants présentent une forte exaltation de fluorescence en présence d'ADN. Les intercalants ont généralement une spécificité de séquence peu marquée tandis que les ligands de sillons ont souvent une préférence pour les régions AT du petit sillon. Ces molécules induisent donc généralement un marquage assez homogène de l'ADN. Suivant leurs propriétés de pénétration cellulaire et de cytoxicité, ces marqueurs peuvent trouver des applications *in vitro*, par exemple pour la détection sur gel, ou en cellules, vivantes ou fixées.

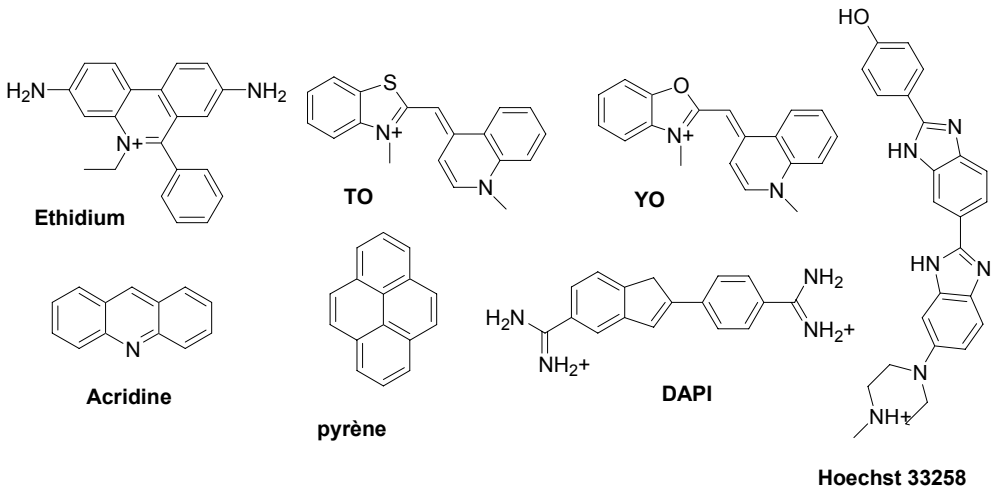


Figure 5 : structure de quelques marqueurs fluorescents d'ADN.

Si l'on veut cibler un site spécifique (séquence ou structure locale), il faut augmenter la complexité structurale des marqueurs. Ainsi, afin d'obtenir une sonde fluorescente spécifique d'une séquence il est nécessaire de conjuguer le marqueur fluorescent à un élément de reconnaissance de la séquence visée, par exemple un oligonucléotide formant un triplexe (TFO pour Triplex Forming Oligonucléotide)[10] ou un polyamide de type pyrrole-imidazole.[11] Cette stratégie, largement développée, est très efficace *in vitro.*

La reconnaissance de structures particulières de l'ADN - structures multibrins, bulges, hairpins, sites abasiques, mésappariemments - par des systèmes fluorescents est un domaine qui s'est développé récemment. Ceci est dû à la difficulté de conception de sondes associant une reconnaissance spécifique de la structure visée à des propriétés de fluorescence adaptées. La conception de tels marqueurs vise deux types d'applications. La première est une application comme outil pour étudier dans des systèmes *in vitro* plus ou moins complexes la structure cible et son interaction avec des ligands. La deuxième application est la détection en milieu complexe (en présence d'un large excès d'autres formes d'ADN, voire en milieu cellulaire). Ce type d'application constitue un véritable défi car il impose une extrême sélectivité de la sonde pour la structure visée.

C. Les méthodes covalentes de marquage d'ADN.

Les techniques de marquage non covalentes ont la caractéristique intrinsèque de ne pas assurer que l'ADN et la sonde restent liés. Le marquage covalent assure au contraire un lien stable entre l'ADN et la sonde. Celle-ci peut alors être choisie uniquement pour ses propriétés de fluorescence, sans se préoccuper de son affinité pour l'ADN. Si les techniques de synthèse sur support solide permettent relativement facilement de greffer un fluorophore sur un

oligonucléotide, le marquage d'acides nucléiques de longue taille pose plus de difficultés. Plusieurs méthodes existent, toutes ont des avantages et des inconvénients. Nous présentons ici les plus courantes, sans constituer une liste exhaustive.

1° Les méthodes non sélectives.

a) les agents alkylants.

Plusieurs agents alkylants ont été utilisés pour attacher de façon covalente divers composés à l'ADN. D'une manière générale, il s'agit de dérivés de composés très réactifs ou générant des espèces réactives et déjà connus pour leur capacité à établir des liaisons avec les acides nucléiques. Le développement de composés alkylant un seul brin de l'ADN permet de marquer des plasmides en limitant l'altération de leur structure et de leurs fonctions. La figure 6 donne un exemple d'un composé de ce type.

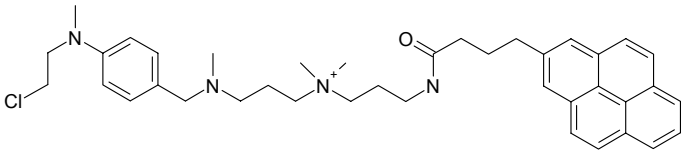


Figure 6 : structure d'un dérivé fluorophore monoalkylant de type « moutarde à l'azote ». [12]

b) les sels de platine.

La capacité des sels de platine à se fixer au niveau de la position N-7 des guanines a été largement étudiée. Cette propriété a été utilisée pour le marquage fluorescent des acides nucléiques.[13] L'approche repose sur l'utilisation de complexes monofonctionnels de Pt(II) dérivatisés par des fluorophores. Les composés ainsi obtenus (figure 7), contrairement aux dérivés bifonctionnels du platine (par exemple le cis-platine), ne forment plus qu'une seule liaison avec l'ADN évitant ainsi la création de ponts entre chaînes, ce qui doit minimiser les perturbations de l'activité du plasmide.

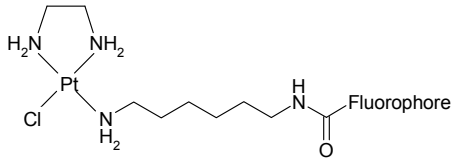


Figure 7 : structure générale de marqueurs fluorescents dérivés du Pt(II).

c) les p-*azoture d'aryles.*

Les dérivés *para*-azotures d'aryles sont activés par irradiation autour de 350 nm pour conduire à des espèces intermédiaires qui réagissent de préférences avec des nucléophiles

(résidu actif ou solvant), selon le schéma présenté figure 8. Les dérivés perfluorés des azotures d'aryles sont plus réactifs que leurs homologues non fluorés. Cette technique a été utilisée pour lier de manière covalente des fluorophores aux plasmides.[14]

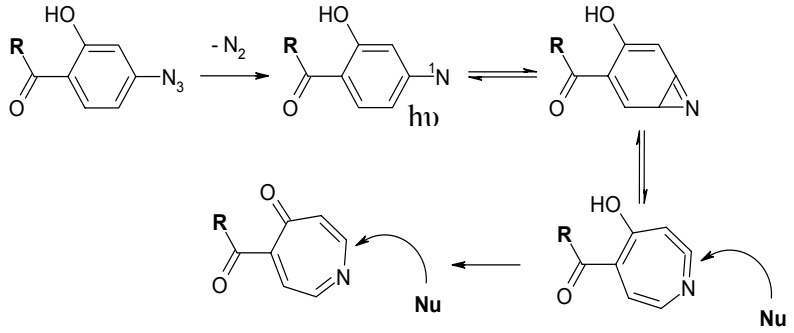


Figure 8 : schéma réactionnel simplifié de la photolyse d'un dérivé de l'azoture de 3-hydroxyphényle (schéma extrait de Sainlos M.[15]).

d) L'incorporation de dérivés fluorescents de nucléotides.

En parallèle des méthodes chimiques présentées ci-dessus, différentes méthodes enzymatiques assurant la réplication ou l'amplification d'une molécule d'ADN, comme par exemple la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) permettent l'incorporation de nucléotides fluorescents, ou de nucléotides modifiés (souvent par une fonction aminoallyl) pouvant ensuite être marqués par un fluorophore. Cette technique est toutefois assez dépendante de la séquence à répliquer.

2° Les approches sélectives pour le marquage d'ADN natif.

Les méthodes précédentes, si elles sont relativement simples à mettre en œuvre, ne permettent pas de contrôler les positions de marquage et n'offrent qu'un contrôle limité du nombre de fluorophores introduits sur l'ADN, *via* la stœchiométrie de la réaction de marquage. Des systèmes de marquage plus sélectifs ont donc été développés.

a) La stratégie triplexe.

Le couplage de fluorophores à un TFO, présentée précédemment, peut être adapté pour obtenir un marquage, qui bien que non covalent au sens strict du terme s'avère extrêmement robuste. Dans ce cas, l'oligonucléotide utilisé pour le marquage comporte une séquence formant un triplexe et des extrémités susceptibles d'être refermées par catalyse enzymatique après formation du triplexe (figure 9). Il se forme ainsi un « cadenas » par caténation de l'oligonucléotide autour de sa cible, ce qui assure une fixation très robuste. Un nombre

variable de fluorophores peut-être greffé sur la « tige » reliant le cadenas au triplexe, par l'une ou l'autre des méthodes non spécifiques décrites plus haut.[16,17]

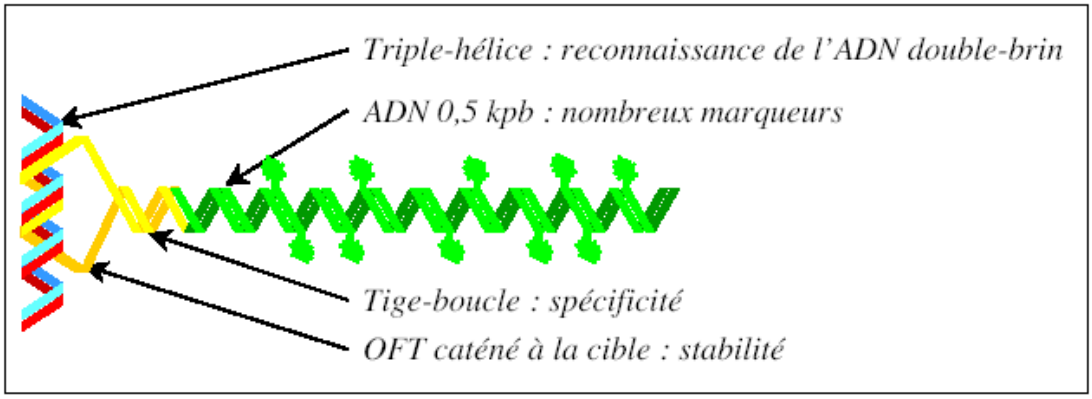


Figure 9 : principe du marquage d'ADN à l'aide de triplexes cadenas. Image extraite de Géron-Landre, B.[8]

b) Synthèse sur les extrémités.

La synthèse sur les extrémités (3' ou 5') des acides nucléiques est envisageable dans le cas particulier des plasmides linéaires. Les méthodes de synthèse classiques des oligonucléotides peuvent *a priori* être envisagées ou bien celles employant des enzymes de ligation pour insérer des oligonucléotides fonctionnalisés. Ces méthodes ne permettent que d'introduire un nombre limité de signaux de manière très localisée.

b) La méthode de Smiling DNA.

Le Smiling DNA (pour Sequence-specific Methyltransferase Induced Labeling of DNA) est une méthode enzymatique qui permet de coupler un cofacteur synthétiquement modifié au niveau de la séquence de reconnaissance d'une méthyltransférase (figure 10).[18,19] La méthode repose sur l'utilisation de méthyltransférases et d'un cofacteur synthétique comportant un fluorophore et une fonction aziridine qui permet l'alkylation, suivant l'enzyme utilisée, de la position N-6 de l'adénosine ou la position N-4 ou C-5 de la cytosine suivant la séquence de reconnaissance. Le nombre de fluorophores greffés sur un plasmide est donc déterminé par le nombre de séquences de reconnaissance présentes sur ce plasmide, qui varie avec la méthyltranférase utilisée. Cette méthode présente l'avantage d'associer l'efficacité d'une catalyse enzymatique à un contrôle précis du nombre et de la position des sites de marquage.

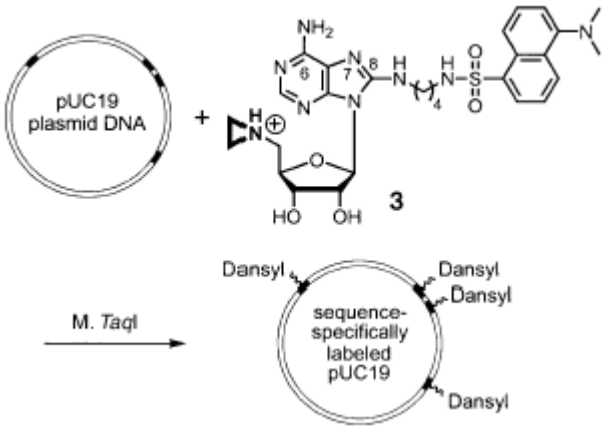


Figure 10 : principe de la méthode Smiling DNA, le fluorophore est dans ce cas le dansyle. Image extraite de Pljevaljcic *et al*.[19]

Toutes ces méthodes de marquage, chimiques ou enzymatiques, impliquent l'utilisation de systèmes fluorescents dérivatisables pouvant être couplés à l'agent chimique ou au cofacteur synthétique qui va ensuite réagir sur l'ADN.

Partie I

Marquage non covalent

par reconnaissance structurale.

Exemple de l'ADN quadruplexe.

Chapitre I-1 : l'ADN quadruplexe. Eléments bibliographiques.

Ce chapitre d'introduction a pour objectif de présenter la structure de l'ADN quadruplexe, son polymorphisme et ses rôles biologiques potentiels. Nous nous intéresserons ensuite aux ligands d'ADN quadruplexe les plus efficaces et les plus étudiés à ce jour, ainsi qu'aux principales techniques utilisées pour déterminer l'affinité et la sélectivité d'un composé pour l'ADN quadruplexe. Nous présenterons enfin les applications possibles du marquage d'ADN quadruplexe par des fluorophores et les travaux réalisés précédemment dans ce domaine.

I. L'ADN quadruplexe – structure.

A. Tétrades de guanines et ADN quadruplexe.

On sait depuis le début du XX^{ème} siècle que les dérivés de la guanine ont tendance à former des gels visqueux dans l'eau. En 1962, des études par diffraction des rayons X ont permis d'expliquer ce comportement particulier en mettant en évidence l'existence de tétrades de guanines, qu'on appelle aussi G-quartets. Ces G-quartets résultent de l'association de quatre guanines coplanaires par des liaisons hydrogène de type Hoogsteen (figure I-*1*-1A).[20]

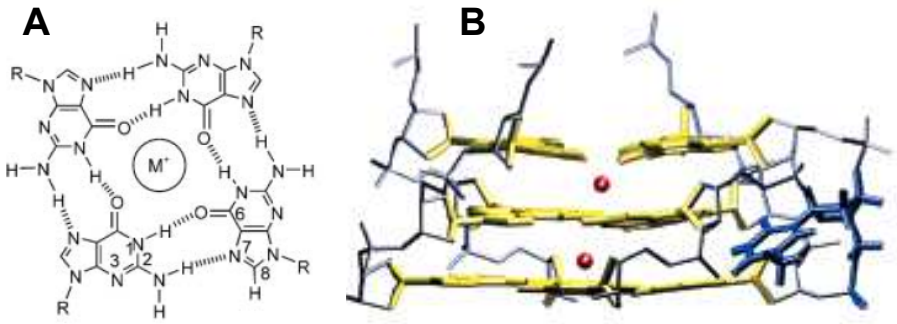


Figure I-*1*-1 : **A.** Tétrade de guanines. M^+ est un cation, métallique ou non. **B.** G-quadruplexe : les guanines constituant les tétrades sont représentées en jaune, les acides nucléiques constituant les boucles en bleu et le cation en rouge (image extraite de Neidle *et al.* [21]).

Des brins d'ADN riches en G peuvent ainsi former des structures à 4 brins appelées quadruplexes de guanine ou G-quadruplexes, résultant de l'empilement de plusieurs G-quartets, cet empilement étant stabilisé par interaction de π-stacking (figure I-*1*-1B). Les quadruplexes de guanine ne peuvent se former qu'en présence de cations qui sont piégés entre deux tétrades de guanine, par coordination avec huit atomes d'oxygène des groupements carbonyles des guanines. De nombreux cations, métalliques ou non, peuvent stabiliser la

structure quadruplexe à condition que leur rayon ionique corresponde bien à la taille de la cavité entre les deux tétrades de guanine.[20,22] Ainsi, les ions K^+, présents en milieu biologique, stabilisent fortement les quadruplexes de guanine. Les ions Na^+, eux aussi présents en milieu biologique, stabilisent cette structure mais dans une moindre mesure, alors que, par exemple, la présence d'ions Li^+ n'induit pas de stabilisation.[22]

B. Une grande diversité structurale.

1° Diversité structurale due à la stoechiométrie et à la polarité des brins.

De nombreux types de G-quadruplexes ont été mis en évidence. Ainsi, des G-quadruplexes formés à partir d'un, deux ou quatre brins d'ADN ont été observés (figure I-*1*-2). Dans chacune de ces structures, les quatre brins peuvent avoir des polarités 5'-3' identiques (on parle alors de brins parallèles) ou inversées (brins antiparallèles). Les guanines peuvent adopter une conformation syn ou anti (figure I-*1*-3) : deux guanines adjacentes impliquées dans la même tétrade doivent avoir la même conformation si elles sont sur deux brins parallèles et des conformations opposées si elles sont sur deux brins antiparallèles. Suivant l'alternance de brins parallèles ou anti-parallèles, les quatre sillons du quadruplexe peuvent être identiques ou de tailles différentes.

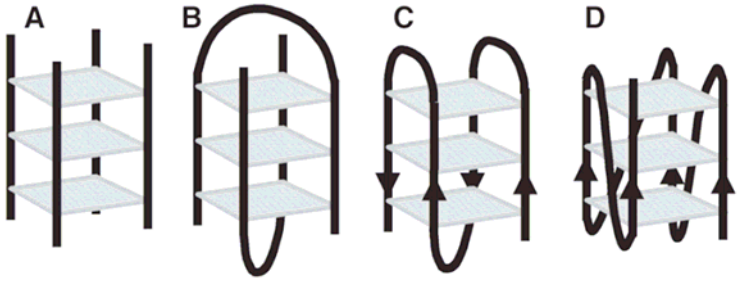


Figure I-*1*-2 : Exemples de structures quadruplexes **A.** tétramoléculaire **B.** bimoléculaire **C.** et **D.** intramoléculaire (image extraite de [23]).

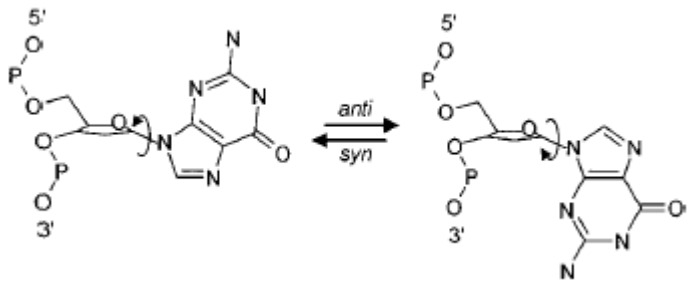


Figure I-*1*-3 : conformations syn et anti d'un nucléotide (guanine G).

2° Diversité structurale due à la séquence.

L'arrangement des boucles connectant les tétrades du quadruplexe varie suivant l'oligonucléotide. Ces boucles peuvent ainsi être latérales (figure I-*1*-4A), diagonales (figure I-*1*-4B) ou externes (figure I-*1*-4C). Ceci peut être illustré par trois études RMN. L'une a été menée sur l'oligonucléotide de séquence d($G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2$), aptamère de la thrombine, qui adopte en présence d'ions potassium une forme « chaise » antiparallèle avec uniquement des boucles latérales (figure I-*1*-4A).[24] De même, l'oligonucléotide mimant les répétitions de la séquence télomérique de *Oxytricha* (d(GGGG(TTTTGGGG)$_3$)) adopte une forme « panier » antiparallèle (figure I-*1*-4B).[25] Enfin, un oligonucléotide mimant les répétitions de la séquence télomérique de *Tetrahymena* (d(TTGGGG)$_4$) adopte une structure antiparallèle dite « double loop hybrid » (figure I-*1*- 4C).[26]

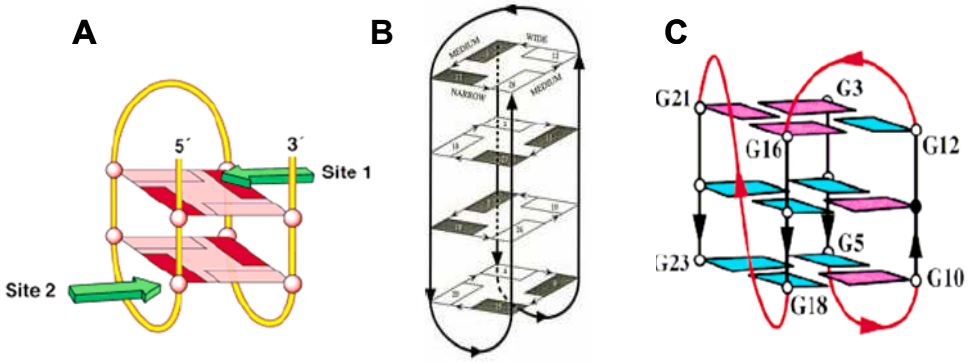


Figure I-*1*-4 : Exemples de structures quadruplexes intramoléculaires **A.** forme « chaise » (TBA) (image extraite de Hurley *et al.*[27]) **B.** forme « panier » (*Oxytricha)* (image extraite de Patel *et al.* [25]) **C.** « double loop hybrid » (image extraite de Patel *et al.*[28]).

3° Polymorphisme d'une même séquence.

La nature du cation joue un rôle fondamental dans la structuration de l'ADN quadruplexe. Ainsi, pour l'oligonucléotide mimant les répétitions de la séquence télomérique humaine (TTAGGG), la structure déterminée par RMN en présence d'ions sodium sur le 22-mer Tel22 (d(AGGG(TTAGGG)$_3$)) par Patel *et al.* est une forme « panier » antiparallèle (figure I-*1*-5A).[29] En revanche, en présence d'ions potassium, une forme parallèle de type « hélice » (« propeller » en anglais, figure I-*1*-5B) a été déterminée par cristallographie par Neidle *et al.*.[30] De nombreuses études, parfois contradictoires, employant des techniques biophysiques et biochimiques variées,[5,31-35] sur ce 22-mer ou sur le 21-mer correspondant (d(GGG(TTAGGG)$_3$)) ont ensuite montré qu'en solution cette structure était beaucoup plus polymorphique et qu'il existait probablement un équilibre entre plusieurs formes. Très récemment, une étude par dichroïsme circulaire sur des oligonucléotides modifiés (des 22-

mers où certaines guanines sont remplacées par des 8-bromoguanines)[36] et deux études RMN, l'une sur le 24-mer Tel24 de séquence d(TTGGG(TTAGGGG)$_3$A),[28] l'autre sur le 26-mer Tel26 de séquence d(AAAGGG(TTAGGGG)$_3$AA),[37] ont mis en évidence une forme « hybride » mixte parallèle / antiparallèle (figure I-*1*-5C) prédominante en présence d'ions K^+, qu'il y ait ou non des ions Na^+ dans la solution.

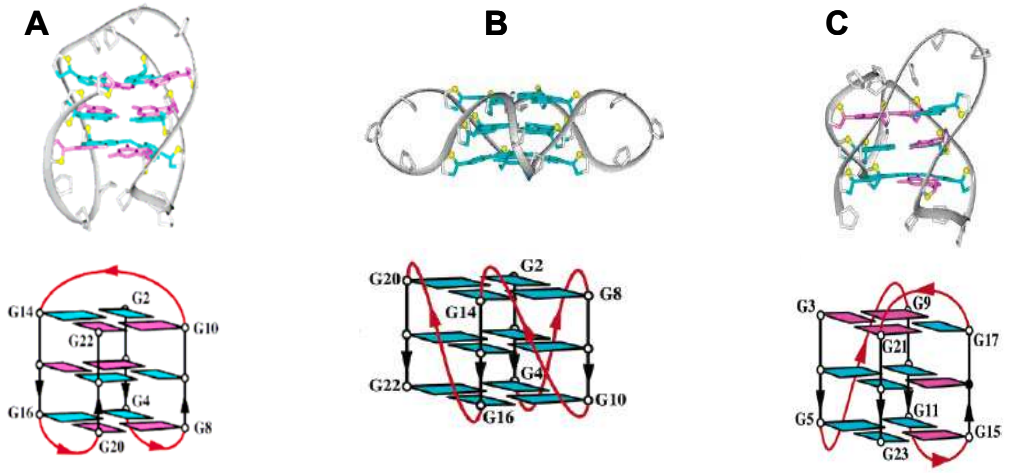


Figure I-*1*-5 : structure des quadruplexes intramoléculaires mimant les répétitions de la séquence télomérique humaine : **A.** en solution Na^+, **B.** structure cristalline en présence de K^+, **C.** en solution en présence de K^+.

Il faut noter l'importance des extrémités (bases non appariées) des oligonucléotides sur la structure quadruplexe adoptée : ainsi, Yang *et al.* mettent en évidence une forme hybride en présence d'ions K^+ pour l'oligonucléotide Tel26 mais observent, par RMN et par CD, un mélange de deux formes bien distinctes (probablement de la forme hybride et de la forme « panier » antiparallèle) pour Tel22 en présence d'ions K^+. Or, en milieu cellulaire il faut s'attendre à des structures plus complexes dues à l'empilement de plusieurs quadruplexes. La stabilité d'un tel empilement influence l'équilibre entre les différentes conformations possibles pour un quadruplexe. La forme « panier » antiparallèle serait ainsi défavorisée stériquement puisque les extrémités 5' et 3' et la boucle diagonale se trouvent du même côté du quadruplexe. Ceci est cohérent avec le fait que Yang *et al.* n'observent pas une forme bien définie pour l'oligonucléotide Tel26 en présence de Na^+ alors que l'oligonucléotide sans bases non appariées en 3' adopte une forme « panier » stable.[37]

Par ailleurs, Vorlickova *et al.* ont étudié différents oligonucléotides contenant un nombre variable de répétitions télomériques humaines (d(G_3($TTAG_3$)$_n$ n=1-16) et ont montré que le quadruplexe le plus stable et donc celui le plus susceptible de se former *in vivo* était celui constitué de trois tétrades.[38]

Enfin, plusieurs études ont montré qu'un ligand d'ADN quadruplexe était susceptible d'induire une conformation préférentielle. Ainsi, Hurley et *al.* ont montré par dichroïsme circulaire que l'ajout de télomestatine (figure I-*1*-6) à une solution d'oligonucléotide mimant la séquence télomérique humaine en présence de potassium induisait préférentiellement une forme quadruplexe « panier » alors que l'ajout de la porphyrine modifiée **Se2SAP** induisait la forme mixte hybride.[31]

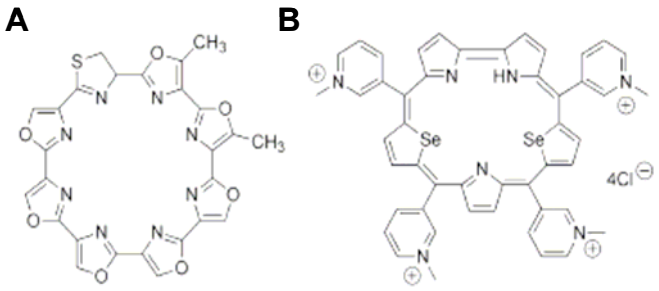


Figure I-*1*-6 : **A**. Télomestatine et **B.** Se2SAP.

L'ADN quadruplexe est donc une structure mouvante en interconversion. La structure tridimensionnelle adoptée par un oligonucléotide structuré en quadruplexe dépend en effet de la séquence de l'oligonucléotide (composition des boucles reliant entre elles les tétrades de guanines), du ou des cations présents mais aussi de la présence d'un ligand stabilisant cette structure. La compréhension de ce polymorphisme est un élément indispensable dans la reconnaissance structurale de l'ADN quadruplexe, à partir de laquelle on peut envisager l'obtention de composés ayant une sélectivité pour une forme particulière d'ADN quadruplexe. La large surface aromatique plane formée par une tétrade de guanines constitue néanmoins une caractéristique de cette structure, pouvant servir de cible pour la reconnaissance par des petites molécules.

II. Rôles biologiques.

A. Existence in vivo.

Il existe dans les génomes eucaryotes de nombreuses séquences d'ADN susceptibles de se structurer en quadruplexes de guanine. La formation de ces structures *in vivo* reste sujet à débat, néanmoins de nombreux arguments vont dans le sens de l'existence des G-quadruplexes *in vivo*. Tout d'abord, il faut noter que dans une cellule, les quatre cations métalliques présents à des concentrations supérieures au nanomolaire sont K^+ (150 mM), Na^+ (5 mM) , Mg^{2+} (0,5 mM) et Ca^{2+} (0,2 µM) : la structuration en quadruplexe d'une séquence

d'ADN riche en G est donc *a priori* favorisée en milieu biologique. De plus, il a été montré que ces séquences susceptibles d'adopter une structure quadruplexe sont très nombreuses : deux études bioinformatiques indépendantes ont calculé qu'il pourrait théoriquement se former jusqu'à 376000 G-quadruplexes au sein du génome humain.[39,40]

Par ailleurs, Boussin *et al.* ont mis en évidence, dans différentes lignées cellulaires, la fixation préférentielle aux extrémités des chromosomes (régions particulièrement riches en guanines) d'un ligand très sélectif des G-quadruplexes.[41] De plus, Schaffitzel *et al*. ont montré qu'il était possible de générer artificiellement des anticorps spécifiques d'une structure quadruplexe et que, chez un cilié, microorganisme possédant un macronoyau contenant de très nombreux chromosomes, donc de très nombreux télomères, ces anticorps se fixaient spécifiquement dans les régions riches en guanines du génome.[42] De même, des protéines se liant de façon sélective à des séquences d'ADN structurées en G-quadruplexes ont été mises en évidence, ainsi que des protéines induisant la structuration en quadruplexe et des protéines capables de dénaturer ces structures.[22] Ainsi, Paeschke *et al.* ont montré, toujours sur un cilié, que les « telomer end-binding proteins » contrôlaient *in vivo* la formation des quadruplexes de guanine.[43] Enfin, une étude utilisant la microscopie électronique suggère la formation (*in vitro* et chez *E. Coli*), lors de la transcription des régions riches en guanine, d'une structure appelée G-loop, constituée d'une part d'un duplexe mixte ADN/ARN et d'autre part d'un brin composé de quadruplexes.[44]

Tout ceci permet d'affirmer que les quadruplexes de guanine peuvent se former *in vivo* et pourraient jouer un rôle dans plusieurs processus biologiques. Nous allons maintenant présenter brièvement les principaux d'entre eux.

B. Implications dans la structure des télomères.

Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques constituant les extrémités des chromosomes. L'ADN télomérique, d'une longueur de 2 à 10kb chez l'homme, est constitué de séquences répétitives non codantes : chez tous les vertébrés, la séquence télomérique est $(TTAGGG)_n$. Les télomères existent chez toutes les espèces eucaryotes et leur rôle est de protéger les chromosomes contre les phénomènes de dégradation et de fusion lors de la réplication cellulaire. L'extrémité 3' des télomères est simple brin sur quelques centaines de bases (la longueur varie selon les organismes et les types de cellules), et est associée avec plusieurs protéines dans un complexe en forme de boucle appelé « T-loop » (figure I-*1*-7) qui permet notamment que l'extrémité ADN simple brin ne soit pas reconnue par les enzymes

chargées de la réparation de l'ADN.[45-47] Des G-quadruplexes sont susceptibles de se former au sein de cette extrémité simple brin riche en guanines.

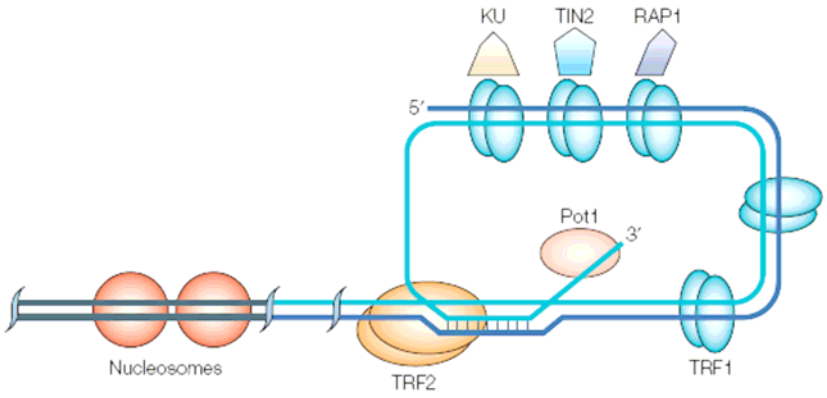


Figure I-*1*-7 : représentation schématique de la « T-loop ». Image extraite de Neidle *et al.* [45].
TRF : telomeric-repeat binding factor Pot : protection of telomeres.

Dans une cellule normale, à chaque réplication cellulaire, les télomères sont raccourcis, du fait de l'incapacité de l'ADN polymérase à les répliquer complètement. Quand l'extrémité télomérique a atteint une certaine taille, appelée limite de Hayflick, la cellule arrête de se diviser puis meurt. Il a été constaté que dans les cellules cancéreuses, les télomères ne raccourcissent pas : la limite de Hayflick n'est jamais atteinte et la cellule devient immortelle. En 1994, Shay *et al.* ont montré que 80 à 85% des cellules cancéreuses exprimaient la télomérase, une enzyme capable de rallonger les extrémités télomériques.[48,49]

La télomérase est une reverse transcriptase, mise en évidence en 1985 dans le microorganisme cilié *Tetrahymena* par Blackburn *et al.*.[50] Elle est constituée d'une sous unité catalytique hTeRT et d'une séquence d'ARN hTR servant de matrice pour l'addition de nucléotides à l'extrémité simple brin du télomère.[51] Il a été montré que l'inhibition de la télomérase entraîne un arrêt de croissance des cellules tumorales dû au raccourcissement des télomères.[45] De façon intéressante, l'activité télomérase est très faible voire inexistante dans la plupart des cellules somatiques normales. De plus, les télomères de la plupart des cellules cancéreuses sont plus courts que ceux des cellules germinales. L'inhibition de la télomérase pourrait ainsi conduire au développement d'agents antitumoraux plus spécifiques donc moins cytotoxiques.[45]

La stabilisation de structures quadruplexes au sein de l'extrémité simple brin du télomère, au moyen de ligands spécifiques, va perturber la fixation de plusieurs protéines télomériques. Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été centrés sur la télomérase : il a ainsi été montré que des ligands de G-quadruplexes inhibaient la télomérase *in vitro*[52-55] et que des cellules cultivées en présence de ligands de G-quadruplexes présentaient des signes de

sénescence et un raccourcissement des télomères.[56,57] Néanmoins, plusieurs études ont montré que la stabilisation de la structure quadruplexe au niveau de l'ADN télomérique a des conséquences multiples sur la structure du télomère et ne se limite pas à l'inhibition de la télomérase.[53,57,58] Il semble donc que l'ADN quadruplexe soit une structure qui joue un rôle crucial dans l'organisation du télomère.

C. Autres rôles biologiques supposés.

Les télomères pourraient *a priori* être considérés comme l'endroit du génome où les quadruplexes sont les plus susceptibles de se former, non seulement du fait de leur taille assez importante (quelques kb) mais surtout du fait de leur extrémité simple brin : la formation d'un quadruplexe n'implique alors pas la dissociation préalable d'un duplexe. Toutefois, d'autres régions du génome sont susceptibles de se structurer en quadruplexe.

Ainsi, Hurley *et al.* ont montré qu'un promoteur de l'oncogène c-Myc est susceptible de se structurer en quadruplexe et qu'en présence d'un ligand stabilisant les quadruplexes de guanine, la transcription de c-Myc n'avait pas lieu : la structuration en quadruplexe empêcherait la transcription du promoteur et l'activation du gène.[59]

De même, le promoteur du gène codant pour l'oncoprotéine Bcl-2 possède une séquence susceptible de structurer en quadruplexe[60] ainsi que le promoteur de l'oncogène KRAS,[61] celui de l'oncogène c-kit[62] et celui du gène de la protéine HIF1-α (Hypoxia Inducible Factor-1) impliquée notamment dans le phénomène d'angiogénèse.[63] Des régions riches en guanines se retrouvent aussi au niveau des centromères et dans les régions « switch » des chaînes lourdes des immunoglobulines.[58] L'ADN quadruplexe est aussi impliqué dans les mécanismes du syndrome de l'X fragile qui provoque des retards mentaux chez l'homme. Ainsi, Darnell *et al.* ont montré qu'une des protéines responsables de ce syndrome se liait *in vivo* à des ARNm structurés en quadruplexe, apportant ainsi un argument supplémentaire en faveur de l'existence *in vivo* des quadruplexes de guanine.[64] Enfin, des quadruplexes de guanine sont susceptibles de se former dans le génome de HIV.[65]

De façon intéressante, ces séquences peuvent *a priori* adopter des conformations quadruplexes différentes, conformations pouvant elle-même être modifiées par la présence d'un ligand.[27] On pourrait ainsi espérer concevoir des ligands possédant une certaine sélectivité pour une structure quadruplexe choisie, afin d'espérer une activité biologique plus spécifique. Ainsi, la porphyrine modifiée **Se2SAP** (figure I-*1*-6) a une plus forte affinité pour le quadruplexe obtenu à partir de la séquence de c-Myc que pour le quadruplexe télomérique humain.[27]

Les quadruplexes de guanine sont donc susceptibles de jouer un rôle dans plusieurs processus biologiques. Cette activité biologique supposée a conduit à une recherche active de ligands reconnaissant ces structures et au développement de techniques permettant d'évaluer l'affinité et la sélectivité d'un ligand potentiel pour l'ADN quadruplexe. Nous présenterons d'abord les ligands de quadruplexes les plus efficaces connus à ce jour puis les principales techniques utilisées pour l'étude de leur interaction avec l'ADN quadruplexe.

III. Ligands d'ADN quadruplexe. Méthodes biophysiques d'étude.

A. Principaux ligands d'ADN quadruplexe.

Différentes familles de composés ont été testées pour leurs propriétés d'interactions spécifiques avec les quadruplexes de guanine. Parmi ces composés, on peut tout d'abord citer plusieurs macrocycles (figure I-*1*-8) tel que la télomestatine,[55,66] produit naturel isolé chez *Streptomyces anulatus*, mais aussi les porphyrines cationiques **TmPyP4**[67] et **Se2SAP**,[27] et le macrocycle **BOQ_1** développé au laboratoire.[68]

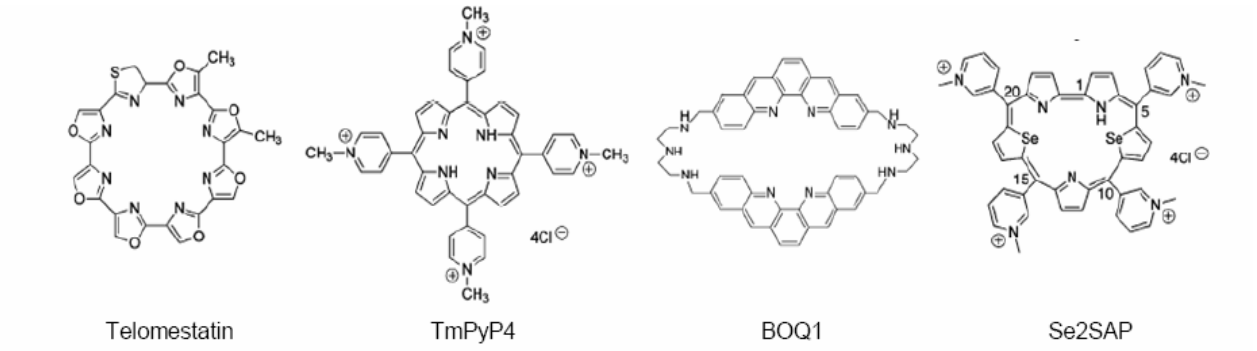


Figure I-*1*-8 : Exemples de ligands macrocycliques de G-quadruplexes.

On peut ensuite citer plusieurs ligands possédant une large surface aromatique plane (figure I-*1*-9), tels que l'anthraquinone **BSU1051**,[45] les acridines di- ou tri-substituées (tel que le **BRACO19**),[69] le perylene diimide ou **PIPER**,[70] les dibenzophénanthrolines ou quinacridines (par exemple **MMQ_3** représenté ici),[52] les dérivés d'éthidium (tel que **1**),[71] les triazines (telle que la **111405**)[56] et les pyridodicarboxamides (**360A**).[53,72] Récemment, Neidle *et al.* ont montré que le complexe de nickel **2** stabilisait fortement la structure quadruplexe.[73]

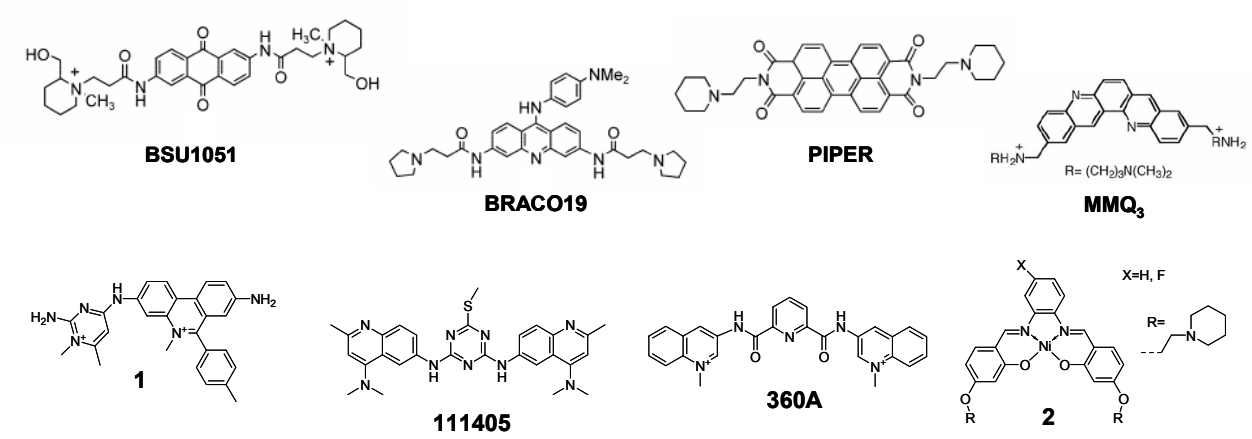


Figure I-*1*-9 : Exemples de ligands de G-quadruplexes.

Tous ces composés possèdent une large surface aromatique plane, qui peut interagir par interaction de π-stacking avec les tétrades de guanine terminales et par interactions non covalentes (π-stacking ou électrostatiques suivant les ligands) avec les boucles. Ce mode de fixation par stacking sur les tétrades externes semble le plus probable étant donnée le coût en énergie de l'intercalation entre deux tétrades de guanine.

Une étude cristallographique sur un quadruplexe bimoléculaire formé par deux brins de la séquence télomérique d'*Oxytricha (*$d(T_4G_4T_4)$) cocristallisé avec une acridine disubstituée (figure I-*1*-10A)[74] ainsi que plusieurs études RMN, avec le **PIPER,**[70] la quinacridine **MMQ_1**,[75] l'acridine **RHPS4** (figure I-*1*-10B),[76] la distamycine, qui forme un complexe où deux molécules se fixent sur chacune des deux tétrades externes,[77] la quinobenzoxazine **QQ58**,[78] et la porphyrine **TMPyP4,**[79] viennent confirmer ce mode de liaison. Le polymorphisme des quadruplexes et l'interconversion possible entre différentes formes compliquent l'analyse RMN des complexes quadruplexes / ligands, ce qui peut expliquer qu'assez peu de données structurales sont disponibles sur ces complexes.

Dans le cas du ligand organométallique **2**, outre les interactions de π-stacking avec les tétrades et les interactions électrostatiques avec les boucles ou les sillons, il est supposé que le cation métallique stabilise la structure quadruplexe en se substituant à un des cations métalliques normalement présent dans la structure. De la même façon, il a été proposé que dans le cas des acridines une protonation *in situ* de l'azote intracyclique, qui joue alors le rôle de pseudo-cation, participe à la stabilisation du quadruplexe par le ligand.[54]

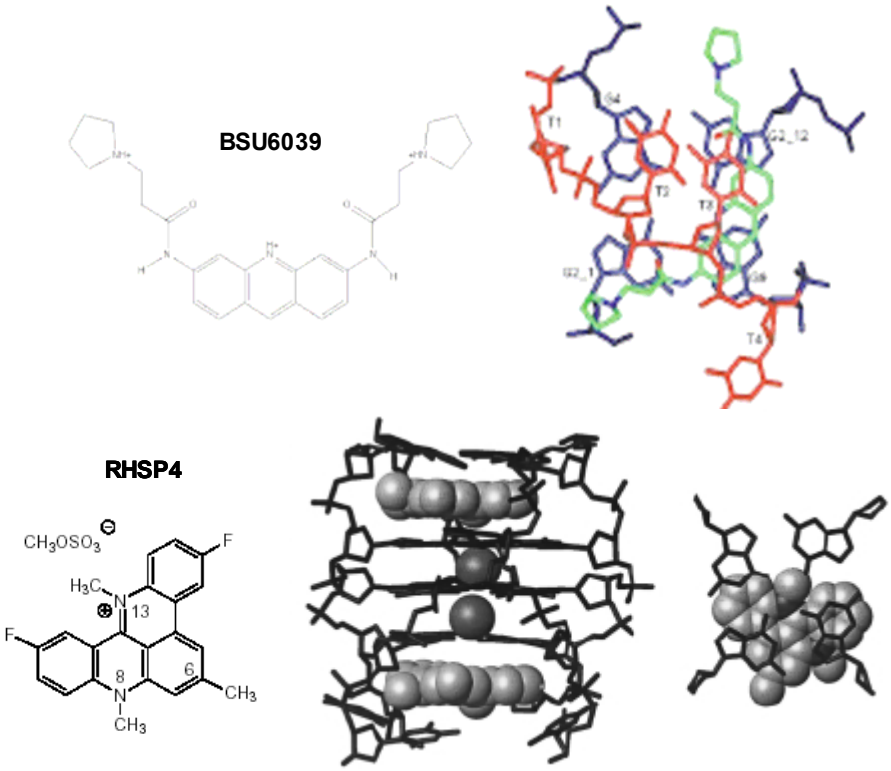


Figure I-*1*-10 : **A.** structure du complexe **BSU6039**/ADN quadruplexe déterminée par cristallographie des rayons X.[74] Le quartet de guanine est représenté en bleu, la molécule en vert et les thymines de la boucle qui interagissent par π-stacking avec la molécule en rouge. **B.** structure du complexe 2 : 1 déterminée par RMN entre le **RHSP4** et le quadruplexe $d(TTAG_3T)_4$.[76]

La stœchiométrie du complexe ligand / quadruplexe varie suivant le ligand et le quadruplexe. Les deux tétrades externes constituent deux sites potentiels, mais l'interaction spécifique d'un ligand avec une boucle peut conduire à l'existence d'un site d'interaction préférentiel. C'est le cas par exemple pour certaines acridines di- ou tri-substituées,[80] ou pour la **Se2SAP**.[31] D'autres ligands, au contraire, (par exemple le **BOQ_1**[68]) possèdent deux sites d'interaction équivalents. Un complexe 3 / 1 entre la daunomycine et un quadruplexe parallèle a même été caractérisé à l'état solide.[81]

Les études menées jusqu'à présent sur la reconnaissance de l'ADN quadruplexe par des petites molécules tendent ainsi à montrer que pour cibler spécifiquement l'ADN quadruplexe, un ligand doit posséder une large surface aromatique plane, permettant le stacking sur les tétrades externes. Des interactions entre le ligand et les sillons ou les boucles du quadruplexe viennent améliorer cette reconnaissance, ou peuvent éventuellement permettre de cibler une structure quadruplexe particulière.

B. Comment évaluer l'affinité d'un ligand pour l'ADN quadruplexe ?

L'objectif de ce paragraphe et du suivant est d'exposer succinctement le principe, les avantages et les limitations éventuelles des méthodes biophysiques les plus communément utilisées jusqu'à présent pour l'étude des ligands d'ADN quadruplexe.

1. La mesure de dénaturation thermique par FRET.

Le chauffage d'une solution d'ADN structuré (en double hélice, triplexe, quadruplexe…) entraîne la perte de la structure secondaire par rupture des liaisons hydrogène (dénaturation). On définit la température de fusion (T_m) comme étant la température de demi-dissociation de l'ADN. L'ajoute à la solution d'un composé se fixant préférentiellement sur la structure d'ADN étudiée retarde la fusion : l'interaction entre l'ADN et le composé déplace l'équilibre ADN structuré / ADN dénaturé. Ainsi, plus l'affinité du composé est importante, plus l'effet stabilisant (ΔT_m, différence entre les températures de fusion de l'ADN en présence du composé et de l'ADN seul), est grand. On peut donc mesurer par cette méthode l'affinité d'un composé pour une structure d'ADN donnée.

Dans le cas d'un ADN en double hélice, l'empilement des bases a pour conséquence une forte diminution de leur absorption UV (hypochromisme) : la dénaturation se traduit par une augmentation de la densité optique à λ=260 nm. Le suivi des variations de la densité optique à 260nm constitue ainsi une méthode standard pour mesurer la température de fusion d'un duplexe. Dans le cas d'un G-quadruplexe, la mesure de la température de fusion par UV (à 295 nm) est possible mais moins précise, les courbes présentant des profils élargis difficilement exploitables, surtout en présence de ligands. Cette difficulté a conduit au développement par Mergny *et al*.[52] d'une méthode de dénaturation thermique suivie par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer ou Transfert d'énergie de fluorescence par résonance).

Cette méthode utilise l'oligonucléotide F21T, un 21-mer contenant 3 répétitions de la séquence télomérique humaine, de séquence d((GGGTTA)$_3$GGG), susceptible de se structurer en G-quadruplexe et portant deux fluorophores : la fluorescéine (donneur) en 5' et la tétraméthylrhodamine (accepteur) en 3' (figure I-*1*-11). Lorsque l'oligonucléotide est sous forme simple brin, les deux fluorophores sont trop éloignés l'un de l'autre pour que le FRET ait lieu. Lorsque l'oligonucléotide est structuré en G-quadruplexe, la distance entre les deux fluorophores est suffisamment faible et il y a transfert d'énergie : l'excitation de la fluorescéine entraîne la fluorescence de la tétraméthylrhodamine. La mesure est effectuée en excitant le système à 470 nm et en suivant la restauration de la fluorescence de la fluorescéine

(515 nm) avec l'augmentation de la température. La température de fusion ($T_{1/2}$) est définie comme la température où l'intensité relative de fluorescence est de 0,5. La mesure peut aussi être effectuée en utilisant une paire fluorophore / inhibiteur (« quencher » en anglais), ici la paire fluorescéine / dabcyl. Par ailleurs, la méthode de mesure de $\Delta T_{1/2}$ par FRET a été récemment adaptée pour une mesure simultanée de 96 échantillons.[82]



Figure I-*1*-11 : **A.** principe de la mesure de $\Delta T_{1/2}$ par FRET. **B.** exemple du composé **MMQ_1**.[52]

La mesure doit être effectuée en présence de cations lithium qui stabilisent peu l'ADN quadruplexe, de façon à obtenir une température de fusion accessible (dans un tampon cacodylate de sodium 10 mM, LiCl 100 mM, la température de fusion $T_{1/2}$ de l'oligonucléotide F21T est de 43,2°C).[52] Des études ont été effectuées pour étudier l'influence du cation, dans des mélanges lithium/sodium ou lithium/potassium, de façon à obtenir une force ionique proche de celle existant en milieu biologique (100 mM) sans obtenir une température de fusion du quadruplexe trop élevée. Une stabilisation plus grande en présence de potassium qu'en présence de sodium est généralement observée.[82] En revanche, à notre connaissance la mesure de dénaturation thermique suivie par FRET n'a jusqu'à présent été utilisée que sur un oligonucléotide mimant les répétitions de la séquence télomérique humaine. Une des limites de la méthode est que pour pouvoir être étudié, un ligand potentiel ne doit pas fluorescer dans la même zone que la fluorescéine. La plupart des ligands de quadruplexe connus à ce jour ne posent pas ce problème.

2. <u>La résonance de plasmon de surface (technologie Biacore).</u>[83]

La mesure d'affinité par résonance de plasmon de surface (SPR pour Surface Plasmon Resonance) est une technique assez récente (les premiers appareils commercialements disponibles sont apparus en 1990). Elle utilise une puce, constituée d'une surface de verre couverte d'une fine épaisseur d'or (≈ 50 nm) recouverte d'une matrice de dextran et sur laquelle est fixée la molécule à étudier (figure I-*1*-12).[83] L'unité optique de l'appareil Biacore

est constituée d'une source lumineuse qui éclaire un prisme avec un angle tel qu'il y a réflexion totale. Il y a alors propagation d'ondes évanescentes jusqu'à la surface d'or. Dans certaines conditions (longueur d'onde et angle d'incidence particuliers), il se produit un phénomène d'excitation des électrons de conduction de la surface d'or (ce phénomène est appelé la résonance plasmon), qui se traduit par une diminution de l'intensité du faisceau réfléchi. L'angle d'incidence à laquelle se produit la résonance plasmon est sensible à la masse de la couche dextran / molécule étudiée. Ainsi, si on considère une puce sur laquelle on a fixé un oligonucléotide structuré en quadruplexe et qu'on place cette puce dans un courant d'une solution contenant un ligand de quadruplexe, on va suivre la formation du complexe quadruplexe-ligand en suivant la variation de l'angle auquel a lieu la résonance plasmon. On obtient ainsi des sensorgrammes à partir desquels on peut déterminer la constante d'association et la stœchiométrie du complexe quadruplexe-ligand.

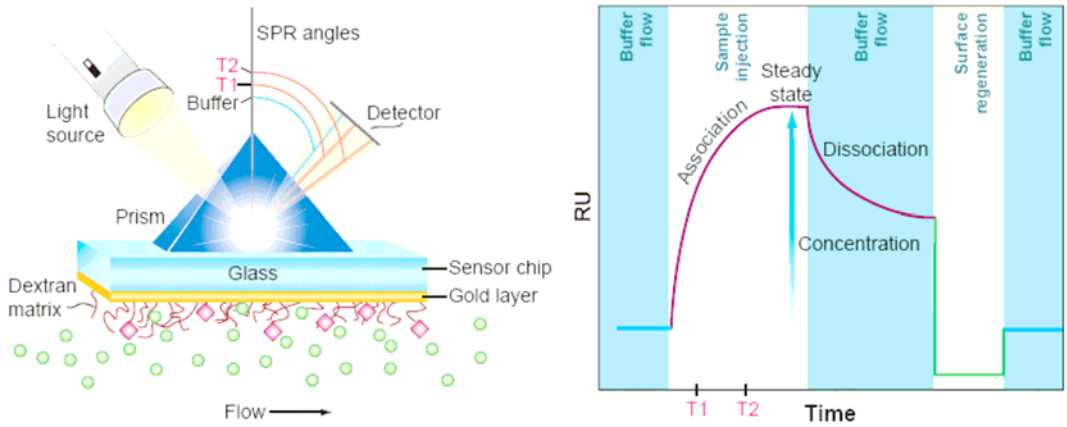


Figure I-*1*-12 : principe de la mesure SPR et sensorgramme (images extraites de Wilson, W. D. [83]).

Cette méthode peut *a priori* être utilisée avec n'importe quadruplexe intramoléculaire (des quadruplexes bi- ou tétramoléculaires poseraient des problèmes pour la fixation à la puce) en présence de sodium ou de potassium, même si la fixation du quadruplexe sur la puce peut constituer une étape délicate. Elle présente l'avantage d'être très sensible et de donner accès aux paramètres cinétiques et thermodynamiques de l'interaction quadruplexe / ligand.

3. <u>La spectrométrie de masse électrospray.</u>

L'étude de complexes ADN/ ligand par spectrométrie de masse électrospray (ESI-MS) connaît actuellement un développement important. Cette méthode est basée sur l'hypothèse que les complexes ADN/ligand observés en masse sont les mêmes que ceux présents en solution et qu'un complexe ADN/ligand se comportera dans le spectromètre de la même façon que l'ADN seul. Dans les conditions douces de l'ionisation électrospray ces hypothèses

semblent bien vérifiées puisque les études des complexes formés par de nombreux ligands des acides nucléiques donnent des résultats similaires à ceux obtenus en milieu aqueux.[84] La première étude des complexes ligand/quadruplexe par spectrométrie de masse Electrospray a été réalisée sur un quadruplexe tétramoléculaire.[85] Par la suite, Rosu *et al.* ont étendu l'utilisation de la spectrométrie de masse Electrospray à l'étude des quadruplexes bimoléculaire et intramoléculaire.[86] Un avantage important de cette méthode est qu'elle permet d'obtenir la stoechiométrie des différents complexes ADN/ligands formés et leurs constantes d'association. Il faut toutefois noter que les spectres de masses doivent être réalisés en présence d'ions ammonium pour éviter la formation d'adduits provoquée par la présence de cations monovalents. Ceci ne semble pas poser de problème car les ions ammonium ont un rayon de Van der Waals proche de celui des ions potassium et stabilisent l'ADN quadruplexe.

4. <u>La titration fluorimétrique.</u>

Le principe de la titration fluorimétrique est extrêmement simple : il consiste à suivre les variations de fluorescence d'un ligand lors de l'ajout d'ADN quadruplexe (il est aussi possible de partir d'une solution d'ADN à laquelle on ajoute des quantités croissantes de ligand). La courbe de titration permet ensuite d'obtenir la constante d'association et la stœchiométrie du complexe. Un exemple est présenté figure I-*1*-13. Cette méthode est bien évidemment limitée à des dérivés fluorescents dont la fluorescence varie significativement lors de l'interaction avec l'ADN. En revanche, elle présente l'avantage de pouvoir *a priori* être utilisée avec n'importe quel quadruplexe (intra- ou intermoléculaire) et d'être simple à mettre en oeuvre. Toutefois l'ajustement (« fit » en anglais) des courbes de titration n'est pas toujours possible, notamment lorsque les variations de fluorescence sont trop brutales. C'est souvent le cas pour les composés ayant des interactions électrostatiques fortes avec l'ADN.

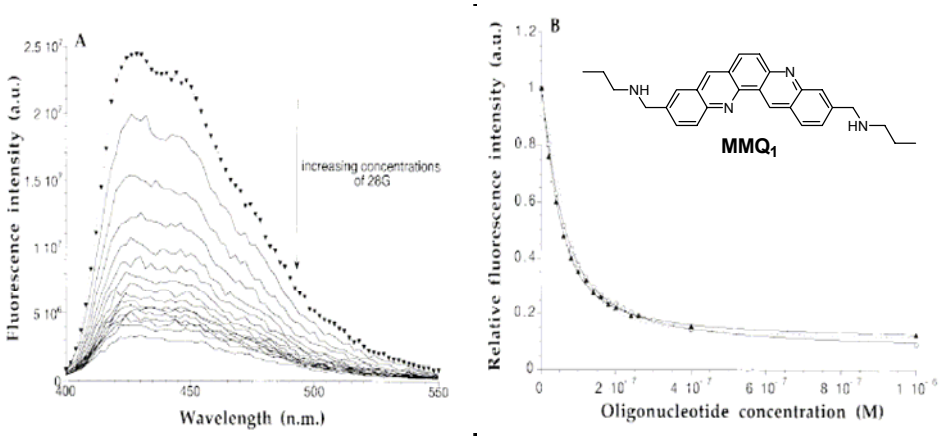


Figure I-*1*-13 : exemple de titration fluorimétrique du composé **MMQ_1** .[52]

C. Comment évaluer la sélectivité d'un ligand pour l'ADN quadruplexe ?

Le problème de la sélectivité quadruplexe/duplexe est absolument crucial pour envisager d'éventuelles applications pharmacologiques aux ligands de quadruplexe du fait de la faible proportion de séquences susceptibles de se structurer en quadruplexe par rapport à l'ADN duplexe. Une grande partie des ligands d'ADN quadruplexe décrits jusqu'à présent ne présentent qu'une sélectivité quadruplexe / duplexe faible ou moyenne : les affinités pour les deux structures sont du même ordre de grandeur.

1. Méthodes dérivées des méthodes précédentes.

Toutes les méthodes décrites au paragraphe précédent permettent d'évaluer la sélectivité quadruplexe / duplexe d'un ligand potentiel. En effet, les titrations fluorimétriques, la spectrométrie de masse et le SPR peuvent être utilisés avec des duplexes. La sélectivité quadruplexe/duplexe peut alors être exprimée comme le rapport des affinités pour ces deux structures.

Par ailleurs, la dénaturation thermique par FRET peut être réalisée en présence d'un duplex compétiteur non marqué.[82,87] Si le ligand est peu sélectif de l'ADN quadruplexe, il va alors se répartir entre les deux espèces, donc stabiliser moins le quadruplexe et le $\Delta T_{1/2}$ va diminuer. Ainsi le $\Delta T_{1/2}$ de la quinacridine **MMQ_3** chute d'environ 12°C en présence d'un excès de duplexe compétiteur (15 équivalents molaires d'un duplex de 26bp).[87]

Toutes ces méthodes peuvent être utilisées non seulement pour estimer une sélectivité quadruplexe/duplexe mais aussi pour comparer l'affinité d'un composé pour plusieurs formes quadruplexes.

2. La dialyse à l'équilibre.

La dialyse à l'équilibre a initialement été développée par Ren et Chaires[88] et adaptée par Mergny *et al.* pour étudier différentes structures quadruplexes.[89] Le principe de la mesure consiste à mettre une solution contenant le ligand à étudier en contact avec des tubes de dialyse contenant chacun une structure d'ADN différente (figure I-*1*-14). Une fois l'équilibre atteint, la concentration en ligand dans chaque tube est dosée, après séparation des complexes ADN/ligand. Cette concentration reflète la sélectivité du ligand pour les différentes structures d'ADN.

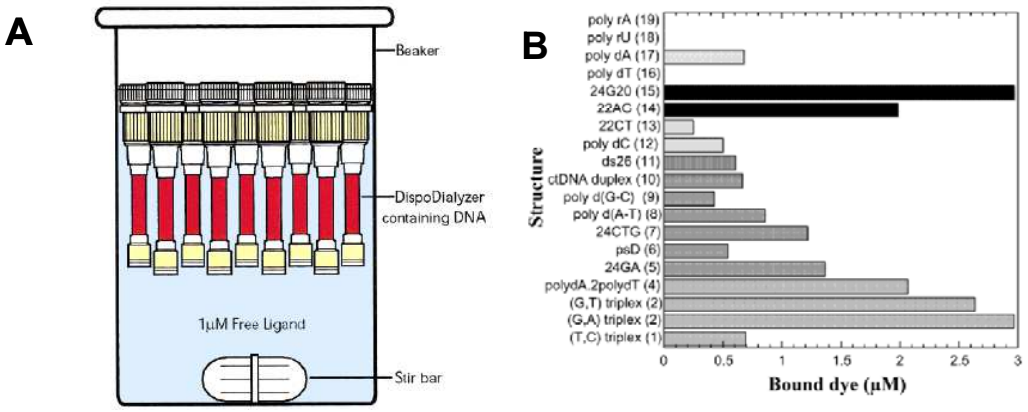


Figure I-*1*-14 : **A.** dispositif expérimental utilisé pour la dialyse à l'équilibre.[88] **B.** diagramme de dialyse à l'équilibre obtenu sur le composé **BOQ_1**.[68]

Cette méthode peut être *a priori* appliquée à n'importe quelle structure d'ADN, sans restriction sur le tampon utilisé (présence de sodium ou de potassium, force ionique variable…). Elle présente en revanche l'inconvénient de consommer une quantité relativement importante de ligand (400 mL à 1 µM) et ne peut *a priori* être appliquée qu'à des ligands absorbant la lumière au-delà de 320 nm. En effet, le dosage de la quantité de ligand liée à chaque structure d'ADN se fait par UV ou par fluorescence et n'est donc possible que si les ligands absorbent la lumière dans une gamme de longueur d'onde où l'absorption des acides nucléiques est négligeable.

L'ADN quadruplexe est ainsi une cible biologique extrêmement étudiée pour laquelle de nombreux ligands ont été conçus. Cette recherche de ligands d'ADN quadruplexe s'est accompagnée du développement de nouvelles méthodes biophysiques permettant d'évaluer l'affinité et la sélectivité d'un composé pour l'ADN quadruplexe. Ce contexte nous a conduit à nous intéresser au marquage d'ADN quadruplexe par des fluorophores. Une sonde fluorescente spécifique de l'ADN quadruplexe pourrait en effet être utilisé pour la détection en milieu cellulaire, ce qui constitue un objectif extrêmement ambitieux, mais aussi comme un outil biophysique pour les études *in vitro*. Nous allons tout d'abord présenter les travaux antérieurs dans ce domaine.

IV. Marquage d'ADN quadruplexe par des fluorophores.

Les oligonucléotides modifiés de façon covalente par des fluorophores sont des outils couramment utilisés pour étudier l'hybridation de deux brins complémentaires[90] ou encore la conformation adoptée par différentes séquences d'ADN.[91] Concernant l'ADN quadruplexe,

les oligonucléotides modifiés par des fluorophores ont été utilisés dans des études sur le polymorphisme de l'ADN quadruplexe[5,92] en plus de la méthode de dénaturation thermique suivie par FRET dont nous avons détaillé le principe plus haut

En ce qui concerne le marquage non covalent par des petites molécules, les seules études existantes à notre connaissance concernent les dérivés d'éthidium développés par Mergny *et al*.,[71] le bisvinylpyridinium carbazole **BMCV** développé par Chang *et al*.,[93-95] le **DODC** étudié par Schafer *et al.*[96] et les porphyrines étudiées par Bolton *et al.* (figure I-*1*-15).[97] On peut aussi citer une étude sur l'interaction entre le ligand de petit sillon **Hoescht 33258** et l'ADN quadruplexe (figure 15).[98] Aucun de ces composés n'a été utilisé pour la détection en milieu cellulaire. En ce qui concerne le composé **BMCV**, aucune donnée quantitative d'interaction avec l'ADN quadruplexe n'est à notre connaissance publiée, il est donc difficile de comparer ses propriétés avec celles d'autres ligands. Les propriétés de fluorescence du **Hoescht 33258** et des porphyrines citées plus hauts n'ont à ce jour pas fait l'objet d'applications. Les dérivés d'éthidium du type de **1** permettent de détecter des structures quadruplexes sur gel d'agarose, la limite de détection étant de quelques dizaines de ng de quadruplexe. De même, l'application proposée pour le **DODC** est la détection de quadruplexe sur gel, en utilisant le fait que le transfert d'énergie entre les bases de l'ADN et le ligand n'a lieu de manière significative qu'en présence de quadruplexe.

Une autre stratégie développée par Armitage *et al.* a consisté à concevoir des conjugués PNA-Thiazole Orange s'hybridant avec des quadruplexes d'ARN, la sélectivité pour le quadruplexe étant apporté dans ce cas par la partie PNA et la fluorescence par le Thiazole Orange.[99] L'objectif de cette étude est essentiellement d'étudier la formation de quadruplexes hybrides comprenant des brins PNA. Enfin, dans un but de détection mais en sortant du champ de la fluorescence, un pyridodicarboxamide tritié a été synthétisé et il a été montré qu'il se fixait préférentiellement aux extrémités des chromosomes.[41]

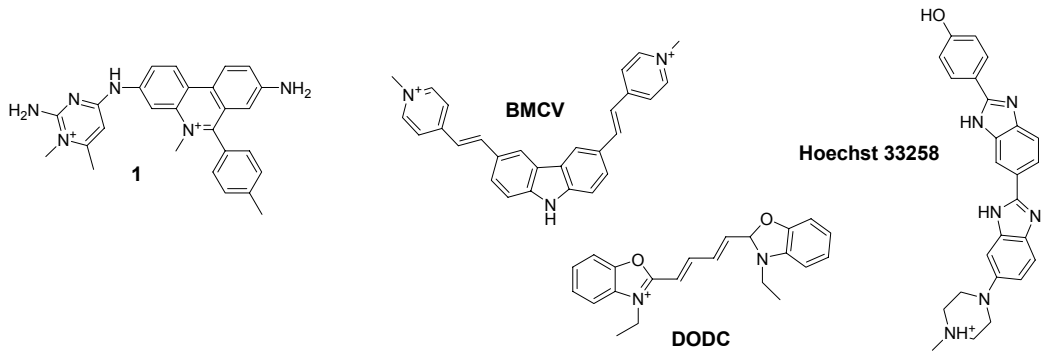


Figure I-*1*-15 : ligands fluorescents d'ADN quadruplexe.

Ainsi, si de nombreux ligands fluorescents d'ADN duplexe ont été étudiés, peu de ligands fluorescents sélectifs de l'ADN quadruplexe sont connus à ce jour, probablement à cause de la difficulté à obtenir une molécule associant à la fois affinité et sélectivité pour l'ADN quadruplexe avec des propriétés de fluorescence intéressantes.

V. Objectifs.

La première stratégie choisie pour obtenir des ligands fluorescents d'ADN quadruplexe consiste à associer le motif quinacridine étudié précédemment au laboratoire à des fluorophores choisis pour leur petite taille et leur forte fluorescence en milieu aqueux, *via* une chaîne polyaminée permettant des interactions électrostatiques stabilisantes avec le quadruplexe (figure I-*1*-16). La synthèse de ces conjugués et les études d'interaction avec l'ADN quadruplexe seront présentées dans le chapitre 2.

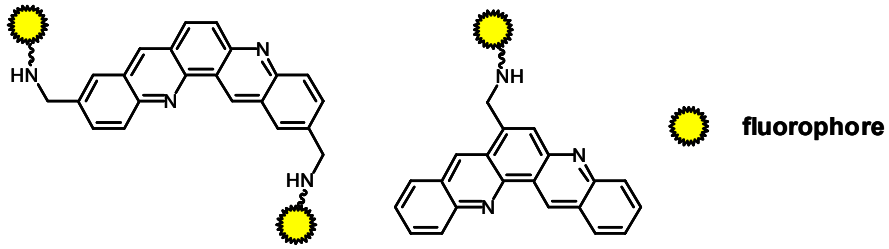


Figure I-*1*-16 : conception de ligands fluorescents d'ADN quadruplexe.

Les résultats obtenus avec ces composés nous ont montré que l'utilisation d'une sonde fluorescente présentant une forte exaltation de fluorescence en présence d'ADN quadruplexe semblait une approche particulièrement intéressante. Ceci nous a amené à étudier l'interaction entre le Thiazole Orange (**TO,** figure I-*1*-17) et l'ADN quadruplexe.

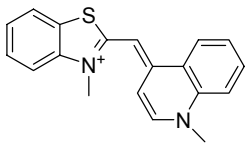


Figure I-*1*-17 : structure du Thiazole Orange.

Nous avons montré que le **TO** possédait une forte affinité pour l'ADN quadruplexe, analogue à son affinité pour l'ADN duplexe. Nous avons ainsi pu mettre au point un test FID (Fluorescent Intercalator Displacement) basé sur le déplacement du **TO** d'un oligonucléotide structuré en quadruplexe par des ligands, qui permet d'évaluer l'affinité et la sélectivité de ces ligands pour l'ADN quadruplexe. Le principe de ce test, ainsi que ses limites et ses avantages seront décrits dans le chapitre 3. L'étude du déplacement du **TO** par différents ligands

disponibles au laboratoire nous a permis de mettre en évidence une nouvelle paire donneur / accepteur donnant lieu à un phénomène de FRET en présence d'ADN quadruplexe. L'étude de ce phénomène fera l'objet du chapitre 4.

Chapitre I-2 : Conception et synthèse de ligands fluorescents d'ADN quadruplexe.

I. Conception structurale.

Le motif dibenzo[b,j]phénanthroline ou quinacridine (figure I-*2*-1) développé au laboratoire a conduit à l'obtention de ligands possédant une très forte affinité pour l'ADN quadruplexe, notamment en fonctionnalisant l'isomère méta par deux chaînes polyaminées.[52]

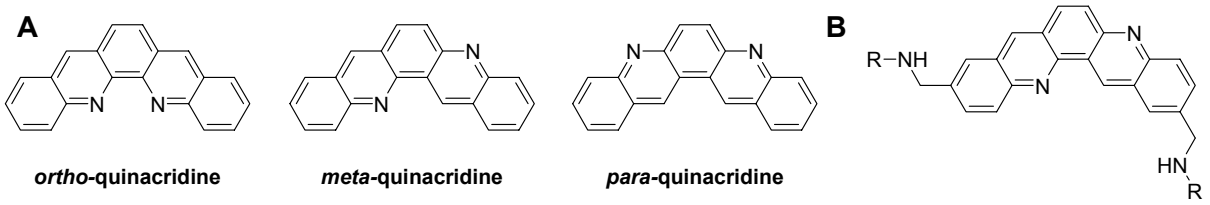


Figure I-*2*-1 : **A.** structure des trois isomères de la quinacridine, **B.** structure générale des ligands d'ADN quadruplexe obtenus à partir du motif *méta*-quinacridine.

Notre première stratégie pour obtenir des ligands fluorescents d'ADN quadruplexe a consisté en l'association du motif quinacridine avec des fluorophores de petite taille, *via* une chaîne polyaminée permettant des interactions électrostatiques stabilisantes avec le quadruplexe et assurant une bonne solubilité dans l'eau (figure I-*2*-2). Il faut noter que si les quinacridines sont en elles-mêmes des molécules fortement fluorescentes en milieu aqueux, leur fluorescence est éteinte lorsqu'elles sont en interaction avec l'ADN, ce qui empêche leur utilisation comme marqueurs.

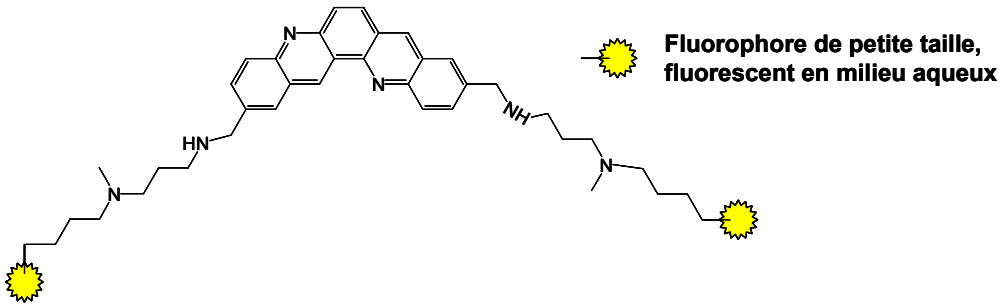


Figure I-*2*-2 : schéma général des conjugués quinacridines-fluorophores étudiés.

Un premier conjugué **1** de ce type a été synthétisé antérieurement à ce travail, en associant la quinacridine à deux molécules de dansyle par une chaîne diaminobutane (figure I-*2*-3). Le dansyle présente en effet l'avantage d'être facile à greffer sur des amines primaires et disponible à un coût réduit. Ce conjugué **1** possède une affinité modérée pour l'ADN quadruplexe ($\Delta T_{1/2}$ mesuré par FRET de +5°C) et s'est révélé peu fluorescent. Le dansyle est

en effet un marqueur des poches hydrophobes des protéines et, dans ce cas, la présence d'ADN ne semble pas constituer un environnement assez hydrophobe pour provoquer une exaltation de la fluorescence.

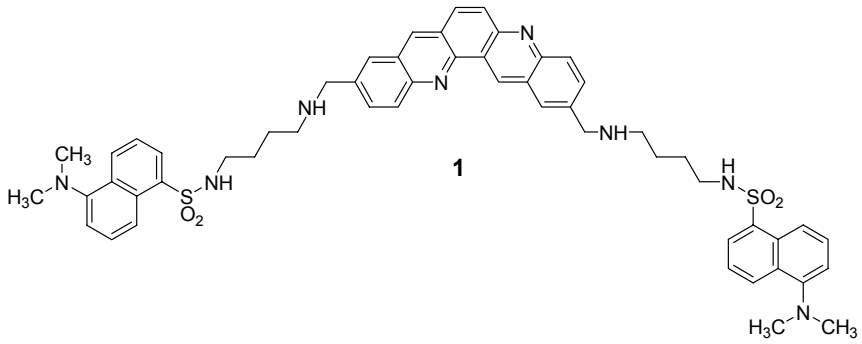


Figure I-*2*-3 : conjugué quinacridine – dansyle **1**.

Ce précédent nous a conduit à synthétiser des conjugués conservant au moins deux charges positives sur chacune des chaînes latérales (figure I-*2*-2) afin d'augmenter la probabilité d'obtenir un composé ayant une forte affinité pour les quadruplexes de guanine. Les fluorophores choisis sont de petite taille, afin de peu perturber l'interaction avec le quadruplexe, connus pour leur fluorescence en milieu aqueux et pouvant être aisément couplés à des amines. Dans un premier temps, nous avons choisi le MANT (N-méthyl anthranilamide) et le Bodipy (complexe difluoroboronique de dipyrrométhène), dont les structures sont représentées figure I-*2*-4.

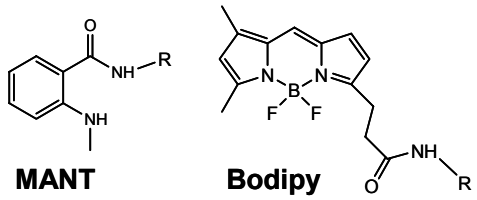


Figure I-*2*-4 : structure des fluorophores MANT et Bodipy.

II. Synthèse.

La rétrosynthèse envisagée est la suivante : le conjugué cible est obtenu par couplage entre le fluorophore souhaité sous forme d'ester activé et la quinacridine **2** possédant une fonction amine primaire à l'extrémité de chaque chaîne latérale. Le composé **2** est lui-même obtenu par une réaction d'amination réductrice entre la 3,3'-diamino-N-méthyldipropylamine monoprotégée par un groupement *tert*butoxycarbonyle (ou Boc) **3** et le dialdéhyde **4** (figure I-*2*-5), suivie d'une déprotection en milieu acide. D'autres voies d'accès à des composés analogues à **2** ont été essayées et seront présentées.

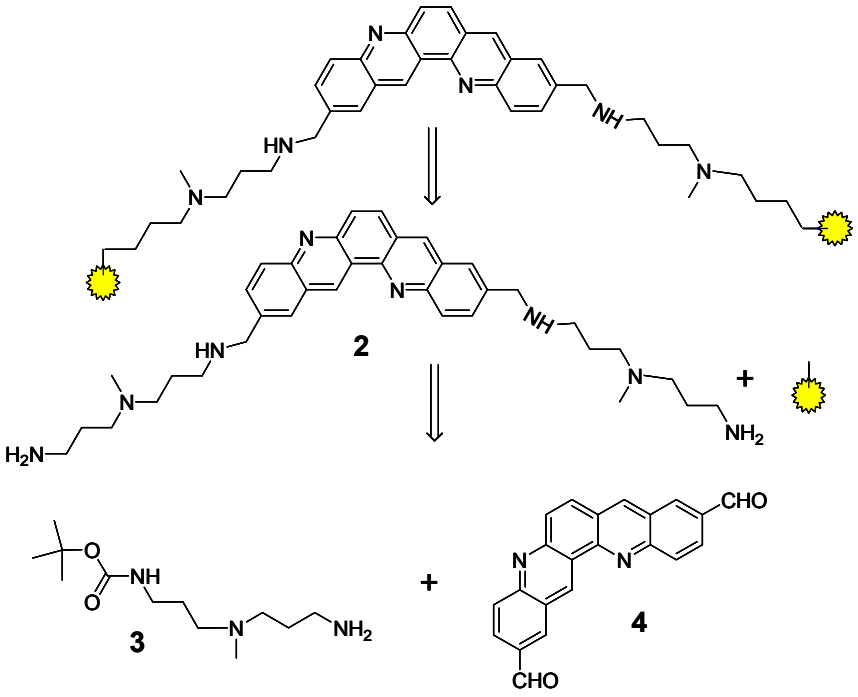


Figure I-*2*-5 : rétrosynthèse envisagée pour les conjugués quinacridines – fluorophores.

A. Synthèse du noyau quinacridine.

Dans ce paragraphe, la méthodologie de synthèse des quinacridines (figure I-*2*-6) est brièvement rappelée et les améliorations apportées sont présentées.

La principale amélioration concerne la première étape de synthèse. Cette réaction d'amination était auparavant réalisée dans les conditions de Ullman-Golberg : utilisation d'un iodure d'aryle, plus réactif que le bromure, catalyse par le mélange Cu/CuI, en présence de K_2CO_3, au reflux du pentanol (135 °C).[100] Le produit de diamination **7c** est alors obtenu avec des rendements moyens (ne dépassant pas 40 %), et la réaction se révèle très sensible à la nature des substrats utilisés. Nous nous sommes tournés vers une catalyse au palladium, en choisissant le système $Pd(OAc)_2$/BINAP en présence de Cs_2CO_3 et en utilisant le dioxanne comme solvant à cause de la faible solubilité de l'acide **5** dans le toluène. Le produit de diamination **7c** est ainsi obtenu à partir de l'acide 2-amino-méthylbenzoïque **5** et du 1,3-dibromobenzène **6** avec un rendement de 58 % sur une échelle de 5 g.[101]

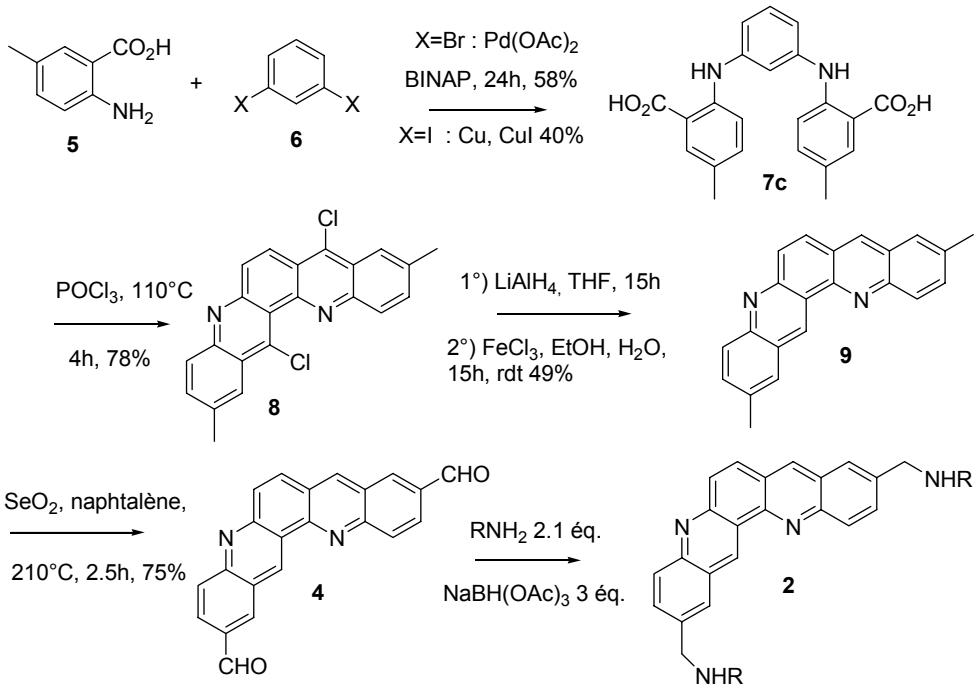


Figure I-*2*-6 : synthèse des quinacridines.

De manière intéressante, l'utilisation du système catalysé au palladium a ensuite permis l'obtention de systèmes polysubstitués : une quinacridine portant trois chaînes aminées à partir du dérivé **7b**, et un composé de symétrie C_3[102] partir du composé **7d** (figure I-*2*-7). Des quinacridines portant une seule chaîne en position latérale ont aussi été obtenues à partir de l'intermédiaire clé **11**.[103]

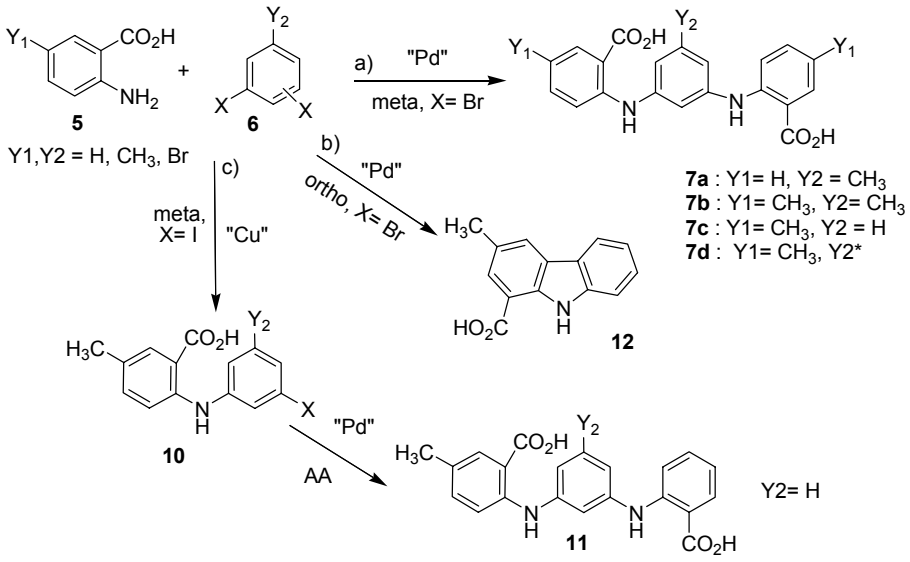


Figure I-*2*-7 : améliorations apportées à la réaction d'amination. Réactifs : AA= acide anthranilique, (a), (b) [Pd] :$Pd(OAc)_2$/BINAP, Cs_2CO_3, dioxane, reflux ; (c) [Cu] : Cu/CuI, K_2CO_3, pentanol, reflux

***** produit trisubstitué résultant de la réaction avec le 1,3,5 tribromobenzène.

Par la suite, nous avons cherché à élargir cette méthodologie à l'obtention des *ortho*-quinacridines. Nous avons alors observé que dans les conditions décrites plus haut, l'utilisation du 1,2-dibromobenzène ne conduisait pas au produit de diamination attendu mais au carbazole fonctionnel **12**, résultant d'une amination suivie d'une cyclisation.[101]

Le dialdéhyde **4** est ensuite obtenu selon le protocole mis au point antérieurement[100] (figure I-*2*-6) : cyclisation par $POCl_3$ (obtention de **8**), réduction au $LiAlH_4$ suivie d'une réoxydation par $FeCl_3$ (obtention de **9**) puis oxydation au dioxyde de sélénium des deux méthyles du composé **9** en aldéhydes**.** Les chaînes polyaminées sont enfin introduites par une réaction d'amination réductrice, soit en deux temps (formation de l'imine puis réduction au $NaBH_4$), soit en un seul pot (utilisation de $NaBH(OAc)_3$). Des améliorations récentes ont permis une nette augmentation du rendement global de la synthèse : utilisation de dérivés de l'anthranilate de méthyle dans la première étape et utilisation du triphénylcarbénium tétrafluoroborate au lieu du $FeCl_3$ pour l'étape de réoxydation du pentacycle.[103]

B. Synthèse de la partie fluorescente – cas du Bodipy.

Le fluorophore MANT peut être introduit à partir de l'anhydride N-méthylisatoïque **13** (figure I-*2*-8), disponible commercialement dans des quantités raisonnables (de l'ordre du gramme). En ce qui concerne le Bodipy, le dérivé commercial **14** est extrêmement coûteux (environ 300€ les 5 mg). Une première tentative de couplage a été effectuée avec ce composé commercial, mais dans le but de travailler sur des quantités de réactifs plus pratiques à l'échelle du laboratoire (de l'ordre de 100 mg), nous avons entrepris la synthèse de dérivés de Bodipy portant une fonction acide carboxylique.

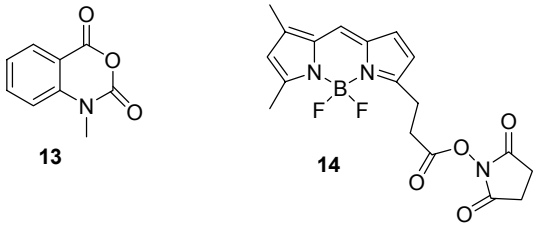


Figure I-*2*-8 : structure de l'anhydride N-méthylisatoïque **13** et du dérivé de Bodipy **14**.

La première stratégie envisagée a été de reproduire la synthèse décrite par Burgess *et al.* (figure I-*2*-9), dont l'étape clé est l'obtention du Bodipy iodé **15**, qui est ensuite fonctionnalisé par des réactions de couplage de type Sonagashira.[104] Le 3,5-diméthyl-pyrrole-2-carboxaldéhyde **17** est obtenu à partir du 2,4-diméthylpyrrole **16** par une réaction de Vilsmeier avec un rendement de 83%.[105] Le composé iodé **18** est ensuite obtenu par iodation dans des conditions basiques, à partir de l'aldéhyde **17,** avec un rendement de 70%. Pour cette

réaction, conserver le milieu réactionnel à 0°C pendant toute la durée de la réaction est important : une élévation de température entraîne une chute du rendement probablement due à la dégradation du composé **18**.

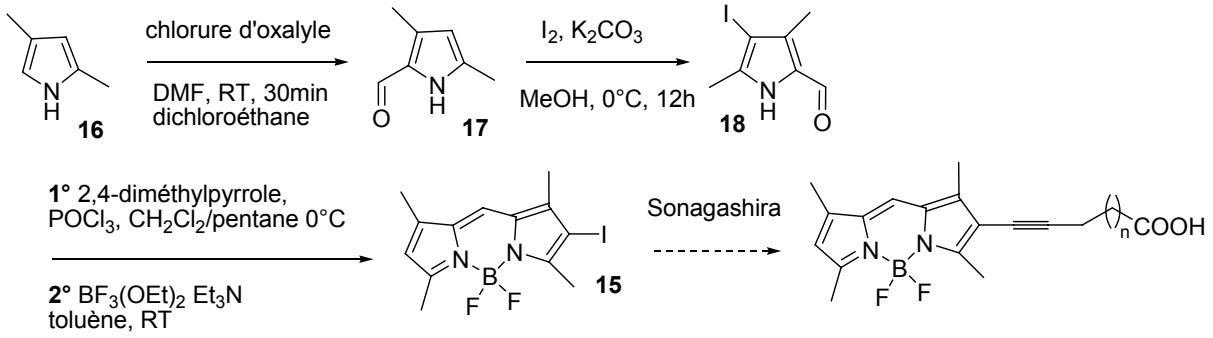


Figure I-*2*-9 : synthèse du iodo-Bodipy **15**.

L'obtention du composé **15** se fait ensuite en deux temps : formation du pyrrométhène **19** (figure I-*2*-10) puis formation du complexe de bore. Les pyrrométhènes sont des composés très instables sous forme neutre[106] qui peuvent être isolés sous forme de sel. Nous avons obtenu le pyrrométhène **19** avec un très bon rendement. Toutefois nous ne sommes pas parvenus à synthétiser **15** en reproduisant le protocole de complexation décrit (chauffage à 70°C dans le toluène pendant deux heures, en présence de 4 équivalents de $BF_3(OEt)_2$ et de 2,5 équivalents de triéthylamine). Dans ces conditions, nous obtenons très majoritairement le Bodipy non iodé **20** (figure I-*2*-10) avec seulement des traces du produit attendu. La réaction effectuée à température ambiante et dans des temps beaucoup plus courts (15 min) a permis d'obtenir le produit attendu avec un rendement ne dépassant pas 15% et s'est révélée peu reproductible. Différentes conditions expérimentales ont été essayés (formation du dipyrrométhène en présence de TFA au lieu de $POCl_3$, suivie de la complexation en un seul pot ou après isolation du dipyrrométhène, variation du temps de réaction) sans plus de succès. L'équilibre entre des conditions favorisant la formation du complexe de bore (chauffage à 70°C, temps de réaction de quelques heures) et des conditions suffisamment douces pour ne pas provoquer l'élimination de l'atome d'iode (température ambiante, temps de réaction de quelques dizaines de minutes) semble délicat à trouver.

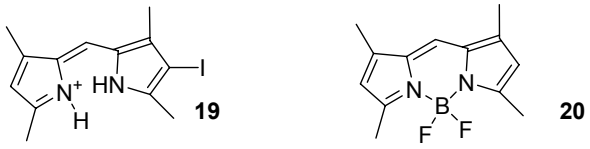


Figure I-*2*-10 : structure des composés **19** et **20**.

Nous avons finalement obtenu un Bodipy fonctionnalisé par un acide carboxylique en utilisant la réaction en un seul pot décrite récemment par Bittmann *et al.*[107] (figure I-*2*-11) :

réaction du 2,4-diméthylpyrrole sur l'anhydride succinique en présence de $BF_3(OEt)_2$ puis formation du complexe de bore en présence de $BF_3(OEt)_2$ et de triéthylamine. Le composé **21** est obtenu avec un rendement très faible (3,3%), mais à partir de produits commerciaux bon marché et peut être purifié facilement par chromatographie sur colonne.

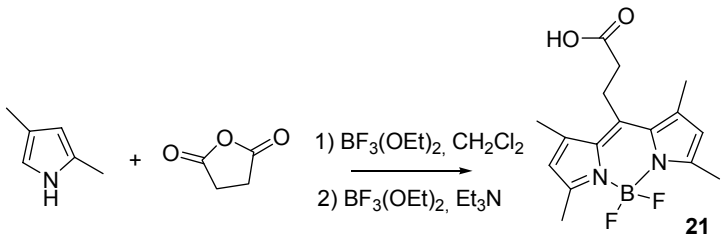


Figure I-*2*-11 : synthèse du composé **21**.

C. Synthèse des conjugués.

Deux stratégies sont possibles pour obtenir les composés souhaités à partir du dialdéhyde **4**. La première consiste à monoprotéger la 3,3'-diamino-N-méthyldipropylamine puis à greffer le composé monoprotégé **3** obtenu sur le dialdéhyde **4**. Après déprotection, on obtient l'intermédiaire **2**, sur laquelle on fait réagir le fluorophore. La deuxième stratégie, plus courte d'une étape, consiste à monosubstituer la 3,3'-diamino-N-méthyldipropylamine par le fluorophore puis à greffer le composé obtenu sur le dialdéhyde **4**. Les purifications sont plus faciles avec la première méthode, ce qui nous a amenés à la préférer par la suite. Le composé **22** a ainsi été obtenu avec un rendement de 37% après avoir été isolé des produits d'hydrolyse de l'excès d'anhydride N-méthylisatoïque par double extraction (figure I-*2*-12).

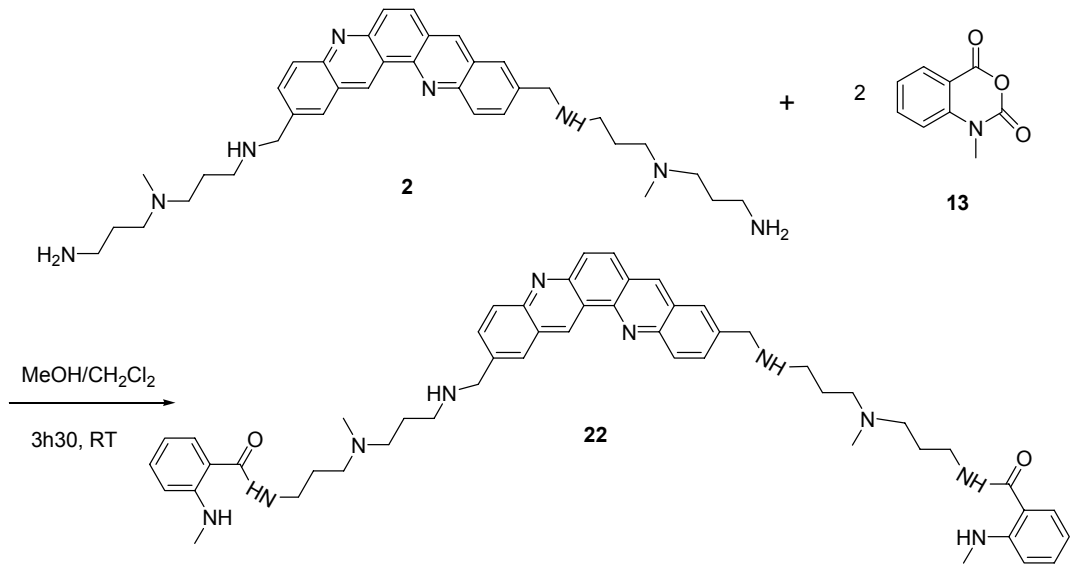


Figure I-*2*-12 : synthèse du conjugué quinacridine - MANT **22**.

La synthèse du conjugué quinacridine – Bodipy **23** a été entreprise selon la même stratégie (figure I-*2*-13). L'analyse RMN montre la présence du produit attendu et de produits secondaires. L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF permet de confirmer la présence majoritaire de **23** et montre la présence du produit de monocouplage et d'un produit trisubstitué. Le composé **23** s'est révélé très lipophile et difficile à purifier en HPLC. De plus, contrairement aux autres quinacridines étudiées jusqu'à présent, il s'est révélé peu stable en milieu acide, interdisant sa purification par précipitation sous forme de chlorhydrate. Les premières mesures de fluorescence et d'interaction avec l'ADN ont donc été entreprises avec l'extrait brut.

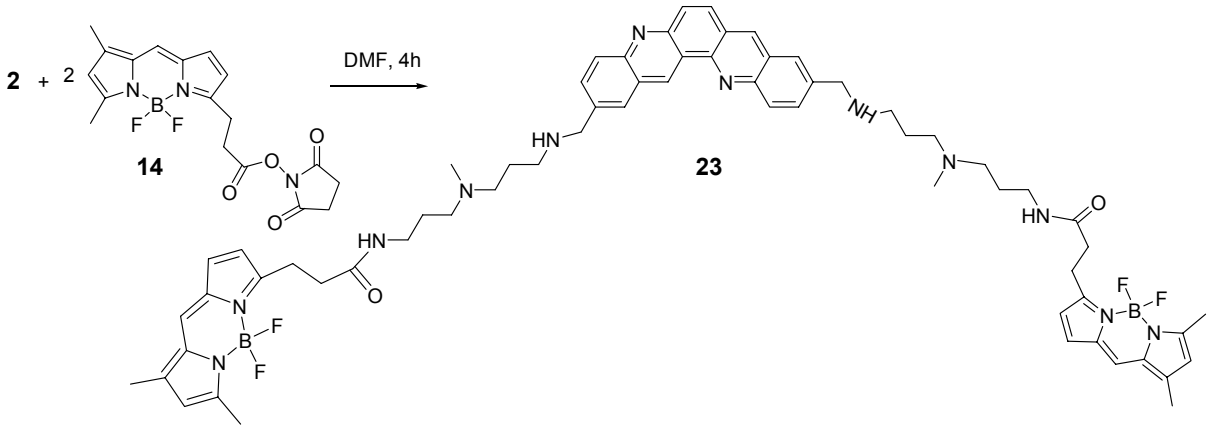


Figure I-*2*-13 : synthèse du conjugué quinacridine - Bodipy **23**.

Par la suite, deux autres conjugués quinacridines – Bodipy **24** et **25** (figure I-*2*-14) ont été obtenus suivant la même stratégie et purifiés par HPLC. Le composé **25**, qui est un mélange de deux isomères de position car les positions de branchements des deux chaînes ne sont pas équivalentes, a été obtenu en très faible quantité (<1mg). Il a été synthétisé en utilisant un excès de la quinacridine **2** par rapport au Bodipy **14**.

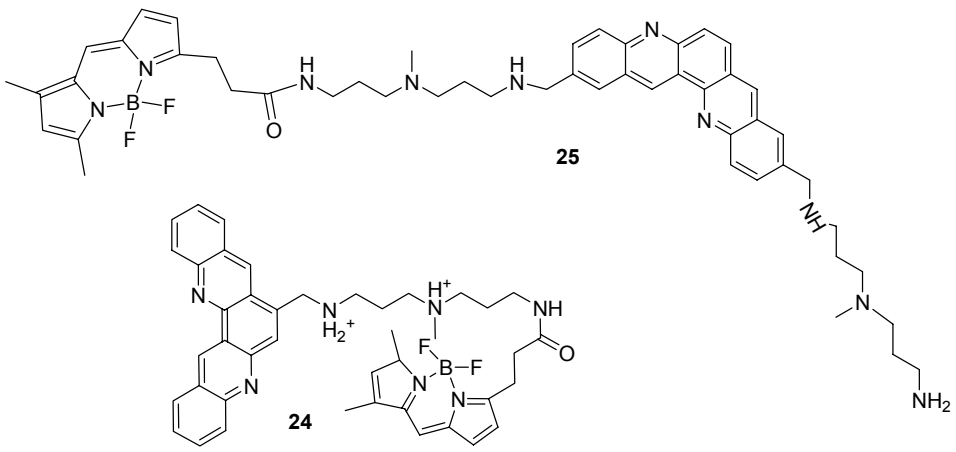


Figure I-*2*-14 : structure des conjugués quinacridine – Bodipy **24** et **25**.

Par ailleurs, dans le but de pouvoir varier la nature et la longueur du bras de liaison quinacridine/fluorophore et pour pouvoir utiliser des fluorophores fonctionnalisés par une amine, différents essais ont été effectués pour obtenir une quinacridine fonctionnalisée par un acide carboxylique. Nous nous sommes ainsi intéressés à la fonctionnalisation du dérivé bromé **26** (figure I-*2*-15).

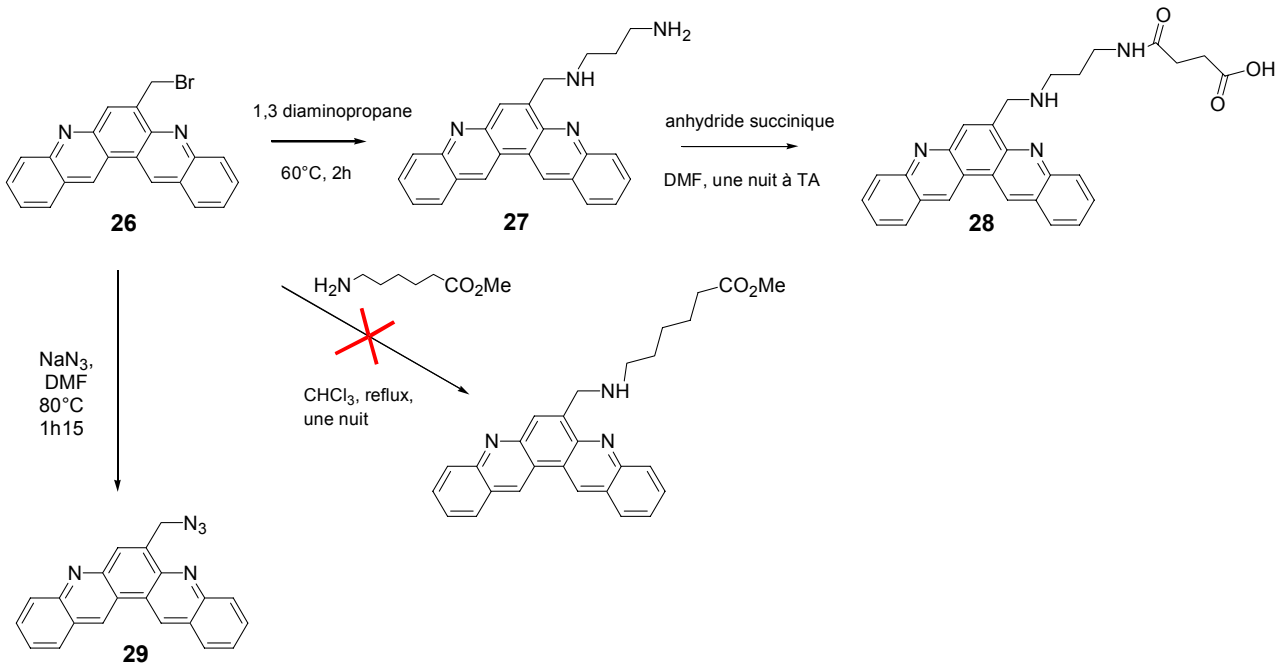


Figure I-*2*-15 : fonctionnalisation du dérivé **26**.

La 6-[(3-aminopropyl)aminométhyl]dibenzo[b,j][4,7]-phénanthroline **27** possédant une extrémité NH_2 libre a été obtenue avec un rendement de 78% à partir du composé **26**, par une réaction de substitution nucléophile en utilisant le 1,3-diaminopropane comme solvant (figure I-*2*-15). Le composé fonctionnalisé par un acide carboxylique **28** a été synthétisé par couplage de **27** avec l'anhydride succinique avec un rendement de 45%. Un essai a été réalisé pour obtenir un analogue du produit **28** en une étape à partir du dérivé bromé **26**, en utilisant comme nucléophile l'ester méthylique de l'acide aminocaproïque (figure I-*2*-15). La réaction est plus difficile : au bout d'une nuit, la réaction n'est pas terminée et des produits de dégradation apparaissent. De plus, les conditions utilisées, adaptées de celles utilisées pour les substitutions nucléophiles avec les diamines (c'est à dire un large excès - 40 éq. - de l'ester de l'acide aminocaproïque) rendent la purification du produit très difficile.

D'une manière générale, les réactions de substitution nucléophiles par des amines sur le dérivé bromé **26** donnent de bons résultats uniquement quand l'amine peut être utilisée en très large excès (solvant de la réaction). L'utilisation d'une quinacridine fonctionnalisée par un

(ou des) aldéhyde(s) semble une méthode beaucoup plus efficace et pouvant être étendue à une gamme beaucoup plus large d'acides aminés.

Par ailleurs, dans le but de diversifier la nature des bras de liaison pouvant être introduits sur la quinacridine, nous avons réalisé la substitution du brome du composé **26** par un groupement azoture (figure I-*2*-15). Le composé **29**, obtenu de manière quantitative par réaction de **26** avec l'azoture de sodium dans le DMF à 80°C, pourrait par la suite être engagé dans des réactions de couplage avec un composé portant une fonction alcyne (cyclo-addition [2+3] de type Huisgen) ou bien être réduit (par exemple par une réaction de Staudinger) pour donner le dérivé aminé correspondant.

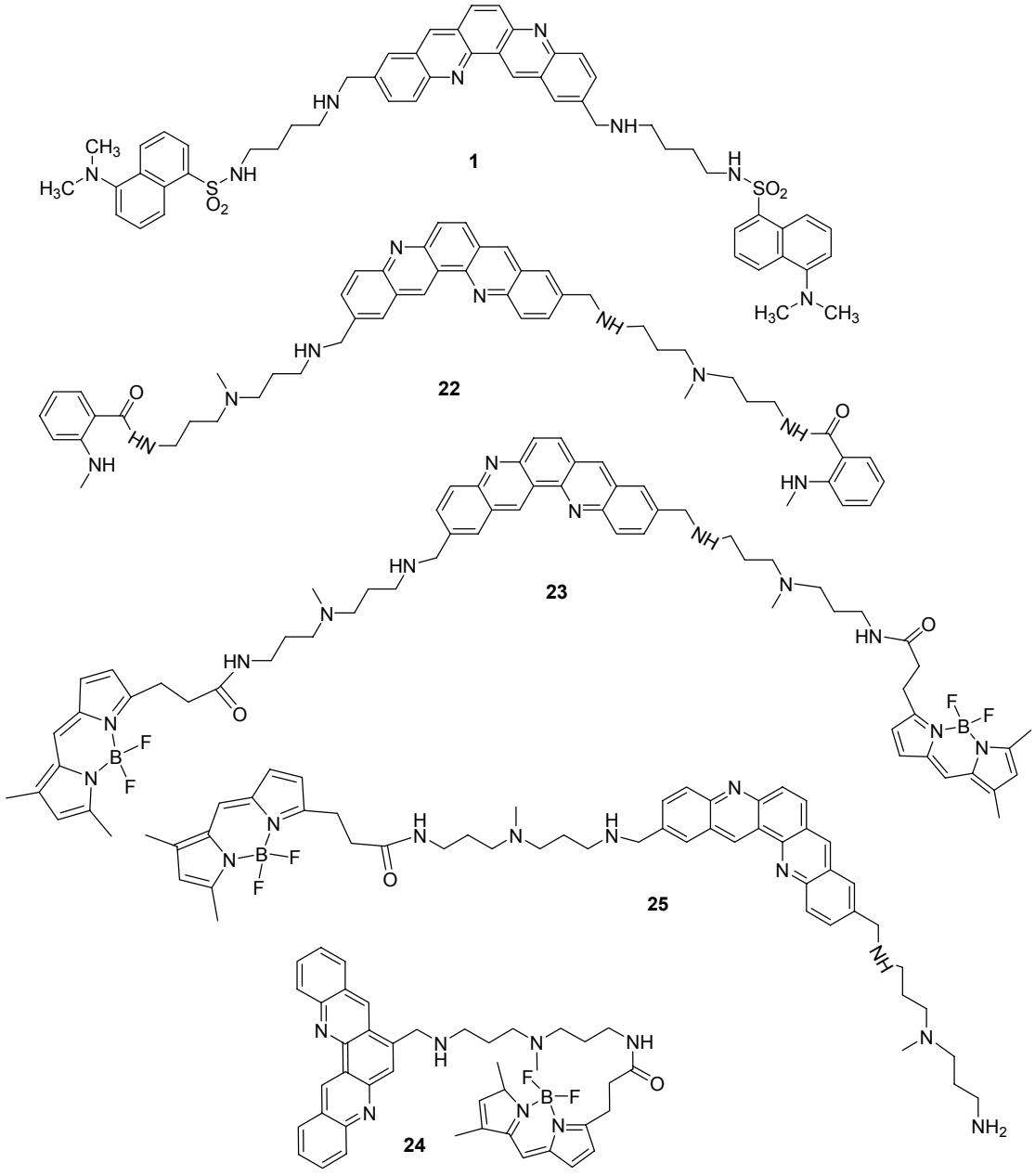


Figure I-*2*-16 : récapitulatif des structures des conjugués quinacridines – fluorophores obtenus.

Nous disposons donc au total de cinq conjugués quinacridine – fluorophores, trois composés où le fluorophore est le Bodipy, un où il s'agit du MANT et un du dansyle (figure I-*2*-16). Par ailleurs, plusieurs essais de synthèse ont été effectués dans le but de diversifier les voies d'obtention possibles de conjugués de quinacridines mais la réaction d'amination réductrice entre une chaîne portant une fonction amine et une quinacridine portant un ou plusieurs aldéhyde(s) reste pour l'instant la plus efficace et celle permettant l'obtention de la plus grande variété de composés.

III. Propriétés de fluorescence et d'interaction avec l'ADN.

*A. Conjugués quinacridine-dansyle **1** et quinacridine-MANT **22**.*

L'affinité des composés **1** et **22** pour le quadruplexe télomérique humain a été mesurée par la méthode de dénaturation thermique suivie par FRET. Pour les deux composés, nous obtenons un $\Delta T_{1/2}$ de +5°C (figure I-*2*-17 pour le composé **22**), ce qui indique une interaction, mais faible comparée aux résultats obtenus avec le précurseur **2** ne portant de fluorophores ($\Delta T_{1/2}$ de +21°C).[108] Des effets stériques (encombrement des fluorophores) peuvent être à l'origine de cette stabilisation modeste. Des interactions intramoléculaires entre la quinacridine et les fluorophores peuvent aussi être envisagées.

Dans le cas du composé **22,** le $\Delta T_{1/2}$ a également été mesuré en présence d'un large excès d'un oligonucléotide structuré en duplexe (ds26, un duplexe de 13 paires de bases) qui joue le rôle de compétiteur (15 et 50 équivalents par rapport à F21T). On observe une perte quasi-complète de la stabilisation du quadruplexe, ce qui semble indiquer que le composé **22** est peu sélectif de l'ADN quadruplexe.

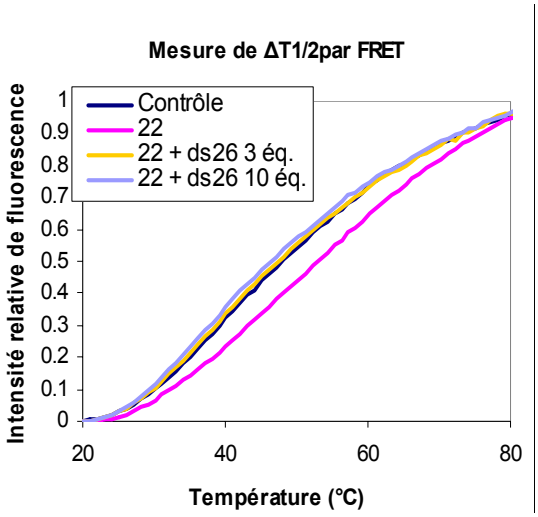


Figure I-*2*-17 : $\Delta T_{1/2}$ induit par le composé **22** (F21T 0.2µM, **22** 1µM, dans une solution LiCl 0,1 M, tampon cacodylate de sodium pH 7,3 10mM).

La sélectivité du composé **22** pour l'ADN quadruplexe a également été mesurée par dialyse à l'équilibre. La sélectivité mesurée par cette méthode est de l'ordre d'un facteur 2, elle est nettement meilleure que celle du précurseur **2** (figure I-*2*-18).

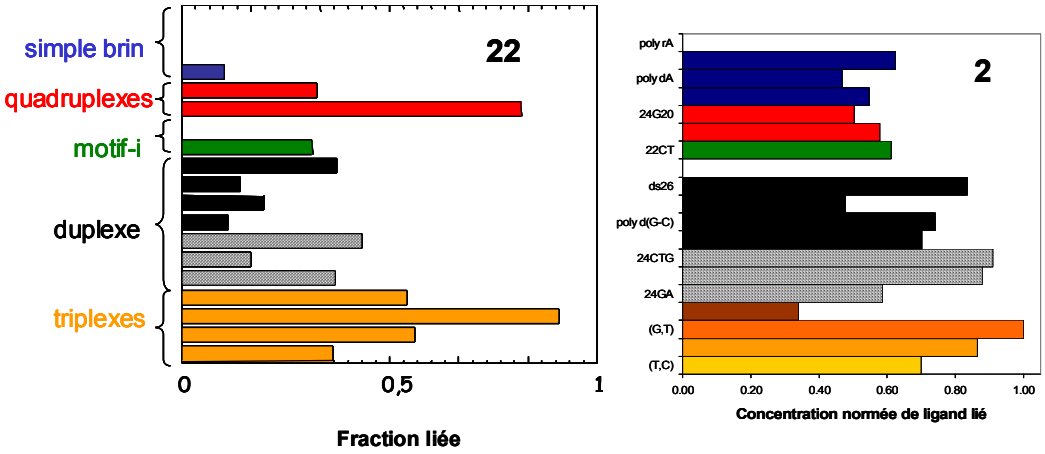


Figure I-*2*-18 : dialyse à l'équilibre des composés **2** et **22**.

Les spectres d'émission de fluorescence de **1** montrent une extinction de l'émission de fluorescence du motif quinacridine et des groupements dansyles. Les bandes d'émission de fluorescence des deux chromophores se superposent, ce qui complique l'étude d'éventuelles interactions entre les deux fluorophores. De plus, aucune variation significative de fluorescence n'est observée lors de l'ajout d'ADN quadruplexe.

De même, dans le conjugué **22**, les bandes d'émission de fluorescence de la quinacridine et du groupement MANT se superposent, comme le montre la comparaison des spectres des composés **2, 22** et **30** (fig. I-*2*-19). Les spectres d'absorption se recouvrant également, il n'est pas possible d'exciter sélectivement un des deux fluorophores. Ces superpositions rendent délicates la réalisation de titrations fluorimétriques avec ce composé. On constate une nette baisse du rendement quantique relatif et une perte de structure du spectre par rapport au composé **2**, ce qui témoigne de l'existence d'interaction entre chromophores.

Contrairement au quinacridines non substituées**,** la fluorescence du composé **22** n'est pas totalement éteinte lors de l'interaction avec l'ADN. On constate toutefois une diminution de l'intensité de fluorescence d'environ 30%, ce qui diminue son intérêt pour détecter l'ADN quadruplexe.

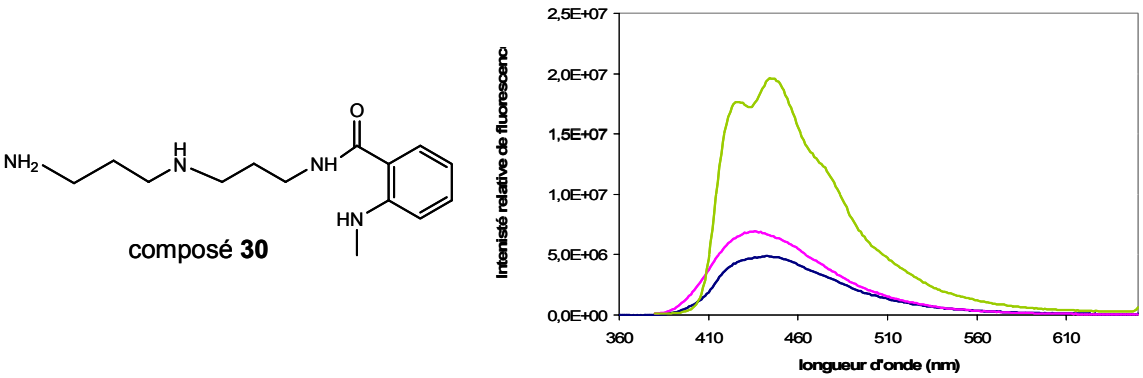


Figure I-*2*-19 : spectres d'émission de fluorescence des composés **2** (en vert), **22** (en bleu) et **30** (en rose), concentration 1 µM dans un tampon cacodylate de sodium pH 6.0, 10 mM, NaCl 10 mM, excitation 330 nm.

*B. Conjugués quinacridines-Bodipy **23, 24, 25**.*

Pour ces composés, la méthode de dénaturation thermique suivie par FRET n'est pas applicable car les longueurs d'onde d'émission et d'excitation du Bodipy coïncident avec celles de la fluorescéine. Nous avons donc étudié l'interaction du composé **23** avec l'ADN quadruplexe par électrophorèse sur gel d'agarose : la migration de l'ADN dans ce gel non dénaturant dépend de la masse, de la charge et de la structure secondaire.[71] Nous avons comparé ce composé **23** avec **22** et avec le bromure d'éthidium (**BET**), marqueur couramment utilisé pour révéler les gels en raison de l'exaltation de sa fluorescence dans l'ADN. L'oligonucléotide utilisé pour cette étude est un 22-mer mimant les répétitions télomériques humaines, le **22AG** de séquence d(A(GGGTTA)$_3$GGG).

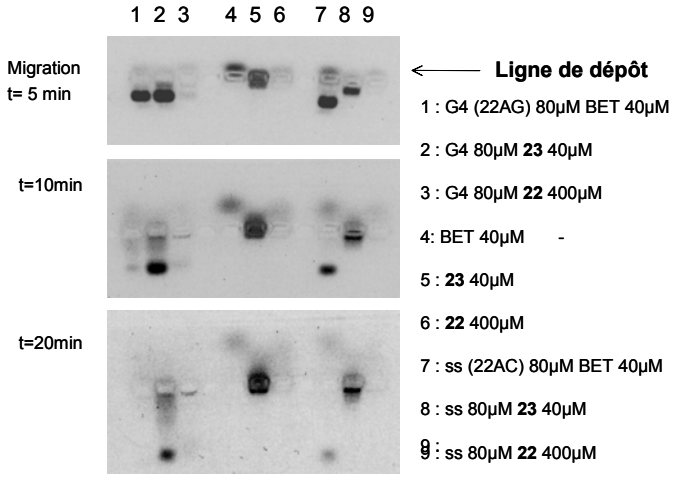


Figure I-*2*-20 : gel d'agarose 2.5%, tampon TEA 1X, 50V.

Ce gel permet de constater que le conjugué de Bodipy **23** fluoresce beaucoup plus que celui de MANT **22,** à l'état libre comme en présence d'ADN : à une concentration de 400µM,

la fluorescence bleue de **22** est visible à l'œil mais pas en photo (figure I-*2*-20, puits 3 et 6) alors qu'à 40µM on détecte parfaitement **23** (fluorescence verte ; figure I-*2*-20, puits 2 et 5). Les deux composés migrent avec le quadruplexe, ce qui témoigne d'une bonne affinité (figure I-*2*-20, puits 2 et 3). En effet, nos composés étant des polycations, à l'état libre ils migrent à l'opposé de l'ADN lorsqu'on applique un champ électrique (figure I-*2*-20, puits 5 et 6). Au bout de 10 min, seul **23** migre encore avec le quadruplexe. Nous avons aussi fait migré un oligonucléotide simple brin (un 22-mer, le 22-AC : d(T(CCCAAT)$_3$CCC)) en présence de nos composés. (figure I-*2*-20, puits 7, 8 et 9). Nos composés semblent interagir différemment avec le simple brin et le quadruplexe, sans qu'il soit possible de conclure par cette seule méthode.

Le composé **23** est donc un meilleur marqueur d'ADN que **22** pour les gels d'agarose. De plus, contrairement à **22**, les contributions des deux fluorophores à la fluorescence de la molécule peuvent être distinguées (figure I-*2*-21). Par ailleurs, l'excitation à 328 nm (zone d'absorption de la quinacridine) se traduit par une fluorescence autour de 510 nm (zone d'émission du Bodipy) et la fluorescence de la quinacridine (autour de 450 nm) est très fortement éteinte. Ceci laisse supposer qu'il existe un transfert d'énergie de fluorescence intramoléculaire de la quinacridine vers le Bodipy (FRET). Ce composé **23** peut donc à la fois être excité dans l'UV et dans le visible (le maximum d'absorption du Bodipy se situe vers 500 nm). Par ailleurs, on constate une légère exaltation de la fluorescence du composé **23** en présence d'ADN quadruplexe (figure I-*2*-21) ainsi qu'un affinement du spectre, qui témoigne de la diminution des interactions interchromophoriques en présence d'ADN.

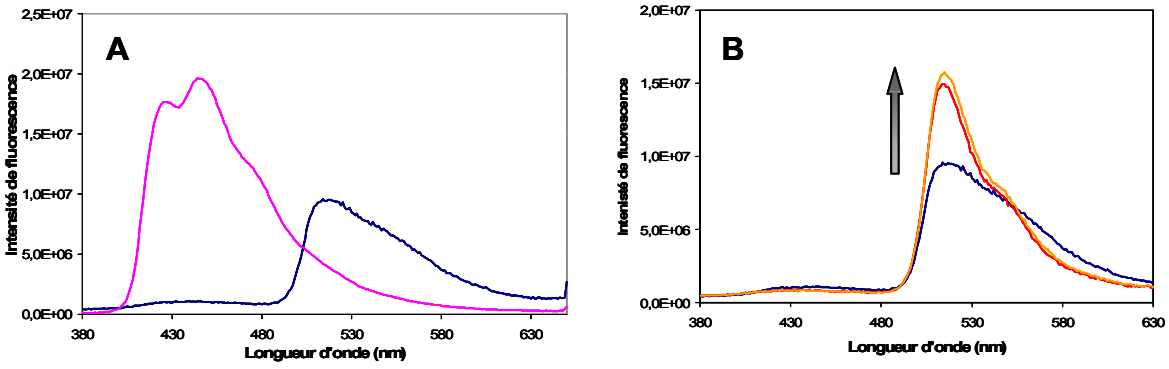


Figure I-*2*-21 : **A.** Emission de fluorescence des composés **2** (1 µM, courbe rose) et **23** (1 µM, courbe bleue) **B.** Emission de fluorescence du composé **23** seul (1 µM, courbe bleue) et en présence d'ADN quadruplexe (1 éq. courbe rouge, 2 éq. courbe orange), tampon cacodylate de sodium pH 6 1 mM, KCl 10 mM) excitation à 328 nm.

Le même phénomène de FRET intramoléculaire est observé avec le composé monofonctionnalisé **24**. En présence d'ADN quadruplexe, une diminution de la fluorescence

du Bodipy excitée par FRET (328 nm) est observée (figure I-*2*-22A), alors que lorsque le Bodipy est excité directement, le signal de fluorescence ne présente pas de variation significative (figure I-*2*-22B). Ce composé peut ainsi être excité à deux longueurs d'onde différentes, et l'émission de fluorescence résultante est sensible à la présence d'ADN quadruplexe pour l'une des deux longueurs d'onde seulement. Il mériterait donc une étude plus approfondie, afin de déterminer s'il peut être utilisé comme sonde ratiométrique pour l'ADN quadruplexe.

Des essais de titration fluorimétrique ont été entrepris sur ces conjugués. En ce qui concerne le composé **24**, nous ne sommes pas parvenus à obtenir un ajustement (« fit ») correct de la courbe de titration. Ceci peut provenir du fait que le signal de fluorescence est peu stable aux concentrations adaptées pour la titration (de l'ordre du µM). Différents phénomènes peuvent être à l'origine de ce problème : formation d'agrégats, interactions avec les parois de la cuve…

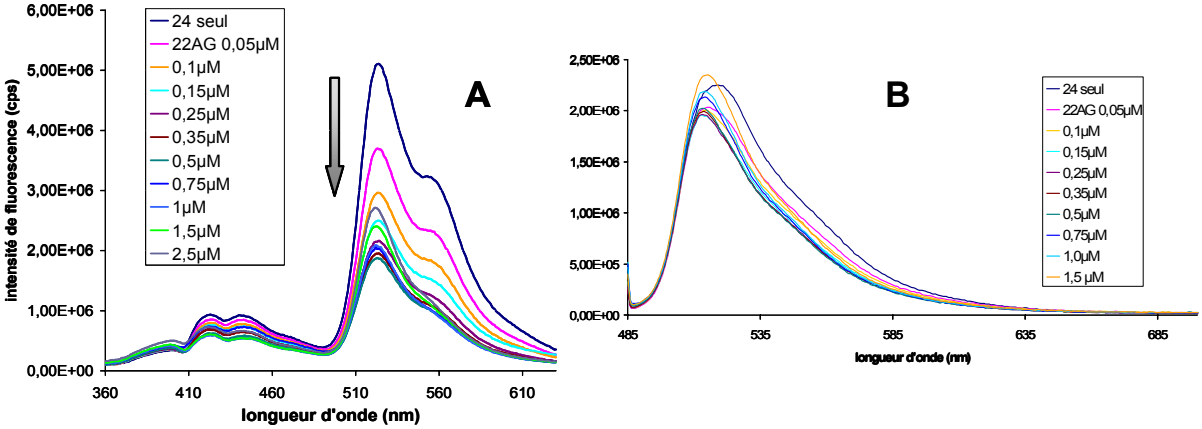


Figure I-*2*-22 : émission de fluorescence du composé **24** (0,5 µM) seul et en présence de quadruplexe 22AG, tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7,3 KCl 100 mM **A.** excitation 328 nm **B.** excitation 475 nm.

IV. Conclusions et perspectives.

Cinq conjugués quinacridines – fluorophores ont été synthétisés et étudiés. A cette occasion, la première étape de la synthèse des quinacridines a été améliorée et plusieurs approches pour obtenir des quinacridines fonctionnalisables (par des fluorophores, des groupements réactifs…) ont été essayées. Deux des conjugués étudiés, **1** et **22**, stabilisent modérément l'ADN quadruplexe et présentent des propriétés de fluorescence décevantes (composé non fluorescent dans l'eau ou diminution de la fluorescence en présence d'ADN). Les conjugués à base de Bodipy se sont révélés plus attractifs, de par leur forte fluorescence et

le phénomène de FRET qu'ils présentent. Il serait intéressant de poursuivre l'étude de leur affinité et de leur sélectivité pour l'ADN quadruplexe en mettant en œuvre d'autres méthodes (spectrométrie de masse, SPR…).

Il faut noter que la plupart des études sur la sélectivité des quinacridines avec des chaînes aminées longues, qui ont montré que ces composés possédaient une faible sélectivité quadruplexe *vs* duplexe, ont été réalisées après le début de ce travail.

Au regard des résultats obtenus avec tous ces composés, pour obtenir des marqueurs fluorescents d'ADN quadruplexe il nous a paru plus pertinent d'utiliser un fluorophore présentant une augmentation significative de rendement quantique en présence d'ADN que des molécules fluorescentes dans l'eau. Le Thiazole Orange présente cette caractéristique, c'est pourquoi nous avons étudié son interaction avec l'ADN quadruplexe

Chapitre I-3 : Mise au point d'un test FID (Fluorescent Intercalator Displacement) pour l'ADN quadruplexe.

Dans ce chapitre, nous présenterons les mesures réalisées pour caractériser l'interaction entre le **TO** et l'ADN quadruplexe. Nous présenterons ensuite comment nous avons mis au point un test FID permettant d'évaluer de façon simple et rapide l'affinité et la sélectivité d'un composé pour l'ADN quadruplexe. Nous discuterons les résultats obtenus sur un ensemble de ligands, les avantages et les limites du test et enfin les perspectives envisageables pour cette étude.

I. Interaction Thiazole Orange / ADN quadruplexe.

A. Le Thiazole Orange : propriétés de fluorescence, interaction avec l'ADN.

Le Thiazole Orange (**TO**, figure I-*3*-1) est une cyanine monométhine asymétrique qui, comme de nombreux composés de cette famille, possède une fluorescence négligeable en solution (rendement quantique de 2.10^{-4}) et une fluorescence intense lorsqu'elle interagit avec des acides nucléiques.[109] Cette exaltation de fluorescence (d'un facteur 500 à 3000 suivant les cas)[110] est attribuée à la restriction de la rotation autour de la liaison entre les deux hétérocycles composant la molécule. Cette caractéristique en fait un marqueur extrêmement attractif, largement utilisé pour le marquage d'oligonucléotides.[110]

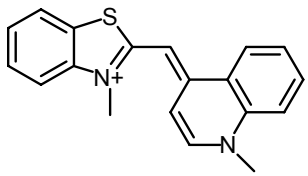


Figure I-*3*-1 : structure du Thiazole Orange
(le contre anion de l'échantillon utilisé dans ce travail est *p*-$CH_3(C_6H_4)SO_3^-$).

En solution aqueuse diluée, le **TO** est présent sous forme monomérique, caractérisée en spectroscopie UV - visible par une bande d'absorption à 500 nm (ε = 63000 $M^{-1}cm^{-1}$) avec un épaulement à 480 nm. A concentration plus élevée, le **TO** s'agrège partiellement sous forme dimérique (λ_{max} = 471 nm, avec un épaulement à 495 nm et un point isobestique à 476 nm). En présence d'ADN double brin, le maximum d'absorption est déplacé à 510 nm.[109,110]

Le **TO** interagit avec l'ADN double brin par intercalation. Le tableau I-*3*-1[109] donne quelques valeurs de constantes d'association du **TO** avec l'ADN en fonction de la séquence.

De façon générale, l'interaction est plus forte avec l'ADN double brin qu'avec le simple brin et beaucoup plus forte avec les polypurines qu'avec les polypyrimidines.

Table I

Type of Complex	Quantum Yield (at 25°C)	log(*K*) (at 100 m*M*)	ε_{max} (M^{-1} cm^{-1})	Abs. Peak (nm)	Ex. Peak (nm)	Em. Peak (nm)
Free TO	0.0002	—	63000	500.6	—	—
TO–ctDNA	0.11	5.5	63000	508.4	508.2	525
TO–poly(dA-dT)$_2$	0.07	5.5	67000	509.4	508.4	527
TO–poly(dG-dC)$_2$	0.11	5.5	78000	510.6	510.2	527
TO–poly(dA)	0.09	4.8	61000	506.6	506	526.6
TO–poly(dG)	0.39	4.8	—	—	515	531.4
TO–poly(dC)	0.06	3.4	43000	475.6	512.2	530.2
TO–poly(dT)	0.01	2.3	78000	476.0	512.2	531.4

Tableau I-*3*-1 : propriétés du **TO** en interaction avec l'ADN (extrait de Nygren, J. *et al.*[109])

A pH physiologique, le **TO** est un composé monocationique (pKa = 2.7 pour le couple dication / monocation). Le rendement quantique de fluorescence du **TO** lié à l'ADN diminue fortement avec la température (diminution d'un facteur 3 à 4 quand la température passe de 5 à 50 °C) : à haute température, l'agitation thermique de l'ADN est plus importante et la rotation interne de la molécule de TO est facilitée.[109]

B. Thiazole Orange et ADN quadruplexe.

A notre connaissance, un seul exemple dans la littérature utilise l'interaction du Thiazole Orange avec une structure quadruplexe. Il s'agit d'une étude sur l'invasion d'un quadruplexe d'ARN par un conjugué PNA (Peptid Nucleic Acid) / **TO**. Les auteurs observent une augmentation de fluorescence d'un facteur 5 entre le PNA libre et le PNA hybridé au quadruplexe.[111]

Nous nous sommes donc intéressés à l'interaction du Thiazole Orange avec l'ADN quadruplexe, en nous limitant dans un premier temps à des quadruplexes intramoléculaires bien caractérisés, qui se forment de façon quantitative par chauffage puis renaturation rapide (trempage dans un bain de glace) : le **22AG**, de séquence d($AG_3(T_2AG_3)_3$), qui mime la séquence télomérique humaine et le **TBA** (Thrombin Binding Aptamer, de séquence d($G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2$)).

1. Etude par spectroscopie d'absorption UV-Visible.

L'ajout d'oligonucléotide **22AG** à une solution de **TO** entraîne un hypochromisme et un effet bathochrome (décalage du maximum vers le rouge de 13 nm, de 501 à 514 nm),

caractéristiques d'une interaction avec l'ADN (figure I-*3*-2).[112] Nous avons ensuite utilisé la spectroscopie de fluorescence pour étudier cette interaction de façon quantitative.

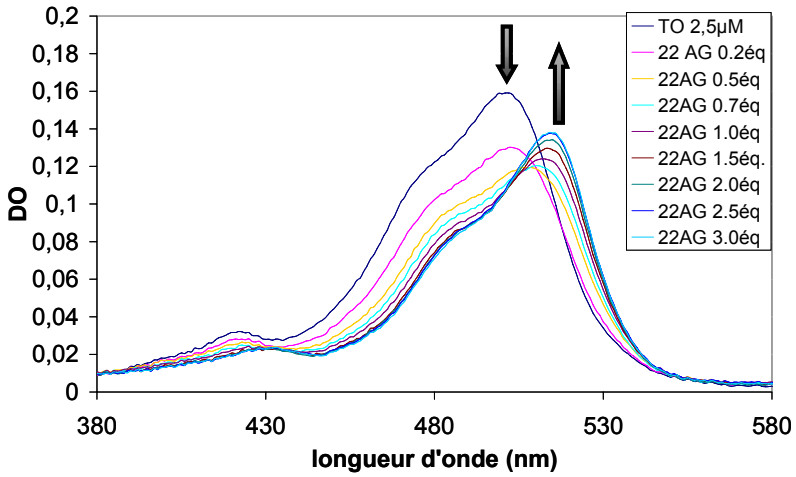


Figure I-*3*-2 : absorbance du **TO** (2,5 µM, dans un tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7,3, KCl 100 mM), en présence de quantités croissantes d'ADN quadruplexe 22AG.

2. Etude par spectroscopie de fluorescence.

Lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de **22AG** à une solution de **TO** (0,5 µM), une forte exaltation de fluorescence est observée, d'un facteur environ 500 pour 5 équivalents de quadruplexe. Ce facteur d'exaltation est calculé en faisant le rapport des aires des pics d'émission de fluorescence. La précision est faible du fait des erreurs sur la mesure de l'aire de fluorescence du **TO** libre, très faible.

Une titration fluorimétrique (figure I-*3*-3A) a été effectuée à force ionique élevée dans des conditions stabilisant fortement la structure quadruplexe (100 mM KCl). Le traitement de cette titration (figure I-*3*-3B) montre que, dans ces conditions, le **TO** forme un complexe 1 : 1 avec le 22AG, avec une forte affinité (Ka = 3.10^6 M^{-1}). De même, en présence de Na^+ (100 mM), le **TO** possède un seul site de forte affinité sur le 22AG (Ka = $3,5.10^6$ M^{-1}). L'interaction entre le **TO** et le 22AG ne semble donc pas être modulée par le cation présent dans la solution (Na^+ ou K^+).

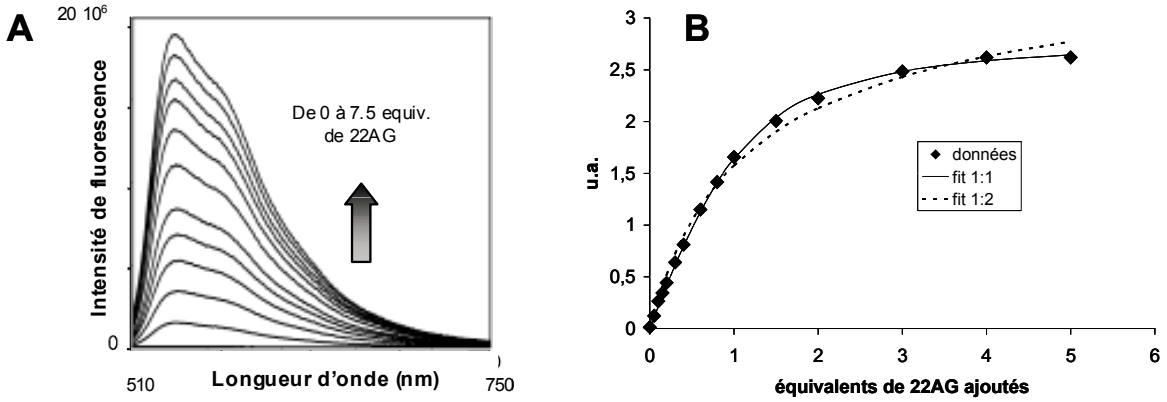


Figure I-*3*-3 : titration fluorimétrique (excitation 501 nm) du **TO** (1 µM) par l'oligonucléotide 22AG, tampon cacodylate de sodium pH 7.3 10 mM, 100 mM KCl. Les données sont traitées avec le logiciel Specfit 32.

Une deuxième expérience a été effectuée en partant d'une solution de quadruplexe 22AG 0,5 µM et en ajoutant des quantités croissantes de **TO** (figure I-*3*-4). On observe là encore une exaltation de fluorescence, avec un maximum d'émission à 536-537 nm jusqu'à deux équivalents de **TO** ajoutés. Au delà de trois équivalents de **TO** ajoutés, la forme du spectre d'émission de fluorescence change, avec un maximum d'émission à 542 nm et un épaulement vers le rouge plus marqué. On remarque aussi qu'au delà de trois équivalents, l'intensité de fluorescence diminue lorsqu'on ajoute du **TO**.

On peut donc supposer qu'en présence d'un faible excès de **TO** une des deux tétrades du quadruplexe est marquée préférentiellement, comme cela a été observé avec plusieurs ligands de quadruplexes. Il apparaît un second mode d'interaction entre le **TO** et le quadruplexe en présence d'un excès de **TO**, peut-être lié à des phénomènes additionnels d'agrégation du **TO** à forte concentration. Il serait donc intéressant de confirmer la stœchiométrie du complexe **TO** / 22AG par d'autres méthodes, par exemple par spectrométrie de masse.

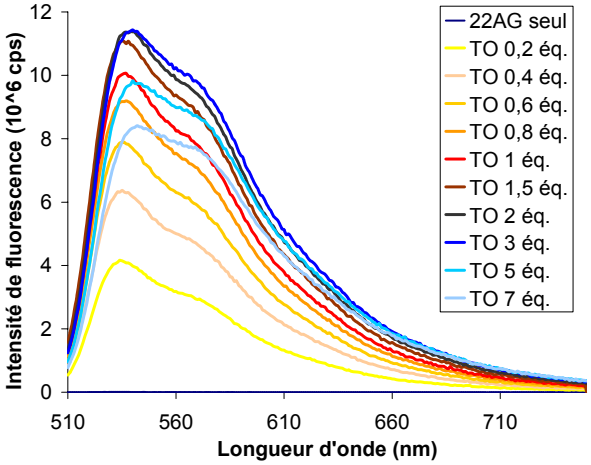


Figure I-*3*-4 : solution de quadruplexe 22AG 0.5µM, ajout de quantités croissantes de **TO**. Excitation : 501nm, tampon cacodylate de sodium pH 7.3 10 mM, 100 mM KCl.

De la même façon, nous avons montré par titration fluorimétrique (figure I-*3*-5) que le **TO** formait un complexe 1 : 1 avec l'oligonucléotide TBA, là aussi avec une forte affinité (Ka = 2.0 x10^6 M^{-1}).

Le **TO** constitue ainsi un marqueur présentant à la fois une forte exaltation de fluorescence en présence d'ADN quadruplexe et une forte affinité pour cette structure. Il ne présente pas de sélectivité pour l'ADN quadruplexe par rapport l'ADN duplexe, ce qui rend impossible son utilisation directe à des fins de détection. Toutefois, le **TO** semble une sonde fluorescente parfaitement adaptée à la mise au point d'un test de déplacement compétitif (FID) pour l'ADN quadruplexe.

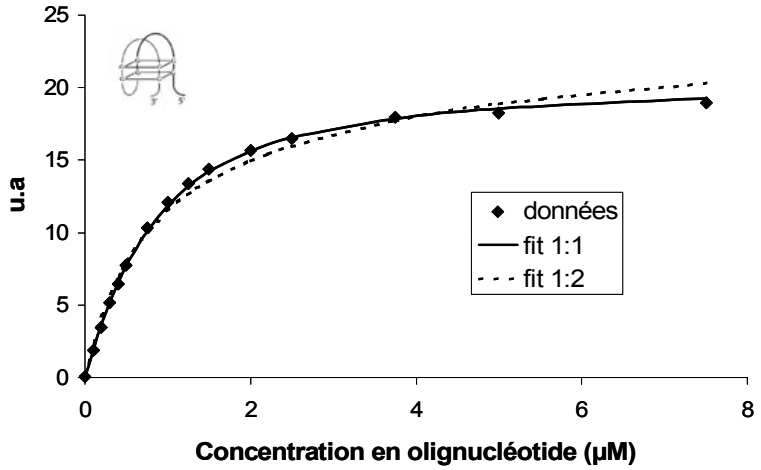


Figure I-*3*-5 : titration fluorimétrique (λ_{ex} = 501 nm) du TO (0,5 µM) par l'oligonucléotide TBA, tampon cacodylate de sodium pH 7.3 10mM, 100mM KCl. Les données sont traitées avec le logiciel Specfit 32.

II. Principe du FID. Eléments bibliographiques.

Le FID est un test permettant d'évaluer l'affinité et la sélectivité d'un composé pour une structure d'ADN donnée, dont le principe est présenté figure I-*3*-6. Il consiste à marquer la structure d'ADN par une sonde fluorescente : un intercalant (Bromure d'éthidium, Thiazole Orange) ou un ligand de petit sillon (Hoechst 33258) dont la fluorescence est exaltée en présence d'ADN. L'ajout de quantités croissantes du composé à étudier entraîne un déplacement de la sonde fluorescente par compétition et donc une diminution de son émission. La diminution de la fluorescence en fonction de la concentration en ligand permet une estimation de l'affinité de celui-ci, souvent exprimée à l'aide d'une DC_{50}, qui est la concentration en ligand nécessaire pour diminuer l'intensité de fluorescence de moitié par rapport à son niveau initial.

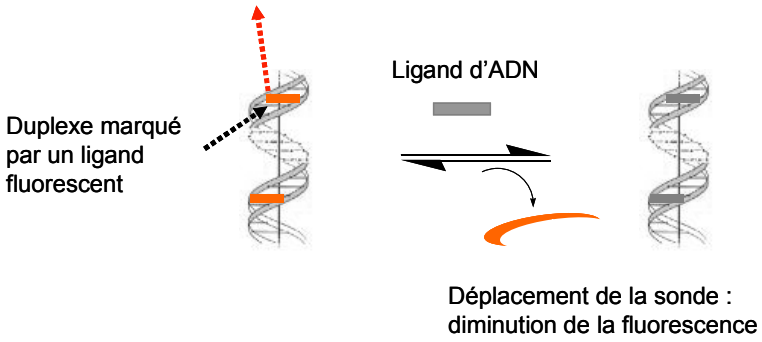


Figure I-*3*-6 : schéma de principe du FID.

Le FID est un test simple à mettre en œuvre et rapide à réaliser pouvant être appliqué à des composés fluorescents ou non, à condition qu'il n'y ait pas de recouvrement spectral entre la sonde fluorescente et le composé à étudier.

Les premiers exemples de FID, réalisés sur des duplexes, utilisaient le bromure d'éthidium (**BET**) comme sonde fluorescente,[113] et cet intercalant est resté très largement utilisé par la suite.[114] Le **TO** se révèle une bonne alternative : il présente une plus forte exaltation de fluorescence, une toxicité moindre, une plus forte affinité pour l'ADN et des maxima d'absorption et d'émission différents.[109,114,115] Ces deux dernières caractéristiques le rendent complémentaires du **BET**. Le Hoechst33258 a lui aussi été utilisé, pour des études sur des ligands de petits sillons.[116]

Ce test a été utilisé sur un grand nombre de séquences afin d'étudier la sélectivité d'un composé pour diverses séquences, ou bien pour comparer plusieurs composés entre eux. Boger *et al.* ont ainsi développé une version à haut débit de ce test, en utilisant des plaques 96 puits.[114,117] Il existe des exemples de tests FID sur des petites molécules,[117] sur des protéines,[118] et sur des oligonucléotides formant des triplexes.[119] À notre connaissance, aucun test FID n'a encore été utilisé sur des G-quadruplexes.

Les données obtenues par FID peuvent être traitées pour obtenir la constante d'association d'un composé pour une structure d'ADN, et la stoechiométrie du complexe ADN / ligand. Des précautions doivent toutefois être prises dans le calcul de ces constantes d'association dans le cas où le composé étudié et la sonde fluorescente ont des sites de fixation différents.[116] Dans ce cas, le FID permet une évaluation globale de l'affinité du composé pour la structure, *via* la mesure d'une DC_{50}.

III. Le test G4-FID. Evaluation de l'affinité de ligands potentiels d'ADN quadruplexe.[108]

A. Conception du test.

Le **TO** constitue donc une sonde fluorescente bien adaptée pour un test FID sur l'ADN quadruplexe (test « G4-FID »), contrairement au **BET** qui est connu pour n'avoir qu'une faible affinité pour cette structure.[71] Pour mettre au point ce test, nous avons choisi d'utiliser une série de quinacridines développées au laboratoire (figure I-*3*-7), pour lesquelles nous avions des données de dénaturation thermique suivie par FRET sur le même oligonucléotide (quadruplexe télomérique humain).[52,120]

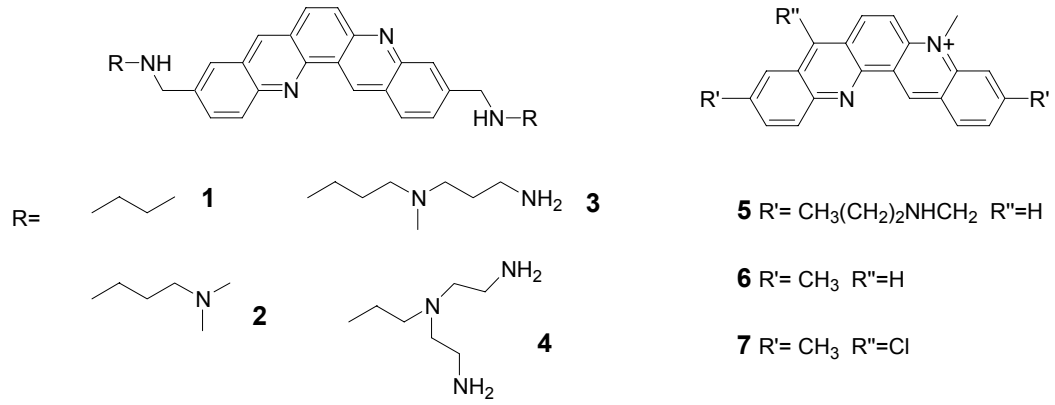


Figure I-*3*-7 : structure des quinacridines utilisées pour mettre au point le test FID.

Nous avons choisi d'opérer à force ionique élevée, dans des conditions stabilisant fortement la structure quadruplexe (100 mM KCl) en utilisant le quadruplexe 22AG, avec deux équivalents de **TO** par rapport au quadruplexe, en cohérence avec les résultats obtenus par titration fluorimétrique. Il faut souligner que les essais effectués avec un plus large excès de **TO** (5 éq.) ont donné des résultats analogues.

Les résultats des mesures sont traités comme suit. L'aire de fluorescence FA_0 ($510 < \lambda_{ém} < 750$ nm) du **TO** avant ajout de ligand est prise comme référence. A chaque ajout de ligand (de 0 à 10 équivalents) on mesure l'aire de fluorescence FA du **TO** et on calcule un pourcentage de déplacement $PD = 100-[(FA/FA_0)*100]$. Le pourcentage de déplacement peut ensuite être tracé en fonction de la concentration en ligand ajouté. Les courbes correspondant à la série testée sont présentées figure I-*3*-8. Pour comparer les ligands entre eux, on définit ensuite un $^{G4}DC_{50}$ comme étant la concentration en ligand nécessaire pour déplacer 50% du **TO** (tableau 1).

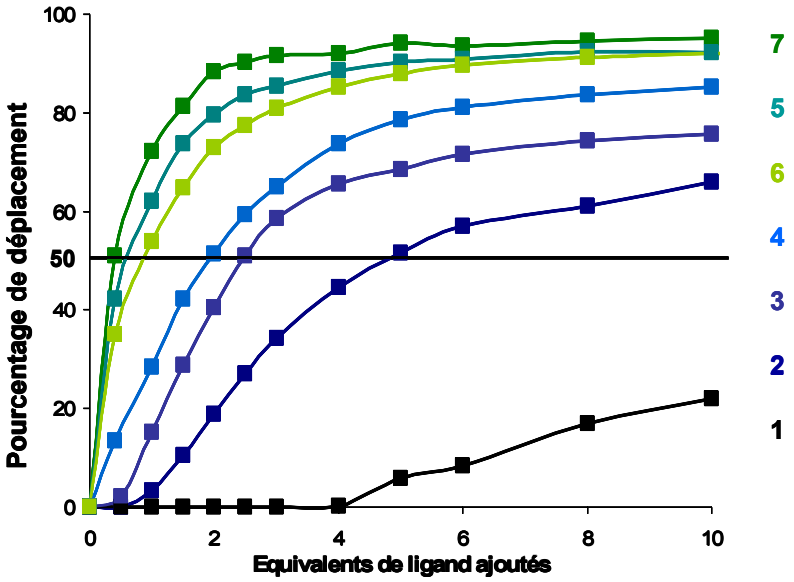


Figure I-*3*-8 : pourcentage de déplacement du **TO** en fonction de la concentration en ligand ajouté pour les quinacridines **1** à **7**. Le $^{G4}DC_{50}$ d'un ligand est la concentration nécessaire pour déplacer 50% du **TO** (ligne en gras sur le graphique).

B. Résultats obtenus.

Au sein d'une série de ligands (quinacridines polyaminées **1-4** ou quinacridines N-méthylées **5-7**), les résultats obtenus par FID sont en bon accord avec les $\Delta T_{1/2}$ mesurés par FRET (tableau I-*3*-2), l'exemple le plus frappant étant la série des quinacridines portant des chaînes polyaminées (composés **1-4**). La quinacridine **1**, malgré un $\Delta T_{1/2}$ de 12 °C, déplace difficilement le **TO** ($^{G4}DC_{50} > 2{,}5$ µM). Ceci est en partie due à la forte affinité du **TO** pour le quadruplexe ($Ka = 3.10^6\ M^{-1}$). En revanche, le FID permet d'estimer l'affinité des ligands **3** et **4** pour l'ADN quadruplexe ($^{G4}DC_{50} = 0{,}61$ µM et 0,48 µM respectivement), alors que ce n'est pas possible par titration fluorimétrique : la forte charge cationique des ligands entraîne probablement des phénomènes de précipitation.[120] L'ensemble de ces résultats indique que ce test FID permet de sélectionner des ligands possédant une très forte affinité pour l'ADN quadruplexe ($Kd \leq$ µM).

Afin de confirmer la validité de ce test avec des ligands de structures variées, nous avons testé deux autres composés disponibles au laboratoire : le macrocycle **BOQ$_1$**[68], le pyridodicarboxamide **360A**[41,53] (figure I-*3*-9). Pour ces deux ligands possédant une forte affinité pour l'ADN quadruplexe ($\Delta T_{1/2} > 25$ °C), un déplacement efficace du **TO** est observé ($^{G4}DC_{50} < 0{,}5$ µM).

Ligand	$^{G4}DC_{50}$ (µM) [a]	$\Delta T_{1/2}$ (°C) [b]	$^{ds}DC_{50}$ (µM) [a]	Sel. [d]	Est. Sel. [e]
1	>2.5	12	*n.d.* [c]	*n.d.* [c]	-
2	1.185	19	0.667	0.6	-
3	0.611	21	0.497	0.8	-
4	0.480	32	0.392	0.8	-
BOQ$_1$	0.475	28	1.862	3.9	-
360A	0.320	26	>2.5	>6.4	43.5
5	0.162	21	0.400	2.5	-
6	0.217	10	0.925	4.3	-
7	0.096	16	>2.5	>25.9	31.7
TMPyP4	0.106	22	0.190	1.8	-

[a] $^{G4}DC_{50}$ et $^{ds}DC_{50}$ représentent la concentration nécessaire pour déplacer 50% du **TO** de l'ADN quadruplexe (G4-DNA) et duplexe (ds-DNA) respectivement (erreurs expérimentales estimées à ±5 %). [b] $\Delta T_{1/2} = T_{1/2}$(DNA + ligand) – $T_{1/2}$(DNA); déterminé par dénaturation thermique suivie par FRET. [c] *n.d.* pour non déterminé. [d] Sel. pour sélectivité G4- *vs* ds-DNA, définie comme : Sel. = $^{ds}DC_{50}/^{G4}DC_{50}$. [e] Est. Sel. pour sélectivité estimée, voir le paragraphe IV A. pour une définition détaillée.

Tableau I-*3*-*2* : résultats du test FID (DC_{50} et sélectivité) et résultats de FRET ($\Delta T_{1/2}$) pour différents composés disponibles au laboratoire.

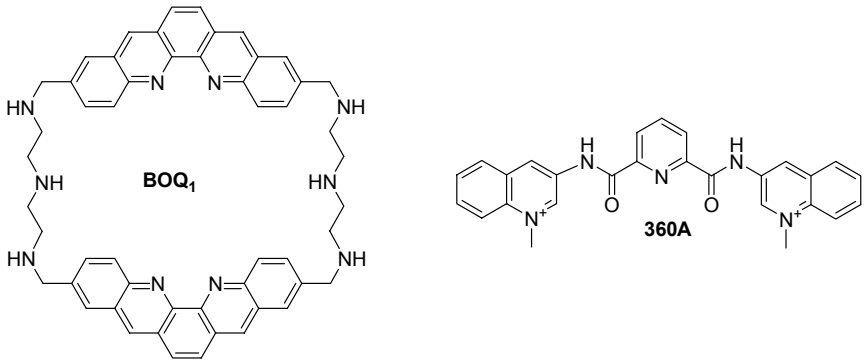


Figure I-*3*-9 : composés **BOQ$_1$** (tétrachargé à pH physiologique, le contre anion est Cl^- dans notre cas) et **360A** (le contre anion est I^-).

De façon intéressante, les quinacridines N-méthylées (composés **5**-**7**) déplacent plus efficacement le **TO** que les quinacridines portant des chaînes polyaminées, alors que leurs $\Delta T_{1/2}$ sont plus faibles (tableau I-*3*-2). Ce décalage entre les résultats obtenus par les deux méthodes peut être expliqué par des modes d'interaction différents des deux familles de ligands avec le quadruplexe.

Les quinacridines polyaminées forment préférentiellement un complexe 2 :1 avec le 22AG, alors que le **TO** forme un complexe 1 :1. La compétition entre les quinacridines polyaminées et le **TO** n'est donc pas directe. On peut supposer qu'elle l'est dans le cas des quinacridines N-méthylées, ce qui peut expliquer le déplacement plus efficace. De plus, alors

que les quinacridines N-méthylées interagissent très probablement avec le quadruplexe par interaction de stacking, les quinacridines portant des chaînes polyaminées établissent probablement des interactions électrostatiques avec les boucles ou les sillons du quadruplexe en complément de l'interaction de stacking.

Ainsi, il semble que la capacité de déplacement du **TO** dépende fortement des interactions de π-stacking entre le composé testé et le quadruplexe. Notamment, les résultats de FID montrent que plus la quinacridine est pauvre en électrons, plus le déplacement du **TO** est efficace. Cette observation a été confirmée en testant la porphyrine **TMPyP4** (figure I-*3*-10), connue pour interagir par stacking avec une des tétrades du quadruplexe.[79] On peut considérer que ni l'absorbance ni la fluorescence du **TMPyP4** ne perturbent la détermination de la DC_{50} car la DC_{50} est obtenu à des concentrations en **TMPyP4** où elles sont négligeables devant celles du **TO**. Cette porphyrine déplace très efficacement le **TO** ($^{G4}DC_{50}$ = 0,106µM), de façon analogue aux quinacridines N-méthylées. Ce lien entre capacité de π-stacking et déplacement du **TO** devra être confirmé en testant d'autres familles de ligands.

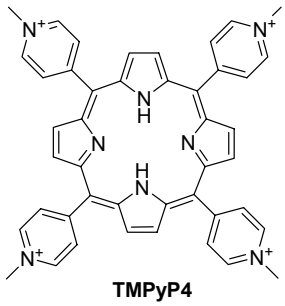


Figure I-*3*-10 : composé **TMPyP4** (le contre anion est *p*-$CH_3(C_6H_4)SO_3^-$).

Nous avons donc montré que le test G4-FID était une méthode simple et rapide pour mettre en évidence des composés possédant une forte affinité pour l'ADN quadruplexe et qui permet de comparer des ligands d'une même série. La capacité d'un ligand à déplacer le **TO** dépend du mode d'interaction de ce ligand avec le quadruplexe. Ceci peut rendre délicate la comparaison des $^{G4}DC_{50}$ de composés de structures différentes : l'affinité des ligands ayant une compétition indirecte est sous-estimée par rapport à celle des ligands en compétition directe avec le **TO**. En revanche, la comparaison des résultats obtenus par le test G4-FID et par la mesure de dénaturation thermique suivie par FRET pourrait apporter des informations sur le mode d'interaction d'un composé avec la structure quadruplexe.

IV. « FID Comparatif ». Evaluation de la sélectivité quadruplexe *vs* duplexe.

A. Conception du test.

Le **TO** ayant des affinités comparables pour l'ADN quadruplexe et pour l'ADN duplexe et étant connu pour ne pas présenter de spécificité de séquence vis-à-vis d'un duplexe particulier, il nous a été possible d'utiliser le FID pour évaluer la sélectivité quadruplexe/duplexe d'un ligand. Pour cela, nous avons réalisé le même test que précédemment mais en utilisant un duplexe (un 17-mer contenant la séquence de reconnaissance d'une enzyme, utilisé précédemment au laboratoire).[68] Toutefois, la stoechiométrie du complexe **TO**/duplexe est plus élevée : théoriquement, jusqu'à une molécule de **TO** toutes les deux paires de base, et Boger *et al.* ont déterminé empiriquement un rapport optimal d'un **TO** toutes les trois paires de base pour leurs expériences de FID sur des duplexes. Afin de nous assurer que le duplexe était suffisamment marqué dans nos conditions, nous avons testé des ratio **TO**/duplexe de 2/1 et 4/1, et constaté que les résultats étaient identiques.

Il est ainsi possible de déterminer de la même façon que précédemment une $^{ds}DC_{50}$. La sélectivité du ligand est alors définie comme étant le rapport des deux DC_{50} (G4/ds). Dans certains cas, le ligand interagit faiblement avec le duplex et il est donc impossible de déplacer 50% du **TO**. On estime alors le pourcentage de déplacement atteint à 10 équivalents et on définit une sélectivité estimée (Est. Sel.) en utilisant la concentration ^{G4}**c** nécessaire pour atteindre le même pourcentage de déplacement sur le 22AG (Est. Sel.=2,5/^{G4}c).

B. Validation par des ligands connus.

Les résultats obtenus par FID (figure I-*3*-11 et tableau I-*3*-2) sont en bon accord avec ceux obtenus par d'autres techniques. Par exemple, une sélectivité comprise entre 10 et 3,3 a été déterminée pour **BOQ$_1$** par SPR et par dialyse à l'équilibre[68] et la sélectivité obtenue par FID est de 3,9. De même, une sélectivité supérieure à 50 a été déterminée par AlphaScreen pour le composé **360A**[41] et une sélectivité estimée Est. Sél.= 43,5 est obtenue par FID. Le composé **TMPyP4** est lui connu pour être peu sélectif du quadruplexe par rapport au duplexe,[88] et nous déterminons effectivement une faible sélectivité (1,8) par FID.[121]

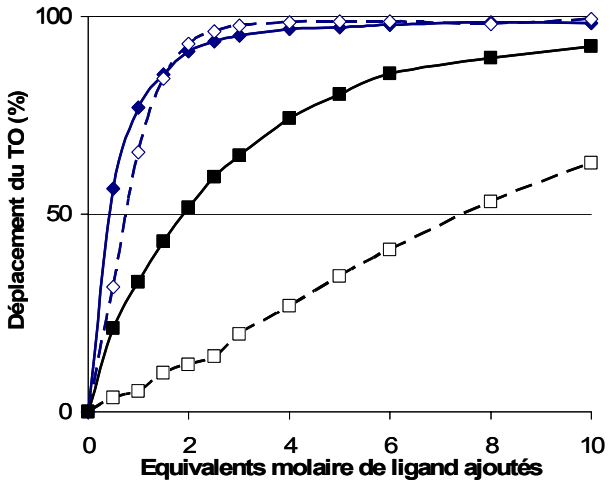


Figure I-*3*-11 : FID comparatif, exemple des composés **BOQ_1** (carrés) et **TMPyP4** (losanges). Les courbes « G4 » sont en traits pleins, les courbes « duplexe » en pointillés.

Concernant les quinacridines, si les composés portant des chaînes polyaminées apparaissent peu sélectifs (sélectivité de 0,6 à 0,8, voir figure I-*3*-12 et tableau I-*3*-2), les composés N-méthylés présentent eux une sélectivité très intéressante (jusqu'à un facteur 31,7 pour le composé **7**). Là encore, les tendances obtenues récemment par spectrométrie de masse (ESI-MS, tableau I-*3*-3) sont confirmées.[121]

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**7**
FID sel.	-	0,6	0,7	0,8	2,5	31,7
ESI-MS sel.	1,9	1,2	1,4	1,4	1,3	22

Tableau I-*3*-3 : comparaison des sélectivités déterminées en FID et par spectrométrie de masse.

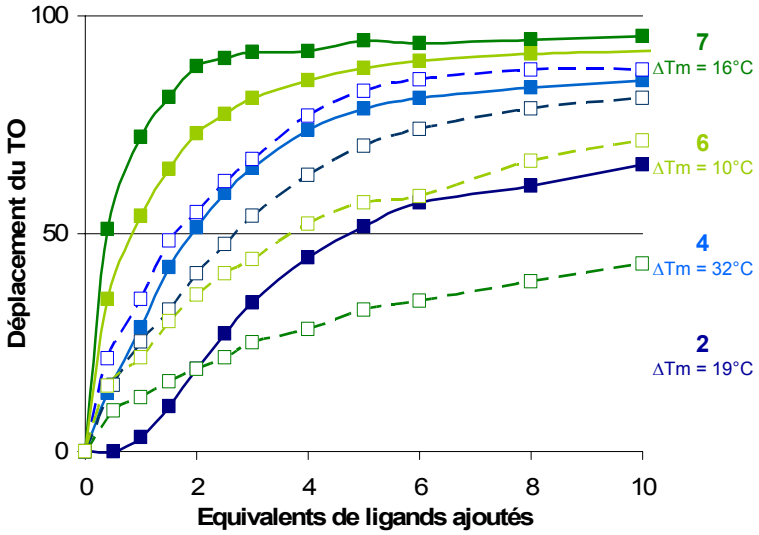


Figure I-*3*-12 : FID comparatif, exemple des composés **2, 4, 6** et **7**.
Les courbes « G4 » sont en traits pleins, les courbes « duplex » en pointillés.

Le FID comparatif constitue donc une méthode simple et rapide pour évaluer la sélectivité quadruplexe/duplexe d'un composé donné. Les précautions à prendre dans l'interprétation des $^{G4}DC_{50}$ s'appliquent aussi dans l'interprétation des données de sélectivité. Néanmoins pour toutes les séries de composés testés, les valeurs de sélectivités obtenues sont en bon accord avec les valeurs obtenues par d'autres méthodes de mesures (SPR, AlphaScreen, MS).

V. Conclusions et perspectives.

A. Avantages et limites du test.

Le G4-FID constitue un test simple à mettre en œuvre, rapide et consommant peu de composé et d'ADN (respectivement 7,5 et 1,5 nmol par test). Il permet de sélectionner des composés ayant une forte affinité pour l'ADN quadruplexe et permet de classer des ligands d'une même série en fonction de leur affinité. Le FID comparatif permet d'évaluer, là encore de façon simple et rapide, la sélectivité quadruplexe/duplexe d'un composé. Il serait évidemment très intéressant de poursuivre ce test avec d'autres ligands, afin d'étendre sa validité.

La principale limite du test vient du fait que la capacité d'un ligand à déplacer le **TO** dépend du mode d'interaction de ce ligand avec le quadruplexe. Il faut donc se limiter à exprimer des $^{G4}DC_{50}$ sans chercher à en déduire des données thermodynamiques sur l'interaction entre le G4 et le ligand étudié, et des précautions doivent être prises si l'on souhaite comparer des $^{G4}DC_{50}$ de composés de familles différentes.

Un avantage particulièrement intéressant du test G4-FID est qu'il peut très facilement être adapté à une grande variété de conditions (force ionique variable, choix du cation métallique) et surtout qu'il peut être réalisé avec n'importe quelle structure quadruplexe (intra-, bi- ou tétramoléculaire). Dans l'ensemble, le FID constitue un moyen simple et rapide d'évaluer l'affinité et la sélectivité d'un composé pour l'ADN quadruplexe et semble donc présenter un intérêt certain pour faciliter le criblage de nouveaux ligands de l'ADN quadruplexe.

B. Perspectives.

De nouveaux ligands synthétisés au laboratoire ont été testés en FID, les résultats sont en bon accord avec les données de dénaturation thermique mesurées par FRET. De plus, l'ensemble des composés présentés dans ce chapitre a été testé d'une part en présence de sodium et non plus de potassium, et d'autre part pour leur capacité à déplacer le **TO** du

quadruplexe TBA, un quadruplexe présentant uniquement des boucles latérales.[122] De façon intéressante, les quinacridines N-méthylées (composés **5** à **7**) ont des $^{G4}DC_{50}$ quasiment identiques quel que soit le quadruplexe, alors que les quinacridines polyaminées présentent des écarts plus importants ce qui semble confirmer les différents modes d'interaction : essentiellement par π-stacking pour les quinacridines N-méthylées alors qu'il existe des interactions additionnelles avec les boucles et les sillons pour les quinacridines N-méthylées, ces interactions dépendant du quadruplexe.

L'utilisation du quadruplexe tétramoléculaire $(TG_4T)_4$ est ensuite prévue. Des résultats préliminaires encourageants montrent que le **TO** possède deux sites d'affinité élevée sur ce quadruplexe. D'autres séquences peuvent également être envisagées. L'objectif de cette étude est de confirmer que le FID peut apporter des informations sur le mode d'interaction du composé testé avec l'ADN quadruplexe et de voir s'il peut être utilisé pour mettre en évidence l'affinité particulière d'un composé pour une structure quadruplexe donnée (affinité pour les boucles latérales, diagonales…).

Chapitre I-4 : Un système FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) spécifique de l'ADN quadruplexe.

Dans ce chapitre, nous présentons le phénomène de FRET et comment il peut être utilisé pour l'étude des structures d'acides nucléiques. Nous décrivons une nouvelle paire donneur/accepteur, constituée d'une quinacridine comme donneur et du Thiazole Orange comme accepteur. Cette paire de chromophores permet de mettre en évidence un phénomène de FRET dans lequel l'ADN joue le rôle d'une matrice qui positionne favorablement les deux chromophores. Enfin, nous étudions l'influence de la matrice ADN (quadruplexe ou duplexe) et des conditions expérimentales (nature du cation métallique présent) sur l'efficacité de ce phénomène de FRET.

I. Le phénomène de FRET.

A. Principe du FRET.

Le FRET est un phénomène de transfert d'énergie non radiatif entre deux molécules (figure I-*4*-1). Il existe plusieurs types de FRET, selon la distance et la nature du couplage entre les molécules.[1] Celui observé le plus souvent est dit de type « Förster », il est caractéristique d'interactions dipôle - dipôle entre le donneur et l'accepteur. Dans la suite, nous nous limiterons à la description du FRET de type « Förster ». En effet, c'est le phénomène prépondérant aux distances pertinentes pour l'observation d'évènements biologiques (chromophores distants de quelques nm).

Pour qu'il y ait FRET, il faut qu'il y ait un recouvrement spectral entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur. L'efficacité du FRET de type « Förster » varie en $1/[1+(r/R_0)^6]$, où r est la distance donneur - accepteur et R_0 le rayon de Förster, qui correspond à la distance à laquelle 50% de l'énergie d'excitation du donneur est transférée à l'accepteur. La valeur de R_0, généralement comprise entre 1 et 10 nm, est caractéristique du couple donneur-accepteur. Elle dépend aussi de l'orientation relative des deux molécules. R_0 peut être calculé en utilisant l'équation (1)[123], où η est l'indice de réfraction du milieu séparant le donneur et l'accepteur, κ^2 est un facteur associé à l'orientation relative des moments dipolaires de transition du donneur et de l'accepteur, Φ_d est le rendement quantique du donneur en l'absence de l'accepteur et $J = 10^{17} \int q_{d,\lambda}\, \varepsilon_{a,\lambda}\, \lambda^4\, d\lambda$ représente le recouvrement

spectral entre l'émission de fluorescence du donneur $q_{d,\lambda}$ et l'absorption UV-Visible de l'accepteur $\varepsilon_{a,\lambda}$.

$$R_0 = (8{,}79.10^{-28}\, J\, \kappa^2\, \eta^{-4}\, \Phi_d)^{1/6}\ \text{nm}. \quad (1)$$

La valeur de l'indice de réfraction η est généralement prise égale à 1,4 pour des chromophores en milieu biologique.[4] Le facteur κ^2 varie entre 0 (moments dipolaires de transition perpendiculaires) et 4 (moments parallèles) et prend la valeur 2/3 lorsque les orientations relatives du donneur et de l'accepteur varient de façon aléatoire (molécules libres de bouger autour d'un point d'attache).[1,4]

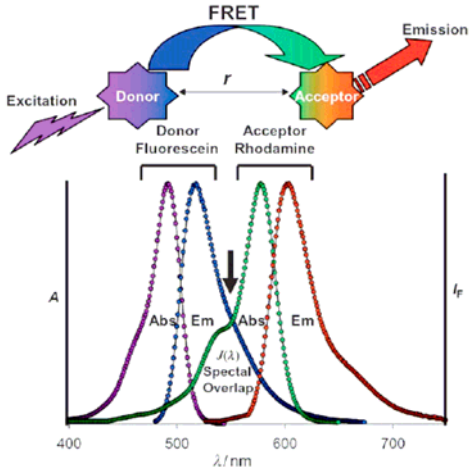


Figure I-*4*-1 : schéma de principe du FRET. Les spectres sont ceux du couple fluorescéine/rhodamine. Image extraite de Sapsford *et al.*[4].

Le phénomène de FRET se traduit par un déclin de la fluorescence du donneur, qui se désexcite non plus par fluorescence mais par transfert d'énergie à l'accepteur, et par une diminution de la durée de vie de l'état excité du donneur. La sensibilité du FRET aux variations de la distance donneur/accepteur (décroissance en $1/r^6$ du transfert d'énergie) en fait un outil énormément utilisé en biologie (études d'interactions antigène/anticorps, du repliement des protéines, étude de l'organisation de la membrane cellulaire...).[4] Le donneur et l'accepteur de la paire FRET peuvent être constitués chacun respectivement de molécules organiques (paire de fluorophores ou paire fluorophore/quencher), de fluorophores endogènes (acides aminés aromatiques, protéines fluorescentes), de complexes organométalliques (tels que les cryptates de lanthanide) ou encore de nanoparticules (nanocristaux semi-conducteurs, nanoparticules d'or).[4]

B. FRET et ADN. Eléments bibliographiques.

Le FRET est un outil extrêmement utile pour sonder la conformation d'une structure d'ADN. En effet, la longueur des oligonucléotides de 10 à 20 paires de bases généralement utilisés dans les études structurales sur l'ADN correspond bien aux distances de quelques nanomètres sur lesquelles le phénomène de FRET peut avoir lieu.

Toutefois, si on veut utiliser le FRET pour mesurer des distances interchromophoriques, il faut déterminer au préalable chacun des paramètres de l'équation (1) pour pouvoir obtenir R_0.[91] De plus, les études structurales utilisant le FRET font généralement appel à des oligonucléotides modifiés de façon covalente par des fluorophores. Or pour pouvoir obtenir des informations sur la structure d'ADN à partir des mesures de FRET sur les fluorophores, il est nécessaire de connaître l'influence de l'interaction entre le fluorophore et l'ADN sur le positionnement de celui-ci. Par exemple, il a été montré par une étude combinant le FRET et la RMN que la fluorescéine est étendue latéralement par rapport à l'ADN tout en bougeant de façon assez libre dans un cône limité par la liaison covalente à l'oligonucléotide, alors que le Cy3 vient s'empiler sur la paire de bases terminale.[124]

Lorsque toutes ces précautions sont prises, le FRET peut être utilisé pour calculer des distances. La validité de cette méthode a notamment été montrée par Clegg *et al.*, qui ont calculé la distance entre deux chromophores greffés aux extrémités d'un duplexe, la longueur de ce duplexe variant entre 8 et 20 bp.[125] Les résultats obtenus correspondent bien à ceux prédits par le modèle de structure en double hélice de type B.

Sans déterminer de distances absolues, le FRET peut être utilisé dans des mesures relatives, par exemple pour étudier la conformation d'un oligonucléotide (axe et sens de l'hélice) en fonction des conditions expérimentales. Dans ce cas, l'orientation relative du donneur et de l'accepteur joue un rôle primordial. Jovin *et al.* ont ainsi utilisé le FRET pour déterminer l'hélicité d'une séquence de m paires de bases constituant une partie d'un oligonucléotide de longueur constante (N paires de bases) dont l'autre partie (N-m paires de bases) est d'hélicité connue (figure I-*4*-2). Si les deux séquences ont la même hélicité, le signal de FRET est constant quelle que soit la position de la jonction entre les deux séquences (figure 2, cas A) ; si les deux séquences ont des hélicités opposées, l'intensité du FRET dépend de la position de la jonction (figure 2, cas B). Ils ont notamment utilisé ce système pour suivre la transition entre une hélice B et une hélice Z, provoquée en changeant le cation métallique présent.[123]

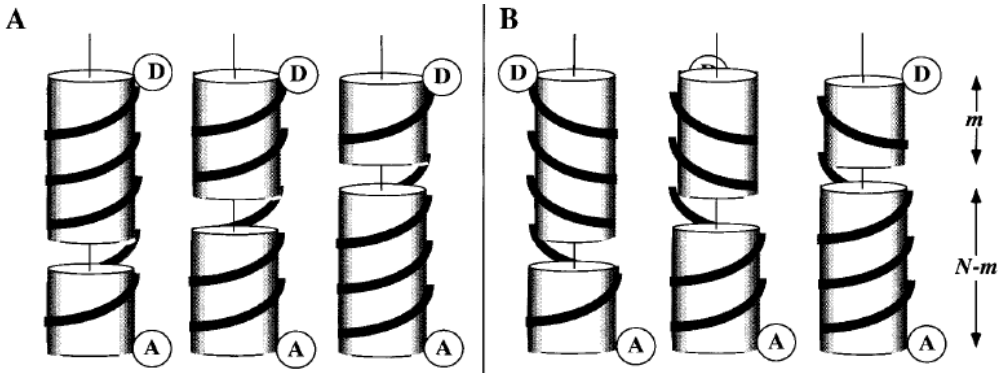


Figure I-*4*-2 : utilisation du FRET pour déterminer l'hélicité d'une séquence d'ADN.[123]

De même, récemment, Lewis *et al.* ont utilisé l'ADN comme matrice pour réaliser une étude systématique de l'influence de l'orientation relative du donneur et de l'accepteur sur l'intensité d'un phénomène de FRET.[126]

Enfin, le FRET a été utilisé pour suivre le repliement, l'hybridation ou la dénaturation de structures d'ARN[91] ou d'ADN : hairpins, triplexes, motif-i,[127] ADN quadruplexe (le cas de l'ADN quadruplexe a été détaillé dans le chapitre 1). Des données thermodynamiques sur la formation d'un duplexe ont par exemple été obtenues en suivant la dissociation par chauffage de deux brins d'ADN marqués par des fluorophores.[128] Le FRET a été étudié non seulement en solution mais aussi à l'échelle de la molécule unique, notamment pour sonder la conformation de l'ADN quadruplexe en fonction du cation métallique,[92] ou encore pour suivre des interactions ADN/protéines.[91]

Ainsi, le FRET est une technique largement utilisée pour l'étude des structures d'acides nucléiques. La plupart de ces études sont réalisées avec des fluorophores fixés de manière covalente à l'ADN. Dans le contexte de notre étude, l'ADN quadruplexe nous a paru une matrice intéressante pour positionner une paire donneur / accepteur puisque les deux tétrades externes constituent deux sites de fixation bien définis, ce qui n'est pas le cas avec l'ADN duplexe. L'étude de l'interaction entre le **TO** et l'ADN quadruplexe nous a montré que celui-ci possédait un seul site d'interaction sur le quadruplexe 22AG. Nous avons donc cherché un autre chromophore susceptible de se positionner sur la deuxième tétrade afin de conduire à un phénomène de FRET, *via* la formation d'un complexe ternaire non covalent donneur / accepteur / quadruplexe. Dans le paragraphe suivant, nous présentons l'étude de ce phénomène de FRET, dû à la formation d'un complexe ternaire utilisant une paire FRET originale, constituée d'une quinacridine comme donneur et du **TO** comme accepteur.

II. Une paire FRET originale pour l'ADN quadruplexe.[129]

A. Choix du système de chromophores.

L'étude des propriétés spectrales des quinacridines, aussi bien macrocycliques comme **BOQ_1** que monomériques (nous avons étudié l'exemple de **MMQ_1**), et du **TO** montre que ces deux molécules peuvent constituer une paire FRET très efficace, de par leur excellent recouvrement spectral (figure I-*4*-3).

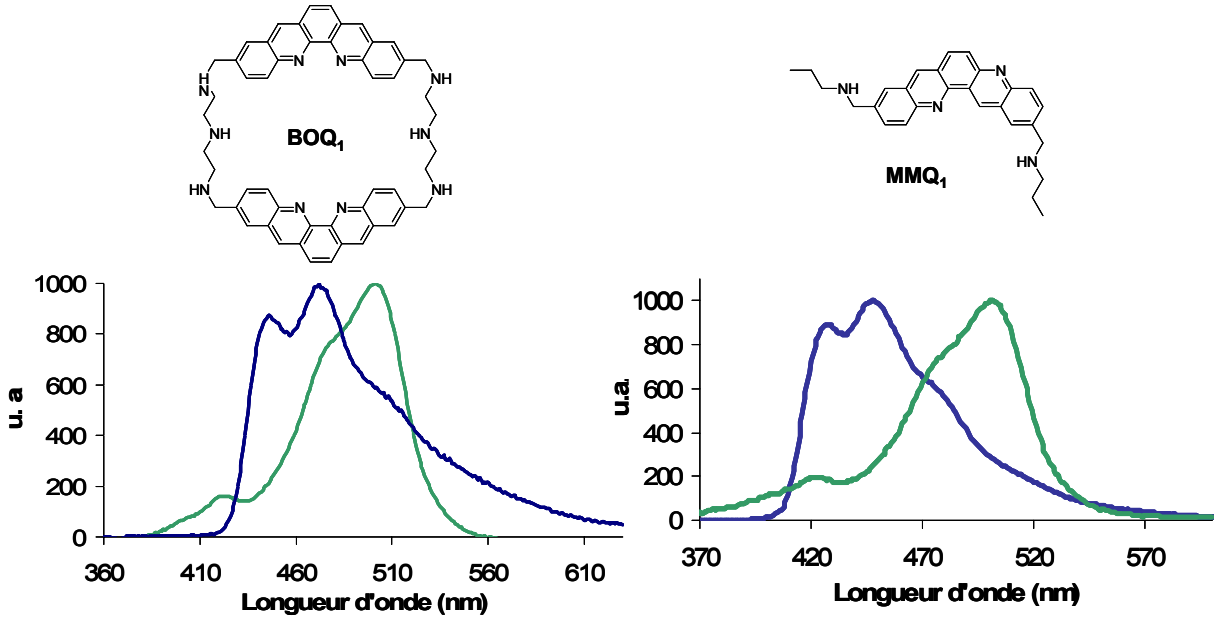


Figure I-*4*-3 : recouvrement spectral entre l'émission de fluorescence des quinacridines **BOQ_1** à gauche et **MMQ_1** à droite (0,5 µM, excitation : 328 nm, en bleu) et l'absorption UV-Visible du **TO** (2,5 µM, en vert), dans un tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7,3 KCl 100 mM.

De plus, si le **TO** forme préférentiellement un complexe 1 : 1 avec le quadruplexe 22AG, le **BOQ_1** possède lui deux sites de fixation d'affinité identiques (stoechiométrie déterminée par SPR et par titration fluorimétrique) sur le quadruplexe, tout comme le composé **MMQ_1**. La formation d'un complexe ternaire **BOQ_1**/**TO**/22AG avec un ligand fixé sur chacune des deux tétrades externes (structure proposée par analogie avec les complexes quadruplexe/ligands décrits dans la littérature) est donc envisageable (figure I-*4*-4A). Le fait que la courbe de G4-FID du **BOQ_1** (réalisée suivant le protocole présenté au chapitre 3), ne corresponde ni à un ajustement (« fit ») 1 : 1 ni à un ajustement 1 : 2 (figure I-*4*-4B) confirme cette compétition indirecte entre les deux ligands et donc la possibilité qu'un complexe ternaire existe.

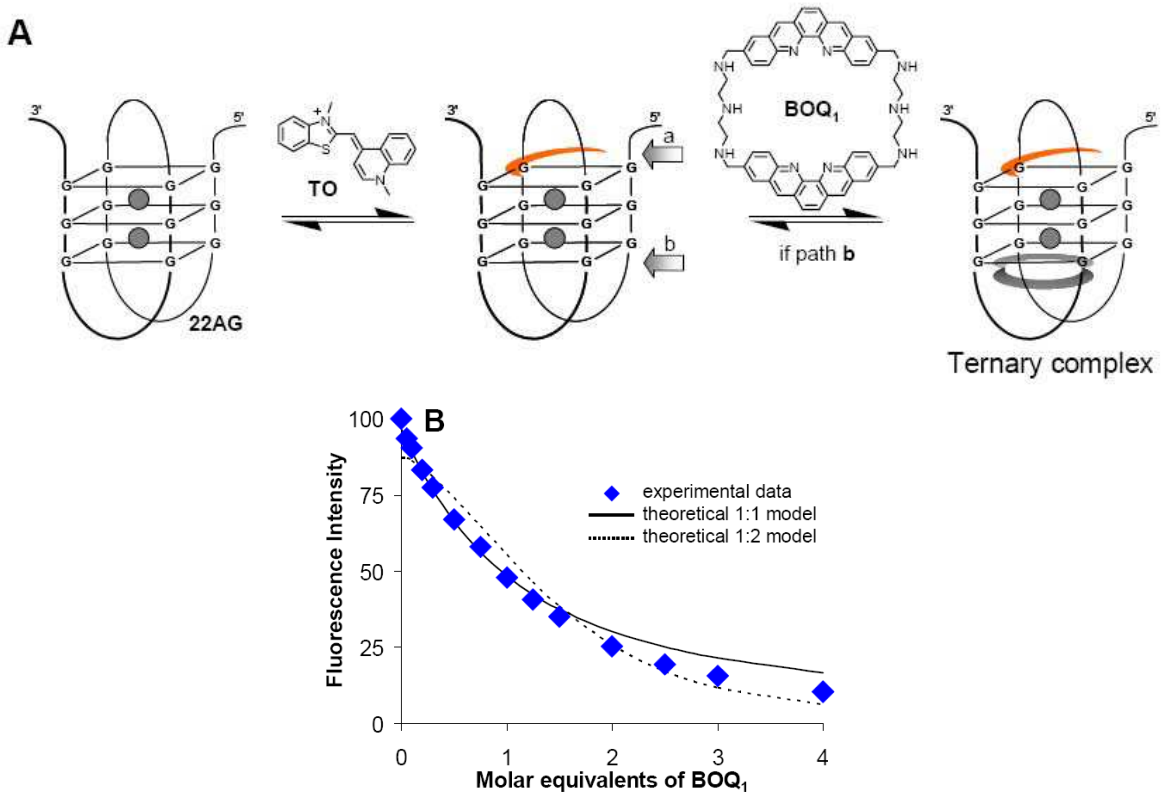


Figure I-*4*-4 **: A.** Représentation schématique des interactions possibles entre le **BOQ_1**, le **TO** et le quadruplexe 22AG. **B.** G4-FID du BOQ_1 sur le 22AG (ajustement calculés avec le logiciel Specfit32 version 3.0, *Spectrum Software Associates*, Marlborough, MA, U.S.A.).

De plus, contrairement au **TO** qui possède une forte affinité mais n'est pas sélectif de l'ADN quadruplexe, les quinacridines étudiées présentent une bonne sélectivité pour cette structure. En effet, la sélectivité quadruplexe/duplexe du **BOQ_1** a été déterminée à 10 par SPR[68] (avec une constante d'affinité $Ka=1,2.10^7 M^{-1}$ pour l'oligonucléotide 22AG). La quinacridine monomérique **MMQ_1** est moins sélective (sélectivité d'environ 3 déterminée par dialyse à l'équilibre) mais conserve une très bonne affinité (Ka d'environ 10^7 M^{-1} déterminée par titration fluorimétrique).[52] Nous pouvons donc espérer que le **BOQ_1** constitue un donneur susceptible de sensibiliser le **TO** et que la paire FRET ainsi obtenue possède une certaine spécificité pour l'ADN quadruplexe.

*B. Phénomène de FRET résultant du complexe ternaire **BOQ_1**/**TO**/22AG.*

Nous avons vérifié l'existence de ce phénomène de FRET en ajoutant des quantités croissantes d'oligonucléotide 22AG à une solution équimolaire de **BOQ_1** et de **TO**. En l'absence de quadruplexe, la fluorescence du **TO** n'est pas observée quand la quinacridine est excitée (328nm, courbe noire, figure I-*4*-5). En revanche, lorsque le quadruplexe est ajouté,

on observe une forte décroissance de l'émission de fluorescence du **BOQ_1** et une fluorescence intense du **TO**, qui augmente avec les ajouts de quadruplexe (courbes bleues à rouges, figure I-*4*-5). Cette décroissance de la fluorescence du donneur et cette augmentation de la fluorescence de l'accepteur sont typiques d'un phénomène de FRET, qui confirme l'existence du complexe ternaire proposé précédemment. En accord avec notre hypothèse, l'ADN quadruplexe agit ici comme une matrice positionnant les deux chromophores d'une manière favorable au phénomène de FRET.

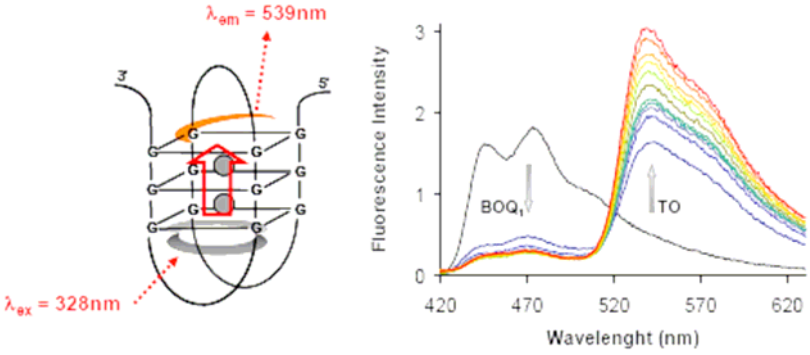


Figure I-*4*-5 : représentation schématique possible du complexe ternaire à l'origine du FRET et spectre de fluorescence de la paire **BOQ_1/TO** (1 :1 ; 0,5 µM) lors d'ajouts de 22AG (0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 ; 2,5 ; 3,0 ; 4,0 et 5,0 équivalents, de la courbe noire vers la rouge), excitation : 328 nm, tampon cacodylate de sodium pH 7,3 10 mM, 100 mM KCl.

La diminution de la fluorescence du **BOQ_1** en présence de quadruplexe étant aussi observée en l'absence de **TO,** du fait de la désexcitation par transfert d'électrons photoinduit aux guanines du quadruplexe, nous avons vérifié que l'émission de fluorescence intense du **TO** n'a pas lieu lorsque le complexe **TO / 22AG** est excité à 328 nm, en l'absence de **BOQ_1**. Nous avons aussi vérifié l'existence d'un FRET en considérant les spectres d'excitation du complexe **TO** / 22AG et du complexe **TO** / **MMQ_1** / 22AG. En présence de **MMQ_1** il apparaît une bande vers 330 nm caractéristique de l'absorption de la quinacridine, ce qui confirme son rôle de donneur (figure I-*4*-6).

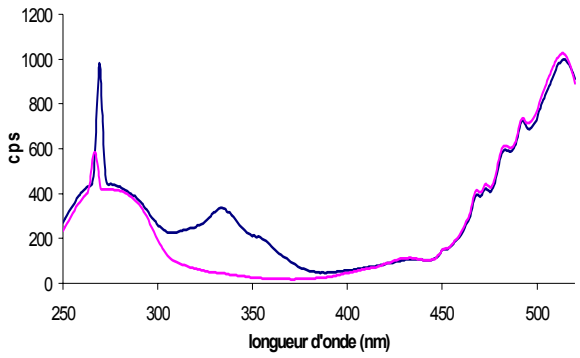


Figure I-*4*- 6 : spectres d'excitation de fluorescence normés des complexes **TO** / 22AG (1 µM / 1 µM, courbe rose) et **MMQ_1/TO** / 22AG (0,5µM / 0,5 µM / 0,25 µM, courbe bleue).
Emission 540 nm, tampon cacodylate de sodium pH 7.3 10 mM, 100 mM KCl.

Par ailleurs, l'hypothèse d'un complexe ternaire et d'une compétition indirecte entre le **BOQ_1** et le **TO**, schématisée figure I-*4*-4 est confirmée par le fait que l'intensité du phénomène de FRET est maximum pour un rapport de concentrations donneur / accepteur compris entre 1 : 1 et 2 : 1, et décroît pour des concentrations en donneur supérieures (figure I-*4*-7), ce qui traduit le déplacement du **TO** par le **BOQ_1**.

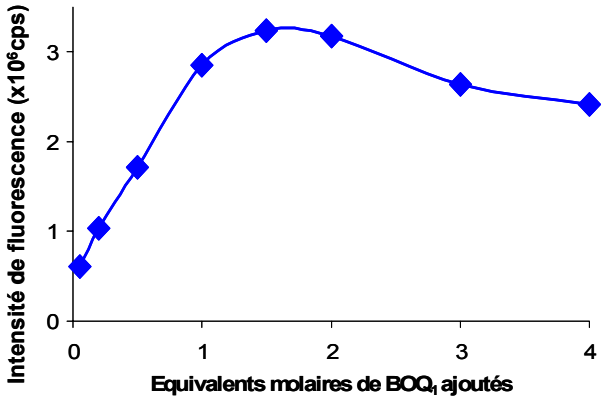


Figure I-*4*-7 : excitation par FRET (328 nm) du **TO** (0.5 µM, émission : 539 nm) en présence de 22AG (0.25 µM) et d'une concentration croissante de **BOQ_1**, tampon cacodylate de sodium pH 7.3 10 mM, 100 mM KCl.

C. Vers une signature de l'ADN quadruplexe ?

Afin de confirmer la sélectivité de l'effet de FRET observé en présence d'une matrice quadruplexe, nous avons testé un duplexe : quand un duplexe (le 17-mer utilisé au chapitre précédent) est utilisé, l'efficacité du phénomène est moins élevée (figure I-*4*-8A). De plus, lorsque le **TO** est excité directement (501 nm, figure I-*4*-8A'), l'intensité de fluorescence ne varie pas significativement avec la matrice ADN. Ceci confirme que l'efficacité élevée du FRET dans le cas du quadruplexe est due à un positionnement favorable des deux chromophores et non à une augmentation de l'exaltation de fluorescence du **TO**, qui pourrait provenir de l'environnement. Cette différence suggère que le quadruplexe positionne les deux chromophores d'une façon plus favorable pour le FRET. Dans le cas du duplexe, on peut supposer que le **TO** s'intercale et que le **BOQ_1** établit des interactions électrostatiques non spécifiques, ce qui entraîne un positionnement relatif des deux chromophores moins favorable. La même différence quadruplexe / duplexe est observée lorsqu'on utilise le quadruplexe TBA (figure I-*4*-8B et 8B'), confirmant que ce phénomène est dû à la structure quadruplexe et non à une particularité du 22AG.

L'étude du phénomène de FRET sur des quadruplexes tétramoléculaires de type $(TG_xT)_4$ avec $x \geq 3$ est envisagée, afin de vérifier la généralité du phénomène et d'étudier les variations de l'efficacité du FRET en fonction de la distance séparant le donneur de l'accepteur.

Toutefois, il semble difficile de séparer les variations de distances des variations d'orientation relative (notamment dues à l'hélicité des quadruplexes) et compte tenu des faibles distances mises en jeu (1 à 2 nm), il est possible que d'autres phénomènes de FRET que celui de Förster interviennent.

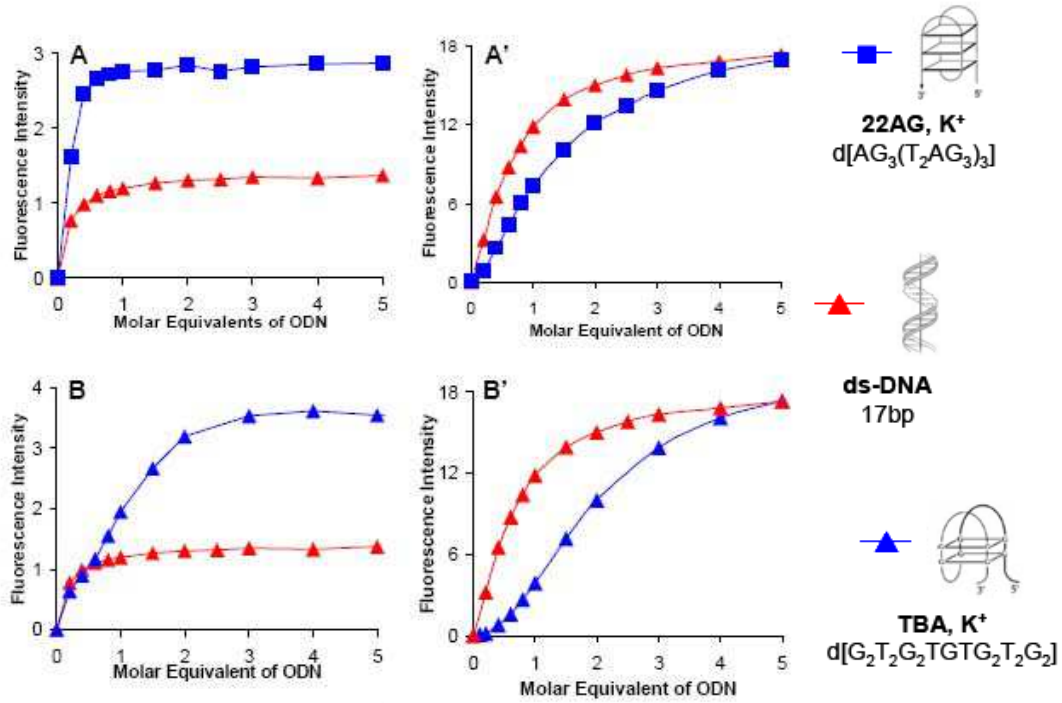


Figure I-*4*-8 : expérience de FRET avec **BOQ_1**. Emission de fluorescence du **TO** en fonction de la concentration en oligonucléotide 17mer (émission 529 nm, triangles rouges), 22AG (émission 539 nm, carrés bleus), et TBA (émission 535 nm, triangles bleus). **A/B.** Excitation par FRET (328 nm). **A'/B'** Excitation directe (501 nm).

Afin de compléter notre étude, nous nous sommes ensuite intéressés à l'influence du donneur sur ce phénomène de FRET. Pour cela, nous avons répété les mêmes expériences avec la quinacridine monomérique **MMQ_1**, qui forme elle aussi une paire FRET très efficace avec le **TO** et qui interagit *a priori* avec l'ADN quadruplexe par empilement sur les deux tétrades externes (détermination par RMN de la structure du complexe entre **MMQ_1** et le quadruplexe tétramoléculaire $(TTAGGGT)_4$)[75] Nous obtenons des résultats analogues (figure I-*4*-9) : l'efficacité du FRET est plus élevée en présence de quadruplexe que de duplexe, alors que l'intensité de fluorescence varie peu avec la matrice ADN quand le **TO** est excité directement.

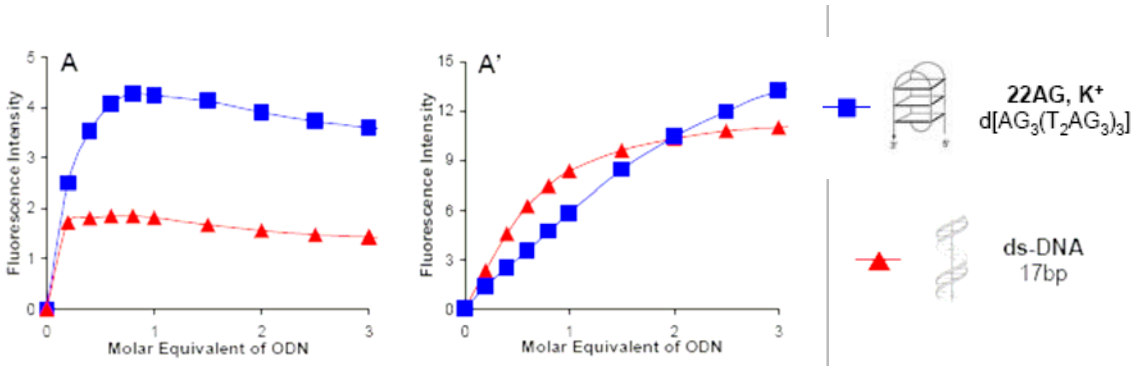


Figure I-*4*-9 : expérience de FRET avec **MMQ$_1$**. Emission de fluorescence du **TO** en fonction de la concentration en oligonucléotide 17mer (émission 529 nm, triangles rouges) et 22AG (émission 539 nm, carrés bleus). **A.** Excitation par FRET (328 nm). **A'.** Excitation directe (501 nm).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le polymorphisme des quadruplexes intramoléculaires est un sujet intensément étudié. En particulier, l'étude de la conformation adoptée par le quadruplexe mimant la séquence télomérique humaine a fait l'objet d'un grand nombre de publications. Il semblait pertinent d'examiner si le phénomène de FRET observé en présence de 22AG était sensible à une différence de conformation du quadruplexe suivant le cation métallique présent en solution (Na^+, K^+).

Aucune différence notable n'est observée dans l'absorption et l'émission de fluorescence des quinacridines et du **TO** lorsque le cation métallique change (passage de K^+ à Na^+), il est donc raisonnable d'envisager qu'une différence dans le signal de FRET proviendrait d'un changement de conformation du quadruplexe. Lorsque le donneur est le macrocycle **BOQ$_1$** aucune variation significative n'est observée entre les expériences réalisées en présence de K^+ et celles réalisées en présence de Na^+, même si la forme des courbes est légèrement différente (figure I-*4*-10A). Au contraire, dans le cas de la paire **MMQ$_1$/TO**, la forme des courbes est sensiblement différente, avec une intensité de FRET nettement plus élevée au début de la courbe (jusqu'à environ un équivalent de quadruplexe ajouté, figure I-*4*-10B).

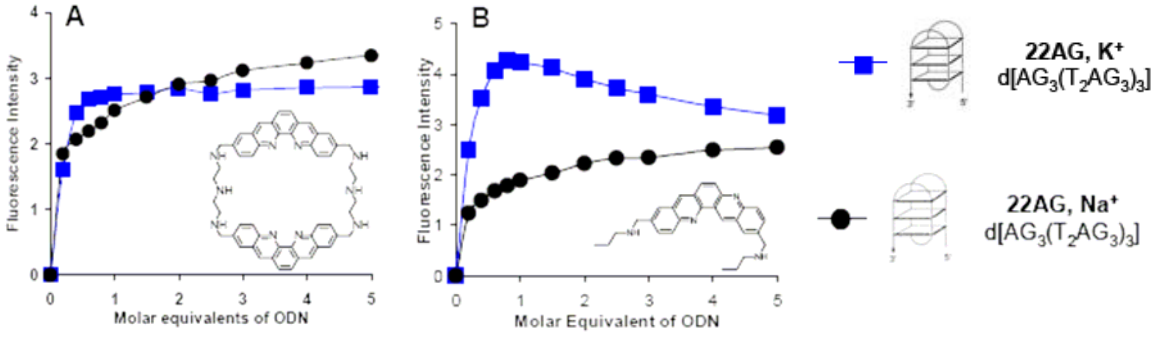


Figure I-*4*-10 : émission de fluorescence du **TO** excité *via* le phénomène de FRET (328nm) dans un tampon cacodylate de sodium pH 7,3 10mM, 100mM K^+ (courbes bleues) ou Na^+ (courbes noires) **A. BOQ$_1$ B. MMQ$_1$**.

Ainsi, la paire FRET **MMQ_1 / TO** apparaît sensible à la différence de conformation du quadruplexe en présence de Na^+ et de K^+. On pourrait penser que l'efficacité plus faible du FRET en présence de Na^+ reflète une accessibilité plus faible d'une des tétrades dans ces conditions (peut-être en raison de la boucle diagonale). En revanche, l'absence de sensibilité de la paire **BOQ_1 / TO** à la nature du cation métallique présent pourrait indiquer que le **BOQ_1** modifie la conformation préférentiellement adoptée par le quadruplexe, comme cela a été observé pour d'autres ligands macrocycliques de quadruplexes.[31] Toutefois, d'autres données sur la structure du complexe ternaire sont nécessaires pour conclure. Il pourrait aussi être intéressant d'effectuer des études de dichroïsme circulaire sur le 22AG en présence de **BOQ_1** et de **MMQ_1**, ces études pouvant permettre de mettre en évidence un changement de conformation du quadruplexe induit par le macrocycle **BOQ_1**.

III. Conclusions et perspectives.

Nous avons donc montré que la paire de chromophores quinacridine/**TO** constitue une nouvelle paire donneur/accepteur qui semble particulièrement intéressante pour l'étude de phénomènes de FRET dans l'ADN quadruplexe. En effet, les quinacridines utilisées possèdent une forte affinité pour l'ADN quadruplexe associée à une assez bonne sélectivité quadruplexe/duplexe et le **TO**, qui n'est pas sélectif de l'ADN quadruplexe, présente une très forte exaltation de fluorescence en présence d'ADN.

Les deux molécules en solution n'interagissent pas entre elles. L'ADN quadruplexe joue le rôle d'une matrice qui les positionne d'une façon favorable pour le FRET. Ce phénomène de FRET permet donc de mettre en évidence l'existence d'un complexe ternaire original quinacridine/**TO**/quadruplexe. L'efficacité du phénomène de FRET dépend de la matrice ADN utilisée : l'intensité du signal de FRET est plus intense en présence de quadruplexe que de duplexe. Cette plus grande efficacité provient probablement d'un positionnement plus favorable des deux chromophores. La sélectivité du donneur pour l'ADN quadruplexe permet ainsi d'obtenir une paire FRET sensible à la nature de la matrice ADN. Compte tenu des données existantes sur les interactions quadruplexe/ligand, un modèle de complexe ternaire où le donneur et l'accepteur interagissent chacun avec une des deux tétrades externes du quadruplexe semble le plus probable.

De plus, lorsque la quinacridine monomérique **MMQ_1** est utilisée comme donneur, l'efficacité du phénomène de FRET est sensible à la nature du cation présent dans la solution.

Ce système FRET pourrait donc éventuellement être utilisé pour établir une signature de différentes conformations d'ADN en solution.

Pour pouvoir tirer davantage d'informations de ce système FRET, il faudra caractériser plus en détail le complexe ternaire responsable du phénomène. Des études par spectrométrie de masse sont envisagées afin d'établir si notre modèle structural de complexe ternaire est le seul envisageable ou si d'autres complexes de stœchiométries plus élevées peuvent jouer un rôle dans le phénomène. Il serait bien évidemment extrêmement intéressant de disposer d'une structure RMN ou RX du complexe, même si ceci est techniquement plus délicat à réaliser. Une autre façon d'obtenir un système mieux caractérisé serait de greffer de façon covalente un des deux fluorophores au quadruplexe.

Partie II.

Synthèse et étude de fluorophores à deux photons pour le marquage d'ADNs natifs.

Chapitre II-1 : La fluorescence excitée à deux photons.

Au cours de notre étude sur le marquage d'ADN par des sondes fluorescentes, nous avons été amenés à nous intéresser à la fluorescence sous excitation à deux photons car cette technique présente de nombreux avantages pour le traçage optique et la détection en milieu cellulaire. Dans ce chapitre, nous présentons le principe de la fluorescence excitée à deux photons et son application à la microscopie. Nous décrivons ensuite les familles de molécules qui possèdent des sections efficaces d'absorption à deux photons élevées, en nous intéressant particulièrement aux molécules conçues pour des études en milieu biologique.

I. Principe de la fluorescence sous excitation biphotonique.

A. Principe de l'absorption biphotonique.

L'absorption à deux photons se traduit par le passage d'une molécule dans un état excité suite à l'absorption simultanée de deux photons d'énergies $h\nu_1$ et $h\nu_2$ (avec en général $\nu1=\nu2$) *via* un niveau d'énergie virtuel, la somme des énergies étant égale à l'énergie de transition $h\nu_s$ d'une absorption à un photon (figure II-*1*-1). Le principe théorique de la fluorescence à 2 photons a été décrit pour la première fois en 1931 par Maria Göppert-Mayer.[130] Les premières observations expérimentales, rendues possibles par le développement des lasers, datent des années 1960.

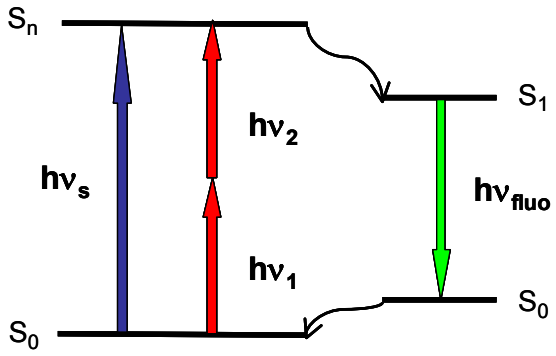


Figure II-*1*-1 : Diagramme énergétique schématique d'une molécule. Absorption à un (flèche bleue) et deux photons (flèche rouge) et émission de fluorescence (flèche verte).
« g » : état fondamental de la molécule, « e » : état excité.

Lors du processus d'absorption biphotonique, la molécule passe par un état virtuel, superposition de l'état fondamental S_0 et de l'état excité S_n. D'après le principe d'incertitude d'Heisenberg, la durée de vie δt de cet état virtuel est de l'ordre de $E\delta t = h$, où E est l'énergie

de transition entre l'état « S_0 » et l'état « S_n » : $E = hc/\lambda \approx 10^{15}h$ d'où $\delta t \approx 10^{-15}$ s. La molécule doit absorber les deux photons pendant ce temps δt, d'où la nécessité d'une source lumineuse très intense, en pratique un laser impulsionnel. Il faut noter qu'une transition qui est permise à un photon est théoriquement interdite à deux photons et réciproquement. Si cette propriété est bien vérifiée pour les atomes isolés, elle ne l'est pas toujours pour les molécules, pour des raisons de géométrie et de symétrie des orbitales.

Il faut préciser que d'autres transitions multi-photoniques (absorption à trois, quatre photons…) sont également possibles. La probabilité de telles transitions étant très faible, ces phénomènes ne sont encore que peu utilisés actuellement pour des applications en biologie. Par conséquent, nous nous limiterons dans la suite à l'étude de l'absorption biphotonique.

Le développement de nouveaux matériaux possédant une forte absorption biphotonique connaît de nombreuses applications (limitation optique, stockage de données, nanofabrication…). Dans cet exposé, nous nous limiterons à l'application biologique la plus développée actuellement, c'est-à-dire la fluorescence excitée à deux photons. Il existe d'autres applications biologiques, notamment la conception de composés produisant de l'oxygène singulet sous excitation biphotonique,[131,132] ou la photolibération de composés cagés.[133]

B. Section efficace d'absorption à deux photons.

La section efficace d'absorption à deux photons, notée δ par la suite, s'exprime en Göppert-Mayer (1 GM = 10^{-50} cm^4s/photon) et traduit la « force » d'une transition par absorption de deux photons. L'intérêt croissant pour les applications de l'absorption biphotonique a conduit à un grand nombre de travaux pour obtenir des molécules possédant une section efficace d'absorption à deux photons élevée, ce qui nécessite que soit disponible un ensemble de méthodes de mesure de cette section efficace d'absorption à deux photons.

Sans rentrer dans les détails expérimentaux, il convient de distinguer la méthode qui consiste à mesurer l'intensité de fluorescence émise par une molécule excitée à deux photons en utilisant un laser délivrant des impulsions femtosecondes des méthodes qui mesurent directement l'absorption (notamment la méthode dite de « Z-scan »). En effet, celles-ci conduisent souvent à mesurer des petites variations sur un signal important qui de plus peuvent être perturbées, par des effets thermiques notamment, ce qui conduit à des erreurs importantes et à une surestimation des sections efficaces mesurées. De même, les mesures réalisées en utilisant des impulsions laser plus longues (pico- ou nanosecondes) sont perturbées par d'autres phénomènes optiques non-linéaires (absorption à partir des états

excités), qui conduisent à une valeur de la section efficace d'absorption également surestimée. Ainsi, Prasad *et al.* ont observé une différence de deux ordres de grandeur entre les sections efficaces d'absorption mesurées avec des impulsions nanosecondes et celles mesurées des impulsions femtosecondes, lors d'une étude sur une série de trois composés.[134] Au cours de ce travail de thèse, nous avons utilisé la première méthode, dont nous détaillerons le principe plus loin.

Par ailleurs, la section efficace d'absorption à deux photons δ de la plupart des chromophores est « large » : leur absorption à 2 photons s'étend sur une large gamme spectrale (figure II-*1*-2). Le maximum d'absorption à deux photons est souvent décalé vers le bleu par rapport au double de la longueur d'onde maximum d'absorption à un photon, ce qui est du notamment à des contributions provenant de transitions vers des états excités plus hauts en énergie (dont la probabilité d'excitation par absorption biphotonique est plus importante que par absorption monophotonique). La plupart des fluorophores standard ont des sections efficaces d'absorption à deux photons faibles, le plus souvent comprises entre 0,1 et 10 GM (figure 2).[135] Parmi les fluorophores standard les plus efficaces figurent la fluorescéine, qui atteint 37 GM à 780 nm et la rhodamine 6G, avec environ 150 GM à 700 nm.[136] Ces deux molécules sont souvent utilisés comme références pour la détermination du δ de molécules « inconnues ». Les protéines fluorescentes, de type GFP, atteignent quant à elles des sections efficaces d'absorption de 100 à 200 GM.[137] Les nanocristaux semi-conducteurs (ou Q-Dots) peuvent atteindre des sections efficaces d'absorption à deux photons très élevée - jusqu'à 47 000 GM - mais leur taille élevée peut constituer une limitation majeure pour leur utilisation en tant que marqueurs de biomolécules.[138]

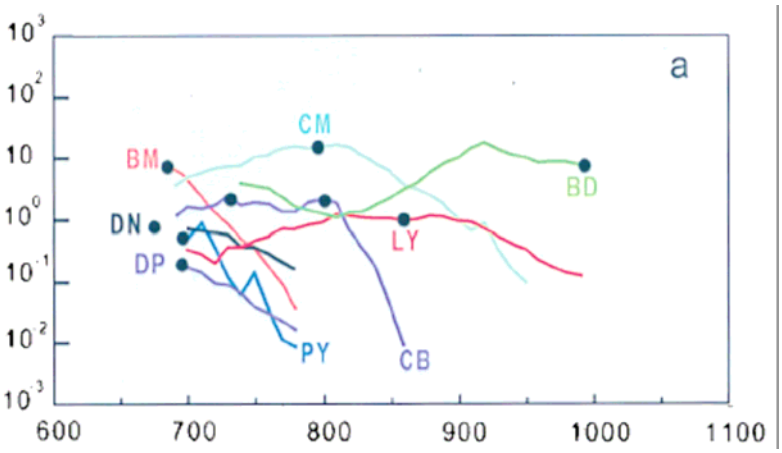


Figure II-*1*-2 : section efficace d'absorption à deux photons (GM) en fonction de la longueur d'onde (nm) pour quelques fluorophores standard, BD=Bodipy, BM= *p*-bis(*o*-methylstyryl)benzene, CB= Cascade Bue hydrazide trisodium salt, DN= Dansyl, DP= DAPI non lié à l'ADN, LY= Lucifer Yellow, PY=1,2-bis-(1-pyrenedecanoyl)-*syn*-glycero-3-phosphocholine, CM= coumarin 307. Courbe extraite de Xu *et al.*[135].

C. Fluorescence excitée à deux photons.

Lors d'une mesure de fluorescence excitée à deux photons, le nombre moyen de photons de fluorescence collectés par unité de temps <F(t)> est donné par l'équation (1) :[139]

$$\langle F(t)\rangle \approx \frac{1}{2}\,\phi\,\eta_2 C\,\delta\,\frac{g_p}{f\tau}\,\frac{8n\langle P(t)\rangle^2}{\pi\lambda}. \qquad \textbf{(1)}$$

où $g_p/f\tau$ est un terme dépendant de la source laser, ϕ est l'efficacité de collecte du système de détection, η_2 est le rendement quantique de fluorescence, C la concentration en fluorophore, δ la section efficace d'absorption à deux photons, et <P(t)> la puissance moyenne incidente. Le rendement quantique de fluorescence est pris égal à celui en fluorescence à un photon : on suppose que l'émission de fluorescence a lieu à partir du même état excité que l'absorption soit mono- ou biphotonique. Ceci est confirmé par le fait que, la plupart du temps, les spectres d'émission de fluorescence excitée à un et à deux photons sont identiques.

L'intensité de fluorescence sous excitation à deux photons dépend ainsi du carré de l'intensité incidente, alors que l'intensité de fluorescence à un photon est proportionnelle à l'intensité incidente. Par conséquent, contrairement à la fluorescence à un photon, l'émission de fluorescence excitée à deux photons est extrêmement localisée dans l'espace puisqu'elle n'a lieu qu'autour du petit volume où la source laser incidente est focalisée (figure II-*1*-3). Nous allons maintenant voir comment cette propriété est exploitée en microscopie. La figure II-*1*-3 illustre aussi le problème de la profondeur de pénétration de l'excitation monophotonique dans un milieu absorbant « à un photon », que l'utilisation d'une excitation biphotonique contribue à résoudre et qui sera présenté plus loin.

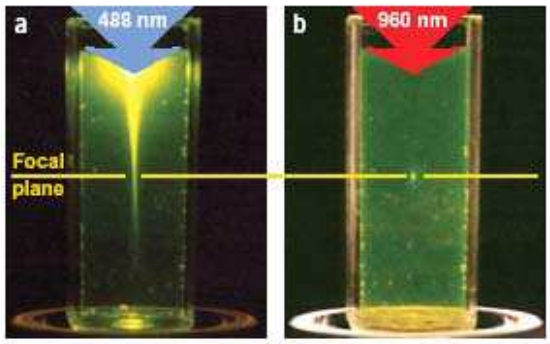


Figure II-*1*-3 : illustration de la résolution spatiale intrinsèque apportée par l'excitation biphotonique. Les deux photos représentent une cuve de fluorescéine. A gauche, l'excitation est monophotonique (488nm), à droite elle est biphotonique (960nm, laser femtoseconde). Les deux faisceaux excitateurs sont focalisés par un objectif d'ouverture numérique NA = 0,16. Image extraite de Zipfel *et al*[137].

II. La microscopie de fluorescence à deux photons.

A. La microscopie de fluorescence : bref rappel.

Au cours du vingtième siècle, la microscopie de fluorescence est devenue une technique indispensable en biologie. Elle permet en effet la détection de structures qui ne peuvent pas être visualisées en microscopie optique conventionnelle (par exemple des protéines ou des acides nucléiques marqués par des fluorophores) et l'étude de phénomènes dynamiques ou d'interactions entre macromolécules, en cellules vivantes ou fixées.

La microscopie à épi-fluorescence (figure II-*1*-4) est une microscopie couramment utilisée. Dans cette technique, la source lumineuse émet dans une large gamme de longueurs d'onde et la longueur d'onde excitatrice souhaitée est sélectionnée à l'aide de filtres. Dans ce type de microscope, la lumière excitatrice arrive au travers de l'objectif de microscope, qui sert aussi à la collecte de la fluorescence émise. L'épaisseur des échantillons que l'on peut imager est donc limitée par l'absorption des composants biologiques aux longueurs d'onde utilisées. Une des limites de cette technique est sa résolution axiale faible. En effet, bien que la mise au point se fasse sur un plan focal précis, l'image est entachée d'un bruit de fond considérable qui résulte, entre autres, de l'excitation de tous les fluorophores situés sur le trajet du faisceau + diffusion et séparation spectrale lumière diffusée/ fluo émise.

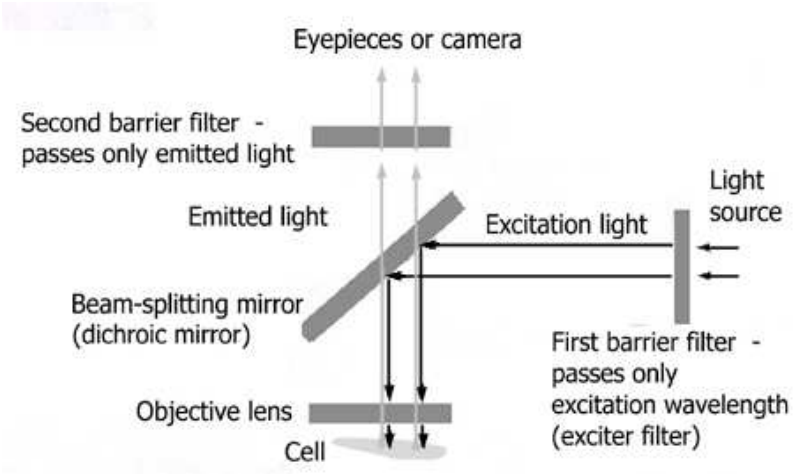


Figure II-*1*-4 : principe du microscope à épi-fluorescence (extrait de http://dept.kent.edu/projects/cell/fluoro.htm).

Le microscope confocal, dont le principe a été proposé en 1957 et les premiers modèles commerciaux sont apparus en 1987, permet une amélioration considérable de la résolution axiale. Le principe consiste à éliminer la fluorescence provenant des plans au-dessus et en dessous du plan focal en plaçant un trou de filtrage (ou « pinhole ») avant le détecteur dans le plan focal image de l'objectif de microscope (figure II-*1*-5). Ce trou permet ainsi d'obtenir

une très bonne résolution axiale mais aussi d'améliorer les résolutions latérales. Ces performances ont conduit à une large utilisation de ce microscope en biologie.

Le microscope confocal présente néanmoins certains inconvénients. Tout d'abord, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étant proches, il est difficile de trouver un miroir dichroïque filtrant efficacement la lumière excitatrice tout en transmettant la fluorescence de manière optimale. Ceci conduit à des pertes de l'intensité de fluorescence détectée. Des pertes supplémentaires sont dues à l'utilisation du trou de filtrage : plus celui-ci est petit, meilleure est la résolution mais plus faible est l'intensité de fluorescence détectée. Ces pertes conduisent à l'utilisation de sources excitatrices d'intensité élevée et donc à une dégradation rapide des échantillons vivants étudiés (phénomènes de photoblanchiment, d'échauffement, de phototoxicité, de saturation…).[2] De plus, ce type de microscope ne résout pas le problème de la profondeur de pénétration réduite dans l'échantillon (<100 µM) due à l'absorption élevée des composants biologiques dans le visible et l'ultraviolet et aux phénomènes de diffusion de la lumière.

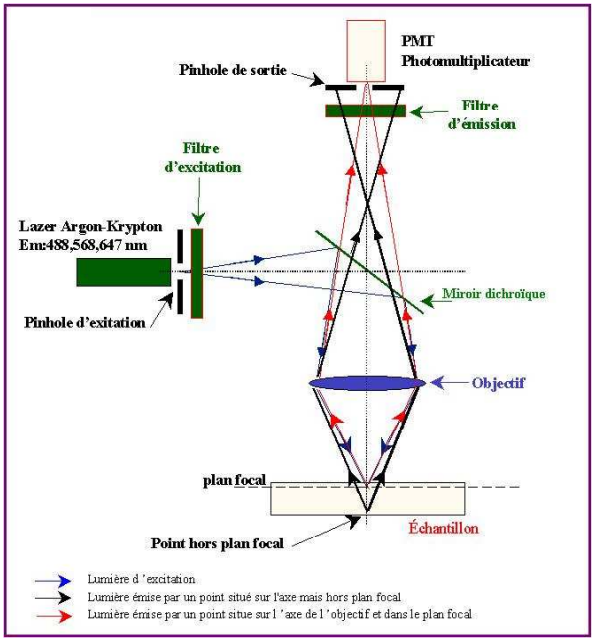


Figure II-*1*-5: principe du microscope confocal (image extraite de http://projects.santec.lu/bioinfo/imaging/tutorial/figure4.jpg).

B. La microscopie de fluorescence à deux photons.

Comme le microscope confocal, le microscope de fluorescence à deux photons utilise un faisceau laser focalisé comme source lumineuse. Le laser d'excitation émettant dans l'UV ou le visible est remplacé par un laser impulsionnel émettant dans le proche infrarouge (figure 6). Etant donné la faible efficacité du processus d'absorption à deux photons, l'émission de fluorescence n'a lieu qu'au point focal de l'objectif du microscope, d'où une très bonne

résolution spatiale. Il est ainsi possible de supprimer le trou de filtrage et de collecter toute la fluorescence provenant de l'échantillon.

La très grande résolution spatiale intrinsèque n'est pas le seul avantage apporté par l'excitation biphotonique. L'écart entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission permet aussi une bonne séparation entre le signal de fluorescence et la lumière excitatrice (transmise directement ou diffusée par l'échantillon), ce qui permet une meilleure détection de la fluorescence, notamment dans le cas de milieux diffusants (tissus épais). De plus, la profondeur de pénétration du faisceau laser est bien meilleure lorsqu'on utilise une excitation dans le proche infrarouge que dans l'ultraviolet (moins de diffusion et absorption plus faible des constituants du milieu biologique). Cet avantage majeur permet d'imager des échantillons jusqu'à des profondeurs de 1 mm.[140] Par ailleurs, la grande largeur spectrale des spectres d'absorption à 2 photons permet d'exciter plusieurs fluorophores avec une seule longueur d'onde d'excitation dans le proche infrarouge et donc d'étudier facilement la colocalisation de différents composants marqués par des fluorophores émettant différemment. Enfin, l'émission de fluorescence étant très localisée, les phénomènes de photoblanchiment et d'échauffement liés le sont aussi. Cependant, il faut noter que les fortes puissances utilisées provoquent aussi l'excitation de transitions infrarouges non luminescentes, simultanément à l'excitation biphotonique. Bien que très faibles, ces transitions infrarouges conduisent à des absorptions de puissance non négligeables à haute intensité lumineuse, ce qui peut conduire à un fort échauffement, très destructeur localement. Néanmoins, la microscopie de fluorescence à deux photons se révèle globalement moins destructrice que la microscopie confocale, ce qui est un avantage majeur pour l'imagerie de cellules ou d'organismes vivants.[137,141]

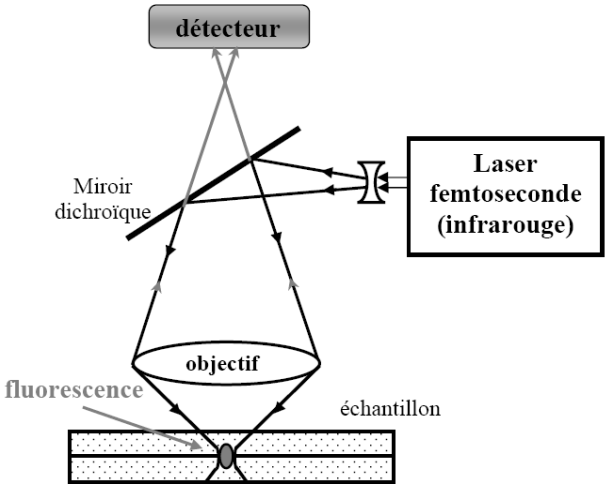


Figure II-*1*-6 : schéma de principe du microscope de fluorescence sous excitation biphotonique.
Image extraite de Guiot, E. [2].

Les premières images de microscopie de fluorescence à deux photons ont été obtenues en 1990 par Webb *et al.*.[142] Depuis, cette technique a connu un développement extrêmement important, comme en témoigne la forte augmentation du nombre de publications associées (figure II-*1*-7), et des microscopes à deux photons commerciaux sont apparus. Nous allons maintenant présenter quelques exemples qui nous semblent témoigner de la grande variété d'applications de la microscopie biphotonique.

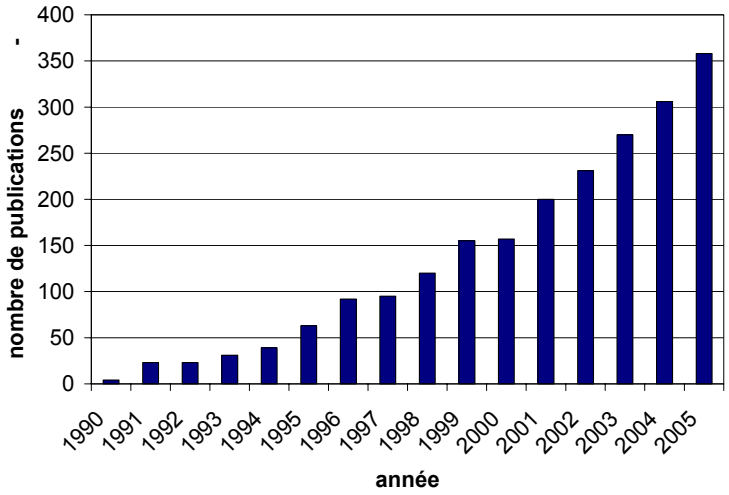


Figure II-*1*-7 : nombre de publications référencées par année par le moteur de recherche « Web of Science » pour la requête « two photon microscopy OR 2 photon microscopy ».

L'excitation biphotonique peut être utilisée, seule ou associée à d'autres microscopies non linéaires (telle la génération de second harmonique),[143] pour détecter l'autofluorescence de certains constituants de la cellule (figure II-*1*-8A),[141,144] mais elle nécessite le plus souvent l'utilisation de fluorophores exogènes. La microscopie de fluorescence biphotonique a ainsi été utilisée pour suivre des flux sanguins.[140] Elle connaît aussi de nombreuses applications en neurophysiologie, que ce soit pour l'étude de tranches de cerveaux ou de petits animaux vivants, grâce notamment à l'utilisation de marqueurs fluorescents sensibles à la présence de calcium (figure II-*1*-8B).[145]

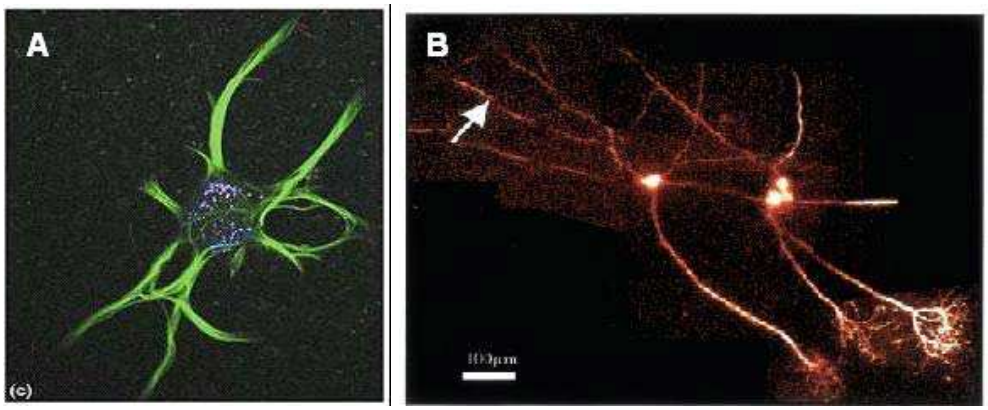


Figure II-*1*-8 : **A.** Fluorescence excitée à deux-photons et génération de second-harmonique endogènes dans un neurone d'*Aplysia* (excitation 760-780 nm). L'autofluorescence (pseudo-couleurs bleue, émission 500-650 nm) est d'origine inconnue, la génération de second-harmonique (pseudo-couleur verte) révèle l'organisation du microtubule. Image extraite de Mertz, J. [143]. **B.** Cellules mitrales de rat marquées à l'Oregon Green BAPTA-1. Image extraite de Debarbieux, F *et al.* [145].

Le marquage de cellules spécifiques ou de constituants d'une cellule a aussi été beaucoup utilisé. Par exemple, la réponse de lymphocytes marqués par des fluorophores à la présentation d'un antigène a été suivie.[133] De même, les différentes phases coexistantes dans des vésicules géantes modélisant la membrane cellulaire ont été visualisées en utilisant des lipides marqués par différents fluorophores (figure II-*1*-9A).[146] Enfin, une expérience dite de « FISH » (Fluorescent In Situ Hybridization) avec plusieurs chromosomes marqués différemment a pu être réalisée avec une seule longueur d'onde d'excitation proche-infrouge (figure II-*1*-9B).[147] Toutefois, le marquage de petites molécules par des fluorophores pour un suivi en microscopie biphotonique reste encore rare aujourd'hui. On peut citer l'exemple d'un agent cytotoxique, le AN152, dont un conjugué fluorescent (conçu pour posséder une forte absorption à deux photons) a été synthétisé et suivi en cellules vivantes.[148]

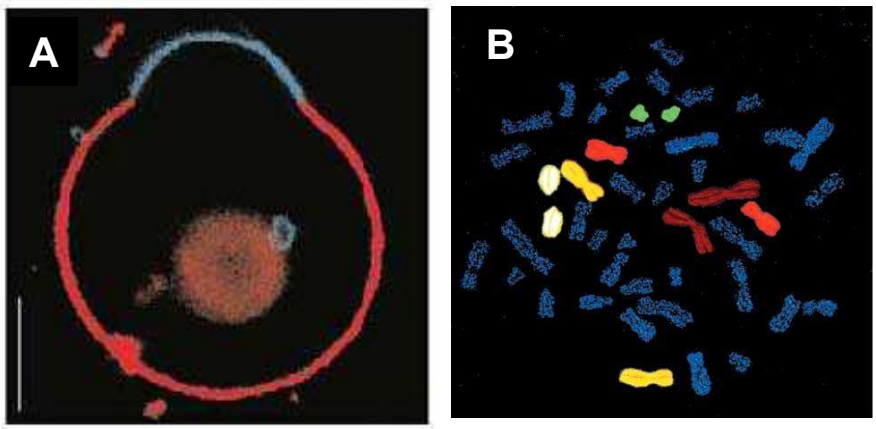


Figure II-*1*-9 : exemples d'applications de la microscopie de fluorescence excitée à deux photons. **A.** Visualisation des deux phases présentes sur une vésicule géante unilamellaire marquées par des fluorophores différents[146] **B.** FISH à plusieurs couleurs.[147]

La plupart des études de microscopie biphotonique utilisent aujourd'hui des fluorophores standard, optimisés pour l'excitation monophotonique et possédant une faible section efficace d'absorption à deux photons, ou des protéines fluorescentes. L'utilisation de fluorophores ayant une forte section efficace d'absorption à deux photons permettrait de diminuer les puissances excitatrices nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence et limiterait donc les photodommages causés par l'excitation biphotonique. Le développement de tels fluorophores s'avère ainsi très prometteur et constitue un domaine de recherche très actif. Toutefois, la plupart des fluorophores optimisés proposés jusqu'à présent ne sont pas compatibles avec la microscopie : ils ne sont pas solubles en milieu aqueux, et sont souvent de taille importante. La recherche du meilleur compromis entre absorption à deux photons optimisée et compatibilité avec le milieu biologique constitue ainsi encore un véritable défi.

III. Fluorophores optimisés pour l'absorption à deux photons. Relations structure / propriétés.

Dans un formalisme classique, l'interaction d'une onde lumineuse avec un matériau est décrite en utilisant le vecteur polarisation électrique induite $\vec{P}$ avec

$\vec{P} = \varepsilon_0(\chi^{(1)}\vec{E} + \chi^{(2)}\vec{E}.\vec{E} + \chi^{(3)}\vec{E}.\vec{E}.\vec{E} + ...)$ où $\chi^{(n)}$ est la susceptibilité d'ordre *n* et E le champ électromagnétique incident. Les termes d'ordre supérieur à 1 ne jouent un rôle que pour de fortes intensités lumineuses et traduisent l'existence de phénomènes d'optique non linéaire. A l'échelle microscopique l'interaction de la lumière avec une molécule est décrite en utilisant le vecteur moment dipolaire induit $\vec{p}$ avec $\vec{p} = \alpha\vec{E} + \beta\vec{E}.\vec{E} + \gamma\vec{E}.\vec{E}.\vec{E} + ...$ où α, β, γ sont les polarisabilités linéaires, quadratiques, cubiques. Les termes α, β, γ sont des tenseurs qui dépendent de la fréquence ω de la radiation incidente mais aussi de la structure de la molécule étudiée, ce qui permet donc d'établir des relations structure / propriétés d'optique non linéaire.

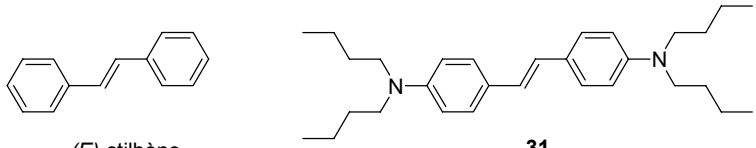
La section efficace d'absorption à deux photons δ dépend de la polarisabilité du 3° ordre γ et est donnée par l'équation (2).[149]

$$\delta = \frac{3}{2}\frac{\hbar\omega^2\,\mathrm{Im}\left[\,\gamma(-\omega;\omega,\omega,-\omega)\,\right]}{\varepsilon_0 c^2} \qquad (2)$$

Nous allons à présent voir comment, en considérant les informations fournies par cette équation, ont été conçues des molécules possédant une forte section efficace d'absorption à deux photons.

A. Structures quadrupolaires.

La première étude visant à concevoir des composés présentant une section efficace d'absorption à deux photons élevée a été publiée en 1998.[150] Les auteurs ont observé que la section efficace d'absorption à deux photons du composé **31** était beaucoup plus élevée que celle du *(E)*-stilbène (figure II-*1*-10).



(E)-stilbène
12 GM

31
210 GM

Figure II-*1*-10 : structure du *(E)*-stilbène et du composé **31** (sections efficaces d'absorption mesurées avec des impulsions nanosecondes).[150]

Une étude théorique leur a alors permis de montrer que, dans cette géométrie, l'absorption à deux photons amenait principalement les composés de l'état S_0 (état fondamental) à l'état S_2, premier état excité possédant la même symétrie que l'état S_0. La section efficace d'absorption à deux photons δ peut alors s'écrire selon l'équation (3), où les indices 0, 1, 2 réfèrent aux états S_0, S_1, S_2, M_{ij} aux moments dipolaires de transition de l'état i vers l'état j, $\omega=(E_2 - E_0)/2$ et Γ est un facteur numérique.

$$\delta_{S_0 \rightarrow S_2} \propto \frac{M_{01}^2 \, M_{12}^2}{(E_1 - E_0 - \hbar\omega)^2 \Gamma} \quad (3)$$

Il est ainsi possible de rationaliser l'augmentation de section efficace d'absorption à deux photons observée en passant du *(E)*-stilbène au composé **31** : l'introduction de groupements électrodonneurs a pour conséquence un transfert de charge lors de l'excitation et donc une augmentation des moments dipolaires de transition M_{01} et M_{12} ainsi qu'une diminution de l'énergie de transition entre les différents états. Ce phénomène de transfert de charge est augmenté lorsqu'on ajoute des groupements électroattracteurs au centre de la molécule et lorsqu'on augmente la longueur de conjugaison.

Les auteurs ont alors conçu une série de composés avec une géométrie dite « quadrupolaire », c'est-à-dire de type donneur-accepteur-donneur ou accepteur-donneur-accepteur (figure II-*1*-11). Cette série de composés (deux exemples sont représentés figure II-

1-12) confirme les prédictions théoriques : l'augmentation de la longueur de conjugaison et l'introduction de groupements électroattracteurs au centre de la molécule et électrodonneurs aux extrémités (ou réciproquement) augmente la section efficace d'absorption à deux photons.

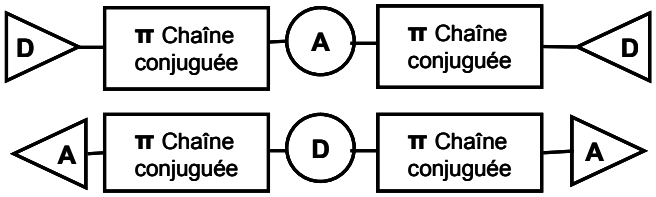


Figure II-*1*-11 : géométrie de type quadrupolaire.

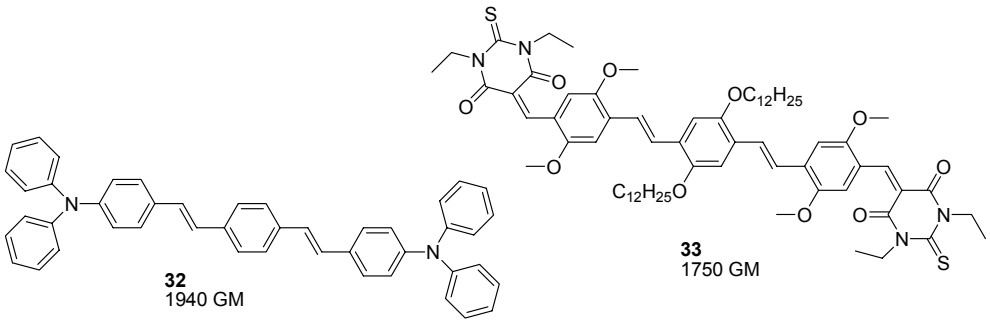


Figure II-*1*-12 : deux exemples de composés de géométrie quadrupolaire (sections efficaces d'absorption mesurées avec des impulsions nanosecondes).[150]

Par la suite, Cho *et al.* ont confirmé par une étude *ab initio* que plus la force des groupements électrodonneurs et/ou électroattracteurs était élevée, plus la section efficace d'absorption à deux photons était élevée.[151] Plusieurs groupes de recherche ont synthétisé différents composés en étudiant l'influence de la nature des groupements électrodonneurs et électroattracteurs et du squelette conjugué sur l'absorption à deux photons, mais aussi sur le rendement quantique de fluorescence et sur la photostabilité des composés. Ainsi, l'utilisation de cœur rigide, de type fluorène[152] ou anthracène,[153] permet d'obtenir des composés présentant une bonne photostabilité. Toujours en terme de photostabilité, les triples liaisons semble aussi donner de meilleurs résultats que les doubles liaisons.[152] La figure 13 donne trois exemples de ce type de composés. On peut noter que Marder *et al.* ont aussi développé des composés de type D-π–A- π–D- π–A- π–D (**37b**) et D- π–D- π-A- π–D- π–D (**37c**) présentant des propriétés intéressantes (jusqu'à 5300 GM à 970 nm, avec un rendement quantique de fluorescence de 0,7).[154]

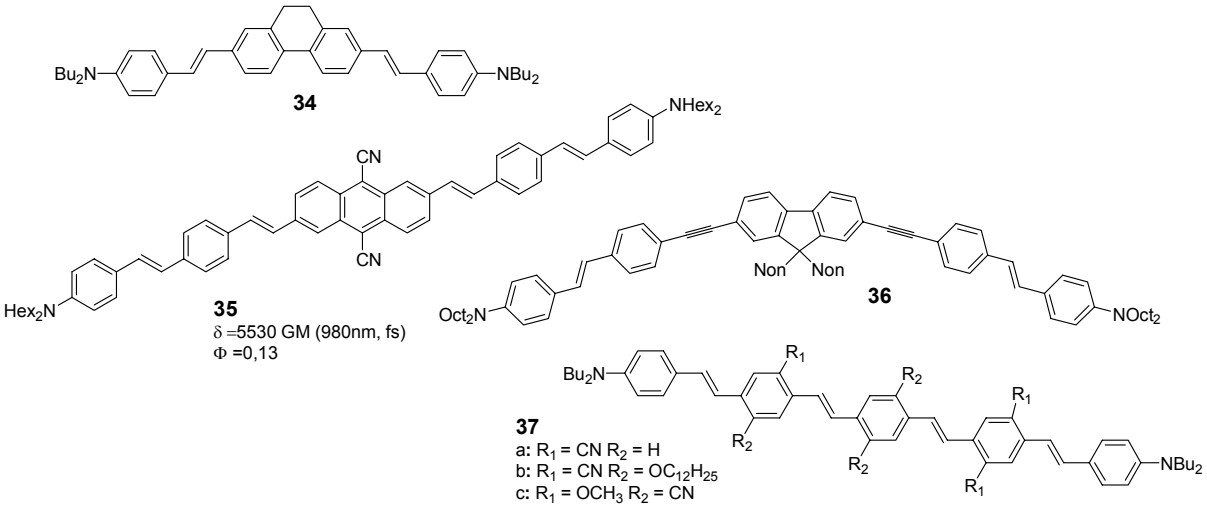


Figure II-*1*-13 : quelques exemples de chromophores de géométrie quadrupolaire : composés **34,**[155] **35**,[153] **36**[152] et **37**.[154]

B. Structures octupolaires.

Les composés de type octupolaires conçus sur le même modèle que les composés quadrupolaires considérés ci-dessus (figure 14) ont été très étudiés pour leurs propriétés d'optique non linéaire depuis les travaux de Zyss *et al.*[156] Dans ces molécules, le transfert de charge lors de l'excitation peut avoir lieu selon trois axes, ce qui entraîne des réponses optiques non linéaires importantes. Comme dans le cas des composés quadrupolaires, il a été montré, par une étude théoriques et des calculs *ab initio* sur des composés modèles, que l'absorption à deux photons de telles molécules augmentait avec la force des groupements électrodonneurs et électroattracteurs.[157]

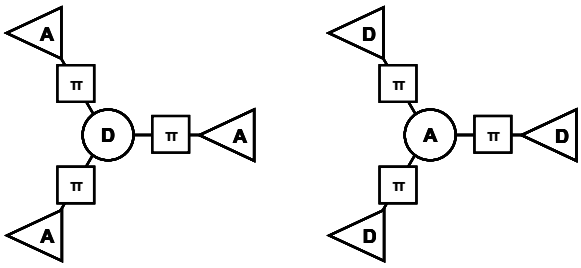
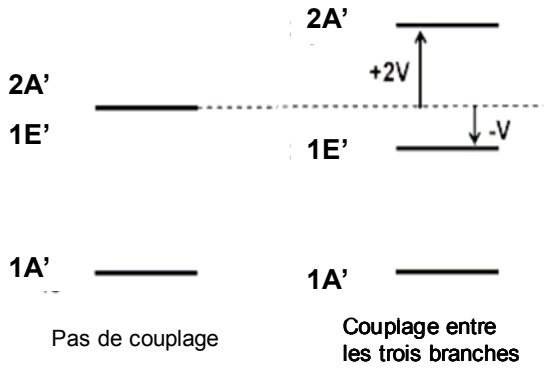


Figure II-*1*-14 : géométrie de type octupolaire.

Ces molécules pourraient être modélisées comme trois dipôles D-π-A reliés mais non couplés entre eux. Toutefois il a été montré, notamment par Prasad *et al.,*[134] qu'il existait une exaltation de l'absorption à deux photons : l'absorption à deux photons d'un composé octupolaire est supérieure à trois fois celle de la molécule dipolaire correspondante.

Cette observation a conduit Beljonne *et al.* à proposer un modèle pour cette géométrie (symétries C_3 ou C_{3h}) et comparer le cas où les trois branches de la molécule sont couplées entre elles à celui où elles ne le sont pas.[149] Dans cette géométrie, le premier niveau excité, noté 1E' (figure II-*1*-15), est doublement dégénéré. Ce niveau peut être atteint par absorption d'un ou de deux photons : l'un des deux états dégénérés est interdit à un photon et autorisé à deux photons, et c'est l'inverse pour le deuxième état. Le deuxième niveau excité, non dégénéré, noté 1A', est interdit à un photon mais autorisé à deux photons. Dans le cas où les trois branches de la molécule ne sont pas couplées, les niveaux 1E' et 2A' sont dégénérés. Le couplage entre les branches introduit une levée de dégénérescence (figure 16). Les sections efficaces d'absorption à deux photons pour les transitions 1A' -> 1E' et 1A' -> 2A' sont données par les équations (3) et (4), où M_{ge} est le moment dipolaire de transition et $\Delta\mu_{ge}$ la différence entre les moments dipolaires de l'état fondamental et de l'état excité (cas sans couplage). L'énergie V augmente avec le couplage entre les états excités.



$$\delta_{2A'} \propto \frac{6}{8}\frac{M_{ge}^2 \Delta\mu_{ge}^2}{(\frac{E_{ge}}{2}-2V)^2\Gamma} \quad (3)$$

$$\delta_{1E'} \propto \frac{3}{8}\frac{M_{ge}^2 \Delta\mu_{ge}^2}{(\frac{E_{ge}-V}{2})^2\Gamma} \quad (4)$$

Figure II-*1*-15 : états électroniques intervenant dans l'absorption à deux photons pour un composé octupolaire et sections efficaces d'absorption correspondantes.[149]

Ce modèle permet de rationaliser les propriétés d'absorption à deux photons intéressantes des composés octupolaires : ces composés possèdent deux états excités de faible énergie accessibles à deux photons, d'où des probabilités de transition élevées. Le couplage électronique entre les trois branches de la molécule augmente la section efficace d'absorption à deux photons (augmentation du terme V). De plus, ce modèle met en évidence l'importance d'un fort transfert de charge lors de l'excitation pour une forte absorption à deux photons : il est ainsi possible de prédire que la section efficace d'absorption à deux photons sera d'autant plus élevée que la longueur de conjugaison sur chacun des bras sera grande et que la force des groupements électroattracteurs et électrodonneurs sera élevée.

Ce modèle a ensuite été repris par Blanchard-Desce et Trétiak,[158] qui ont comparé les résultats de modélisation aux résultats expérimentaux (absorption à un et deux photons, fluorescence) pour trois composés de géométries linéaire, en V et octupolaire (figure II-*1*-16). Les résultats confirment l'existence d'un couplage entre les branches, montrent que l'émission de fluorescence a lieu à partir d'un état excité localisé sur une des trois branches (ce qui explique que le maximum d'émission de fluorescence varie peu avec le nombre de branches du composé) et soulignent que, pour le composé octupolaire, la légère déstabilisation de l'état excité 2A' (autorisé à deux photons seulement) se traduit par une absorption à deux photons décalée vers le bleu par rapport au double de l'absorption à un photon.

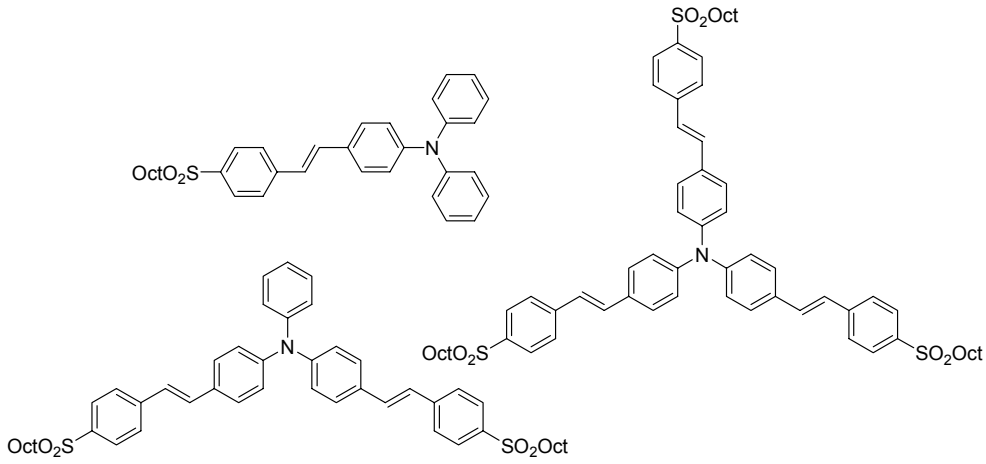


Figure II-*1*-16 : composés servant de support à l'étude menée par Trétiak et Blanchard-Desce.[158]

La forte absorption à deux photons des composés octupolaires a conduit à la synthèse d'un grand nombre de dérivés. Certains possèdent un cœur de type électroattracteur (par exemple une triazine)[159] mais la majorité de ces composés possèdent un cœur électrodonneur, généralement une triphénylamine. Une grande variété de groupements électroattracteurs et de liens conjugués ont été testés (figure II-*1*-17), notamment par les groupes de Prasad (par exemple le composé **38**)[160], Blanchard-Desce (par exemple le composé **39**)[161,162] et Cho (par exemple le composé **40**)[163] confirmant les prédictions théoriques : plus l'espaceur conjugué est de grande taille et plus les groupements aux extrémités ont un caractère électroattracteur fort, plus l'absorption à deux photons est efficace. Des composés possédant un cœur et des extrémités électrodonneurs, ou un cœur de type 1, 3, 5 - trivinylbenzène et des extrémités donneurs ou accepteurs d'électrons ont aussi montré des propriétés d'exaltation de l'absorption à deux photons.[164]

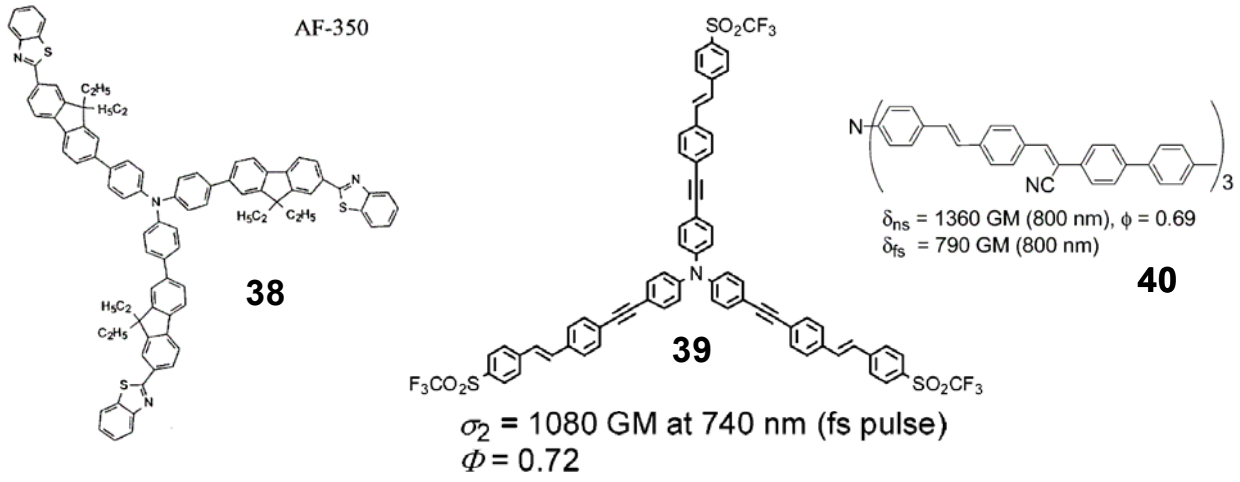


Figure II-*1*-17 : exemples de composés octupolaires présentant une forte absorption à deux photons.

Il faut noter qu'une des conséquences du transfert de charge étendu qui a lieu lors de l'excitation est que ces composés sont très sensibles à la polarité du solvant : plus le solvant est polaire, plus leur déplacement de Stokes est important.[165] En effet, l'état à partir duquel a lieu l'émission de fluorescence possède un caractère ionique plus fort que l'état fondamental et est donc davantage stabilisé par un solvant polaire : plus le solvant est polaire, plus l'énergie de transition pour revenir à l'état fondamental est faible et plus l'émission de fluorescence est décalée vers le rouge. Ces composés octupolaires peuvent donc être utilisés comme sondes de polarité du milieu environnant.

C. Systèmes divers.

Les quadrupôles et les octupôles représentent une large majorité des systèmes synthétisés et étudiés pour leur forte absorption à deux photons. Quelques autres types de composés ont aussi montré des propriétés intéressantes. Parmi ceux-ci, on peut citer plusieurs porphyrines[166,167] et des systèmes à 4 branches possédant un cœur de type cyclophane (par exemple le composé **41**, figure II-*1*-18).[168,169]

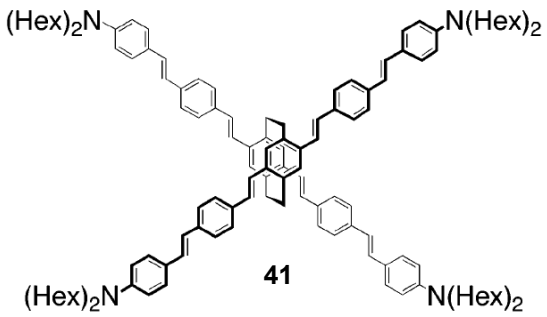


Figure II-*1*-18 : exemple de composé à cœur cyclophane possédant une forte section efficace d'absorption à deux photons (3430 GM, impulsions fs).[169]

Nous avons donc vu que l'étude des relations structure / propriétés optiques a conduit à l'obtention de composés possédant de fortes sections efficaces d'absorption à deux photons. Cependant, à l'heure actuelle, seuls quelques composés ont été conçus dans le but de combiner forte absorption à deux photons et utilisation en milieu biologique.

D. Applications à la biologie.

L'utilisation de fluorophores pour le marquage de biomolécules nécessite que ceux-ci soient hydrosolubles, ou du moins qu'on puisse les utiliser pour obtenir des conjugués fluorescents hydrosolubles. Or la plupart des marqueurs fluorescents que nous avons décrits dans les paragraphes précédents sont des composés aromatiques très hydrophobes. Une solution pour rendre ces composés hydrophiles est de les fonctionnaliser par des chaînes PEG (polyethylène glycol). Nicoud *et al.* ont ainsi synthétisé une série de composés de type D-π–D fonctionnalisés par trois chaînes PEG à chaque extrémité (composé **42**, figure II-*1*-19), possédant une solubilité dans l'eau de l'ordre de 100 g/L, avec une section efficace d'absorption à deux photons d'environ 100 GM à 720 nm. De façon intéressante, les rendements quantiques de fluorescence conservent des valeurs élevées dans l'eau (entre 0,4 et 0,7 contre des valeurs comprises entre 0,75 et 0,85 dans le dichlorométhane).[170]

Une deuxième possibilité est de fonctionnaliser les chromophores par des groupements chargés. Très récemment, un dendrimère polycationique (**43**, figure II-*1*-19) a ainsi été synthétisé et utilisé en imagerie pour la visualisation de flux sanguins dans le système olfactif du rat.[171] Dans ce cas, la structure dendrimérique permet d'encapsuler la sonde fluorescente donc de la protéger du milieu aqueux. Elle conserve donc des caractéristiques proches de celles observées en solvant organique (un bon rendement quantique de fluorescence notamment), mais le rapport entre la section efficace d'absorption à deux photons et la taille de la molécule devient faible (ici 127 GM pour un diamètre hydrodynamique de 5,2 nm).

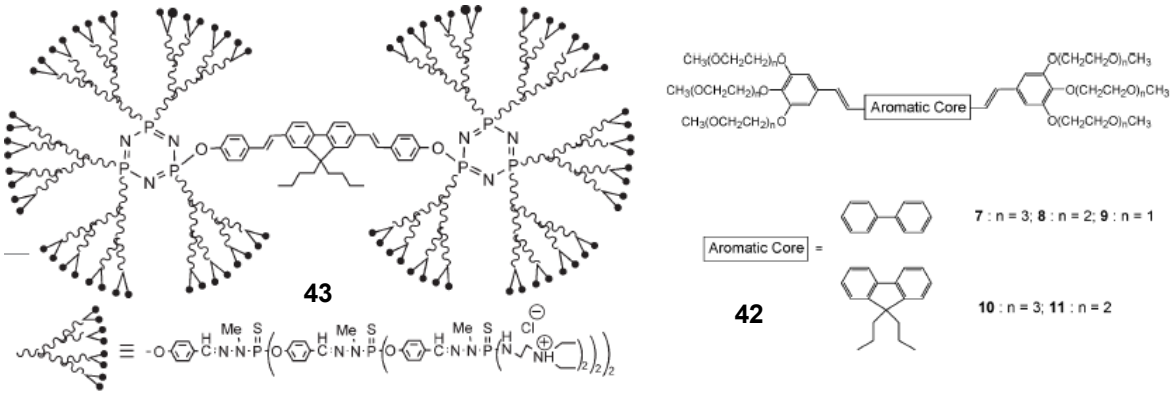


Figure II-*1*-19 : structure des composés hydrosolubles **42** et **43**.

En ce qui concerne le marquage d'ADN, trois composés ont à ce jour été décrits. Prasad *et al.* ont utilisé le Cyan 40 (figure II-*1*-20) pour marquer l'ADN et l'ARN de cellules.[172] Ils observent une sélectivité ADN/ARN intéressante (en cellules vivantes, le composé se fixe préférentiellement sur l'ARN) toutefois aucune valeur de section efficace d'absorption à deux photons n'est donnée. De même Chang *et al.* utilisent le **BMCV**, un composé de géométrie quadrupolaire, pour marquer l'ADN duplexe et quadruplexe et réaliser des études de FLIM (« Fluorescence Life Time Imaging ») sous excitation à deux photons, sans toutefois caractériser ni l'absorption à deux photons du composé **BMCV** ni son interaction avec l'ADN, ce qui rend les résultats quelque peu sujet à caution.[95] L'étude la plus poussée concernant les propriétés d'absorption à deux photons d'un marqueur d'ADN a été réalisée par Abbotto *et al.* sur le Diméthyl – pepep (figure II-*1*-20), un composé de géométrie quadrupolaire qui possède une section efficace de 347 GM à 707 nm (112 GM à 790 nm, mesures par la méthode de « Z-scan ») et un rendement quantique de fluorescence qui passe de 0,1 à 0,4 quand le composé se lie à l'ADN (avec une constante d'affinité de $2{,}0.10^6$ M^{-1} quand la force ionique est de 100 mM).[173]

Enfin, à notre connaissance un seul exemple de conjugué biomolécule – fluorophore optimisé pour la fluorescence biphotonique a été décrit jusqu'à présent. Il s'agit du composé de type «donneur – accepteur » **44** conjugué à de la BSA (Bovine Serum Albumin). Le conjugué obtenu (figure II-*1*-20) possède une section efficace d'absorption de 25 GM à 740 nm, avec un rendement quantique de fluorescence de 0,74.[174]

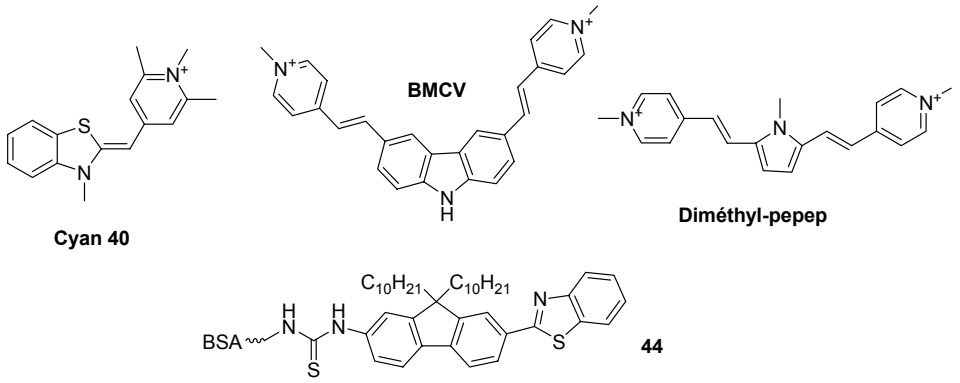


Figure II-*1*-20 : marqueurs d'ADN étudiés pour leur absorption à deux photons et conjugué fluorophore « à deux photons » - protéine.

IV. Objectifs.

Comparée à la microscopie d'épifluorescence et à la microscopie confocale, la microscopie de fluorescence biphotonique présente de nombreux avantages en termes de résolution et de réduction des dommages photoinduits. Les études sur les relations structure / propriétés d'absorption à deux photons ont permis de mettre en évidence des géométries types pour l'obtention de composés possédant une forte absorption à deux photons. Cependant, les travaux concernant l'obtention de molécules possédant à la fois une forte absorption à deux photons et des propriétés de taille et de solubilité compatibles avec le marquage de biomolécules restent rares : aucun n'avait été publié au début de ce travail de thèse.

Dans ce contexte, notre objectif est l'obtention de chromophores ayant une forte absorption à deux photons et possédant une fonction chimique réactive permettant le couplage à une biomolécule. Les marqueurs doivent de plus conserver une taille restreinte (on se fixera comme objectif de conserver des masses moléculaires inférieures à 1000-1200 Da) afin de ne perturber ni la structure ni la fonction de la biomolécule étudiée et présenter une solubilité dans l'eau compatible avec les réactions de couplage.

En continuité avec les thématiques développées au laboratoire, la première application envisagée est le marquage d'ADN : soit d'un plasmide, c'est à dire un ADN circulaire produit par une bactérie, soit d'un oligonucléotide, c'est-à-dire un brin court d'ADN obtenu par synthèse chimique.

Compte tenu des travaux sur l'absorption à deux photons des composés de géométrie octupolaire, nous avons choisi de synthétiser des dérivés de triphénylamines conjuguées avec des groupements électroattracteurs et possédant un bras dérivatisable pour le couplage avec les biomolécules (figure II-*1*-21A). Ce type de motif peut en effet être obtenu *a priori* simplement à partir de réactions d'amination arylique. Les groupements électroattracteurs sont choisis pour leur efficacité mais ne doivent être ni trop encombrants ni trop hydrophobes. La synthèse d'analogues non substitués de symétrie C_3, *a priori* plus simple, a été réalisée, d'une part pour mettre en évidence les structures présentant le meilleur compromis forte absorption à deux photons / petite taille et d'autre part pour étudier l'influence du bras de liaison destiné au couplage sur les propriétés optiques des molécules (figure II-*1*-21B). Dans le but d'obtenir les molécules présentant l'encombrement stérique le plus faible possible, l'influence du nombre de groupements électroattracteurs a aussi été étudiée. Pour cela, nous avons synthétisé des analogues possédant respectivement un et deux groupement

électroattracteurs, et deux groupement électroattracteurs plus un bras de liaison sur le cycle non substitué (figure II-*1*-21C).

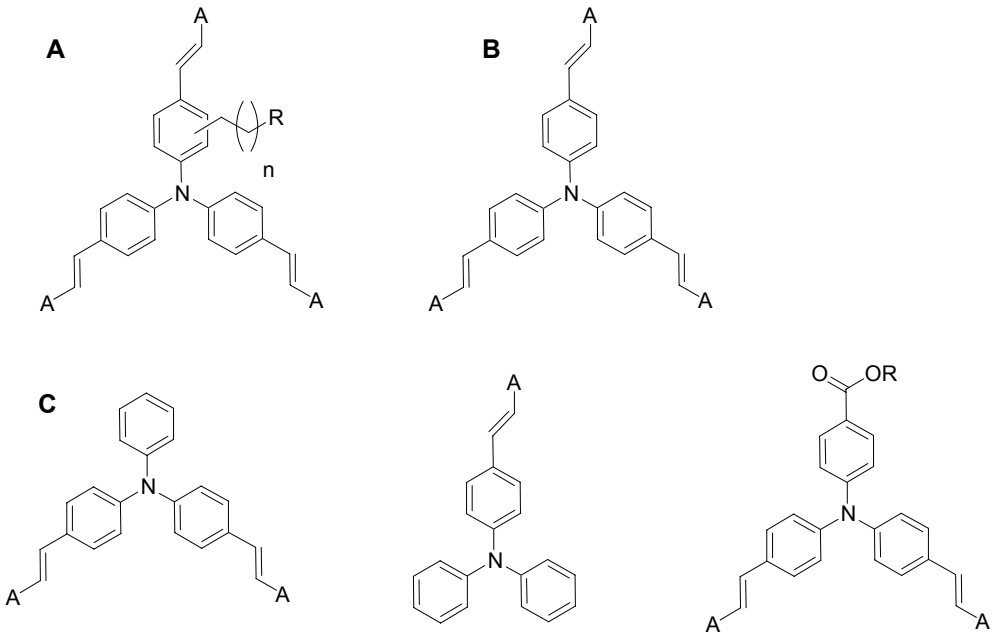


Figure II-*1*-21 : objectifs de synthèse. **A.** triphénylamines dérivatisables. **B.** analogues non substitués. **C.** analogues portant un ou deux groupements électroattracteurs.

La synthèse de ces triphénylamines dérivatisables fait l'objet du chapitre 2, l'étude de leurs comportements en milieu aqueux et de leurs propriétés optiques linéaires et non linéaires est décrite dans le chapitre 3.

Chapitre II-2 : Synthèse de fluorophores dérivatisables optimisés pour la fluorescence à deux photons.

I. Stratégies de synthèse envisagées.

Les molécules souhaitées peuvent être obtenues selon le schéma rétrosynthétique suivant (figure II-*2*-1) : une chaîne fonctionnelle pour le couplage avec des biomolécules est introduite sur une triphénylamine, **45**, portant trois groupements électroattracteurs et une fonction réactive R sur un des trois cycles aromatiques. Les groupements électroattracteurs, soit directement reliés à la triphénylamine, soit conjugués *via* une liaison éthylénique, sont introduits à partir d'un intermédiaire **46** trihalogéné ou **47** trialdéhyde, notamment *via* des réactions de Heck et de Horner Wadsworth Emmons. Ces deux intermédiaires **46** et **47** sont obtenus soit directement par réaction d'amination arylique à partir d'une aniline substituée et d'un halogénure d'aryle, soit par fonctionnalisation d'une triphénylamine elle-même obtenue par une réaction d'amination arylique.

Le phénomène d'absorption à deux photons dépend *a priori* de la symétrie de la molécule et du transfert de charge au sein de celle-ci lors de l'excitation. Nous avons donc choisi d'étudier l'influence de la nature de R et de sa position (en *ortho* ou *méta*) par rapport à l'azote central de la triphénylamine sur les propriétés optiques.

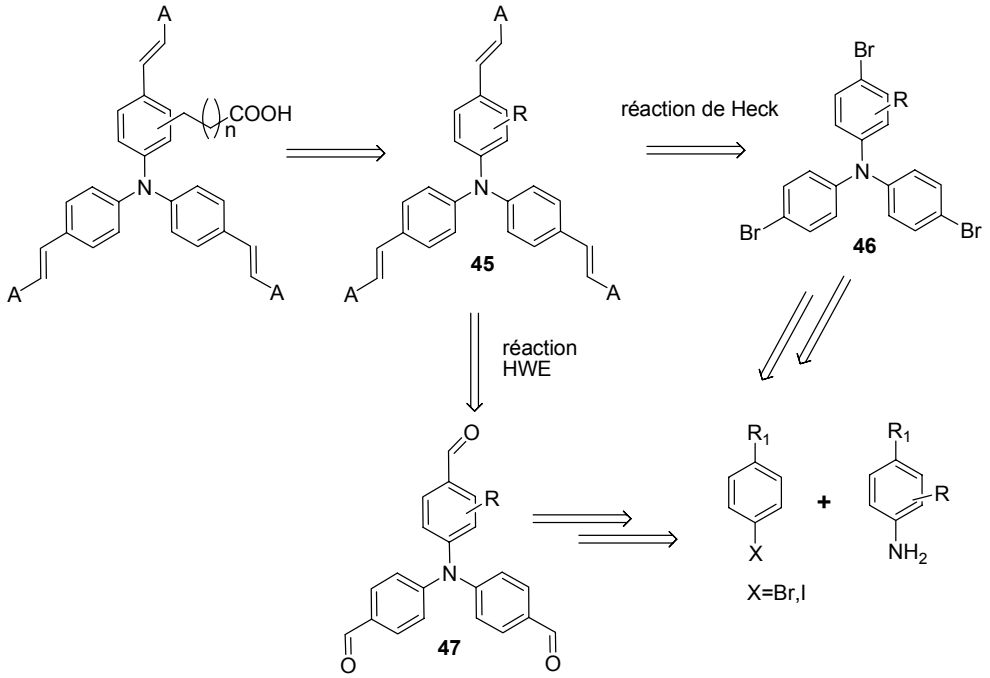


Figure II-*2*-1 : rétrosynthèse proposée pour les triphénylamines dérivatisables.

De même, les analogues non substitués et ceux portant deux groupements électroattracteurs et un bras pour le couplage sur le cycle non substitué sont obtenus à partir des intermédiaires halogénés ou aldéhydes correspondants. Nous décrirons donc dans un premier temps les différentes méthodologies employées pour obtenir les intermédiaires trihalogénés **46** et trialdéhydes **47**. Ensuite, nous décrirons les différents groupements électroattracteurs testés au cours de ce travail. Enfin, nous présenterons les réactions employées pour l'introduction d'un bras fonctionnel pour le couplage aux biomolécules.

II. Synthèse des triphénylamines de type **46**, **47**.

A. Réactions d'amination arylique.

Pour cette réaction, deux grands types de conditions ont été décrites dans la littérature et ont fait l'objet d'un grand nombre de publications : les aminations catalysées au cuivre (réactions de type Ullman)[175,176] et les aminations catalysées au palladium (réactions de Buchwald – Hartwig).[177-179] Nous nous limitons ici à citer quelques revues récentes. On peut noter qu'il existe aussi des systèmes catalysés au nickel[180,181] et des systèmes utilisant à la place de l'halogénure d'aryle un intermédiaire benzyne généré *in situ*[182] ainsi qu'une réaction utilisant la condensation d'une diphénylamine avec la 1,4-cyclohexanedione.[183]

Dans un premier temps, nous avons appliqué la réaction de Ullman - Goldberg utilisée au laboratoire pour la première étape de la synthèse des acridines et des quinacridines[100] : réaction entre un dérivé d'acide anthranilique et un iodure d'aryle catalysée par un mélange Cu / CuI, en présence de K_2CO_3, au reflux du pentanol. Nous avons pu montrer lors de ce travail qu'avec un large excès d'iodure d'aryle (10 éq.), on obtient exclusivement la triphénylamine, sans observer de diphénylamine (figure II-*2*-2), avec des rendements corrects (40 à 60 %) et dans des temps de réaction assez courts (1h30 à 4h).

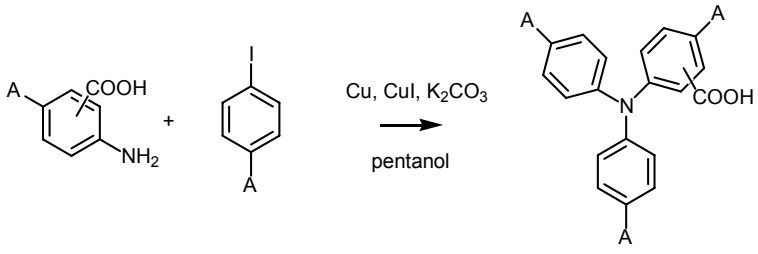


Figure II-*2*-2 : réaction de Ullmann Goldberg.

Nous avons ainsi synthétisé cinq triphénylamines (composés **48** à **52**) à partir de dérivés commerciaux d'acide anthranilique (figure II-*2*-3). Une caractéristique intéressante de la réaction de Ullman-Goldberg est la très forte différence de réactivité entre l'iode et le brome :

dans les conditions utilisées (large excès d'halogénure d'aryle : 10 équivalents), la réaction d'amination a lieu sur le carbone portant l'atome d'iode. Le dérivé tris-bromé **52** est ainsi obtenu très majoritairement par réaction entre l'acide 2-amino-5-bromobenzoïque et le *para*-bromoiodobenzène : la RMN ^1H et la spectrométrie de masse montrent la présence de 5% environ d'une triphénylamine portant deux bromes et un iode. Par ailleurs, un essai a été effectué pour obtenir l'acide 2-diphénylamino-benzoïque **48** en utilisant le bromobenzène à la fois comme réactif et comme solvant. Nous avons obtenu exclusivement le produit de monosubstitution (diphénylamine) avec un rendement faible (19 %). Ceci confirme qu'il est nécessaire d'utiliser des iodures d'aryle pour obtenir un produit de disubstitution.

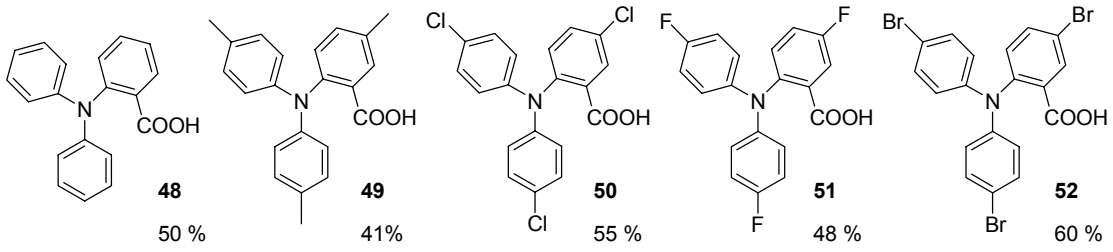


Figure II-*2*-3 : triphénylamines synthétisées par réaction de Ullmann-Golberg.

Nous avons ensuite observé que les deux fonctions amine et acide carboxylique doivent être en *ortho* impérativement. La triphénylamine est alors obtenue avec un rendement correct : la réaction est facilitée par une chélation du cuivre par les fonctions COOH et NH_2.[184] Lorsque les fonctions amine et acide carboxylique sont en *méta,* la réaction a lieu beaucoup plus difficilement.

Ces observations nous ont conduit à utiliser la catalyse au palladium, afin d'introduire la fonction R en *méta*. Parmi le grand nombre de systèmes catalytiques décrits dans la littérature, notre choix s'est porté sur le système $Pd(OAc)_2$ / $P(^tBu)_3$.[185] En effet, ce système permet d'obtenir des triphénylamines avec un excellent rendement en présence d'une base faible (carbonate de césium), ce qui permet d'envisager l'emploi de réactifs portant des fonctions sensibles aux bases fortes.

Nous avons ainsi obtenu la triphénylamine **53** avec un rendement de 88 % sur une échelle de 5 g (figure II-*2*-4), en formant d'abord la diphénylamine **54** puis la triphénylamine par un ajout de bromobenzène (1,1 éq.) et de carbonate de césium (1,5 éq.) dans le milieu réactionnel après 17-18h de réaction. La réaction d'amination semble donner de meilleurs résultats quand on opère avec un faible excès de bromobenzène. Un essai réalisé en utilisant le bromobenzène comme solvant conduit à la formation de la diphénylamine **54** avec 33% de rendement et une conversion incomplète de l'amine de départ, contrairement au cas précédent.

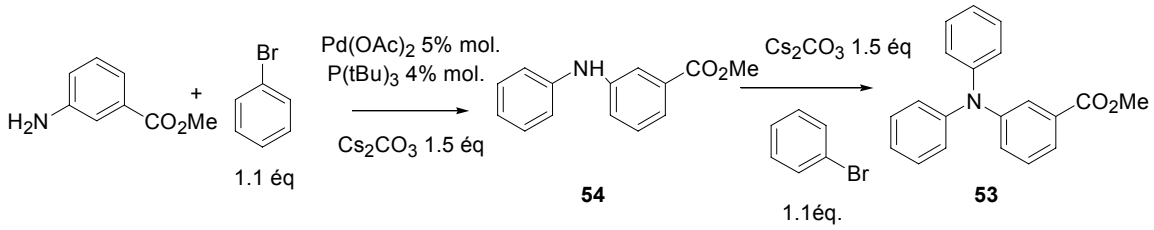


Figure II-*2*-4 : synthèse de la triphénylamine **53** par réaction d'amination catalysée au palladium.

De plus, la triphénylamine **55** a été obtenue dans les mêmes conditions, par couplage entre le 2-méthoxy-4-aminobenzoate de méthyle et le *p*-bromobenzoate de méthyle, avec un rendement de 89% sur une échelle de 12 g (figure II-*2*-5).[186]

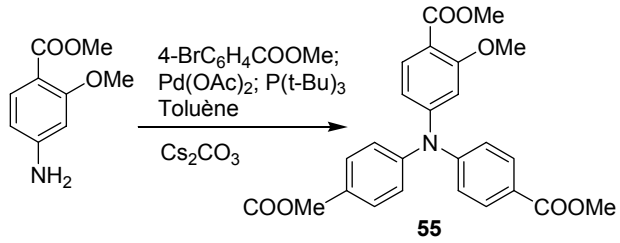


Figure II-*2*-5 : synthèse de la triphénylamine **55** portant trois fonctions ester.

Les deux réactions d'amination arylique testées possèdent ainsi chacune des avantages : si la réaction de Ullmann-Goldberg nécessite des conditions assez drastiques et est fortement dépendante du substrat, elle présente par contre l'avantage d'être simple à mettre en œuvre (aucun besoin de distiller ni de dégazer solvant et réactifs), rapide (1h30 à 4h de réaction selon les produits) et permet d'obtenir en une seule étape une triphénylamine portant un brome sur chaque position *para*. La réaction d'amination catalysée au palladium est plus longue (24 à 36h de réaction), nécessite quelques précautions (travail en milieu inerte et anhydre) mais permet l'obtention, avec de meilleurs rendements, d'une plus grande variété de composés : la fonction dérivatisable n'est plus obligatoirement un acide carboxylique en *ortho* de l'azote et il est possible d'utiliser des bromures d'aryles au lieu des iodures.

Afin d'obtenir des composés possédant 1 et 2 groupes électroattracteurs en *para* de l'azote, nous avons souhaité synthétiser les 4-iodo-triphénylamine et 4,4'-diiodo-triphénylamine. Ces composés semblent délicat à obtenir par les réactions d'amination arylique décrites ci-dessus, du fait de la réactivité de l'atome d'iode. Des réactions d'iodation de la triphénylamine peuvent être envisagées, à la condition d'utiliser un agent d'iodation très doux. Des essais ont ainsi été effectués avec le dichloroiodate de benzyltrimethylammonium (BTMA, ICl_2).[187] Avec ce réactif, il est possible de repérer visuellement la fin de la réaction, qui se traduit par la disparition de la couleur orange foncée due à l'ion ICl_2^-. Quand la réaction est effectuée avec 1,0 équivalent de BTMA, ICl_2, la réaction est terminée au bout de quelques

jours, avec 2,0 équivalents au bout de quelques semaines et avec 3,0 équivalents au bout de quelques mois. Ces temps de réaction très longs, qui indiquent la grande sensibilité du réactif d'iodation à l'effet désactivant pourtant faible des atomes d'iode introduits sur la molécule, rendent la réaction très peu pratique à utiliser. De plus, l'analyse RMN des essais menés avec 1,0 et 2,0 équivalents d'agent iodant montre la présence de produits sous- et suriodés (10 % environ de chaque impureté).

Nous nous sommes donc tournés vers une autre méthode d'arylation, basée sur la génération *in situ* d'un intermédiaire benzyne[182] Les composés désirés ont ainsi été obtenus avec de très bons rendements (96 et 86 %), respectivement par réaction de la 4-iodoaniline et de la 4,4'-diiododiphénylamine sur le 2-(triméthylsilyl)benzènetrifluorométhanesulfonate en présence de CsF.[188]

B. Réactions d'halogénation.

Si le composé **52** et les 4-iodo-triphénylamine et 4,4'-diiodo-triphénylamine sont obtenus directement par réaction d'amination arylique, l'utilisation de réactions d'halogénation permet d'obtenir une plus grande diversité de triphénylamines halogénées. La tris-(4-bromophényl)-amine **56** peut ainsi être obtenue de façon quantitative à partir de la triphénylamine par bromation avec le N-bromosuccinimide (NBS). Par ailleurs, ce produit est disponible commercialement. De la même façon, la triphénylamine tribromée portant une fonction ester **57** est obtenue à partir du composé **53** avec un excellent rendement (95 %, figure II-*2*-6) mais avec des traces d'un produit secondaire non séparable par chromatographie et avec un temps de réaction considérablement plus long (2 jours au lieu de 3h) que pour la synthèse de la tris-(4-bromophényl)-amine non dérivatisable **56**. De même, l'intermédiaire **58** (figure II-*2*-6) a été synthétisé par bromation au NBS du 4-(diphénylamino)benzoate de méthyle.

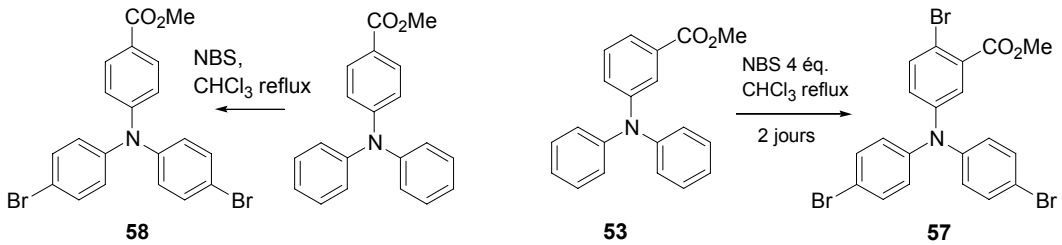


Figure II-*2*-6 : synthèse des composés **57** et **58** par bromation au NBS.

Cependant, dans la plupart des cas, les tentatives de bromation avec de légers excès (3,3 éq.) de NBS aboutissent à des mélanges non séparables de produits di-, tri- et tétrabromés. C'est le cas notamment avec l'acide 2-diphénylamino-benzoïque **48** ou avec la 3-

méthoxytriphénylamine **59**. Dans ce dernier cas, l'ajout d'un excès plus important de NBS (4,3 éq. au total) conduit à la formation du produit tétrabromé **60** (figure II-*2*-7) : l'effet activant du groupement méthoxy entraîne la bromation de la position en *para* de ce groupement malgré l'encombrement stérique.

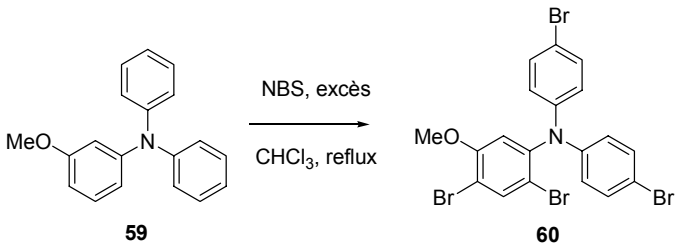


Figure II-*2*-7 : bromation du composé **59**.

La réaction a été effectuée dans le DMF, solvant reconnu comme permettant des réactions plus sélectives,[189] avec le même résultat. De même, la bromation par Br_2 conduit à des mélanges inséparables. Le groupement méthoxy a finalement été clivé par BBr_3 puis converti en acétate. La triphénylamine résultante peut alors être bromée ou iodée sélectivement sur les trois positions *para* pour conduire aux triphénylamines **61** et **62** (figure II-*2*-8).[188]

Nous avons ainsi à notre disposition neuf intermédiaires halogénés (figure II-*2*-8) que l'on pourra fonctionnaliser par des groupements électroattracteurs afin d'étudier l'influence du nombre de groupements électroattracteurs (1, 2 ou 3), de la position (en *ortho* ou en *meta* de l'azote) et de la nature de la fonction (électroattracteur ou électrodonneur) permettant l'introduction du bras pour le couplage aux biomolécules.

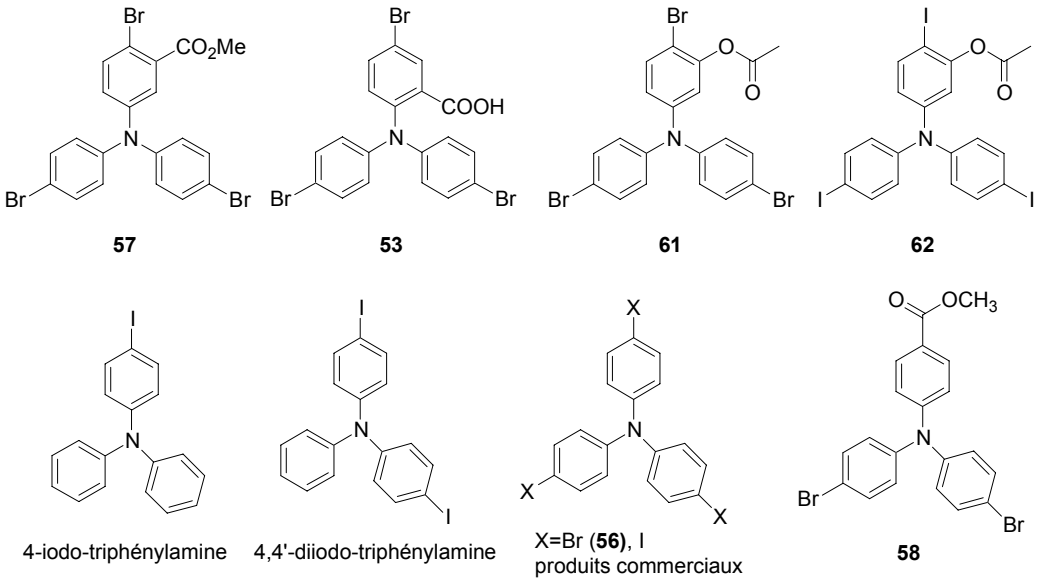


Figure II-*2*-8 : récapitulatif des intermédiaires halogénés obtenus.

C. Obtention des intermédiaires aldéhydes.

Dans un souci de simplicité, les réactions de formylation ont d'abord été étudiées sur les systèmes non dérivatisables. La tris-(4-formyl-phényl)amine **63** est un intermédiaire clé pour la synthèse de nombreux fluorophores possédant un cœur triphénylamine, notamment *via* des réactions HWE, mais sa synthèse est rarement détaillée. Il a été montré que la tris-formylation de la triphénylamine dans les conditions de Vilsmeier-Haack ($POCl_3$, DMF, 95-100°C) ne se produit de que de façon extrêmement partielle.[190] En effet, l'ion iminium formé intermédiairement est très électroattracteur : la présence de deux iminiums désactive fortement la triphénylamine et la troisième formylation n'a pas lieu. Par la suite, une formylation en deux étapes a été décrite : la 4,4'-diformyltriphénylamine est isolée puis remise en réaction.[191,192] Les deux groupements aldéhydes étant moins électroattracteurs que les iminiums, la 3ème formylation peut avoir lieu avec un rendement correct (52% sur les deux étapes après optimisation).[192]

Nous avons cherché à obtenir la tris-(4-formyl-phényl)amine à partir de la tris-(4-bromo-phényl)amine **56** par réaction d'échange halogène-métal suivie d'une formylation. Un protocole décrit la formation de la tris-(4-lithio-phényl)-amine par échange halogène-métal en utilisant le nBuLi dans l'éther à température ambiante.[193] Nos essais dans des conditions proches (PhLi ou ^{t}BuLi dans le THF à température ambiante) ont conduit à des mélanges non analysables, résultant probablement d'une dégradation du lithien. Nous avons finalement obtenu la tris-(4-formyl-phényl)amine **63** avec un rendement de 64 % en utilisant un excès (7 éq.) de ^{t}BuLi dans le THF à –78 °C, suivi d'une formylation au DMF (figure II-*2*-9).[194]

Une réaction originale et plus efficace, adaptée des travaux de Buchwald *et al.*,[195] a ensuite été développée au laboratoire en utilisant un couplage catalysé au palladium entre le 4-bromobenzaldéhyde, protégé sous forme de diéthylacétal, et l'amidure de lithium comme équivalent d'ammoniac. La tris-(4-formyl-phényl)amine est ainsi obtenue en une seule étape avec un rendement de 78 % (figure II-*2*-9).

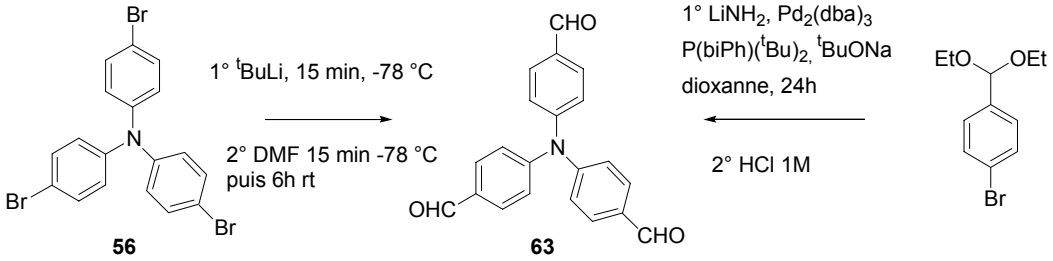


Figure II-*2*-9 : obtention de la tris-(4-formylphényl)amine **63**.

Par ailleurs, toujours dans le but d'étudier l'influence du nombre de groupements électroattracteurs sur les propriétés optiques, les dérivés **64**, **65** et **66** ont également été synthétisés par réaction de Vilsmeier (figure II-*2*-10).

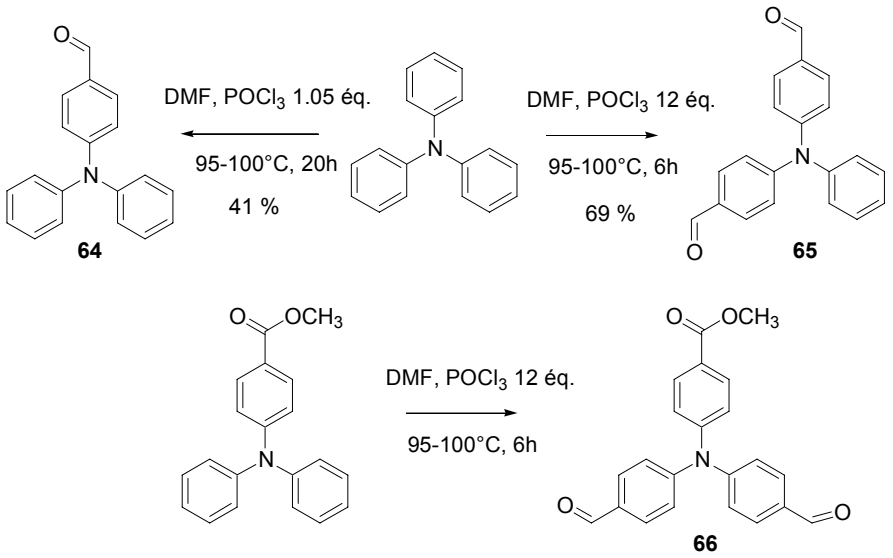


Figure II-*2*-10 : synthèse des triphénylamines **64**, **65** et **66** par réaction de Vilsmeier.

L'obtention de triphénylamine trialdéhydes possédant un bras dérivatisable s'est révélée nettement plus problématique : l'application de la réaction d'échange halogène-métal s'est avérée délicate. Dans un premier temps, nous avions envisagé d'utiliser cette réaction sur la triphénylamine tribromée portant un ester (**57**). Ceci n'est en fait pas possible car il est connu dans la littérature[196] que les lithiens aromatiques portant une fonction ester méthylique ne sont pas stables. En revanche, des réactions d'échange halogène-métal à basse température (-100 °C) ont été décrites sur des acides bromobenzoïques[197] : l'ion carboxylate formé par ajout d'un premier équivalent de lithien est beaucoup moins électrophile qu'un ester méthylique. Nous avons donc cherché à utiliser cette réaction sur l'acide 2-[bis-(4-bromo-phényl)-amino]-5-bromo-benzoïque **52** (figure II-*2*-11). La réaction nécessitant un contrôle précis de la stœchiométrie, le ^{t}BuLi utilisé a préalablement été dosé en utilisant la méthode de Watson – Eastham.[198]

Pour optimiser les conditions réactionnelles de l'étape d'échange halogène – métal, nous avons réalisé des essais d'échange halogène - métal suivi d'un quench à l'eau (figure II-*2*-11). Après 1h30 de réaction, le produit de triple échange est obtenu avec environ 80% de rendement (estimé en RMN), et ce même lorsqu'on effectue l'addition de ^{t}BuLi à -78 °C au lieu de –100 °C. Quand la réaction est effectuée avec un léger excès de lithien (4,1 à 4,4 éq.), la spectrométrie de masse montre qu'on obtient un mélange avec le produit de triple échange (très majoritaire) et un produit possédant encore un brome. Quand la réaction est effectuée

avec un excès de lithien (7 éq.), on obtient aussi très majoritairement le produit de triple échange.

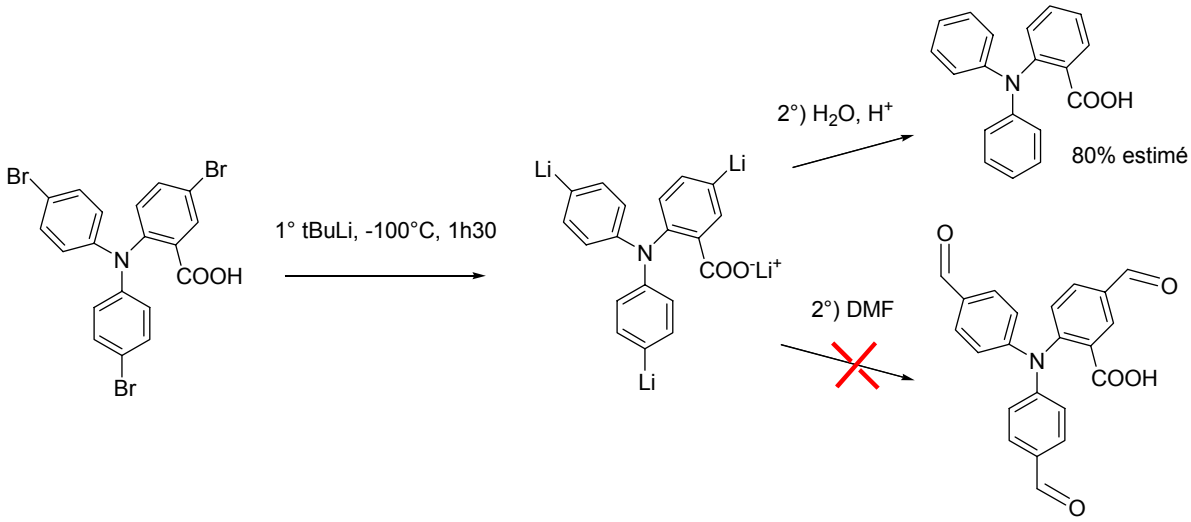


Figure II-*2*-11 : voie de synthèse par échange halogène-métal.

Tous les essais effectués montrent que la réaction d'échange halogène-métal suivie d'un quench à l'eau conduit bien au produit attendu (**48**) avec un très bon rendement (de l'ordre de 80%), qu'on opère à la stoechiométrie ou en excès de lithien. Il est apparemment préférable d'utiliser des temps de réaction assez longs (environ 1h30).

Toutefois, tous les essais avec des agents de formylation (DMF, distillé sur CaH_2, et formate d'éthyle, distillé sur CaH_2) ont conduits à des mélanges complexes, non interprétables en RMN. Les spectres de masse montrent systématiquement la présence du produit attendu et la présence des produits portant 1, 2 et 3 H sur les positions en *para* de l'azote. On ne détecte pas d'autre produits secondaires, ce qui permet *a priori* d'écarter l'hypothèse d'une lithiation suivie d'une attaque électrophile en ortho du carboxylate. D'après les essais réalisés, le tétra-anion formé par échange halogène-métal ne semble pas réagir assez rapidement avec les électrophiles testés pour obtenir avec un rendement correct le produit résultant d'une triple attaque électrophile. Cette voie de synthèse a donc été abandonnée.

Nous avons ensuite tenté d'obtenir la triphénylamine dérivatisable triformylée souhaitée par réaction de Vilsmeier. Dans ces conditions, l'acide 2-diphénylamino-benzoïque **48** conduit exclusivement à la formation de la N-phénylacridone **67** par une réaction d'acylation intramoléculaire (figure II-*2*-12). L'acide **48** a donc été estérifié. La formylation (en utilisant un large excès de $POCl_3$: 12 éq.) de l'ester ainsi obtenu **68** a conduit à un mélange de produits de mono et de di-formylation, les aldéhydes étant introduits exclusivement sur les cycles ne portant pas la fonction ester (figure II-*2*-13). Le mélange de produits mono- et diformylés a

été remis en réaction, avec à nouveau un large excès de $POCl_3$ - 13 éq. - pour conduire à l'obtention très majoritaire du produit diformylé **69** (67 % de rendement sur les deux étapes), sans qu'aucune trace de formylation ne soit observée sur le cycle portant la fonction ester. Le composé **69** n'est pas plus réactif dans les conditions de Rieche ($TiCl_4$ 10 éq., Cl_2CHOMe 10 éq., -5°C).[199] D'autres essais menés au laboratoire dans des conditions analogues avec des triphénylamines portant un ester en position *meta* de l'azote ont mis en évidence la même absence de réactivité. L'introduction d'une fonction avec un caractère électroattracteur semble ainsi désactiver trop la triphénylamine pour permettre une formylation des trois positions en *para* de l'azote. Par ailleurs, les essais de formylation menés sur la 3-méthoxytriphénylamine ont conduit majoritairement à des produits de dégradation. La voie de synthèse par formylation directe a donc été également abandonnée.

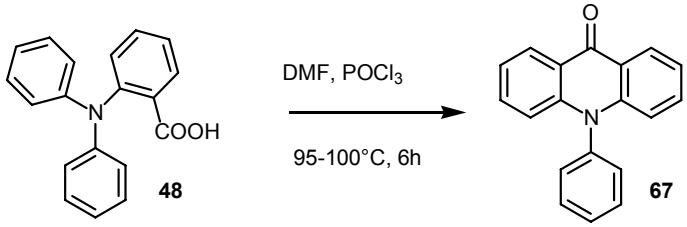


Figure II-*2*-12 : synthèse de la N-phénylacridone **67**.

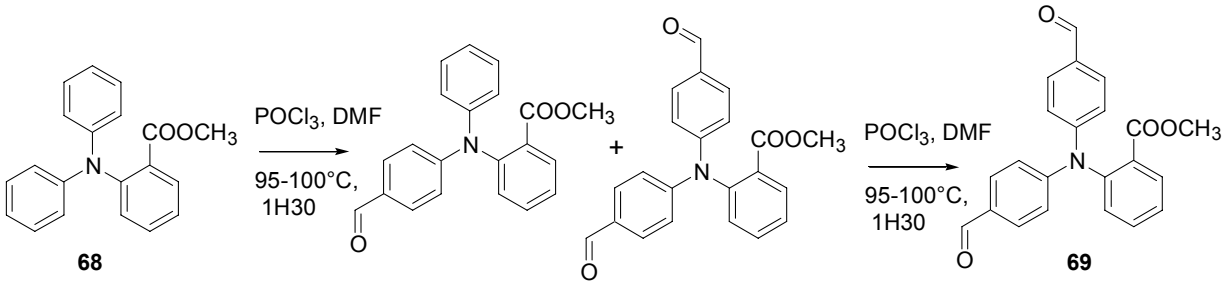


Figure II-*2*-13 : formylation du 2-diphénylamino-benzoate de méthyle **68**.

L'oxydation des groupements méthyles de la triphénylamine **49** n'a pas non plus abouti. Nous avons d'abord utilisé une oxydation au dioxyde de sélénium.[200] Dans des conditions relativement douces (SeO_2 8éq., 2h au reflux d'un mélange dioxanne / eau 96 / 4), le composé **49** ne réagit pas et dans des conditions drastiques (reflux du naphtalène, 10min), un mélange complexe est obtenu et le produit attendu n'est pas observé. Nous avons ensuite testé une oxydation à l'IBX[201,202] qui conduit, de même, à un mélange complexe dont le produit attendu n'est pas isolé (figure II-*2*-14). On peut supposer que le potentiel d'oxydation bas des triphénylamines favorise les réactions parasites.[203] Par ailleurs, un essai de bromation radicalaire des groupes méthyles de **50** a été effectué, dans le but d'oxyder ensuite les groupements halogénés en aldéhydes. La réaction, effectuée avec 3,1 équivalents de NBS

dans CCl_4, a conduit à un mélange de produits de bromation radicalaire des méthyles et de bromation nucléaire sur les cycles aromatiques. La voie « oxydation des groupes méthyles » a donc, elle aussi, été abandonnée.

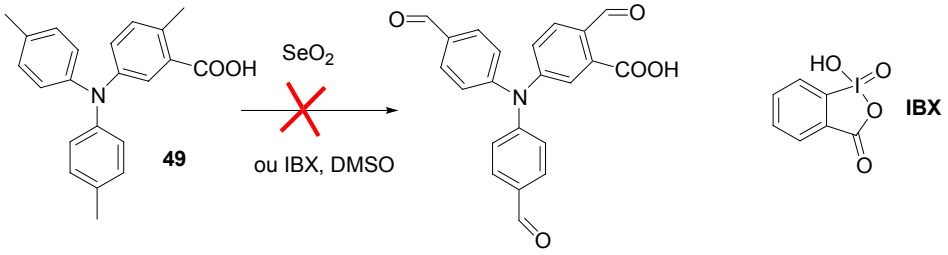


Figure II-*2*-14 : essais d'oxydation des groupes méthyles du omposé **49**.

L'introduction de trois fonctions aldéhydes sur une triphénylamine dérivatisable semblant particulièrement délicate, nous avons finalement essayé d'obtenir le composé souhaité *via* un couplage entre la diphénylamine et le triflate **70** (figure II-*2*-15), dans le but de formyler ensuite les deux cycles non fonctionnalisés. Le composé **70** est obtenu facilement par réaction de l'anhydride triflique sur le 5-formylsalicylate de méthyle **71**, lui-même obtenu par estérification de l'acide 5-formylsalicylique.[204] Toutefois, dans des conditions classiques de couplage au palladium ($Pd(OAc)_2$, $P(^tBu)_3$, en présence de Cs_2CO_3 dans le toluène), nous n'avons observé aucune réaction entre la diphénylamine et le triflate **70**, sans que l'on puisse fournir d'explication satisfaisante à cette absence de réactivité.

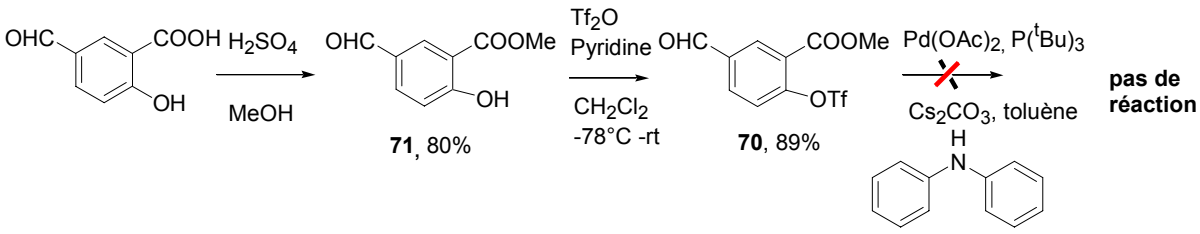


Figure II-*2*-15 : essai d'amination du triflate **71**.

Nous avons finalement pu obtenir une triphénylamine dérivatisable triformylée à partir de la triphénylamine **55** portant trois fonctions ester et un groupement méthoxy. Nous avons effectué une réduction contrôlée des trois fonctions ester en aldéhyde, en utilisant le réactif Red-Al modifié par de la N-méthyl pipérazine, tel que décrit par Hagiya *et al.* pour la réduction du 2,6-naphtalènedicarboxylate de méthyle en dialdéhyde (figure II-*2*-16).[205] Le trialdéhyde **72** est obtenu avec un rendement médiocre de 12 %. La réaction a été optimisée par la suite au laboratoire, pour parvenir à un rendement de 38 % (soit 72 % par réduction). La synthèse a ensuite été améliorée en utilisant une réduction du triester **55** en l'alcool **73** par $LiAlH_4$, suivie d'une oxydation contrôlée à l'aide de MnO_2. Le trialdéhyde **72** est ainsi obtenu avec 72% de rendement à partir de **55**, à l'échelle du gramme.

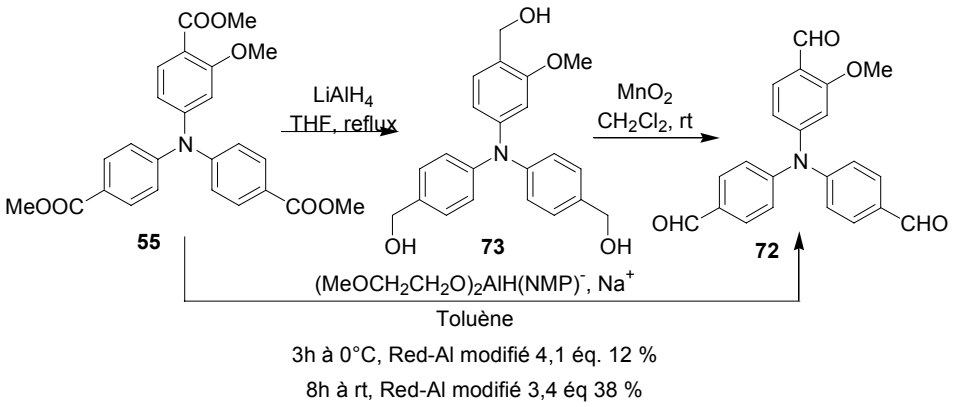


Figure II-*2*-16 : voies de synthèse utilisées pour l'obtention du trialdéhyde dérivatisable **72**.

Nous avons ainsi obtenu cinq intermédiaires aldéhydes : trois composés non dérivatisables **63**, **64** et **65** portant respectivement 3, 1 et 2 fonctions aldéhydes et deux composés dérivatisables **66** et **72** portant respectivement deux fonctions aldéhydes et un ester et trois fonctions aldéhydes et un méthoxy (figure II-*2*-17).

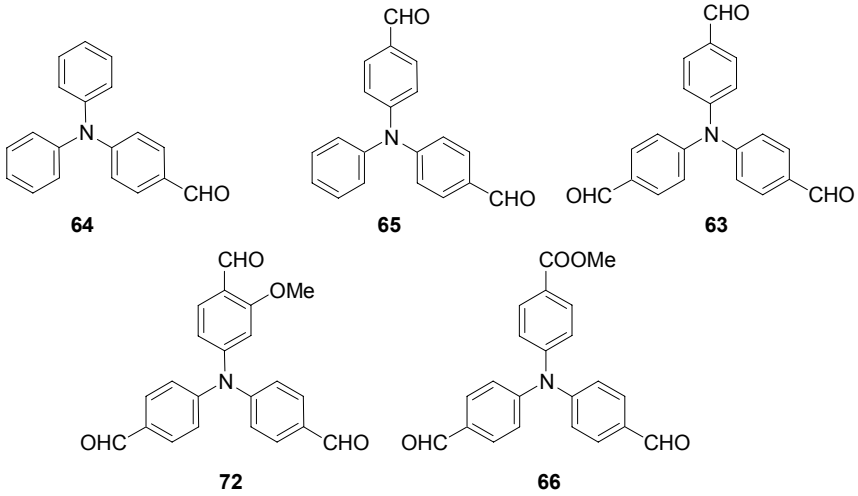


Figure II-*2*-17 : récapitulatif des intermédiaires aldéhydes synthétisés.

III. Fonctionnalisation par des groupes électroattracteurs.

A. A partir des intermédiaires halogénés.

Notre recherche de groupements électroattracteurs de petite taille nous a tout d'abord conduit à l'introduction de groupements cyano. La synthèse de la tris-4-cyanophénylamine à partir de la tris-4-bromophénylamine par réaction de Rosenmund - von Braun (excès de CuCN, au reflux du DMF) est décrite dans la littérature : un mélange de tris-4-cyanophénylamine **73** et de 4,4'-dicyano-4''-bromo-triphénylamine **74** est obtenu (les deux composés sont séparés par sublimation fractionnée).[206]

Nous avons utilisé le ferrocyanure de potassium II ($K_4[Fe(CN)_6]$), décrit récemment comme un réactif de cyanation efficace et qui présente en outre l'avantage d'être non toxique.[207] Nous obtenons un mélange 80 / 20 de **73** / **74** (figure II-*2*-18). En jouant sur des différences de solubilité, nous avons isolé une petite quantité (52 mg, 5 % de rendement) de tris-4-cyanophénylamine **73**. Ce composé possède un maximum d'absorption UV - Visible de 339 nm (dans l'éthanol), alors que nous cherchons des composés présentant un maximum d'absorption vers 400 nm, pour une excitation biphotonique autour de 800 nm. Nous n'avons donc pas tenté d'améliorer cette synthèse.

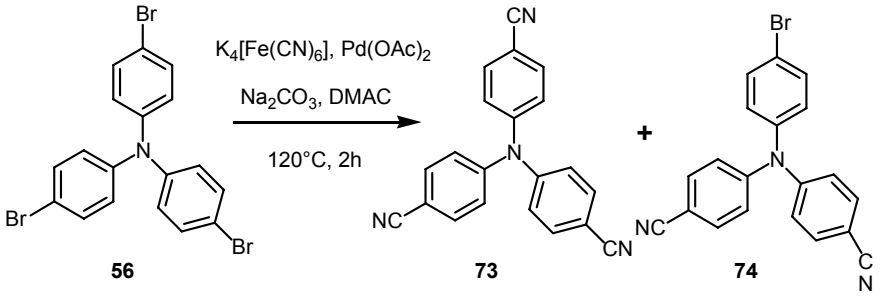


Figure II-*2*-18 : synthèse de la tris-4-cyanophénylamine **73**.

Nous avons ensuite cherché des groupements électroattracteurs plus forts, et nous sommes intéressés à la synthèse de sulfones (σ_p = 0,68 pour SO_2Ph), par réaction entre la tris-4-iodophénylamine et un sel de sulfinate, en présence d'une quantité stoeichiométrique d'iodure de cuivre (I).[208] Nous avons dans un premier temps utilisé le *para*-toluène sulfinate de sodium commercialement disponible. Nous avons ainsi obtenu la tris-[4-(toluène-4-sulfonyl)-phényl]-amine **75** avec un rendement de 29 % (figure II-*2*-19). Ce composé **75** a un maximum d'absorption UV- Visible à 344 nm. L'utilisation d'un groupement électroattracteur plus fort que le groupement cyano n'a donc pas été efficace. Par ailleurs, nous avons testé la tris-4-nitrophénylamine, commercialement disponible ; elle n'est pas fluorescente, ce qui n'est pas surprenant : les groupements nitro sont connus pour éteindre souvent la fluorescence.[1]

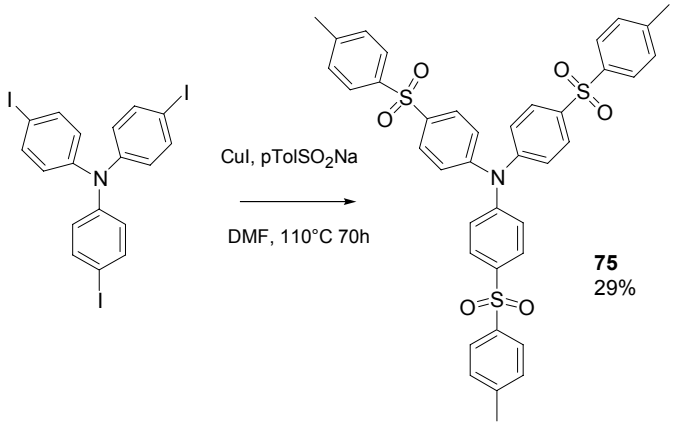


Figure II-*2*-19 : synthèse de la tris-[4-(toluène-4-sulfonyl)-phényl]-amine **75**.

Etant donnés les résultats décevants obtenus avec les composés dont les groupements électroattracteurs sont greffés directement sur la triphénylamine, nous avons décidé de synthétiser des composés conjugués, en utilisant des réactions de Heck entre les triphénylamines halogénées et des composés vinyliques. Nous avons d'abord choisi la 4-vinylpyridine, en utilisant des conditions décrites comme étant très efficaces pour le couplage des vinylpyridines : système catalytique $Pd(OAc)_2/P(o\text{-}Tol)_3$ dans un mélange DMF / Et_3N 2 / 1.[209] Nous avons ainsi obtenu le composé **76** à partir de la tris-4-bromophénylamine **56** avec un rendement de 86 %, exclusivement sous forme d'isomère E. Les analogues mono- et disubstitués **77** et **78**, ainsi que les composés dérivatisables **79**, **80** et **81**, ont été obtenus de la même façon à partir des précurseurs iodés ou bromés correspondants (figure II-*2*-20). Comme attendu, les dérivés iodés sont plus réactifs : la conversion est complète après 3h contre 25h pour les bromés. Il faut aussi noter que, dans le cas du composé **80**, la fonction phénol a été déprotégée au cours de la réaction : le groupement protecteur acétate a été hydrolysé, ce qui probablement dû au fait que le milieu n'était pas rigoureusement anhydre.

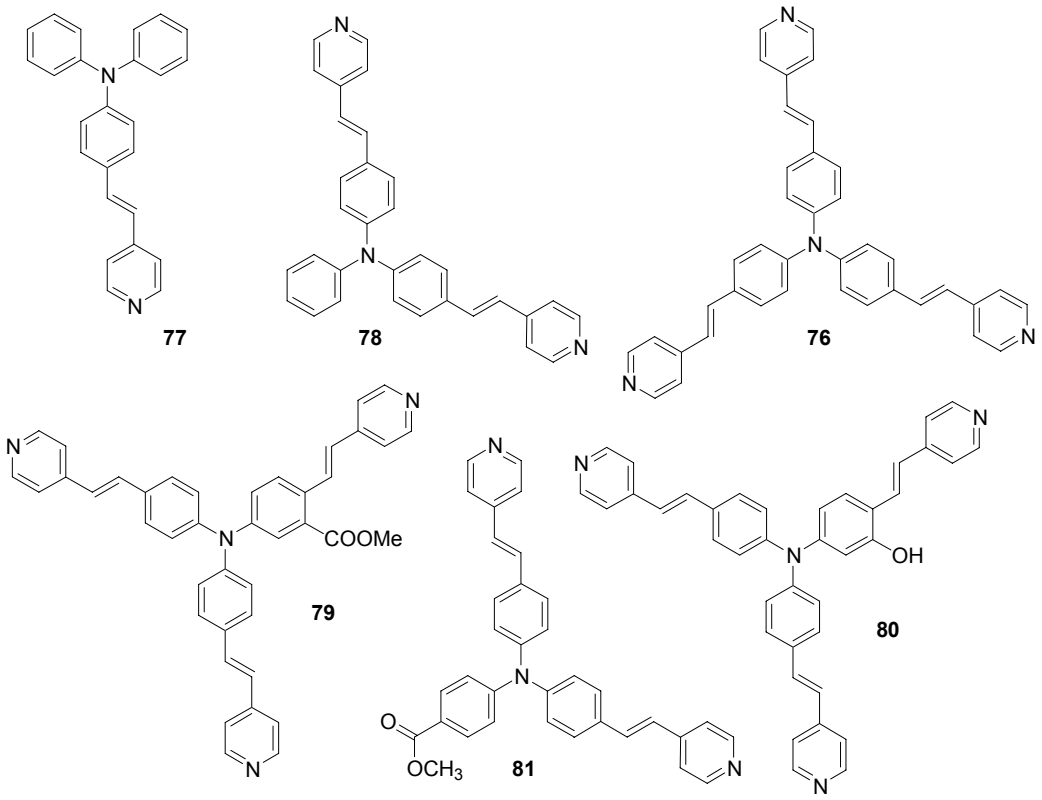


Figure II-*2*-20 : récapitulatif des triphénylamines vinylpyridine obtenues.

B. A partir des intermédiaires aldéhydes.

Nous avons tout d'abord décidé de synthétiser une série de dérivés biscyanovinyle, car ce groupement, largement utilisé dans les matériaux organiques, présente un fort caractère

électroattracteur associé à une bonne stabilité thermique.[210] Pour cela, nous avons appliqué la réaction de Knoevenagel pour obtenir, avec de bons rendements les composés **82** à **86**, représentés sur la figure II-*2*-21, par réaction entre le malononitrile et les aldéhydes correspondants, selon le protocole décrit dans la littérature: dans la pyridine en présence de tamis moléculaire et de quantités catalytiques d'acide acétique et d'acétate de sodium.[211]

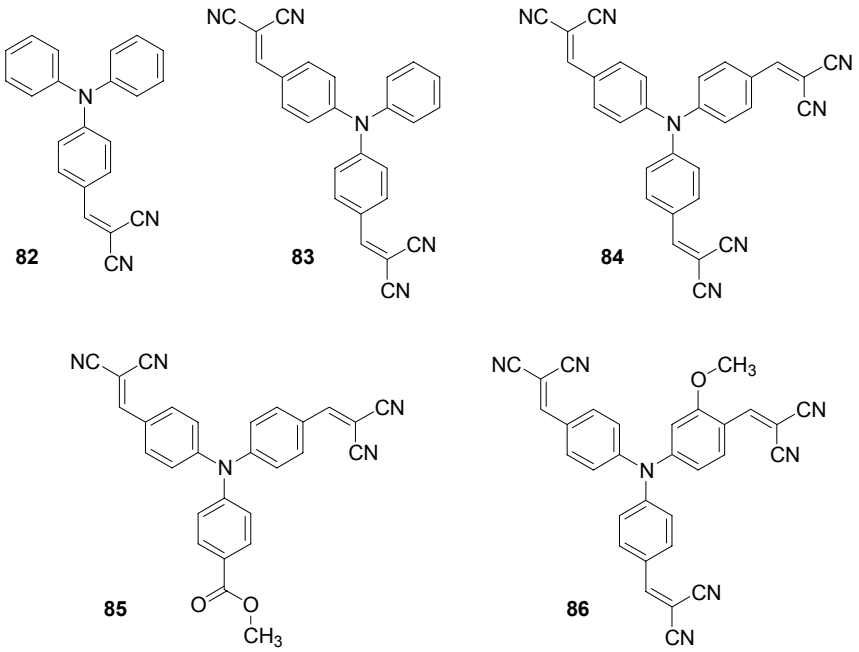


Figure II-*2*-21 : récapitulatif des triphénylamines biscyanovinyl obtenues.

La même réaction appliquée à la fonctionnalisation des triphénylamines par des groupements picolinium,[212] par réaction entre l'iodure de N-méthyl 4-picolinium **87** et les triphénylamines tris et bisformylées **63** et **65**, a conduit à des mélanges (figure II-*2*-21). Les composés ayant été obtenus purs par une autre voie, décrite plus loin, nous avons pas cherché à améliorer cette réaction.

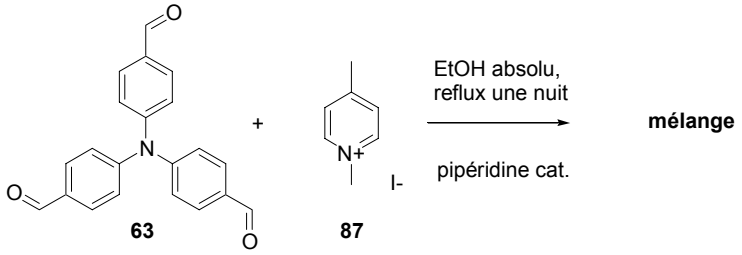


Figure II-*2*-22 : essais de fonctionnalisation des triphénylamines par des groupements picolinium par réaction de Knoevenagel.

Pour obtenir des composés avec des groupements électroattracteurs diversifiés, nous avons ensuite utilisé des réactions HWE (Horner – Wadsworth – Emmons) entre les triphénylamines fonctionnalisées par des aldéhydes et des phosphonates. Nous avons tout

d'abord choisi un phosphonate commercial, le diéthylcyanométhylphosphonate, en utilisant des conditions décrites dans la littérature pour des réactions sur les triphénylamines : réaction une nuit à température ambiante dans le CH_2Cl_2 anhydre en présence de *tert*-butoxide de potassium.[158] Les composés **88** et **89** (figure II-*2*-23) sont ainsi obtenus sous forme de mélanges contenant 90 % d'isomères E et 10% d'isomères Z (analyse RMN). Les rendements moyens, voire faibles, de ces deux réactions (respectivement 47 et 27 %) sont essentiellement dus aux purifications réalisées pour obtenir une fraction la plus riche possible en isomère E. Il faut noter que le diéthylcyanométhylphosphonate est connu pour donner des mélanges Z / E, mêmes dans des conditions favorisant habituellement fortement l'isomère E.[213] Le composé dérivatisable **90** a été obtenu au laboratoire par la même réaction et, dans ce cas, l'isomère (*E, E*) a pu être isolé.

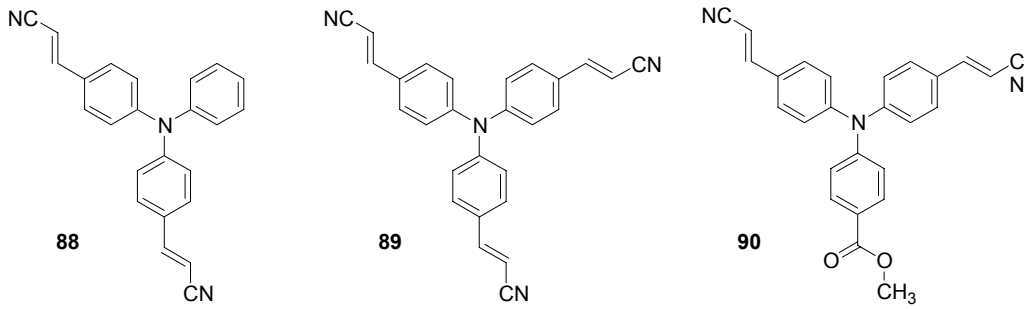


Figure II-*2*-23 : récapitulatif des triphénylamines monocyanovinyl obtenues.

Le diéthyl(2–benzothiazolylméthyl)phosphonate a ensuite été synthétisé selon un protocole décrit.[214] Les conditions utilisées ensuite pour la réaction de Horner – Wadsworth – Emmons (dans le THF, en présence de NaH et d'une quantité catalytique d'éther – couronne (15C5)) sont décrites pour favoriser la formation de l'alcène de configuration E.[215] Les composés **91** à **94** (figure II-*2*-24) ont ainsi été obtenus à partir des aldéhydes correspondants avec de bons rendements, exclusivement sous forme d'isomère (E). On peut noter que, dans le cas des composés **91** et **92**, les conversions sont incomplètes même après 72h de réaction. Les aldéhydes non consommés sont éliminés du mélange réactionnel par traitement avec le réactif de Girard P. Dans le cas des composés **93** et **94**, la réaction est totale : la présence des groupements benzothiazoles électroattracteurs favorise la réaction en activant les aldéhydes vis-à-vis des phosphonates nucléophiles.

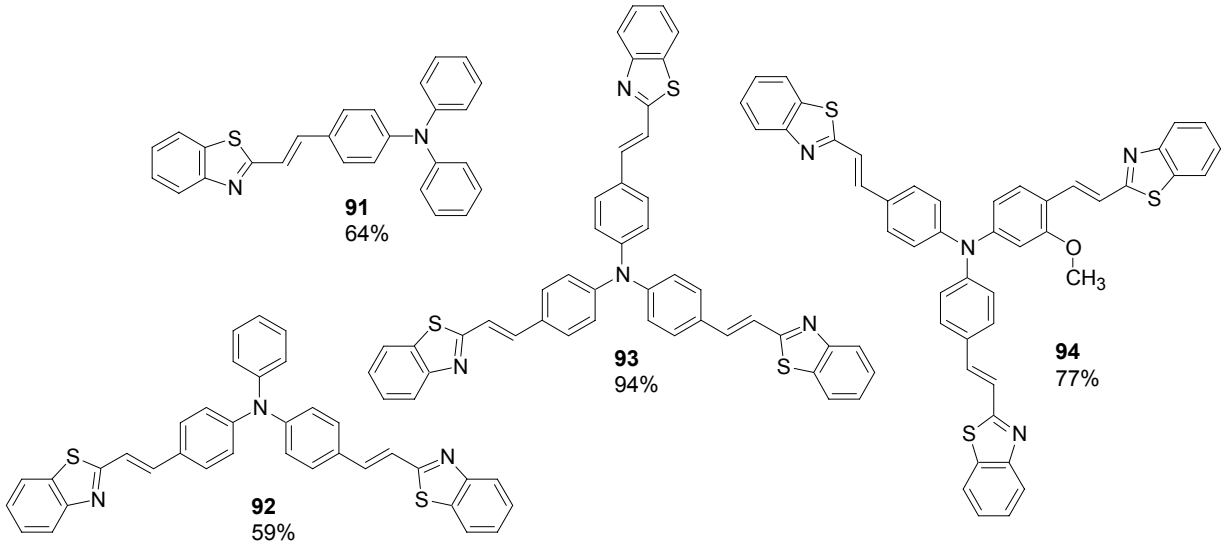


Figure II-*2*-24 : triphénylamines vinylbenzothiazole obtenues.

C. Groupements électroattracteurs chargés.

Afin d'obtenir des composés portant des groupements fortement électroattracteurs et possédant une bonne solubilité dans l'eau, nous avons cherché à quaternariser les triphénylamines substituées par des groupements vinylpyridine et vinylbenzothiazole. Les composés **95** à **98** (figure II-*2*-25) ont ainsi été obtenus avec de bons rendements à partir des triphénylamines **76** à **79** par méthylation en présence d'un large excès d'iodométhane (réaction une nuit à température ambiante). Dans ces conditions, il est possible de méthyler les trois groupements pyridine de la molécule sans attaquer l'azote central de la triphénylamine, très peu réactif.

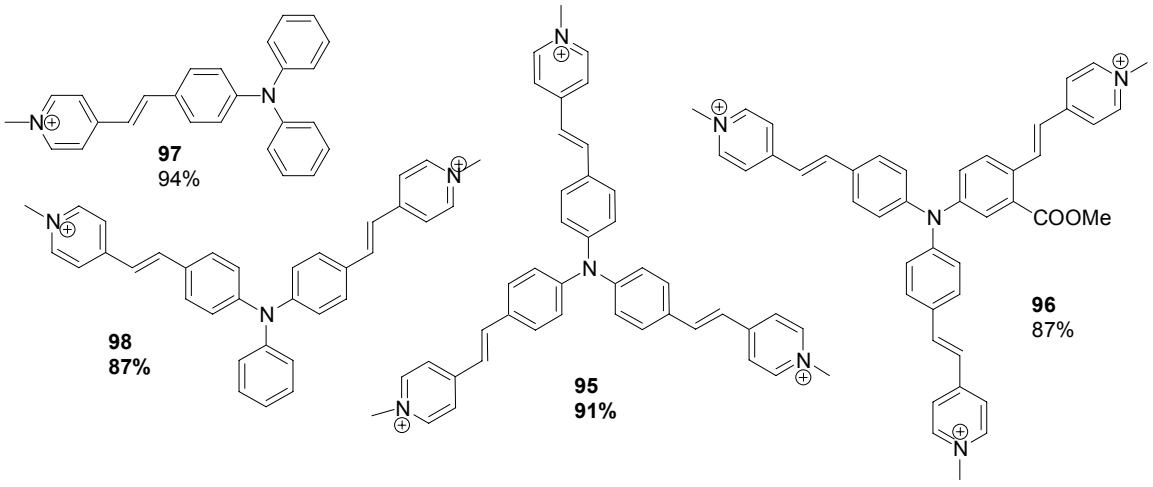


Figure II-*2*-25 : triphénylamines vinylpyridinium obtenues.

La triphénylamine **99** (figure II-*2*-26) portant un groupement méthylbenzothiazolium a été obtenue au laboratoire par la même méthode : méthylation du composé **92**, au reflux de

l'iodométhane utilisé comme solvant. Nous avons ensuite obtenu la triphénylamine **100** substituée par trois groupements méthylbenzothiazolium, à partir du composé **94**, par méthylation en présence de 6 éq. de diméthylsulfate, au reflux du méthanol mais celle-ci s'est révélée extrêmement instable en milieu aqueux : elle subit une déméthylation en quelques secondes dans une solution de dichlorométhane saturée en eau (à l'œil, on peut suivre le changement de couleur de la solution, du violet au jaune). L'utilisation de ce composé en milieu biologique est donc compromise.

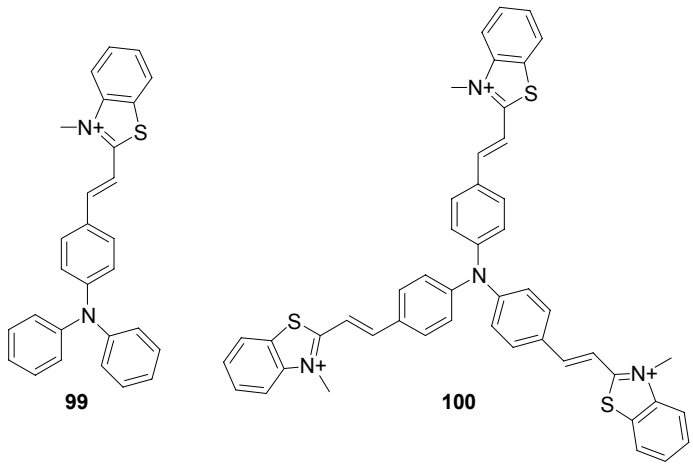


Figure II-*2*-26 : composés vinylbenzothiazole obtenus.

Les stratégies de synthèse mises en œuvre nous ont donc permis, à partir des intermédiaires halogénés et aldéhydes obtenus précédemment, de tester plusieurs groupements électroattracteurs, choisis au départ pour leur petite taille. Parmi tous les groupements électroattracteurs testés, six ont un effet bathochrome suffisamment important ($\lambda_{abs} \geq 400$ nm) pour permettre les mesures de fluorescence excitée à 2 photons autour de 800 nm (figure II-*2*-27). Nous nous sommes ensuite intéressés aux réactions permettant de fonctionnaliser les composés dérivatisables synthétisés, afin de leur greffer un « bras » terminé par une fonction chimique permettant le couplage à des biomolécules.

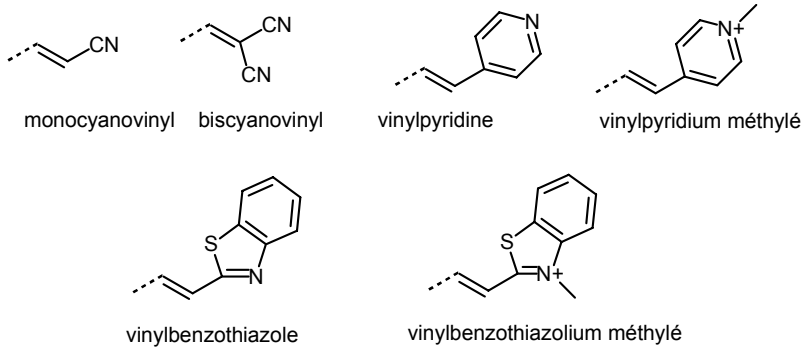


Figure II-*2*-27 : groupements électroattracteurs testés par la suite en fluorescence excitée à deux photons.

IV. Obtention d'un linker fonctionnel pour le couplage à des biomolécules.

A. Réaction de couplage peptidique.

La réaction entre un ester activé, le plus souvent sous forme NHS, et une amine primaire est la réaction la plus utilisée pour le greffage de petites molécules synthétiques sur des biomolécules. Nous nous sommes donc principalement intéressés à l'introduction de bras espaceur terminés par des fonctions acide carboxylique.

Nous avons tout d'abord testé l'introduction d'un bras espaceur de ce type avec des biomolécules sur la triphénylamine trischlorée **50** (figure II-*2*-28). Il s'agissait de vérifier que l'encombrement stérique relativement important autour de la fonction acide carboxylique ne diminuait pas sa réactivité de manière importante. Dans un premier temps, nous avons effectué un essai en utilisant l'ester méthylique de l'acide aminocaproïque **101** (obtenu de façon quantitative à partir de l'acide par estérification en présence de $SOCl_2$ dans le méthanol) en utilisant des conditions classiques de couplage peptidique (EDCI, HOAt, dans le DMF). Le produit de couplage **102** est obtenu avec un rendement de 34 %, ce rendement faible étant dû à des choix peu judicieux pour la purification du produit. Nous n'avons pas optimisé la synthèse de ce dérivé car nous avons préféré nous concentrer sur la synthèse d'un dérivé hydrosoluble.

Celui-ci (**103**, représenté figure II-*2*-28) est obtenu avec un rendement de 97 % en greffant la 2,2'-(ethylènedioxy) diéthylamine monoprotégée par un groupement Boc **104** sur la triphénylamine trischlorée **50**. L'introduction de cette chaîne PEG terminée par une amine primaire (chargée positivement à pH physiologique) rend la molécule soluble en milieu aqueux : nous avons pu obtenir une solution aqueuse de concentration 17 mM du composé **103**.

Par ailleurs, nous avons obtenu l'ester activé sous forme NHS de la triphénylamine **50** (composé **105**) par couplage avec la N-hydroxysuccinimide en présence d'EDCI dans le DMF ; la réaction est quantitative. Cette stratégie pourra permettre de coupler directement les triphénylamines à des molécules possédant une fonction amine primaire, sans ajouter de bras de liaison.

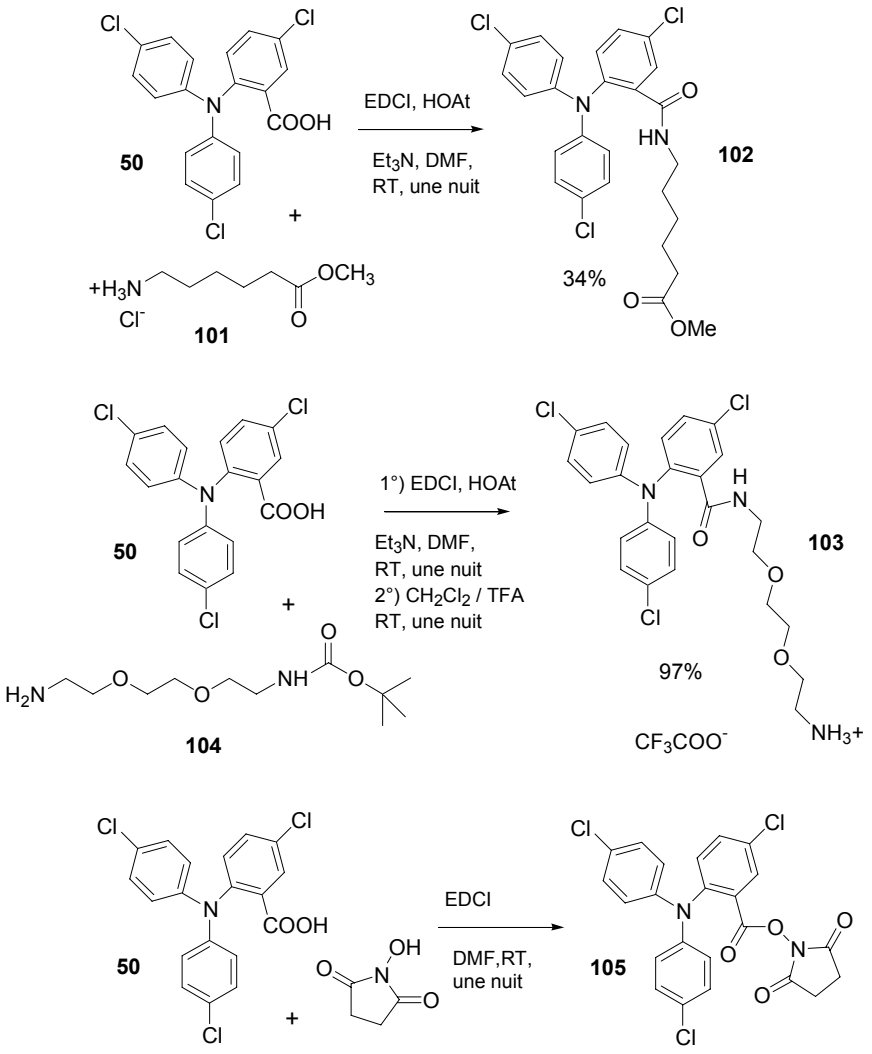


Figure II-*2*-28 : synthèse des composés dérivatisables **102**, **103** et **105**.

Afin d'appliquer la réaction de couplage à des composés ayant les propriétés optiques recherchées, nous avons saponifié le composé **79** puis couplé le carboxylate (**106**) ainsi obtenu avec l'amine PEG monoprotégée **104** pour obtenir le composé **107** (figure II-*2*-29).

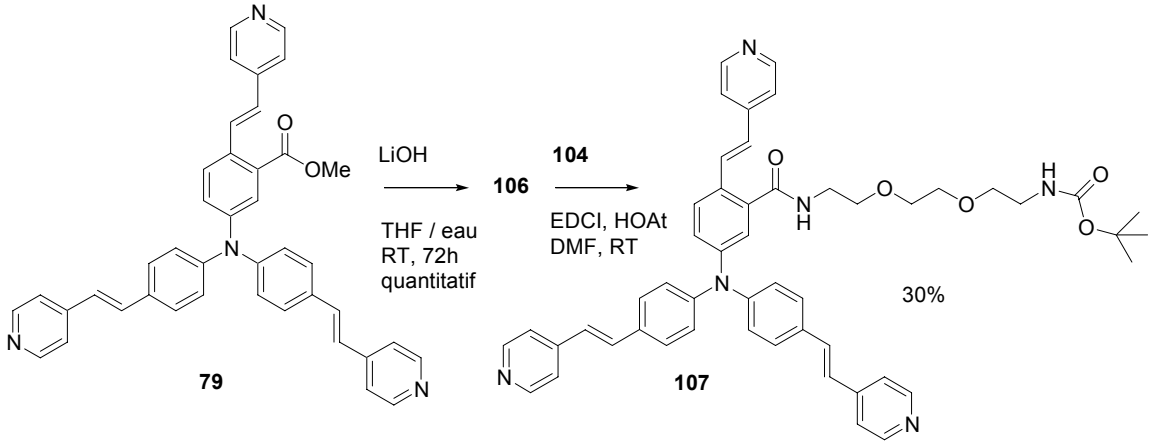


Figure II-*2*-29 : synthèse du composé à chaîne PEG **107**.

Nous avons donc pu montrer, d'abord sur des composés modèles puis sur des composés ayant les longueurs d'onde d'absorption souhaitées, que les triphénylamines portant une fonction acide carboxylique pouvaient être fonctionnalisées par un bras espaceur. Nous avons aussi montré que l'introduction d'une chaîne PEG relativement courte sur ces triphénylamines apportait une bonne solubilité en milieu aqueux, largement suffisante pour étudier les propriétés de fluorescence de ces molécules dans l'eau.

B. A partir de l'intermédiaire méthoxy.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés au composé **94** portant trois groupements benzothiazoles et un groupe méthoxy. Les tentatives pour cliver ce groupe méthoxy par réaction avec BBr_3 ont conduit à la formation d'un complexe de bore, formé entre l'oxygène du phénol et l'azote du groupement benzothiazole adjacent. Tous les essais pour introduire un bras espaceur sur ce produit de déprotection (substitution nucléophile par le 1,3-dibromopropane, réaction de Mitsunobu, formation d'un triflate) ont échoué.

La deuxième stratégie a consisté en la déprotection du trialdéhyde méthoxy **72** avant couplage à des groupements électroattracteurs. La déprotection avec le BBr_3 donne le composé tétrabromé **108**, les deux aldéhydes portés par les cycles sans méthoxy réagissant avec le borane. Ce composé est alors converti en phénol **109** mais malheureusement seulement à petite échelle (100% sur 30mg, 20% sur 300mg). Au contraire, l'utilisation de $AlCl_3$ conduit à une réaction propre avec de bons rendements (87 %) (figure II-*2*-30).[186] La réaction de Williamson avec le bromobutanoate d'éthyle conduit ensuite au bras ester **110** avec un rendement satisfaisant (75 %) (figure II-*2*-31).

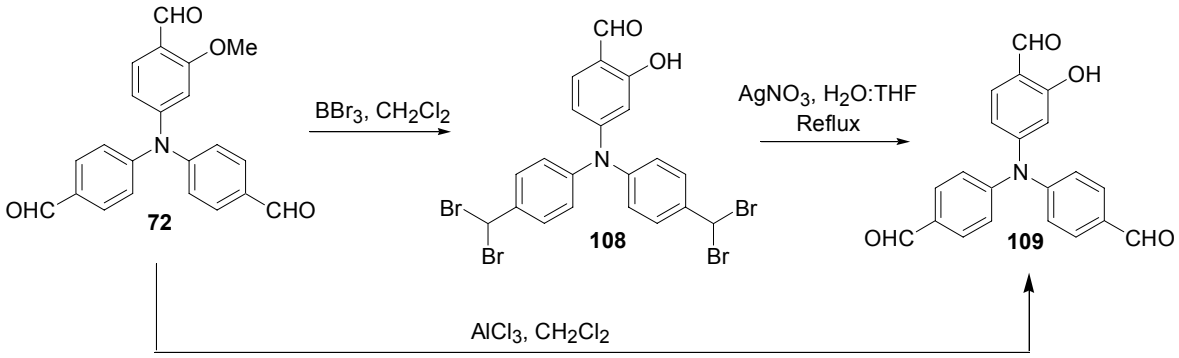


Figure II-*2*-30 : obtention du trialdéhyde phénol **109**.

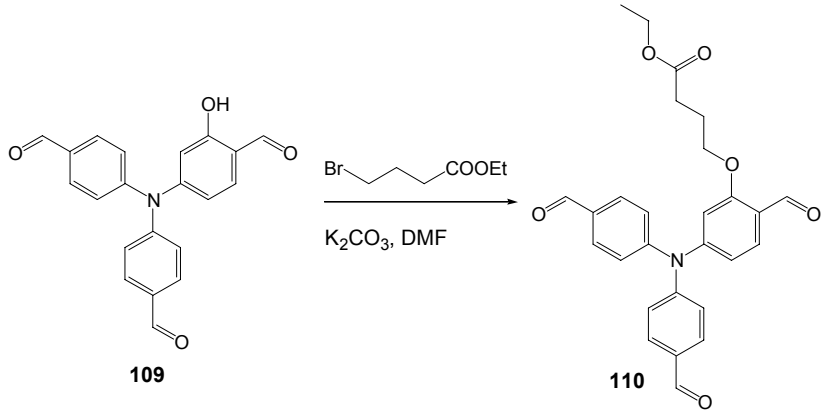


Figure II-*2*-31 : Synthèse du trialdéhyde avec un bras ester **110**.

Le dérivé benzothiazole **111** est ensuite obtenu avec un bon rendement (74%) par réaction de HWE avec le phosphonate correspondant. Le composé **111** est alors saponifié en présence d'une solution aqueuse de lithine saturée. L'acide **112** ainsi obtenu est ensuite couplé à l'amine PEG monoprotégée **104** en présence de EDCI et de HOAt pour donner le composé **113** (figure II-*2*-32).[186]

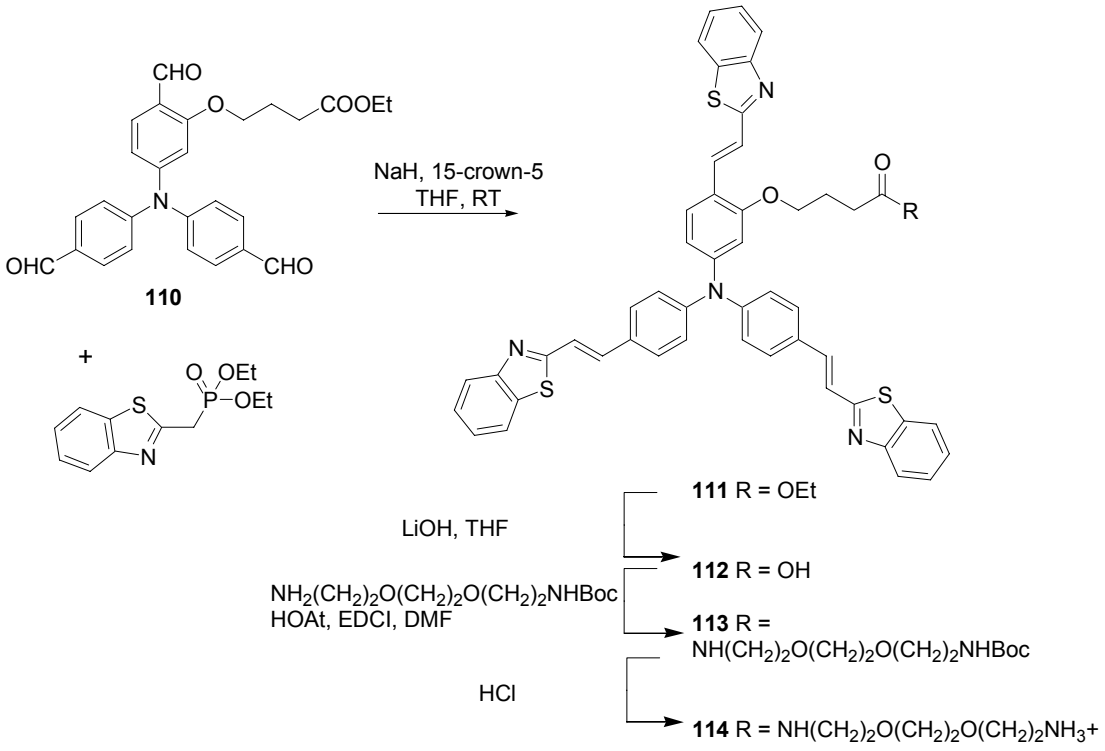


Figure II-*2*-32 : Synthèse du dérivé benzothiazole portant un bras PEG-amine hydrosoluble **114**.

Les triphénylamines portant une fonction méthoxy ont donc pu, elles-aussi, être fonctionnalisées par un bras espaceur portant une fonction acide carboxylique, qui permet le couplage à des biomolécules. Un composé portant une chaîne PEG hydrosoluble a aussi été

obtenu, ce qui permettra l'étude des propriétés de fluorescence des triphénylamines fonctionnalisées par des groupements benzothiazole en milieu aqueux.

V. Conclusions et perspectives.

Ce travail de synthèse a permis l'obtention de triphénylamines fonctionnalisées sur les trois positions en *para* de l'azote par des halogènes (Br, I) ou par des fonctions aldéhydes et portant une fonction dérivatisable en *ortho* ou *meta* de l'azote sur un des cycles. Ces intermédiaires ont ensuite été fonctionnalisés par différents groupements électroattracteurs, choisis dans un premier temps pour leurs petites tailles. Parmi les divers groupements électroattracteurs testés, nous en avons obtenu six possédant un maximum d'absorption UV – Visible supérieur ou égal à 400 nm, donc *a priori* adaptés pour une excitation biphotonique autour de 800 nm. Les divers composés synthétisés permettront d'étudier l'influence du nombre de groupements électroattracteurs, de la présence d'un bras dérivatisable pour le couplage aux biomolécules, et de la nature (électrodonneur ou électroattracteur) de la fonction reliant ce bras à la triphénylamine. Nous avons ensuite mis au point des réactions permettant, à partir de la fonction chimique présente en *ortho* ou *meta* de l'azote sur un des cycles aromatiques, d'introduire un bras espaceur terminé par une fonction acide carboxylique permettant le couplage aux biomolécules. L'utilisation d'une courte chaîne PEG comme bras espaceur a permis d'obtenir des composés hydrosolubles, malgré le caractère aromatique des composés. Nous allons maintenant présenter les propriétés physico-chimiques (stabilité et solubilité en milieu aqueux) et optiques des composés obtenus.

Chapitre II-3 : Etude des composés obtenus.

I. Stabilité et solubilité en milieu aqueux.

A. Stabilité.

La première condition pour qu'une molécule puisse être utilisée pour des études en milieu biologique est qu'elle soit stable en milieu aqueux. La plupart des molécules obtenues dans le cadre de ce travail possèdent une bonne stabilité dans l'eau : les solutions aqueuses diluées sont stables plusieurs heures à température ambiante et peuvent être stockées à –18°C sans dégradation.

Nous avons observé deux exceptions. D'une part, la triphénylamine substituée par trois groupements méthylbenzothiazolium **101** subit une déméthylation en quelques secondes en présence d'eau, qui se traduit par un passage de la solution du violet au jaune. D'autre part, les triphénylamines substituées par des groupements biscyanovinyl (composés **82** à **86**) sont hydrolysées en quelques heures en présence d'eau, pour redonner les aldéhydes correspondants. Dans le cas du composé trisubstitué **84** nous avons suivi cette hydrolyse par spectroscopie d'absorption UV-visible (figure II-*3*-1). Les spectres UV - Visible enregistrés à intervalles de temps réguliers montrent que le composé est parfaitement stable dans le chloroforme (figure II-*3*-1A), alors que dans un mélange tampon cacodylate de sodium pH 6 85% / éthanol 15% on peut suivre la disparition de la bande caractéristique de la fonction biscyanovinyl (454 nm) et la formation d'une bande correspondant à l'aldéhyde (370 nm, figure II-*3*-1B). Une recherche bibliographique nous a montré par la suite que cette instabilité avait déjà été observée sur différents benzylidènemalononitrile : l'hydrolyse y est facilitée car l'anion du malononitrile $(CH)^-(CN)_2$ est un bon nucléofuge.[216]

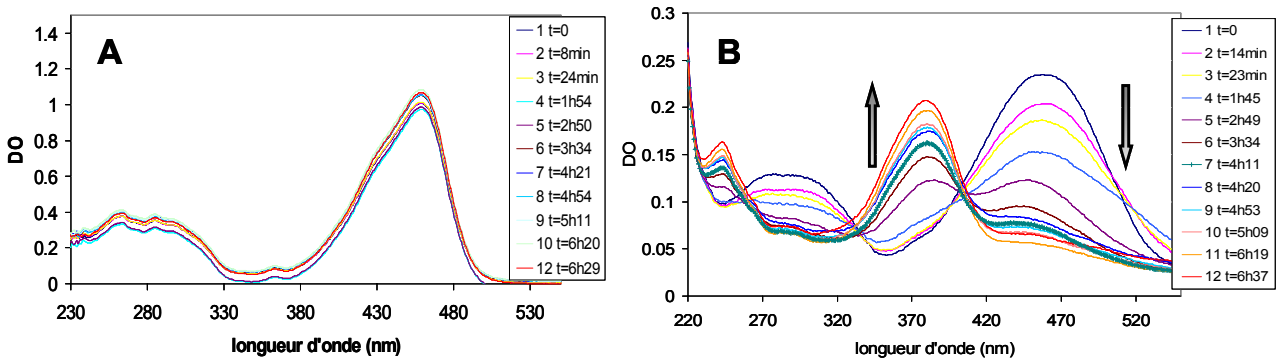


Figure II-*3*-1 : spectres d'absorption UV – Visible du composé **84** enregistrés à différents intervalles de temps, à 37°C **A.** dans le chloroforme **B.** dans un mélange tampon cacodylate de sodium pH 6 10 mM 85 % EtOH 15%.

B. Solubilité.

Les triphénylamines neutres ne portant pas de bras espaceur de type PEG sont peu solubles dans l'eau. Néanmoins, il est possible de préparer des solutions aqueuses aux concentrations adaptées aux mesures d'absorption UV-visible (environ 10 µM) et de fluorescence (de l'ordre de 1 µM) par dilution de solutions stock dans le DMSO (1 à 2 mM). Les triphénylamines substituées par des groupements benzothiazoles (composés **92** à **95**) sont difficiles à solubiliser selon ce protocole : entre 1 et 5 µM la loi de Beer - Lambert n'est pas respectée, probablement à cause de la formation d'agrégats.

La présence de charges augmente de façon notable la solubilité : ainsi, contrairement à ses analogues non chargés, la triphénylamine **112** substituée par trois groupements benzothiazoles et portant un bras terminé par une fonction acide carboxylique (sous forme carboxylate à pH physiologique) est soluble dans l'eau à une concentration de 15 µM (la loi de Beer – Lambert est respectée entre 2 et 15 µM). De façon plus marquante, il est possible de réaliser directement des solutions 1 mM des triphénylamines vinylpyridinium **98** et **95** portant respectivement deux et trois charges positives. Dans ce cas, il est donc possible de réaliser des solutions stock concentrées ne contenant pas de DMSO, ce qui est un avantage certain (la toxicité est moindre) pour les études en milieu cellulaire. La présence de charges permet donc d'obtenir des composés présentant des solubilités suffisantes pour les mesures de spectroscopie.

De même, la présence d'un bras espaceur de type polyéthylène glycol, même court (deux unités -$(CH_2)_2O$-), permet d'obtenir une très bonne solubilité dans l'eau : une solution aqueuse à 17 mM en composé trischloré **104** a ainsi pu être obtenue. Il semble donc raisonnable de penser que la fonctionnalisation par une chaîne PEG pourra permettre d'obtenir des molécules suffisamment hydrosolubles pour le marquage d'ADN.

Par ailleurs, tous les composés synthétisés lors de ce travail possèdent une bonne solubilité dans les solvants organiques chlorés (de l'ordre de la dizaine de mg/mL). Nous avons donc systématiquement étudié leurs propriétés dans le dichlorométhane, afin de pouvoir comparer toutes les molécules entre elles.

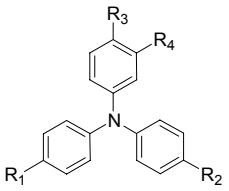
II. Propriétés optiques linéaires.

A. Dérivés neutres.

1. Propriétés d'absorption UV – Visible et d'émission de fluorescence dans le dichlorométhane.

Tous les composés étudiés ici absorbent fortement la lumière ($\varepsilon \geq 40000$ L.mol^{-1}.cm^{-1}), avec des maxima d'absorption compris entre 380 et 480 nm. Les propriétés optiques des composés synthétisés lors de ce travail (maximum d'absorption λ_{max}, maximum d'émission de fluorescence $\lambda_{ém}$, coefficient d'extinction molaire ε, rendement quantique de fluorescence ϕ_F) sont récapitulées dans les tableaux II-*3*-1 et II-*3*-2. Les spectres d'émission de fluorescence correspondants sont présentés en annexe B. De façon générale, les composés étudiés présentent les caractéristiques suivantes :

- L'absorption à un photon ε augmente avec le nombre de groupements électroattracteurs.
- Les composés obtenus ont tous de bons, voire de très bons, rendements quantiques de fluorescence dans le dichlorométhane ($0{,}13 < \phi_F < 0{,}6$). Ils présentent tous des déplacements de Stokes importants (entre 50 et 150 nm) et des spectres d'émission de fluorescence larges et peu structurés.
- Dans toutes les séries, le composé avec deux groupements électroattracteurs a un rendement quantique de fluorescence plus élevé que les autres.
- La présence d'un bras dérivatisable n'influence pas l'absorption UV - Visible : la différence de comportement éventuelle est inférieure à l'erreur expérimentale. Le bras dérivatisable ne semble pas avoir une influence considérable sur la fluorescence même si une baisse du rendement quantique est constatée lorsque nous comparons une molécule avec bras espaceur à une molécule symétrique, par exemple les composés **112** et **93,** ou les composés **76** et **79**.



Composé	R_1	R_2	R_3	R_4	ε	λ_{abs}	$\lambda_{ém}$	QY
88	CN	CN	H	H	42600	404	485	0.60
89	CN	CN	CN	H	57000	419	479	*0.56*
90	CN	CN	CO_2CH_3	H	43500	378	471	*0.55*
82	CN, NC	H	H	H	39400	446	609 ($CHCl_3$)	
83	CN, NC	CN, NC	H	H	49000	476	535 ($CHCl_3$)	0.34
84	CN, NC	CN, NC	CN, NC	H	82600	461	509 ($CHCl_3$)	0.22
85	CN, NC	CN, NC	CO_2CH_3	H	42300	467	515 ($CHCl_3$)	0.20
86	CN, NC	CN, NC	CN, NC	OMe	40300	464	539	*0.14*

Tableau II-*3*-1 : Propriétés d'absorption UV – Visible et de fluorescence des triphénylamines substituées par des groupements cyanovinyl et biscyanovinyl. Les rendements quantiques de fluorescence sont mesurés en prenant comme référence la quinine bisulfate en solution dans H_2SO_4 1N, et en faisant une moyenne sur 6 mesures (deux dilutions, trois longueurs d'onde d'excitation proches du maximum d'absorption de la molécule). L'erreur de mesure peut-être estimée à +/- 10%. Les valeurs de rendements quantiques en italique ont été déterminées sur une seule mesure, l'erreur expérimentale est donc plus grande.

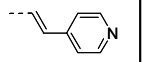
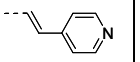
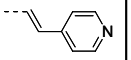
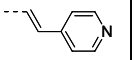
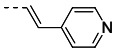
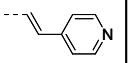
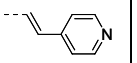
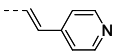
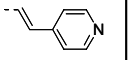
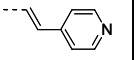
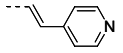
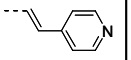
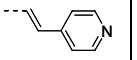
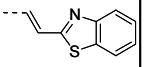
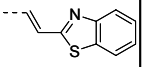
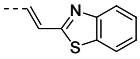
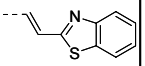
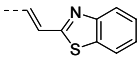
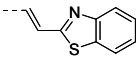
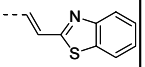
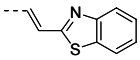
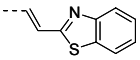
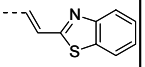
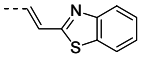
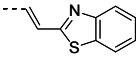
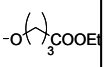
Composé	R_1	R_2	R_3	R_4	ε	λ_{abs}	$\lambda_{ém}$	QY
81				---H	47200	385	488	*0.81*
76				---H	63900	406	519	0.53
79					66100	402	550	0.37
80				--OH	71000	408	521	0.36
78			---H	---H	50350	402	497	0.64
91		---H	---H	---H	19700	403	531	0.24
92			---H	---H	59400	431	530	0.59
93				---H	89200	433	538	0.54
94				--OMe	94700	432	542	0.45
112					90000	428	540	0.38

Tableau II-*3*-2 : Propriétés d'absorption UV – Visible et de fluorescence des triphénylamines substituées par des groupements vinylpyridine et vinylbenzothiazole.

2. Photostabilité.

La photostabilité est un critère important pour toute application qui vise le traçage optique. Il est en effet souhaitable de pouvoir observer les biomolécules marquées pendant le temps le plus long possible, alors que l'excitation lunineuse, notamment en microscopie confocale, tend à provoquer des photodommages. Nous avons testé la photostabilité du composé **112**, un composé dérivatisable présentant des propriétés optiques attrayantes. Pour cela, nous avons irradié ce composé à son maximum d'absorption, dans le fluorimètre (équipé d'une lampe Xe-Hg 150 W), en ouvrant largement les fentes d'excitation : 10 nm et nous avons mesuré l'intensité de fluorescence émise à intervalles réguliers. La photostabilité de ce composé en milieu organique semble correcte (figure II-*3*-2) : après 30 min d'irradiation, l'intensité de fluorescence a diminué d'environ 5 %. Dans les mêmes conditions d'irradiation mais en milieu aqueux et en présence d'ADN, l'intensité de fluorescence du **TO-PRO-3**, un

marqueur d'ADN connu pour poser des problèmes de photoblanchiment en microscopie confocale, chute de 30%.

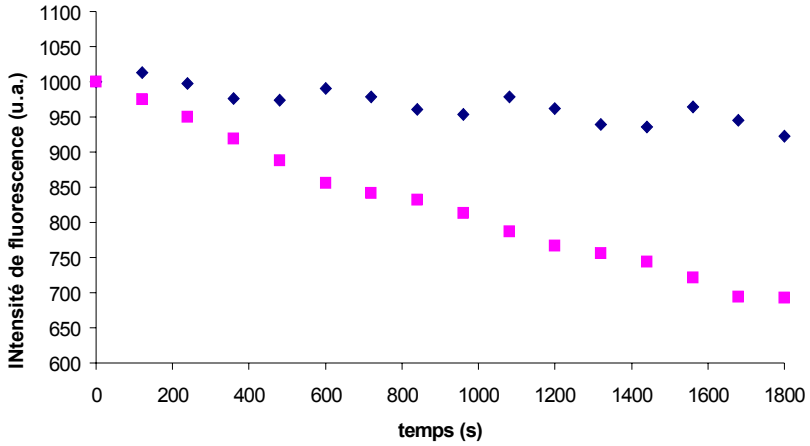


Figure II-*3*-2 : stabilité du composé **112** (en solution 1 µM dans le dichlorométhane, losanges bleus) comparée à celle du **TO-PRO-3** (en solution 1 µM dans un tampon cacodylate de sodium pH 7.3 10mM, KCl 100 mM et en présence de 5 éq. en paires de bases d'ADN de testicules de hareng, carrés roses). Les composés sont irradiés à leur maximum d'absorption, la fluorescence est enregistrée au maximum d'émission.

Il faudra bien sûr étendre l'étude à d'autres composés. Néanmoins il ne semble pas y avoir de problème de photostabilité intrinsèque à la famille de composés étudiés.

3. Influence du solvant sur les propriétés de fluorescence.

Le spectre d'absorption UV – Visible des composés étudiés lors de ce travail dépend peu du solvant utilisé. En revanche, leur fluorescence est fortement influencée par l'environnement : plus le solvant est polaire, plus ces composés ont un maximum d'émission de fluorescence décalée vers le rouge et une intensité de fluorescence faible.

Le décalage vers le rouge (solvatochromisme) est caractéristique des composés présentant un transfert de charge lors de l'excitation. En effet, pour ces composés, le moment dipolaire de l'état excité μ_e est supérieur au moment dipolaire de l'état fondamental μ_g. Ce changement de moment dipolaire suit de façon quasi-instantanée l'absorption du photon par la molécule ($\approx 10^{-15}$ s). D'après le principe de Franck-Condon, il se produit ensuite, sur des échelles de temps plus longues (10^{-12} à 10^{-10} s), une relaxation par vibration pour arriver dans l'état vibrationnel à partir duquel le photon de fluorescence est émis. De plus, la réorganisation des molécules de solvant autour de la molécule excitée entraîne une stabilisation de l'état excité (figure II-*3*-3) : plus le solvant est polaire, plus cette stabilisation est grande et plus l'émission de fluorescence est décalée vers le rouge.

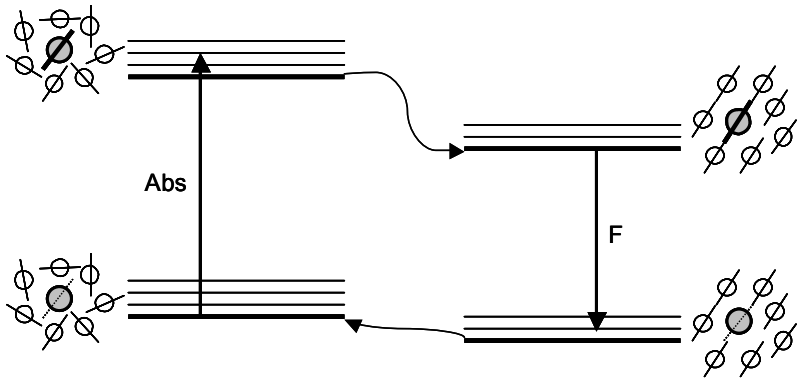


Figure II-*3*-3 : influence de la polarité du solvant sur l'émission de fluorescence. Schéma adapté de Valeur[1].

Si l'extinction de la fluorescence en solvant polaire est une caractéristique partagée par tous nos composés, l'amplitude de cet effet varie selon les séries. A titre d'exemple, la figure II-*3*-4 montre les spectres d'émission de fluorescence des composés **76** (triphénylamine trisvinylpyridine), **93** (trisvinylbenzothiazole) : l'extinction de fluorescence quand on passe du dichlorométhane au méthanol est moins prononcée en série vinylbenzothiazole qu'en série vinylpyridine.

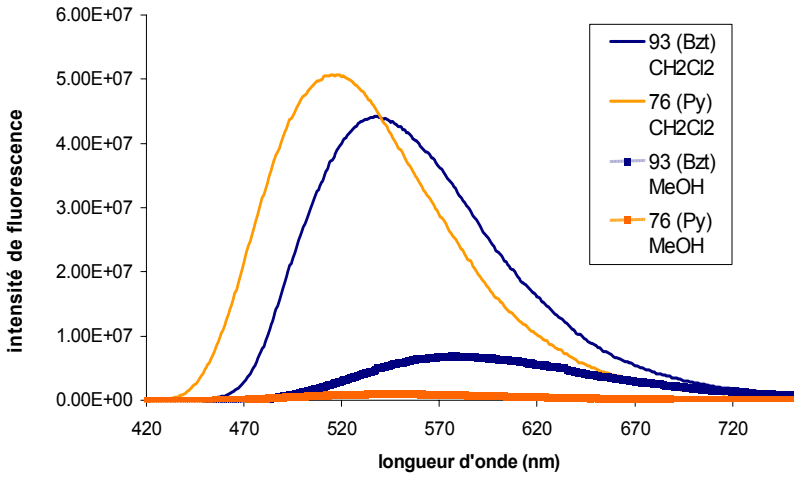


Figure II-*3*-4 : spectres d'émission de fluorescence des composés **76** (série vinylpyridine), **93** (série vinylbenzothiazole), à une concentration 1 µM dans le dichlorométhane (traits fins) et dans le méthanol (traits épais). La longueur d'onde d'excitation est prise au maximum d'absorption pour chaque composé.

A l'intérieur d'une série, l'extinction de fluorescence en solvant polaire semble moins prononcée pour les composés trisubstitués que pour les disubstitués. La figure II-*3*-5A illustre cet effet en série vinylbenzothiazole et la figure II-*3*-5B en série biscyanovinyl.

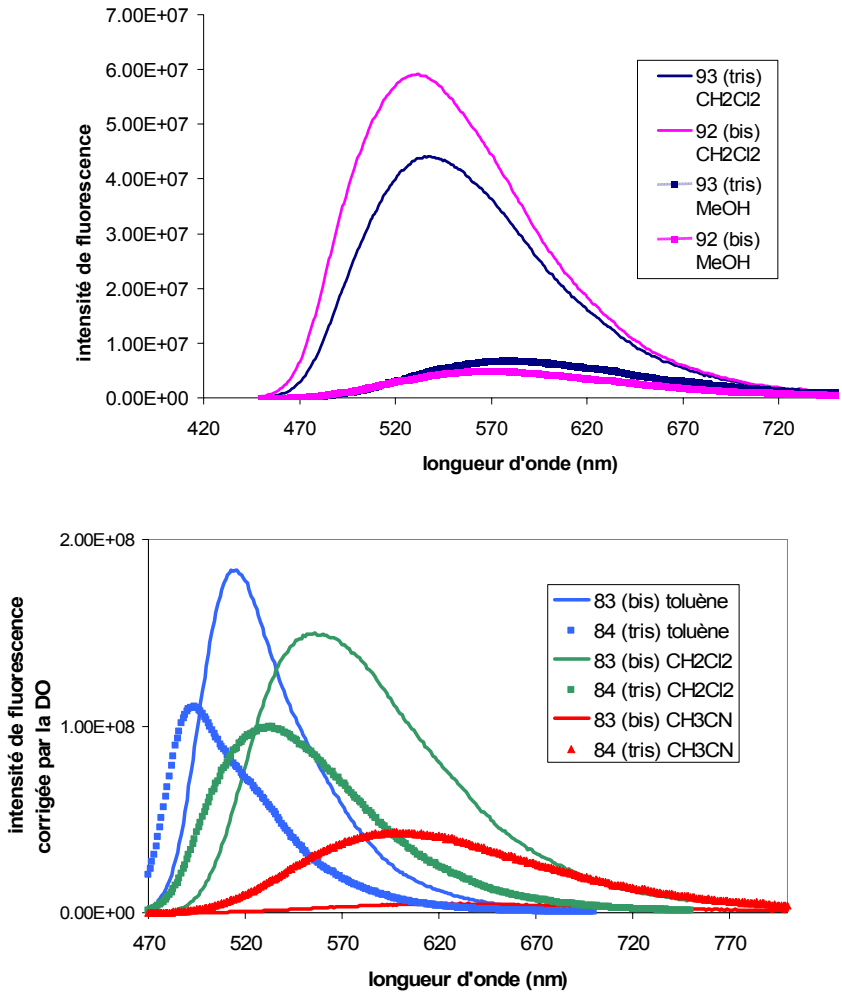


Figure II-*3*-5 **A.** spectres d'émission de fluorescence des composés **92** (bis vinylbenzothiazole) et **93** (tris vinylbenzothiazole), à une concentration 1 µM dans le dichlorométhane (traits fins) et dans le méthanol (traits épais). **B.** spectres d'émission de fluorescence (intensité de fluorescence corrigée par la DO à la longueur d'onde d'excitation) des composés **83** (bis biscyanovinyl, traits fins) et **84** (tris biscyanovinyl, traits épais) dans le toluène (en bleu), le dichlorométhane (en vert) et l'acétonitrile (en rouge). Dans tous les cas, la longueur d'excitation est prise au maximum d'absorption pour chaque composé.

Ce phénomène d'extinction de la fluorescence en solvant polaire a été décrit dans la littérature sur des triphénylamines substituées par des groupements électroattracteurs.[165] Toutefois aucune explication précise à ce phénomène n'est apportée. Il se produit probablement des interactions entre le solvant et le composé dans son état excité qui entraînent des désexcitations non radiatives d'autant plus importantes que le solvant est polaire, toutefois il est difficile de donner une explication plus détaillée. L'amplitude de cet effet reste donc difficile à prévoir, ce qui constitue un inconvénient majeur pour la conception de sondes fluorescentes en milieu aqueux. Néanmoins, la sensibilité de ces composés à la polarité de l'environnement fait qu'ils pourraient trouver une application en tant que sondes

de polarité : ainsi, ces composés pourraient potentiellement être utilisés pour marquer des poches hydrophobes de protéines.

Par ailleurs, l'obtention de sondes de viscosité n'étant pas une application envisagée à ce travail et faute de temps, la sensibilité de ces composés neutres à la viscosité du solvant n'a pas été testée.

B. Dérivés cationiques.

Les composés portant des groupements électroattracteurs chargés (**95** à **99**) n'ont pas été étudiés en solvants organiques peu polaires du fait de leur faible solubilité dans ces milieux. Ils ne sont pas fluorescents en solution dans le méthanol ou dans l'eau. De façon intéressante, ils se révèlent très sensibles à la viscosité du solvant : le passage du méthanol au glycérol entraîne une forte exaltation de fluorescence, d'environ un facteur 100 (figure II-*3*-6). Ceci indique qu'en solvant non visqueux, une partie des désexcitations non radiatives de la molécule est due à des rotations internes. Quand la viscosité du solvant augmente, ces rotations sont empêchées et la fluorescence est restaurée.

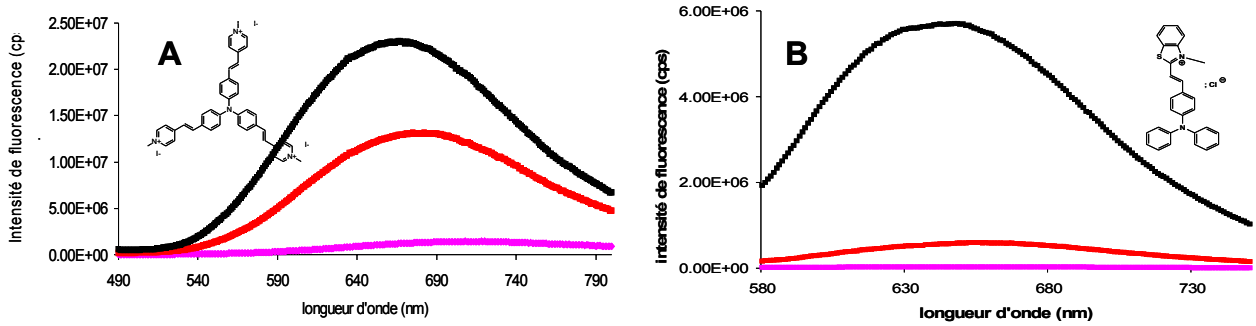
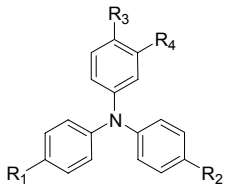


Figure II-*3*-6 : **A.** Emission de fluorescence du composé **95** à une concentration de 1 µM, dans le méthanol (en rose), dans un mélange glycérol / méthanol 80 / 20 (en rouge) et dans le glycérol pur (en noir). **B**. Emission de +fluorescence du composé **99** à une concentration de 5 µM, dans le méthanol (en rose), dans un mélange glycérol / méthanol 2 / 1 (en rouge) et dans le glycérol pur (en noir).

Ces composés présentent des maxima d'absorption entre 450 et 490 nm pour les composés de la série vinylpyridinium et à 554 nm pour le composé portant un groupement vinylbenzothiazolium (tableau II-*3*-3). Ils présentent des déplacements de Stokes très importants, de 100 à 150 nm suivant les composés et les conditions. Ils ont donc une émission de fluorescence dans le rouge (entre 640 et 680 nm suivant les cas, tableau II-*3*-3), avec des rendements quantiques de fluorescence d'environ 0,1 dans le glycérol pour la série vinylpyridinium.



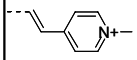
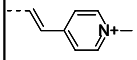
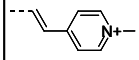
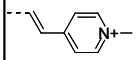
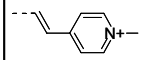
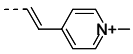
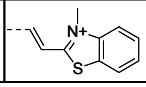
composé	R_1	R_2	R_3	R_4	ε	λ_{abs}	$\lambda_{ém}$	QY
97		—H	—H	—H	28500 (gly) 23000 (Caco)	475 (gly) 452 (Caco)	636 (gly)	0.090 (gly)
98			—H	—H	37400 (gly) 39900 (Caco) 31400 (ADN)	491 (gly) 474 (Caco) 509 (ADN)	656 (gly) 665 (ADN)	0.11 (gly) 0.035 (ADN)
95				—H	66000 (gly) 59000 (Caco) 51000 (ADN)	491 (gly) 474 (Caco) 499 (ADN)	665 (gly) 684 (ADN)	0.12 (gly) 0.021 (ADN)
99		—H	—H	—H	25100 (CH_2Cl_2)	554 (CH_2Cl_2)	640 (gly)	

Tableau II-*3*-3 : Propriétés d'absorption UV – Visible et de fluorescence des triphénylamines substituées par des groupements vinylpyridinium et vinylbenzothiazolium.

Par ailleurs, les composés substitués par des groupements vinylpyridinium présentent une très bonne photostabilité. Celle-ci a été testée d'une part en mesurant l'absorbance des solutions au cours du temps et en comparant à deux marqueurs d'ADN utilisés en microscopie, le **DAPI** et le **TO-PRO3** (excitation par une lampe tungstène-halogène, au maximum d'absorption de chaque composé, figure II-*3*-7) et, d'autre part, pour le composé **95**, en mesurant l'émission de fluorescence au cours du temps et en la comparant à celle du **TO-PRO3** (excitation par une lampe Xe-Hg 150 W, au maximum d'absorption de chaque composé, figure II-*3*-8).

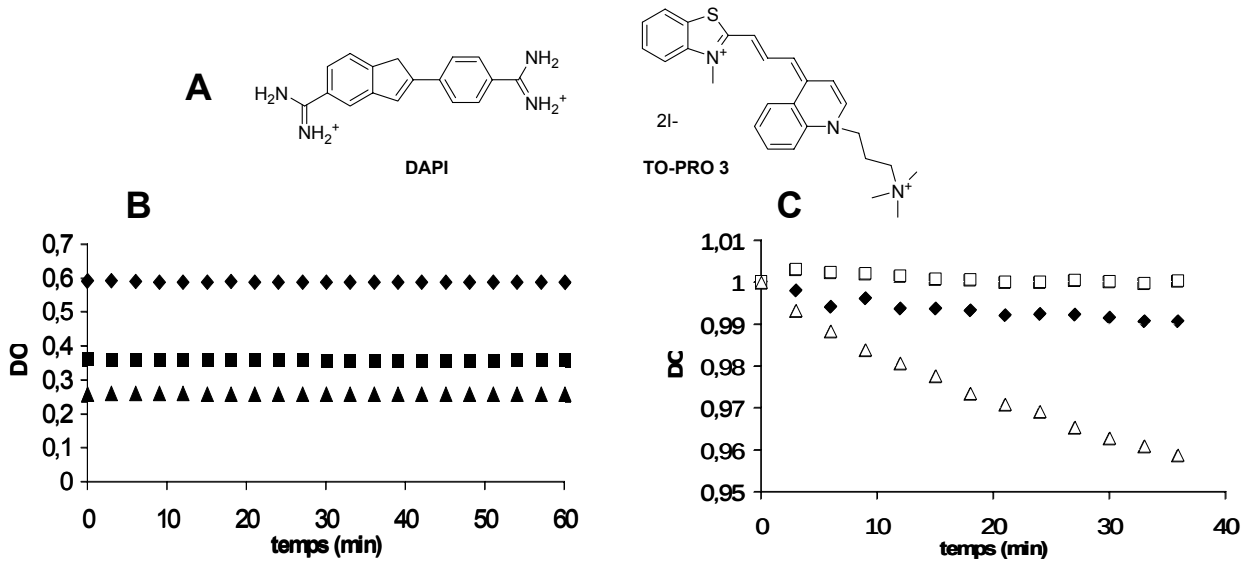


Figure II-*3*-7 : **A.** structure chimique du **DAPI** et du **TO-PRO3**. **B.** Photostabilité des composés substitués par des groupements vinylpyridinium (**97** triangles noirs, **98** carrés noirs et **95** losanges noirs). **C.** Comparaison du composé **95** avec la photostabilité du **DAPI** (carrés blancs) et du **TO-PRO3** (triangles blancs). La photostabilité est testée ici en mesurant l'absorbance des composés au cours du temps.

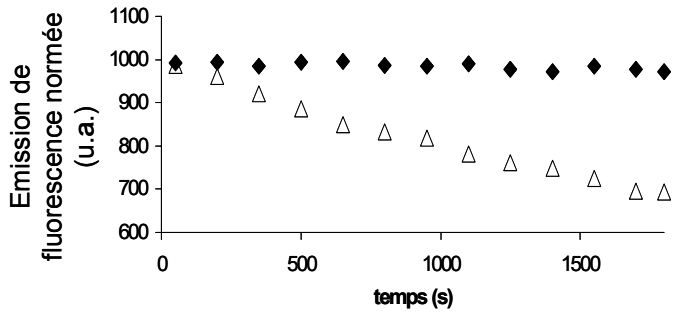


Figure II-*3*-8 : photostabilité, testée en mesurant l'émission de fluorescence au cours du temps, du composé **95** (losanges noirs) à une concentration de 3 µM et en présence de 20 éq. (paire de bases) d'ADN de Hareng et du **TO-PRO3** (triangles blancs) à une concentration de 1 µM et en présence de 5 éq. (paire de bases) d'ADN de Hareng. Pour les deux composés, les mesures sont effectuées en excitant le composé à son maximum d'absorption et en enregistrant l'intensité de fluorescence au maximum d'émission. La très bonne photostabilité du composé **95** indique donc aussi que ce composé ne créé pas de photodommages sur l'ADN.

Le caractère cationique de ces composés et le fait que le motif pyridinium se retrouve dans différents ligands d'ADN (dérivés du viologène, porphyrine **TMPyP4**, Dimethyl-pepep…) nous ont incité à tester la fluorescence de ces composés en présence d'ADN. Si l'ajout d'ADN n'induit aucun changement sur la fluorescence des composés **97** et **99**, les composés **95** et **98** présentent eux une exaltation de fluorescence en présence d'ADN (tableau II-*3*-3). Cette exaltation peut s'expliquer par comparaison avec les résultats obtenus dans le glycérol :

l'interaction avec l'ADN, contraignant et rigidifiant la molécule, fait augmenter sa fluorescence.

Les mesures d'absorption UV-Visible et de fluorescence effectuées montrent que les deux séries de composés obtenus (neutres et cationiques) possèdent des propriétés attrayantes : pour les dérivés neutres un bon rendement quantique de fluorescence en milieu organique et une sensibilité à la polarité du solvant et pour certains dérivés cationiques une exaltation de fluorescence en présence d'ADN. Nous allons maintenant présenter les mesures d'absorption à deux photons réalisées sur ces composés. Dans une dernière partie, nous présenterons les études d'interaction entre les dérivés vinylpyridinium et l'ADN, puis les résultats obtenus en microscopie.

III. Absorption à deux photons des composés obtenus.

A. Mesure de fluorescence excitée à deux photons : montage expérimental.

1° Principe de la mesure.

Les sections efficaces d'absorption à deux photons ont été obtenues en mesurant la fluorescence sous excitation biphotonique.[136] Le principe de la mesure est le suivant : l'émission de fluorescence d'une solution de concentration connue de la molécule testée est mesurée puis comparée à l'émission de fluorescence d'une solution de concentration connue d'une molécule de référence. La section efficace d'absorption à deux photons σ_{new} est alors donnée par l'équation (1)[136], où l'indice « new » correspond au composé étudié et l'indice « cal » correspond à la référence, η au rendement quantique de fluorescence (pris identique à celui sous excitation à un photon), ϕ à l'efficacité de collecte du dispositif de mesure, C à la concentration, <P(t)> à la moyenne temporelle de la puissance incidente (en photons.s^{-1}), <F(t)> à la moyenne temporelle de du flux de photons collectés par unité de temps et n à l'indice de réfraction du solvant utilisé pour la mesure :

$$\sigma_{2new}(\lambda)\eta_{2new} = \frac{\phi_{cal}\eta_{2cal}\sigma_{2cal}(\lambda)C_{cal}}{\phi_{new}C_{new}} \frac{\langle P_{cal}(t)\rangle^2}{\langle P_{new}(t)\rangle^2} \frac{\langle F(t)\rangle_{new}}{\langle F(t)\rangle_{cal}} \frac{n_{cal}}{n_{new}}. \quad (1)$$

2° Montage expérimental.

Le montage utilisé est analogue à celui décrit par Albota et Webb.[136] Il a été mis en place à l'occasion des mesures réalisées sur les composés présentés dans ce travail. Il a donc fallu mettre au point les conditions expérimentales à utiliser pour ces mesures. Le montage utilisé,

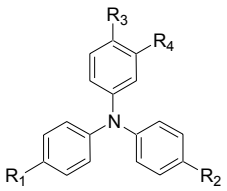
les problèmes rencontrés et les solutions apportées sont détaillés en annexe C. La référence choisie pour ces mesures est la fluorescéine, ce choix est expliqué en annexe C.

L'erreur expérimentale donnée dans la littérature pour ce type de mesures est +/-30 % et cet écart de +/-30% semble une estimation raisonnable dans notre cas. Il faut noter que la précision de ces mesures reste tout à fait suffisante pour comparer nos composés aux sondes fluorescentes existantes et pour établir des relations structure / propriétés.

B. Résultats obtenus.

1° Composés neutres.

Les valeurs maximales des sections efficaces d'absorption à deux photons de nos composés (mesurées dans le dichlorométhane) sont résumées dans le tableau II-*3*-4, et les spectres d'absorption à deux photons en fonction de la longueur d'onde sont présentés dans la figure II-*3*-9.



Composé	R_1	R_2	R_3	R_4	GM max
88	CN	CN	H	H	63
89	CN	CN	CN	H	*55*
90	CN	CN	CO_2CH_3	H	*76*
82	CN, NC	H	H	H	
83	CN, NC	CN, NC	H	H	205
84	CN, NC	CN, NC	CN, NC	H	204
85	CN, NC	CN, NC	CO_2CH_3	H	136
87	CN, NC	CN, NC	CN, NC	OMe	140

Tableau II-*3*-4 : **A.** Valeurs maximales des sections efficaces d'absorption à deux photons des composés substitués par des groupements cyanovinyl et biscyanovinyl. Les valeurs en italique correspondent à des composés pour lesquels l'erreur expérimentale sur la mesure de rendement quantique est grande (voir tableau II-*3*-1). De par la technique de mesure employée, cette erreur se répercute sur la valeur de la section efficace d'absorption à deux photons.

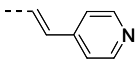
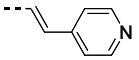
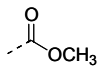
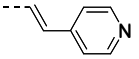
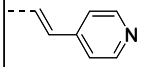
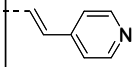
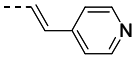
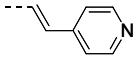
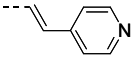
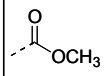
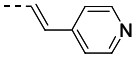
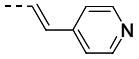
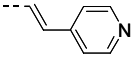
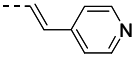
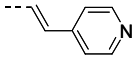
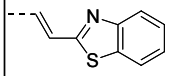
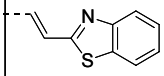
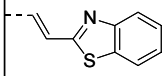
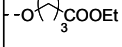
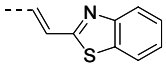
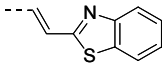
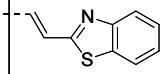
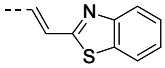
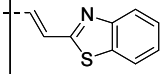
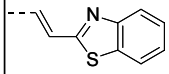
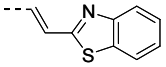
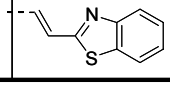
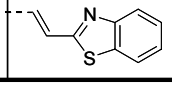
Composé	R_1	R_2	R_3	R_4	GM
81				---H	*34*
76				---H	90
79					97
80				--OH	73
78			---H	---H	102
112					365
91		---H	---H	---H	*16*
92			---H	---H	158
93				---H	345
94				--OMe	341

Tableau II-*3*-4 : **B.** Valeurs maximales des sections efficaces d'absorption à deux photons des composés substitués par des groupements vinylpyridine et vinylbenzothiazole. Les valeurs en italique correspondent à des composés pour lesquels l'erreur expérimentale sur la mesure de rendement quantique est grande. De par la technique de mesure employée, cette erreur se répercute sur la valeur de la section efficace d'absorption à deux photons.

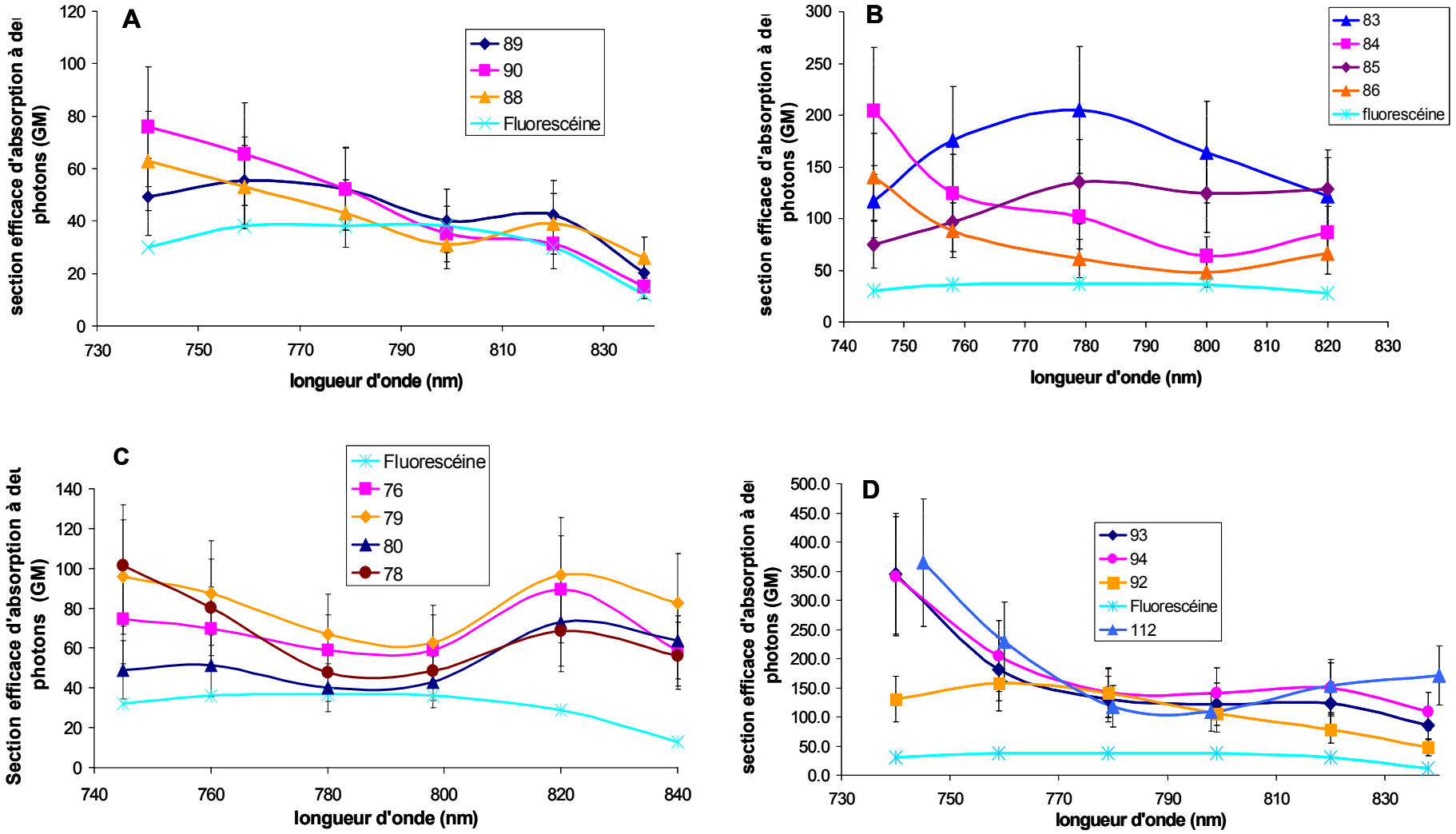


Figure II-*3*-9 : Sections efficaces d'absorption à deux photons en fonction de la longueur d'onde des composés substitués **A**. par des groupements cyanovinyl. **B**. par des groupements biscyanovinyl. **C**. par des groupements vinylpyridine. **D**. par des groupements vinylbenzothiazoles.

On peut souligner les caractéristiques suivantes :

- Parmi tous les composés étudiés, les composés portant des groupements vinylbenzothiazoles (neutres) possèdent une absorption à deux photons élevée : le maximum est de 360 GM, alors que la plupart des fluorophores organiques ont une absorption à deux photons comprise entre 1 et 10 GM. La fluorescéine et la rhodamine B sont deux exceptions avec respectivement des sections efficaces d'absorption maximales de 38 et 150 GM. Les composés substitués par des groupements biscyanovinyl présentent eux aussi une forte absorption, avec un maximum à 205 GM.
- La présence d'une fonction permettant d'introduire un bras espaceur n'influe pas de manière significative sur l'absorption à deux photons (figure II-*3*-9). Cette observation, très importante dans le sens où elle valide notre choix de synthétiser de tels composés, a été vérifiée quelle que soit la série, pour les composés bisubstitués comme pour les trisubstitués.
- Les composés portant un seul groupement électroattracteur présentent une absorption à deux photons beaucoup plus faible que les composés polyfonctionnels. Pour cette raison leurs sections efficaces d'absorption à deux photons n'ont pas toutes été systématiquement mesurées en fonction de la longueur d'onde. Là aussi, notre conception initiale est validée : il est nécessaire d'utiliser des composés polysubstitués pour avoir une absorption à deux photons efficace.
- Les composés à trois groupements électroattracteurs ont, suivant les séries, une absorption à deux photons supérieure ou analogue à celle des composés portant deux groupements électroattracteurs.
- L'absorption à deux photons des composés trisubstitués (à l'exception de la série des composés vinylpyridine) augmente quand la longueur d'onde d'excitation diminue de 800 à 740 nm, le maximum d'absorption n'étant pas atteint à 740 nm. Le maximum d'absorption est donc décalé vers le bleu par rapport au double du maximum d'absorption à un photon, ce qui est caractéristique d'une contribution d'états excités plus hauts en énergie à l'absorption à deux photons et ce qui correspond bien à ce qui est décrit dans la littérature.[149,158]

On peut noter qu'une étude sur les propriétés de fluorescence de triphénylamines substituées par des groupements vinylpyridine et acétylpyridine a été publiée pendant la rédaction de ce manuscrit.[217] Les auteurs décrivent pour le composé **76** une valeur de section efficace d'absorption à deux photons significativement plus élevée que celle que nous avons obtenue : 370 GM contre 90 GM. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de conditions

d'excitations laser différentes : impulsions laser de 30 fs avec une largeur spectrale de 47 nm alors que notre laser délivre des impulsions de 90 fs avec une largeur spectrale de 10 nm. Cette différence dans les conditions d'excitation peut avoir une influence significative sur la force de l'absorption à deux photons, et il est donc difficile de comparer les deux mesures.

2° Composés vinylpyridinium.

En ce qui concerne les composés trisubstitués **95** et bisubstitués **98**, nous avons mesuré les sections efficaces d'absorption à deux photons des composés dans le glycérol et dans un tampon cacodylate de sodium, en présence d'ADN de Hareng. Dans le glycérol, à forte intensité d'excitation (P_{laser} > 200mW) nous n'observons pas une relation de proportionnalité entre l'intensité de fluorescence et le carré de l'intensité d'excitation (figure II-*3*-10). Ceci peut s'expliquer par le fait que les composés ayant des rendements quantiques de fluorescence d'environ 0,1, ils réémettent la majeure partie de l'énergie qu'ils absorbent sous forme non radiative. Ils provoqueraient ainsi un échauffement très localisé du milieu, entraînant une diminution de la viscosité du glycérol et donc une diminution de la fluorescence des composés. En revanche, en présence d'ADN, la proportionnalité attendue entre intensité de fluorescence et carré de l'intensité d'excitation est bien observée (figure II-*3*-10).

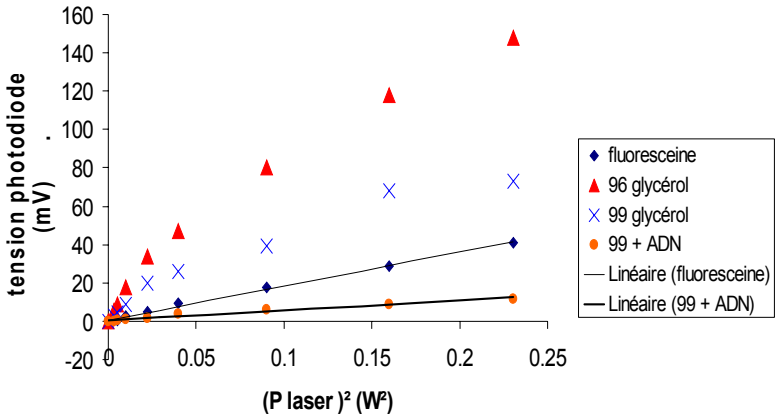


Figure II-*3*-10 : tension aux bornes de la photodiode utilisée comme détecteur (proportionnelle au nombre moyen de photons émis par unité de temps : voir annexe C) en fonction du carré de la puissance moyenne émise par le laser.

Nous avons mesuré la section efficace d'absorption à deux photons des composés **95** et **98** en fonction de la longueur d'onde, en présence d'ADN de Hareng. Pour ces deux composés qui émettent dans le rouge l'atténuation du signal due aux filtres utilisés pour couper le faisceau d'excitation (voir annexe C) est très importante : les filtres coupent environ 90% du

signal ! De plus, les rendements quantiques de fluorescence demeurent modestes (< 0,1). Les signaux de fluorescence mesurés sont donc faibles, ce qui augmente l'erreur expérimentale sur les mesures. La précision des mesures est toutefois suffisante pour mettre en évidence la très forte absorption à deux photons du composé **95** compte tenu de sa taille : environ 700 GM, avec un maximum d'absorption situé autour de 820-840 nm (figure II-*3*-11). La section efficace d'absorption à deux photons du composé **98** atteint environ 200 GM. Cette différence entre les composés bi et trisubstitués est plus importante que dans les séries de composés neutres.

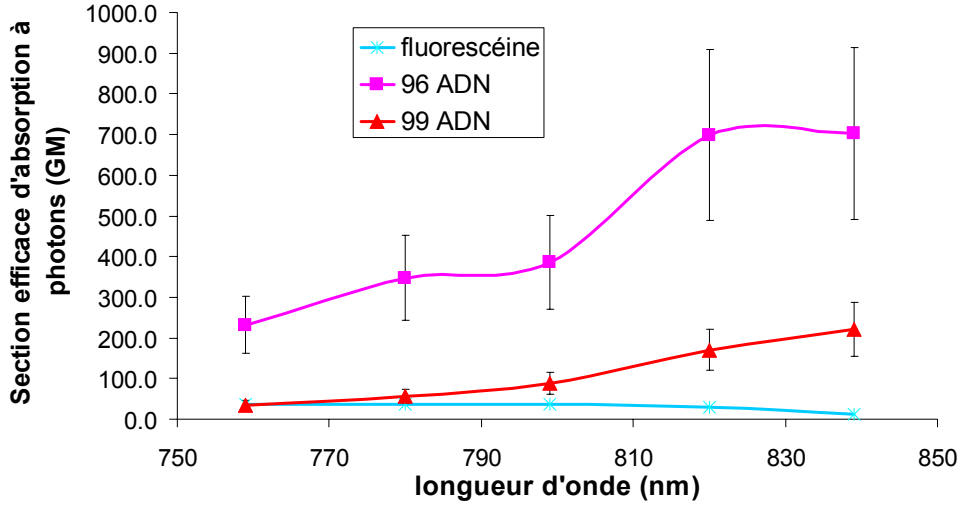


Figure II-*3*-11 : section efficace d'absorption à deux photons en fonction de la longueur d'onde des composés **95** et **98**. La mesure a été effectuée avec des solutions 200 µM, en présence de 5 éq. (paires de bases) d'ADN de Hareng, dans un tampon Cacodylate de sodium pH 7.3 10mM.

La même série de mesures a été effectuée dans le glycérol, à forte puissance d'excitation (environ 500 mW). La sous-estimation des valeurs due à l'échauffement du glycérol (figure II-*3*-10) a ensuite été corrigée : on peut estimer, en comparant la courbe d'intensité de fluorescence en fonction du carré de l'intensité d'excitation à la droite d'extrapolation obtenue à partir des points de cette courbe réalisés à faible puissance incidente, que les mesures que nous avons effectuées sont sous-estimées d'un facteur 2. La figure II-*3*-12 donne l'allure des spectres d'absorption de nos composés dans le glycérol, en corrigeant cette sous-estimation initiale. Il est ainsi possible de voir que les spectres d'absorption à deux photons en fonction de la longueur d'onde ont la même allure dans le glycérol qu'en solution aqueuse en présence d'ADN (maximum vers 820-840 nm pour le composé **95** et au delà de 840 nm pour **98**). Une mesure a ensuite été effectuée à faible puissance (100 mW) au maximum d'absorption (820 nm). Pour le composé trisubstitué **95**, les valeurs maximales des sections

efficaces d'absorption à deux photons en présence d'ADN et dans le glycérol sont comparables : environ 700 GM dans les deux cas. Pour le composé bisubstitué **98**, l'absorption à deux photons est plus élevée dans le glycérol : on estime le maximum à 315 GM, contre 200 GM en présence d'ADN. Cette différence de comportement entre les composés **95** et **98** pourrait refléter un degré d'immobilisation différent des deux composés dans l'ADN.

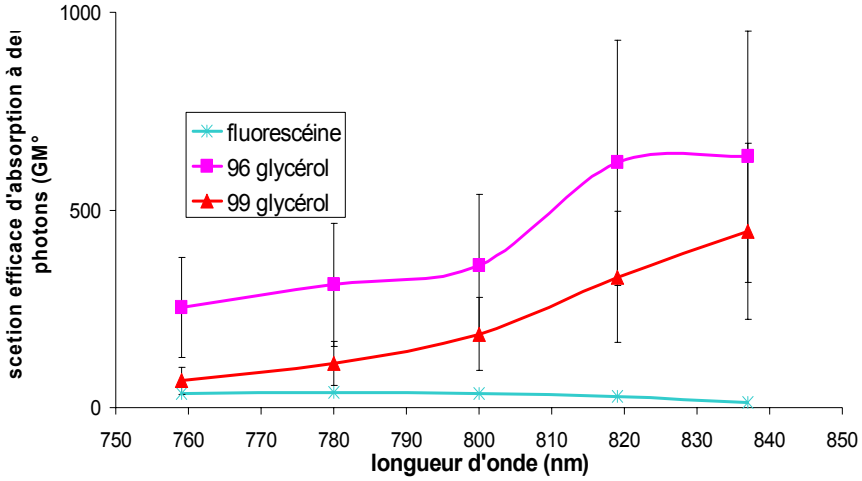


Figure II-*3*-12 : section efficace d'absorption à deux photons en fonction de la longueur d'onde des composés **95** et **98**. La mesure a été effectuée avec des solutions 100 µM dans le glycérol.

Par ailleurs, nous avons vérifié la photostabilité du composé **95** (en présence d'ADN) sous irradiation à deux photons, critère essentiel pour une application éventuelle en microscopie sous excitation biphotonique. Elle se révèle très bonne : après 30 min d'irradiation (puissance moyenne du laser de 480 mW, à 820 nm), nous observons que l'émission de fluorescence n'a pas varié de manière significative.

IV. Marquage d'ADN par les dérivés vinylpyridinium.

A. Etudes in vitro.

En présence d'ADN, un hypochromisme d'environ 20 % ainsi qu'un décalage vers le rouge (30 nm environ) sont observés pour les composés **95** et **98**, ce qui est indicatif d'une liaison au biopolymère par intercalation et / ou interaction avec les sillons (figure II-*3*-13).[112] De plus, lorsque ces composés sont mis en présence d'ADN, une forte exaltation de fluorescence est observée. Un empilement (stacking) d'une ou deux branches avec des bases de l'ADN et / ou un ancrage dans les sillons (interaction électrostatique avec les phosphates) peut ainsi être envisagé pour expliquer l'immobilisation de la molécule.

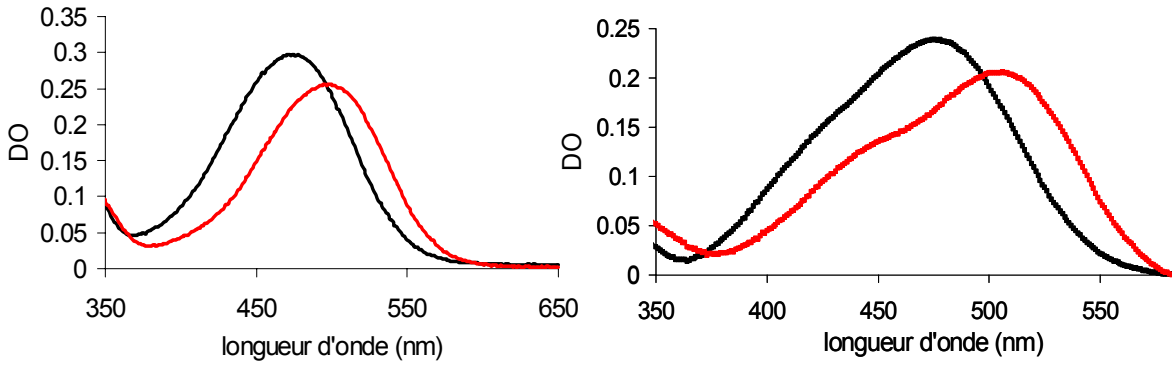


Figure II-*3*-13 : absorption UV – Visible des composés **95** (à gauche) et **98** (à droite), à une concentration de 5 µM, dans un tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7,3 100 mM KCl, seuls (courbes noires) et en présence de 5 éq. d'un duplexe de 26 bp (ds26 : 5'- d(CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG)-3').

Ces mesures ont été effectuées sur un ADN duplexe de 26 paires de bases de séquence autocomplémentaire, le ds26, et sur de l'ADN de testicules de hareng. En présence de l'oligonucléotide court, les deux composés présentent une exaltation de fluorescence d'un facteur 20 environ. De manière étonnante mais reproductible, en présence d'ADN de hareng, le composé **98** présente une exaltation plus forte, d'environ un facteur 100 alors que le composé **95** conserve la même exaltation de fluorescence qu'en présence de l'oligonucléotide court (figure II-*3*-14), sans que nous puissions pour l'instant apporter d'explication à cette différence de comportement. Les titrations en présence d'ADN de Hareng ont été réalisées à des forces ioniques de 10 et 100 mM, sans qu'une différence marquante soit observée, ce qui démontre que les composés possèdent une forte affinité pour l'ADN en conditions biologiques et que les interactions ne sont pas purement de nature électrostatique.

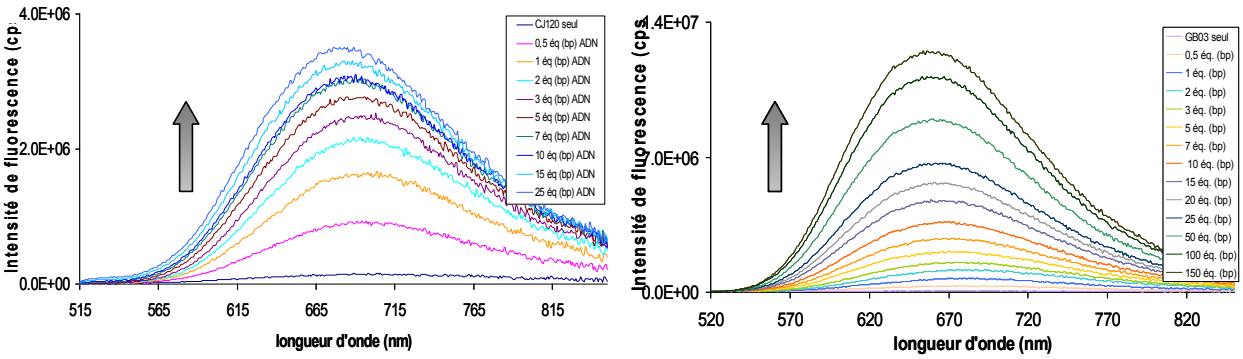


Figure II-*3*-14 : titration des composés **95** (à gauche) et **98** (à droite), à une concentration de 2µM dans un tampon cacodylate de sodium pH 7,3 10mM par de l'ADN de testicules de hareng (de 0 à 25 éq. en paire de bases pour **95** et de 0 à 150 éq. en paires de bases pour **98**).

Nous avons mesuré les rendements quantiques en présence d'ADN de ces composés. Ils demeurent modestes : 0,021 pour le composé **95** et 0,035 pour le composé **98**, en présence de 5 éq. (molaires) de ds26. En présence d'ADN de Hareng, et avec des quantités d'ADN correspondants aux plateaux des courbes de titration, les rendements quantiques sont de 0,066 pour le composé **98** (150 éq. en paires de bases d'ADN) et de 0,0131 pour le composé **95** (25 éq. en paires de bases d'ADN). Les rendements quantiques de fluorescence varient donc de façon significative avec le type d'ADN utilisé, sans que nous ayons d'explication à apporter pour l'instant.

A partir des mesures de fluorescence réalisées en présence d'oligonucléotide ds26, les constantes de dissociation des composés bi- et tri-substitués **98** et **95** ont été déterminées (figure II-*3*-11). Dans les deux cas, un Kd de l'ordre du µM (0,93 µM pour **95** et 0,91 µM pour **98**) est obtenu à une force ionique de 100 mM.

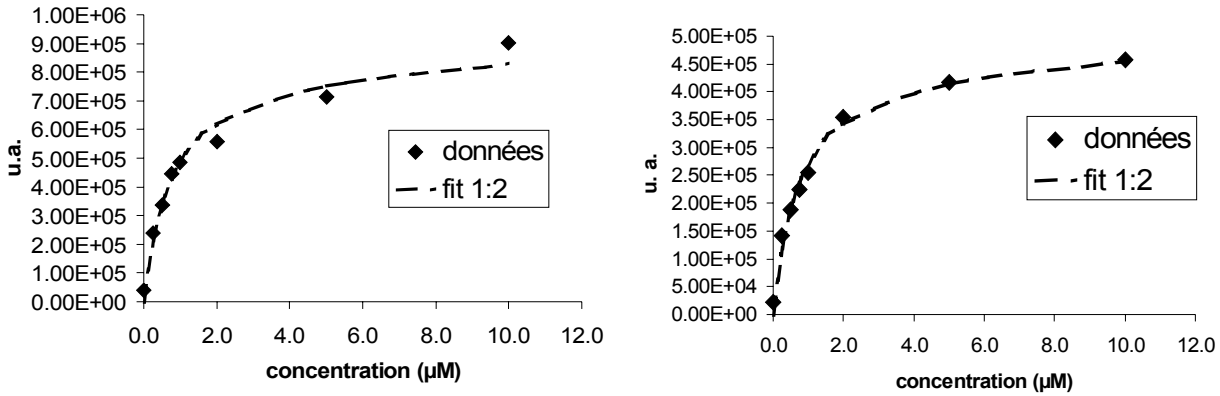


Figure II-*3*-15 : titration des composés **95** (à gauche) et **98** (à droite) à une concentration de 1 µM par l'oligonucléotide ds26, dans un tampon cacodylate 10mM, pH = 7,0, 100 mM NaCl.

Les composés **95** et **98** possèdent donc une forte affinité pour l'ADN et présentent une forte exaltation de fluorescence en présence d'ADN (de 20 à 100 fois selon les conditions). Même si les rendements quantiques de fluorescence de ces composés mesurés *in vitro* en présence d'ADN restent modestes, il est difficile de prévoir quel sera le facteur d'exaltation dans un contexte cellulaire.

Par ailleurs, ces molécules émettent dans le rouge ce qui présente plusieurs avantages pour une application en microscopie : cette gamme de longueur d'ondes d'émission évite les interférences avec la majorité des composants cellulaires qui n'absorbent pas dans cette zone, est moins sensible à la diffusion et peut facilement être distinguée de l'autofluorescence des constituants cellulaires.

La fluorescence dans le rouge de ces molécules, leur excellente photostabilité, leur forte affinité pour l'ADN et le très bon contraste entre les molécules liées à l'ADN et les molécules libres, non fluorescentes, constituent un ensemble idéal de propriétés pour le marquage d'ADN.

B. Etudes en microscopie.

Les composés **95** et **98** ont donc été testés, sur cellules fixées, en microscopie d'épifluorescence puis en microscopie confocale. La figure II-*3*-16A montre des cellules de lignée CHO-K1 (pour Chinese Hamster Ovarian Cell de type K1), dans lesquelles on a introduit nos marqueurs, observées en microscopie d'épifluorescence. Les molécules se révèlent être de très bons marqueurs de noyaux ; les images présentent un très bon contraste, c'est-à-dire aucune fluorescence au niveau du cytoplasme. Ce très bon contraste pourrait indiquer une discrimination de l'ADN duplex du noyau de l'ARN présent dans le cytoplasme par les composés. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenu avec le **DAPI,** un marqueur utilisé couramment, qui fluoresce dans le bleu. Sur les images de cellules co-marquées par du **DAPI** et le composé **98**, on observe un parfait recouvrement (Figure II-*3*-16B) qui confirme la colocalisation des composés dans les noyaux cellulaires.

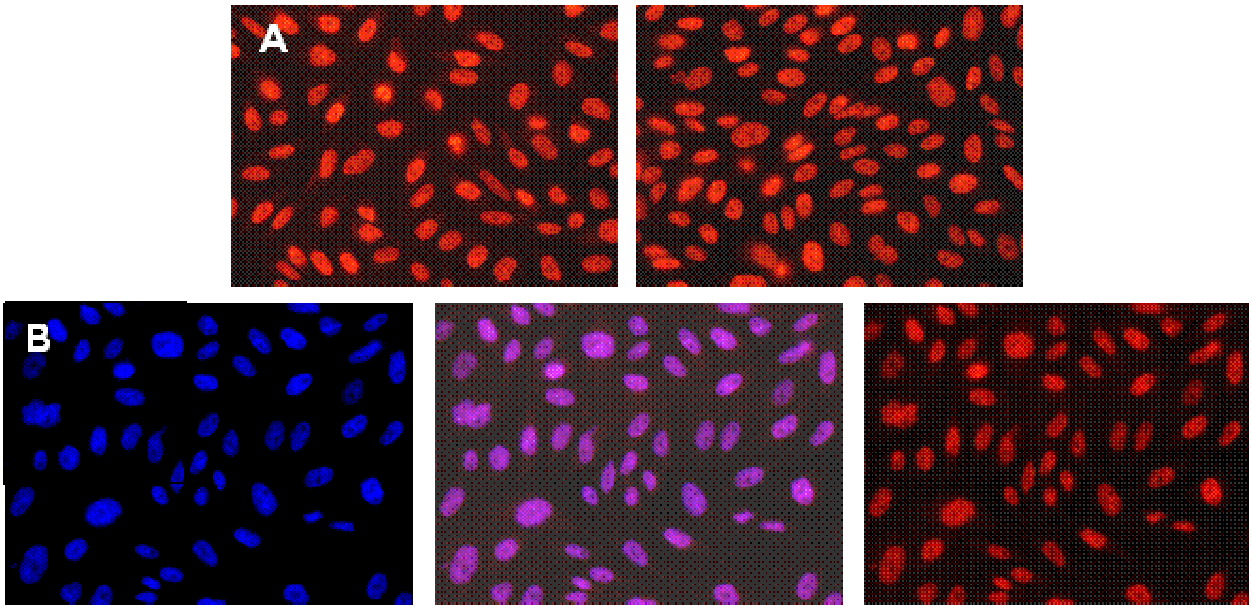


Figure II-*3*-16 : **A.** Images de cellules CHO-K1 observées en microscopie d'épifluorescence, marquées par les triphénylamine **95** à gauche et **98** à droite (2 µM). **B.** Images de cellules CHO-K1 observées en microscopie d'épifluorescence, marquées par la triphénylamine **98** (2 µM et par du **DAPI** (3 µM). A gauche, fluorescence bleue du DAPI, à droite fluorescence rouge de **98**, au milieu superposition des deux images.

Les composés ont également été testés en microscopie confocale. De la même façon, un marquage unique des chromosomes est observé, comme le montre la figure II-*3*-17 dans le cas de cellules en mitose.

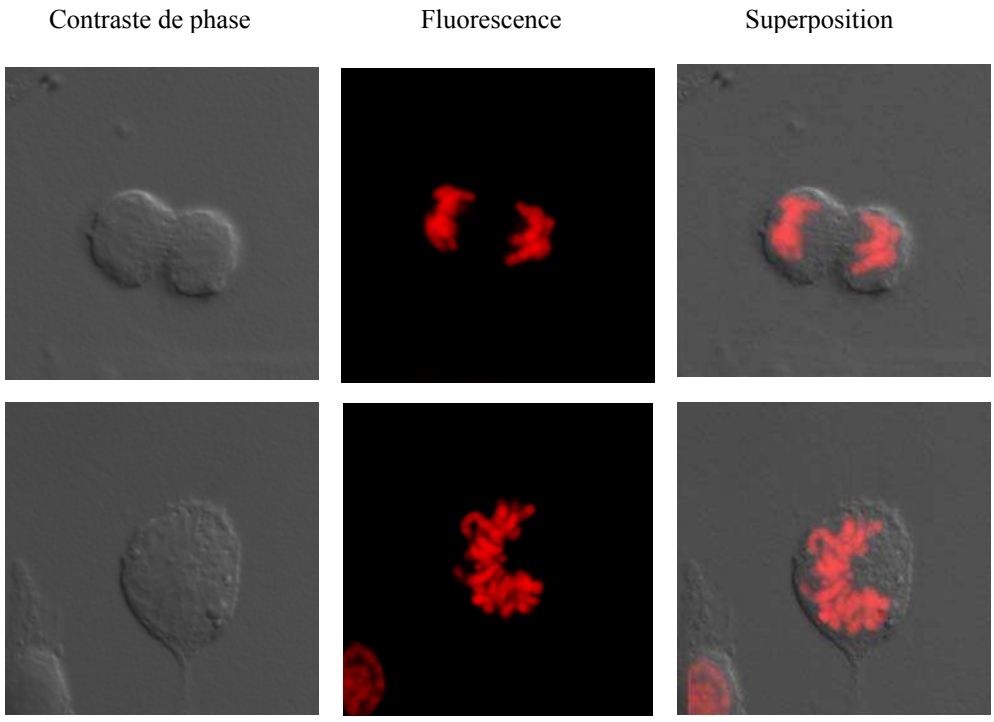


Figure II-*3*-17 : cellules CHO-K1 marquées par la triphénylamine **95** et observées en microscopie confocale.

Le très bon contraste obtenu en microscopie avec les triphénylamines **95** et **98**, associé à leur émission de fluorescence dans le rouge et à leur très bonne photostabilité, fait de ces deux composés des marqueurs d'ADN et de noyaux aux propriétés idéales pour la microscopie, qui peuvent se révéler une alternative aux marqueurs utilisés habituellement. La cytotoxicité de ces composés et leur capacité à pénétrer dans des cellules vivantes doit maintenant être testée.

Le composé **95** possède aussi des propriétés très intéressantes pour la microscopie de fluorescence sous excitation biphotonique : très forte section efficace d'absorption à deux photons comparé aux marqueurs standard, et très bonne photostabilité, sous irradiation mono- comme biphotonique. Des images en microscopie de fluorescence sous excitation biphotonique ont été obtenues, la figure II-*3*-18 montre un exemple.

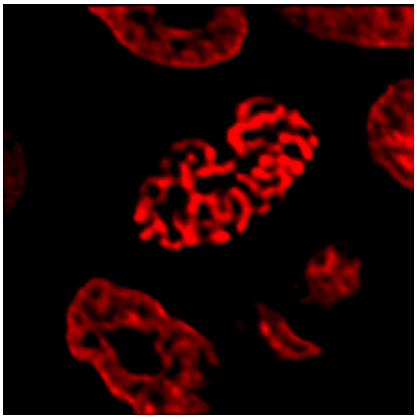


Figure II-*3*-18 : image obtenue en microscopie à deux photons sur des cellules CHO-K1 fixées et marquées à l'aide du composé **95** (excitation 840 nm, émission 580-630 nm).

V. Conclusions et perspectives.

Tout d'abord, les mesures de fluorescence et d'absorption à deux photons sur les différentes séries de composés synthétisés ont permis de valider le choix de conception des molécules : la présence d'un bras fonctionnel permettant le couplage covalent à des biomolécules perturbe peu voire pas les propriétés d'absorption mono- et biphotonique et de fluorescence des molécules. De même, les mesures d'absorption à deux photons ont montré qu'il était indispensable que les composés soient polysubstitués (deux ou trois groupements électroattracteurs) pour avoir une forte absorption biphotonique.

Pour la suite de ce travail et la synthèse éventuelle de triphénylamines substituées par d'autres groupements électroattracteurs, il semble judicieux de continuer à comparer les composés bi- et trisubstitués : les composés bisubstitués sont plus simples à synthétiser, et dans certains cas se révèlent aussi efficaces que les composés trisubstitués. De plus, les composés bisubstitués sont moins encombrants, ce qui peut constituer un avantage pour le marquage de biomolécules. Dans d'autres cas, par exemple celui des triphénylamines substituées par des groupements vinylbenzothiazoles, les composés trisubstitués sont nettement plus efficaces.

Parmi les composés synthétisés au cours de ce travail, deux séries se sont révélées particulièrement intéressantes : celle des triphénylamines vinylbenzothiazoles neutres et celle des triphénylamines vinylpyridinium cationiques. Les triphénylamines vinylbenzothiazoles possèdent une forte absorption à deux photons compte tenu de leur taille, une forte intensité de fluorescence en solvant organique et sont sensibles à la polarité du solvant. Ces composés pourraient ainsi constituer des sondes de polarité intéressantes, potentiellement applicables comme marqueurs de certaines structures d'acides nucléiques ou encore des poches

hydrophobes des protéines. Dans cet objectif, l'étude des propriétés optiques du composé trisbenzothiazole portant une chaîne PEG sera entreprise, ainsi que la synthèse de dérivés portant une fonction activée pour le couplage aux biomolécules (ester activé sous forme NHS, maléimide).

Les triphénylamines vinylpyridium ont montré des propriétés extrêmement attractives : très forte absorption à deux photons, émission de fluorescence dans le rouge, excellente photostabilité et forte exaltation de fluorescence en présence d'ADN. Cet ensemble de propriétés en fait des composés de grand intérêt pour le marquage d'ADN. Les résultats obtenus en microscopie, sous excitation mono- comme biphotonique, confirment que ces composés peuvent se révéler une alternative aux marqueurs utilisés habituellement. La synthèse d'analogues dérivatisables est envisagée : ces fluorophores semblent particulièrement attrayants pour le traçage optique intracellulaire de plasmides marqués à l'aide de la méthode Smiling présentée en introduction. Par ailleurs, la synthèse d'autres composés portant des groupements électroattracteurs chargés, par exemple des quinolinium, est envisagée afin d'obtenir des molécules aux propriétés optimisées.

Conclusions et perspectives.

La première partie de ce travail avait pour objectif initial l'obtention et l'étude de sondes fluorescentes pour l'ADN quadruplexe. La première stratégie envisagée, la synthèse de conjugués quinacridines-fluorophores, a donné des résultats mitigés : ces composés ne sont ni assez affins ni assez sélectifs de l'ADN quadruplexe pour permettre une détection efficace. Nous nous sommes ensuite tournés vers l'étude d'une sonde présentant une forte exaltation de fluorescence en présence d'ADN : le Thiazole Orange (**TO**). Nous avons montré que le **TO** présente une forte affinité pour l'ADN quadruplexe et une forte exaltation de fluorescence en présence de cette structure. Le **TO** possède des affinités analogues pour l'ADN duplexe et quadruplexe, ce qui interdit son utilisation directe pour la détection. En revanche, nous avons pu l'utiliser pour mettre au point un test permettant d'évaluer l'affinité et la sélectivité d'un ligand potentiel d'ADN quadruplexe par déplacement compétitif de la sonde (test G4-FID). Nous avons ensuite montré que l'ADN quadruplexe agit comme une matrice favorisant le transfert d'énergie (FRET) entre une quinacridine (donneur) et le **TO** (accepteur) : la géométrie particulière de cette structure positionne favorablement les deux partenaires Cet effet pourrait être qualifié de FRET spécifique de l'ADN quadruplexe puisqu'il est moins efficace en présence d'ADN duplexe.

Plusieurs perspectives peuvent être envisagées à ce travail. En ce qui concerne les conjugués ligands de quadruplexe / fluorophores, des composés bifonctionnels contenant un motif de reconnaissance de l'ADN quadruplexe et un motif TO pourraient constituer des sondes intéressantes, puisque les expériences de FRET ont montré que deux ligands différents peuvent être piégés sur le quadruplexe. En ce qui concerne le développement du test G4-FID, l'utilisation de structures différentes du quadruplexe télomérique humain et de différentes conditions est en cours. Des résultats préliminaires montrent que ce test pourrait apporter des informations sur le mode d'interaction d'un ligand avec le quadruplexe. Enfin, en ce qui concerne l'étude du phénomène de FRET en présence d'une matrice quadruplexe, plusieurs voies seront développées pour une compréhension plus détaillée des différents paramètres impliqués et pour valider notre modèle structural. Tout d'abord, la proportion de complexe ternaire formé devra être déterminée. Une étude par spectrométrie de masse semble bien adaptée pour cela. Ensuite le nombre de plateaux de guanines du quadruplexe pourra être varié afin d'observer la dépendance de notre système par rapport à la distance.

La deuxième partie de ce travail de thèse visait l'obtention de fluorophores présentant une forte absorption à deux photons, une taille réduite, une solubilité compatibles avec le marquage d'ADN et pouvant être greffés de façon covalente à l'ADN. Nous avons choisi de synthétiser des dérivés de triphénylamine portant des groupements électroattracteurs et un bras permettant le couplage à l'ADN. L'influence de la présence de ce bras et du nombre de groupements électroattracteurs a été testée. Les résultats obtenus ont validé notre choix de structure : le bras dérivatisable n'a pas d'influence significative sur les propriétés optiques et les composés portant deux ou trois groupements ont une absorption à deux photons beaucoup plus élevée que les composés monosubstitués.

Différents groupements électroattracteurs, neutre ou cationiques, ont été testés. Deux séries de composés ont donné des résultats particulièrement intéressants. L'une est la série des composés substitués par des groupements vinylbenzothiazoles (neutres) : ces composés présentent une forte absorption à deux photons, une forte fluorescence en milieu organique et une sensibilité à la polarité du solvant. L'autre série est constituée de triphénylamines substituées par des groupements vinylpyridinium (cationiques) : ces composés présentent une très forte absorption à deux photons, une excellente photostabilité et une exaltation de fluorescence en présence d'ADN. Les résultats obtenus en microscopie confocale et biphotonique confirment que ces composés constituent de très bon marqueurs des noyaux des cellules.

L'étude des propriétés de fluorescence des triphénylamines vinylbenzothiazoles doit maintenant être poursuivie en milieu aqueux et en présence de biomolécules. De même, la synthèse puis le couplage à l'ADN de triphénylamines vinylpyridinium dérivatisables doivent être entrepris. La modulation des propriétés optiques par le milieu biologique orientera ensuite le choix de nouveaux groupements électroattracteurs. La méthodologie synthétique que nous avons mise au point permettra de coupler ces marqueurs à des biomolécules variées (oligonucléotide, ADN natif mais aussi peptide ou protéine).

Références bibliographiques

(1) Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*; Wiley-VCH, 2002.
(2) Guiot, E. thèse de doctorat, Université Paris XI Orsay, 2001.
(3) Mollova, E. T. *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 823-828.
(4) Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 4562-4588.
(5) Ying, L. M.; Green, J. J.; Li, H. T.; Klenerman, D.; Balasubramanian, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 14629-14634.
(6) Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*, 1984.
(7) Gilbert, D. E.; Feigon, J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 305-314.
(8) Géron-Landre, B. thèse de doctorat, Université Paris 6, 2005.
(9) Searle, M. S.; Williams, H. E. L.; Gallagher, C. T.; Grant, R. J.; Stevens, M. F. G. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 810-812.
(10) Grimm, G. N.; Boutorine, A. S.; Lincoln, P.; Norden, B.; Helene, C. *Chembiochem* **2002**, *3*, 324-331.
(11) Fechter, E. J.; Olenyuk, B.; Dervan, P. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16685-16691.
(12) Slattum, P. S.; Loomis, A. G.; Machnik, K. J.; Watt, M. A.; Duzeski, J. L.; Budker, V. G.; Wolff, J. A.; Hagstrom, J. E. *Molecular Therapy* **2003**, *8*, 255-263.
(13) Heetebrij, R. J.; Talman, E. G.; Von Velzen, M. A.; Von Gijlswijk, R. P. M.; Snoeijers, S. S.; Schalk, M.; Wiegant, J.; Von der Rijke, F.; Kerkhoven, R. M.; Raap, A. K.; Tanke, H. J.; Reedijk, J.; Houthoff, H. J. *Chembiochem* **2003**, *4*, 573-583.
(14) Neves, C.; Byk, G.; Escriou, V.; Bussone, F.; Scherman, D.; Wils, P. *Bioconjugate Chemistry* **2000**, *11*, 51-55.
(15) Sainlos, M. thèse de doctorat, Université Paris 6, 2004.
(16) Escude, C.; Garestier, T.; Helene, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 10603-10607.
(17) Geron-Landre, B.; Roulon, T.; Desbiolles, P.; Escude, C. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*.
(18) Pljevaljcic, G.; Pignot, M.; Weinhold, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3486-3492.
(19) Pljevaljcic, G.; Schmidt, F.; Weinhold, E. *Chembiochem* **2004**, *5*, 265-269.
(20) Davis, J. T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 668-698.
(21) Hazel, P.; Huppert, J.; Balasubramanian, S.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16405-16415.
(22) Simonsson, T. *Biological Chemistry* **2001**, *382*, 621-628.
(23) Juskowiak, B.; Takenaka, S. In *Methods in Molecular Biology : Fluorescent Energy Transfer Nucleic Acid Probes: Design and Protocols*; Didenko, V. V., Ed.; Humana Press Inc: Totowa; Vol. 335, p 311-341.
(24) Schultze, P.; Macaya, R. F.; Feigon, J. *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 1532-1547.
(25) Wang, Y.; Patel, D. J. *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 76-94.
(26) Wang, Y.; Patel, D. J. *Structure* **1994**, *2*, 1141-1156.
(27) 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. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2944-2959.
(28) Luu, K. N.; Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Lacroix, L.; Patel, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *ASAP*.
(29) Wang, Y.; Patel, D. J. *Structure* **1993**, *1*, 263-282.
(30) Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S. *Nature* **2002**, *417*, 876-880.
(31) Rezler, E. M.; Seenisamy, J.; Bashyam, S.; Kim, M. Y.; White, E.; Wilson, W. D.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9439-9447.
(32) Kan, Z. Y.; Yao, Y. A.; Wang, P.; Li, X. H.; Hao, Y. H.; Tan, Z. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 1629-1632.
(33) Li, J.; Correia, J. J.; Wang, L.; Trent, J. O.; Chaires, J. B. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4649-4659.
(34) He, Y. J.; Neumann, R. D.; Panyutin, I. G. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 5359-5367.
(35) Ourliac-Garnier, I.; Elizondo-Riojas, M. A.; Redon, S.; Farrell, N. P.; Bombard, S. *Biochemistry* **2005**, *44*, 10620-10634.

(36) Xu, Y.; Noguchi, Y.; Sugiyama *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5584-5591.
(37) Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Bialis, T.; Jones, R. A.; Yang, D. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2723-2735.
(38) Vorlickova, M.; Chladkova, J.; Kejnovska, I.; Fialova, M.; Kypr, J. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5851-5860.
(39) Todd, A. K.; Johnston, M.; Neidle, S. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2901-2907.
(40) Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2908-2916.
(41) Granotier, C.; Pennarun, G.; Riou, L.; Hoffschir, F.; Gauthier, L. R.; De Cian, A.; Gomez, D.; Mandine, E.; Riou, J. F.; Mergny, J. L.; Mailliet, P.; Dutrillaux, B.; Boussin, F. D. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4182-4190.
(42) Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Pluckthun, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 8572-8577.
(43) Paeschke, K.; Simonsson, T.; Postberg, J.; Rhodes, D.; Lipps, H. J. *Nature Structural & Molecular Biology* **2005**, *12*, 847-854.
(44) Duquette, M. L.; Handa, P.; Vincent, J. A.; Taylor, A. F.; Maizels, N. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1618-1629.
(45) Neidle, S.; Parkinson, G. *Nature Reviews Drug Discovery* **2002**, *1*, 383-393.
(46) Neidle, S.; Parkinson, G. N. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 275-283.
(47) Cech, T. R. *Cell* **2004**, *116*, 273-279.
(48) Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L. C.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. *Science* **1994**, *266*, 2011-2015.
(49) Shay, J. W.; Bacchetti, S. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 787-791.
(50) Greider, C. W.; Blackburn, E. H. *Cell* **1985**, *43*, 405-413.
(51) Smogorzewska, A.; de Lange, T. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 177-208.
(52) 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.; Helene, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 3062-3067.
(53) Pennarun, G.; Granotier, C.; Gauthier, L. R.; Gomez, D.; Hoffschir, F.; Mandine, E.; Riou, J. F.; Mergny, J. L.; Mailliet, P.; Boussin, F. D. *Oncogene* **2005**, *24*, 2917-2928.
(54) Moore, M. J. B.; Schultes, C. M.; Cuesta, J.; Cuenca, F.; Gunaratnam, M.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 582-599.
(55) Kim, M. Y.; Vankayalapati, H.; Kazuo, S.; Wierzba, K.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2098-2099.
(56) Riou, J. F.; Guittat, L.; Mailliet, P.; Laoui, A.; Renou, E.; Petitgenet, O.; Megnin-Chanet, F.; Helene, C.; Mergny, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 2672-2677.
(57) Burger, A. M.; Dai, F. P.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J.; Double, J. A.; Neidle, S. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1489-1496.
(58) Riou, J. F.; Gomez, D.; Lemarteleur, T.; Trentesaux, C. *Bull. Cancer* **2003**, *90*, 305-313.
(59) Siddiqui-Jain, A.; Grand, C. L.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 11593-11598.
(60) Dai, J. X.; Dexheimer, T. S.; Chen, D.; Carver, M.; Ambrus, A.; Jones, R. A.; Yang, D. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1096-1098.
(61) Cogoi, S.; Xodo, L. E. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2536-2549.
(62) Fernando, H.; Reszka, A. P.; Huppert, J.; Ladame, S.; Rankin, S.; Venkitaraman, A. R.; Neidle, S.; Balasubramanian, S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7854-7860.
(63) De Armond, R.; Wood, S.; Sun, D. Y.; Hurley, L. H.; Ebbinghaus, S. W. *Biochemistry* **2005**, *44*, 16341-16350.
(64) Darnell, J. C.; Jensen, K. B.; Jin, P.; Brown, V.; Warren, S. T.; Darnell, R. B. *Cell* **2001**, *107*, 489-499.
(65) Lyonnais, S.; Gorelick, R. J.; Mergny, J. L.; Le Cam, E.; Mirambeau, G. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5754-5763.
(66) Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Matsuo, K.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1262-1263.
(67) Han, F. X. G.; Wheelhouse, R. T.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3561-3570.

(68) Teulade-Fichou, M. P.; Carrasco, C.; Guittat, L.; Bailly, C.; Alberti, P.; Mergny, J. L.; David, A.; Lehn, J. M.; Wilson, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4732-4740.
(69) 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. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4463-4476.
(70) Fedoroff, O. Y.; Salazar, M.; Han, H. Y.; Chemeris, V. V.; Kerwin, S. M.; Hurley, L. H. *Biochemistry* **1998**, *37*, 12367-12374.
(71) Koeppel, F.; Riou, J. F.; Laoui, A.; Mailliet, P.; Arimondo, P. B.; Labit, D.; Petitgenet, O.; Helene, C.; Mergny, J. L. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1087-1096.
(72) Mailliet, P.; De Lemos, E.; Caulfield, T.; Gomez, D.; Riou, J. F.; Belmokhtar, C.; Petitgenet, O.; Renou, E.; Mergny, J. L.; Guittat, L.; Mandine, E. In *94th AACR Meeting. LB38. July 11-14, Washington DC, USA* 2003.
(73) Reed, J. E.; Arnal, A. A.; Neidle, S.; Vilar, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5992-5993.
(74) Haider, S. M.; Parkinson, G. N.; Neidle, S. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 117-125.
(75) Jourdan, M.; Teulade-Fichou, M. P. *unpublished results*.
(76) Gavathiotis, E.; Heald, R. A.; Stevens, M. F. G.; Searle, M. S. *Angew. Chem., Int Ed.* **2001**, *40*, 4749-+.
(77) Cocco, M. J.; Hanakahi, L. A.; Huber, M. D.; Maizels, N. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 2944-2951.
(78) Mehta, A. K.; Shayo, Y.; Vankayalapati, H.; Hurley, L. H.; Schaefer, J. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11953-11958.
(79) Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Gaw, H. Y.; Patel, D. J. *Nature Chemical Biology* **2005**, *1*, 167-173.
(80) Read, M.; Harrison, R. J.; Romagnoli, B.; Tanious, F. A.; Gowan, S. H.; Reszka, A. P.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 4844-4849.
(81) Clark, G. R.; Pytel, P. D.; Squire, C. J.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4066-4067.
(82) Guittat, L.; De Cian, A.; Rosu, F.; Gabelica, V.; De Pauw, E.; Delfourne, E.; Mergny, J. L. *Biochim. Biophys. Acta-General Subjects* **2005**, *1724*, 375-384.
(83) Wilson, W. D. *Science* **2002**, *295*, 2103-+.
(84) Hofstadler, S. A.; Griffey, R. H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 377-390.
(85) David, W. M.; Brodbelt, J.; Kerwin, S. M.; Thomas, P. W. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2029-2033.
(86) Rosu, F.; Gabelica, V.; Houssier, C.; Colson, P.; De Pauw, E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1729-1736.
(87) Kaiser, M.; De Cian, A.; Sainlos, M.; Renner, C.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1049-1057.
(88) Ren, J. S.; Chaires, J. B. *Biochemistry* **1999**, *38*, 16067-16075.
(89) Rosu, F.; De Pauw, E.; Guittat, L.; Alberti, P.; Lacroix, L.; Mailliet, P.; Riou, J. F.; Mergny, J. L. *Biochemistry* **2003**, *42*, 10361-10371.
(90) Asseline, U. *Current Organic Chemistry* **2006**, *10*, 491-518.
(91) Lilley, D. M. J.; Wilson, T. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 507-517.
(92) Lee, J. Y.; Okumus, B.; Kim, D. S.; Ha, T. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 18938-18943.
(93) Chang, C. C.; Wu, J. Y.; Chien, C. W.; Wu, W. S.; Liu, H.; Kang, C. C.; Yu, L. J.; Chang, T. C. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6177-6183.
(94) Chang, C. C.; Kuo, I. C.; Ling, I. F.; Chen, C. T.; Chen, H. C.; Lou, P. J.; Lin, J. J.; Chang, T. C. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4490-4494.
(95) Chang, C. C.; Chu, J. F.; Kao, F. J.; Chiu, Y. C.; Lou, P. J.; Chen, H. C.; Chang, T. C. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2810-2815.
(96) Chen, Q.; Kuntz, I. D.; Shafer, R. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 2635-2639.
(97) Arthanari, H.; Basu, S.; Kawano, T. L.; Bolton, P. H. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3724-3728.
(98) Maiti, S.; Chaudhury, N. K.; Chowdhury, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *310*, 505-512.
(99) Marin, V. L.; Armitage, B. A. *Biochemistry* **2006**, *45*, 1745-1754.
(100) Baudoin, O.; Teulade-Fichou, M. P.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5458-5470.

(101) Jacquelin, C.; Saettel, N.; Hounsou, C.; Teulade-Fichou, M. P. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 2589-2592.
(102) Saettel, N.; Katsonis, N.; Marchenko, A.; Teulade-Fichou, M. P.; Fichou, D. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3175-3180.
(103) Lartia, R.; Bertrand, H.; Teulade-Fichou, M. P. *Synlett* **2006**, 610-614.
(104) Wan, C. W.; Burghart, A.; Chen, J.; Bergstrom, F.; Johansson, L. B. A.; Wolford, M. F.; Kim, T. G.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R. M.; Burgess, K. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430-4441.
(105) Anderson, H. J.; Loader, C. E.; Foster, A. *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 25272530.
(106) Vos de Wael, E.; Pardoen, J. A.; van Koeveringe, J. A.; Lugtenburg, J. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* **1977**, *96*, 306-309.
(107) Li, Z. G.; Mintzer, E.; Bittman, R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1718-1721.
(108) Monchaud, D.; Allain, C.; Teulade-Fichou, M. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4842-4845.
(109) Nygren, J.; Svanvik, N.; Kubista, M. *Biopolymers* **1998**, *46*, 39-51.
(110) Lartia, R. *thèse de doctorat, université d'Orléans* **2004**.
(111) Marin, V. L.; Armitage, B. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8032-8033.
(112) Jenkins, T. C. In *Methods in Molecular Biology, vol 90: Drug-DNA Interaction Protocols*; Fox, K. R., Ed.; Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 1997.
(113) Baguley, B. C.; Falkenhaug, E.-M. *Nucleic Acids Res.* **1978**, *5*, 161-171.
(114) Boger, D. L.; Fink, B. E.; Brunette, S. R.; Tse, W. C.; Hedrick, M. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5878-5891.
(115) Boger, D. L.; Tse, W. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 2511-2518.
(116) Browne, K. A.; He, G.-X.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7072-7079.
(117) Tse, W. C.; Boger, D. L. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 61-69.
(118) Ham, Y. W.; Tse, W. C.; Boger, D. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3805-3807.
(119) Yeung, B. K. S.; Tse, W. C.; Boger, D. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3801-3804.
(120) Hounsou, C. thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, 2004.
(121) Gabelica, V.; Teulade-Fichou, M. P. *unpublished results*.
(122) Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P. *unpublished results*.
(123) JaresErijman, E. A.; Jovin, T. M. *J. Mol. Biol.* **1996**, *257*, 597-617.
(124) Norman, D. G.; Grainger, R. J.; Uhrin, D.; Lilley, D. M. J. *Biochemistry* **2000**, *39*, 6317-6324.
(125) Clegg, R. M.; Murchie, A. I. H.; Zechel, A.; Lilley, D. M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 2994-2998.
(126) Lewis, F. D.; Zhang, L. G.; Zuo, X. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10002-10003.
(127) Mergny, J. L. *Biochemistry* **1999**, *38*, 1573-1581.
(128) Vamosi, G.; Clegg, R. M. *Biochemistry* **1998**, *37*, 14300-14316.
(129) Allain, C.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *in press*.
(130) Goeppert-Mayer, M. *Annals of Physics* **1931**, *31*, 559-577.
(131) McIlroy, S. P.; Clo, E.; Nikolajsen, L.; Frederiksen, P. K.; Nielsen, C. B.; Mikkelsen, K. V.; Gothelf, K. V.; Ogilby, P. R. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1134-1146.
(132) Dichtel, W. R.; Serin, J. M.; Edder, C.; Frechet, J. M. J.; Matuszewski, M.; Tan, L. S.; Ohulchanskyy, T. Y.; Prasad, P. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5380-5381.
(133) Helmchen, F.; Denk, W. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2002**, *12*, 593-601.
(134) Chung, S. J.; Kim, K. S.; Lin, T. H.; He, G. S.; Swiatkiewicz, J.; Prasad, P. N. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 10741-10745.
(135) Xu, C.; Zipfel, W.; Shear, J. B.; Williams, R. M.; Webb, W. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1996**, *93*, 10763-10768.
(136) Albota, M. A.; Xu, C.; Webb, W. W. *Appl. Opt.* **1998**, *37*, 7352-7356.
(137) Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1368-1376.
(138) Larson, D. R.; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Clark, S. W.; Bruchez, M. P.; Wise, F. W.; Webb, W. W. *Science* **2003**, *300*, 1434-1436.
(139) Xu, C.; Webb, W. W. *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* **1996**, *13*, 481-491.
(140) Helmchen, F.; Denk, W. *Nature Methods* **2005**, *2*, 932-940.
(141) Williams, R. M.; Zipfel, W. R.; Webb, W. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 603-308.
(142) Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. *Science* **1990**, *248*, 73-76.

(143) Mertz, J. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2004**, *14*, 610-616.
(144) Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Christie, R.; Nikitin, A. Y.; Hyman, B. T.; Webb, W. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 7075-7080.
(145) Debarbieux, F.; Audinat, E.; Charpak, S. *J. Neurosci.* **2003**, *23*, 5553-5560.
(146) Baumgart, T.; Hess, S. T.; Webb, W. W. *Nature* **2003**, *425*, 821-824.
(147) Konig, K.; Riemann, I.; Fischer, P.; Halbhuber, K. J. *HistoChem. Cell. Biol.* **2000**, *114*, 337-345.
(148) Wang, X.; Krebs, L. J.; Al-Nuri, M.; Pudavar, H. E.; Ghosal, S.; Liebow, C.; Nagy, A. A.; Schally, A. V.; Prasad, P. N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 11081-11084.
(149) Beljonne, D.; Wenseleers, W.; Zojer, E.; Shuai, Z. G.; Vogel, H.; Pond, S. J. K.; Perry, J. W.; Marder, S. R.; Bredas, J. L. *Advanced Functional Materials* **2002**, *12*, 631-641.
(150) Albota, M.; Beljonne, D.; Bredas, J. L.; Ehrlich, J. E.; Fu, J. Y.; Heikal, A. A.; Hess, S. E.; Kogej, T.; Levin, M. D.; Marder, S. R.; McCord-Maughon, D.; Perry, J. W.; Rockel, H.; Rumi, M.; Subramaniam, C.; Webb, W. W.; Wu, X. L.; Xu, C. *Science* **1998**, *281*, 1653-1656.
(151) Lee, W. H.; Cho, M. H.; Jeon, S. J.; Cho, B. R. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 11033-11040.
(152) Mongin, O.; Porres, L.; Moreaux, L.; Mertz, J.; Blanchard-Desce, M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 719-722.
(153) Lee, S. K.; Yang, W. J.; Choi, J. J.; Kim, C. H.; Jeon, S. J.; Cho, B. R. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 323-326.
(154) Chung, S. J.; Rumi, M.; Alain, V.; Barlow, S.; Perry, J. W.; Marder, S. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10844-10845.
(155) Ventelon, L.; Moreaux, L.; Mertz, J.; Blanchard-Desce, M. *Chem. Comm.* **1999**, 2055-2056.
(156) Zyss, J.; Ledoux, I. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 77-105.
(157) Lee, W. H.; Lee, H.; Kim, J. A.; Choi, J. H.; Cho, M. H.; Jeon, S. J.; Cho, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10658-10667.
(158) Katan, C.; Terenziani, F.; Mongin, O.; Werts, M. H. V.; Porres, L.; Pons, T.; Mertz, J.; Tretiak, S.; Blanchard-Desce, M. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109*, 3024-3037.
(159) Kannan, R.; He, G. S.; Lin, T. C.; Prasad, P. N.; Vaia, R. A.; Tan, L. S. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 185-194.
(160) He, G. S.; Swiatkiewicz, J.; Jiang, Y.; Prasad, P. N.; Reinhardt, B. A.; Tan, L. S.; Kannan, R. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 4805-4810.
(161) Mongin, O.; Porres, L.; Katan, C.; Pons, T.; Mertz, J.; Blanchard-Desce, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8121-8125.
(162) Porres, L.; Mongin, O.; Katan, C.; Charlot, M.; Pons, T.; Mertz, J.; Blanchard-Desce, M. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 47-50.
(163) Yang, W. J.; Kim, D. Y.; Kim, C. H.; Jeong, M. Y.; Lee, S. K.; Jeon, S. J.; Cho, B. R. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1389-1392.
(164) Brunel, J.; Mongin, O.; Jutand, A.; Ledoux, I.; Zyss, J.; Blanchard-Desce, M. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 4139-4148.
(165) Le Droumaguet, C.; Mongin, O.; Werts, M. H. V.; Blanchard-Desce, M. *Chem. Comm.* **2005**, 2802-2804.
(166) Kurotobi, K.; Kim, K. S.; Noh, S. B.; Kim, D.; Osuka, A. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 3944-3947.
(167) Ogawa, K.; Hasegawa, H.; Inaba, Y.; Kobuke, Y.; Inouye, H.; Kanemitsu, Y.; Kohno, E.; Hirano, T.; Ogura, S.; Okura, I. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2276-2283.
(168) Woo, H. Y.; Hong, J. W.; Liu, B.; Mikhailovsky, A.; Korystov, D.; Bazan, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 820-821.
(169) Bartholomew, G. P.; Rumi, M.; Pond, S. J. K.; Perry, J. W.; Tretiak, S.; Bazan, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11529-11542.
(170) Hayek, A.; Bolze, F.; Nicoud, J. F.; Baldeck, P. L.; Mely, Y. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 102-106.
(171) Krishna, T. R.; Parent, M.; Werts, M. H. V.; Moreaux, L.; Gmouh, S.; Charpak, S.; Caminade, A. M.; Majoral, J. P.; Blanchard-Desce, M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 4645-4648.

(172) Ohulchanskyy, T. Y.; Pudavar, H. E.; Yarmoluk, S. M.; Yashchuk, V. M.; Bergey, E. J.; Prasad, P. N. *Photochem. Photobiol.* **2003**, *77*, 138-145.
(173) Abbotto, A.; Baldini, G.; Beverina, L.; Chirico, G.; Collini, M.; D'Alfonso, L.; Diaspro, A.; Magrassi, R.; Nardo, L.; Pagani, G. A. *Biophysical Chemistry* **2005**, *114*, 35-41.
(174) Schafer-Hales, K. J.; Belfield, K. D.; Yao, S.; Frederiksen, P. K.; Hales, J. M.; Kolattukudy, P. E. *Journal of Biomedical Optics* **2005**, *10*.
(175) Ley, S. V.; Thomas, A. W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 5400-5449.
(176) Beletskaya, I. P.; Cheprakov, A. V. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 2337-2364.
(177) Prim, D.; Campagne, J. M.; Joseph, D.; Andrioletti, B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2041-2075.
(178) Muci, A. R.; Buchwald, S. L. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *219*, 131-209.
(179) Corbet, J. P.; Mignani, G. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2651-2710.
(180) Chen, C.; Yang, L. M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2209-2211.
(181) Kuhl, S.; Fort, Y.; Schneider, R. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 6169-6177.
(182) Liu, Z. J.; Larock, R. C. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 4673-4675.
(183) Haga, K.; Iwaya, K.; Kaneko, R. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1986**, *59*, 803-807.
(184) Ma, D. W.; Xia, C. F. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2583-2586.
(185) Hartwig, J. F.; Kawatsura, M.; Hauck, S. I.; Shaughnessy, K. H.; Alcazar-Roman, L. M. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5575-5580.
(186) Bordeau, G. rapport de master, Université de Montpellier II, 2006.
(187) Kosynkin, D. V.; Tour, J. M. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 991-992.
(188) Lartia, R., communication personnelle.
(189) Mitchell, R. H.; Lai, Y.-H.; Williams, R. V. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4733-4735.
(190) Lai, G. F.; Bu, X. R.; Santos, J.; Mintz, E. A. *Synlett* **1997**, 1275-&.
(191) Lee, H. J.; Sohn, J.; Hwang, J.; Park, S. Y. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 456-465.
(192) Mallegol, T.; Gmouh, S.; Meziane, M. A. A.; Blanchard-Desce, M.; Mongin, O. *Synthesis-Stuttgart* **2005**, 1771-1774.
(193) Dapperheld, S.; Eberhard, S.; Karl-Heinz, G. B.; Esch, T. *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 2557-2567.
(194) Thayumanavan, S.; Mendez, J.; Marder, S. R. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4289-4297.
(195) Huang, X. H.; Buchwald, S. L. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3417-3419.
(196) Parham, W. E.; Bradsher, C. K. *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 300-305.
(197) Parham, W. E.; Sayed, Y. A. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 2051-2053.
(198) Watson, S. C.; Eastham, J. F. *J. Organomet. Chem.* **1967**, *9*.
(199) Osman, M. A. *Helv. Chim. Acta* **1982**, *65*, 2448-2449.
(200) Chandler, C. J.; Deady, L. W.; Keiss, J. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, *18*, 599.
(201) Nicolaou, K. C.; Baran, P. S.; Zhong, Y. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3183-3185.
(202) Nicolaou, K. C.; Montagnon, T.; Baran, P. S.; Zhong, Y. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2245-2258.
(203) Baker III, T. N.; Doherty Jr, W. P.; Kelley, W. S.; Newmeyer, W.; Rogers Jr, J. E.; Spalding, R. E.; Walter, R. I. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 3714-3718.
(204) Kohrt, J. T.; Filipski, K. J.; Rapundalo, S. T.; Cody, W. L.; Edmunds, J. J. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6041-6044.
(205) Hagiya, K.; Mitsui, S.; Taguchi, H. *Synthesis-Stuttgart* **2003**, 823-828.
(206) Pearson, G. A.; Rocek, M.; Walter, R. I. *J. Phys. Chem.* **1978**, *82*, 1185-1192.
(207) Weissman, S. A.; Zewge, D.; Chen, C. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 1508-1510.
(208) Lacour, J.; Monchaud, D.; Bernardinelli, G.; Favarger, F. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1407-1410.
(209) Wang, Z. Y.; Jiang, C.; Wu, J. H.; Guo, Q. X. *Chin. Chem. Lett.* **2001**, *12*, 399-402.
(210) Ishow, E.; Bellaiche, C.; Bouteiller, L.; Nakatani, K.; Delaire, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15744-15745.
(211) Lambert, C.; Gaschler, W.; Schmalzlin, E.; Meerholz, K.; Brauchle, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 577-587.
(212) Huang, Y. Y.; Cheng, T. R.; Li, F. Y.; Huang, C. H.; Hou, T. J.; Yu, A. C.; Zhao, X. S.; Xu, X. J. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 10020-10030.
(213) Maryanoff, B. E.; Reitz, A. B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863-927.
(214) Cai, G.; Bozhkova, N.; Odingo, J.; Berova, N.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7192-7198.

(215) Baker, R.; Sims, R. J. *Synthesis* **1981**, 117.
(216) Bernasconi, C. F.; Fox, J. P.; Kanavarioti, A.; Panda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2372-2381.
(217) Bhaskar, A.; Ramakrishna, G.; Lu, Z.; Twieg, R.; Hales, J. M.; Hagan, D. J.; VanStryland, E.; Goodson, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11840-11849.

Publications

Une partie de ce travail a fait l'objet de publications :

- publications dans des revues internationales avec comité de lecture :

Jacquelin C. ; Saettel N. ; Hounsou C ; Teulade-Fichou M.-P., Palladium Versus Copper-Catalyzed N-Arylation Towards an Efficient Access to Polysubstituted Dibenzophenanthrolines and Carbazoles, *Tetrahedron Letters*, **2005**, *46*, 2589-2592.

Monchaud D. ; Allain C. ; Teulade-Fichou M.-P., Development of a Fluorescent Intercalator Displacement assay (G4-FID) for establishing quadruplex-DNA affinity and selectivity of putative ligands, *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2006**, *16,* 4842-4845

Allain C. ; Monchaud D. ; Teulade-Fichou M.-P., FRET-templated by G-Quadruplex DNA: a specific ternary interaction using an original pair of donor/acceptor. *J. Am. Chem. Soc.,* **2006**, *128,* 11890-11893.

- articles en préparation :

Allain C. ; Schmidt F. ; Lartia R. ; Bordeau G. ; Fiorini-Debuisschert C. ; Charra F. ; Tauc P. ; Teulade-Fichou M.-P. , Vinyl-pyridinium Triphenylamines: novel red emitters with high photostability and two-photon absorption properties for DNA staining (*soumis).*

Lartia R. ; Allain C. Bordeau G. ; Schmidt F. ; Fiorini C. ; Charra F. ; Teulade-Fichou M.-P., Synthesis and Fluorescent Properties of Derivatizable Triphenylamines (*en préparation*).

- actes de conférences :

Teulade-Fichou M.-P. ; Kaiser M. ; Sainlos M. ; Bombard S. ; Monchaud D. ; Jacquelin C ; Hounsou C. ; Lartia R., Customized Fused Aromatics for Structural Recognition of Nucleic Acids, *Proceedings of XIII Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components*, Spindleruv Mlyn, Czech Republic, September 3-9 2005. Collection Symposium series **7** (2005) 245-248.

Monchaud D. ; Allain C. ; Teulade-Fichou M.-P., Thiazole orange: a useful probe for fluorescence sensing of G-quadruplex–ligand interactions., *Proceedings of the XVII International Roundtable* in *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* soumis.

Une partie de ce travail a fait l'objet d'une demande de dépôt de brevet : NOUVEAUX DERIVES DE LA TRIPHENYLAMINE UTILES COMME FLUOROPHORES EN BIOLOGIE, NOTAMMENT POUR LA MICROSCOPIE BIPHOTONIQUE, déposée le 10/11/06 sous le numéro 06 54837 (France).

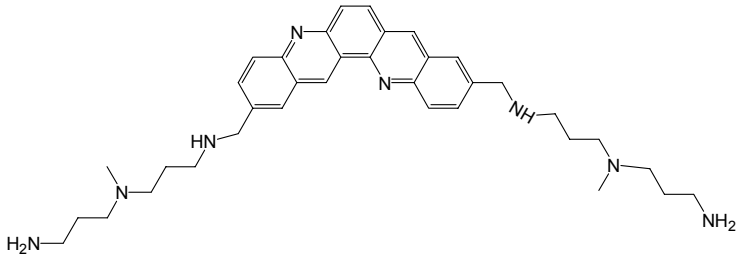
Experimental part

Syntheses:

Generals methods:

- NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer at 300 MHz for ^{1}H and 75.5 MHz for ^{13}C using solvent residuals as internals references.
- Mass spectrometry was performed at the Ecole Normale Supérieure (ENS) in Paris for chemical ionization (CI) and Fast Atomic Bombardment (FAB) and at the Institut de Chimie des Substances Naturelle (ICSN) in Gif-sur-Yvette for Electrospray Ionisation (ESI).
- Elementary analysis were performed at the service de microanalyse de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris) or at the service de microanalyse de l'ICSN (Gif-sur-Yvette).
- Melting points were determined on a Kofler apparatus.
- IR spectra were obtained on a Bruker Vector 22 FT – IR spectrometer.
- UV-vis experiments were monitored on a Uvikon XL spectrophotometer.
- Fluorescence spectra were recorded on a FluoroMax-3 (Jobin Yvon) apparatus, at 20°C unless specified.
- TLC were performed on 0.25mm $60F_{254}$ silica plates (Merck) and flash chromatography were performed with 40-63 μm silica.
- HPLC analysis were performed on a Gilson apparatus equipped with a C4 modified silica column (Aquapore butyl 7μ, diameter 0.46 cm, length 25 cm) and a UV-Vis 118 Gilson detector.
- THF, dioxane and toluene were distilled from sodium / benzophenone ketyl before use. Commercial reagents were used without further purification unless specified.

2,10-Di[[(3-N-(3-amino-propyl)-3'-N-methyl]propyl)aminomethyl]dibenzo [b,j][1,7]phenanthroline **2** :



A solution of dibenzo[b,j][1,7]phenanthroline-2,10-dicarboxyaldehyde **4** (0.200 g, 0.595 mmol, 1.0 eq.) and 3-N-[3-(tert-butoxycarbonylamino)propyl]-3'-N-methyldiaminopropane **3** (0.283 g, 1.153 mmol, 2.1 eq.) in 1,2-dichloroethane (10 mL) was stirred for 30 min at 30 °C, under argon. $NaBH(OAc)_3$ (0.378 g, 1.784 mmol, 3.0 eq.) was then added by portions. The mixture was stirred at 30 °C under argon for 36 h. Saturated aqueous $NaHCO_3$ (10 mL) was then added. The aqueous phase was extracted with dichloromethane (3x10 mL). Organic phases were gathered, washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ (2x15 mL) and concentrated. The resulting solid was purified by flash chromatography (elution with a gradient from CH_2Cl_2 / MeOH 4 / 1 to CH_2Cl_2 / MeOH / NH_4OH aq. 28% 4 / 1 / 0,2). Fractions yielding the Boc-diprotected derivative of **2** were concentrated and deprotected by stirring at rt in MeOH/HCl during 1h30. Addition of ether gave a yellow-green precipitate, which is filtered and dried to give **2** (0.292 g, 60 %)

2 $C_{36}H_{50}N_8$ M = 594.8 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (DCl 0.33M in D_2O): 10.48 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.50 (d, 1H, *J* = 9.6 Hz), 8.17-8.28 (m, 4H), 7.91-8.00 (m, 2H), 4.60 (s, 2H, benzylic CH_2), 4.47(s, 2H, benzylic CH_2), 3.12-3.37 (m, 12H), 2.96-3.02 (m, 4H), 2.85 (s, 3H, N-methyl), 2.82 (s, 3H, N-methyl), 2.22-1.96 (m, 8H).

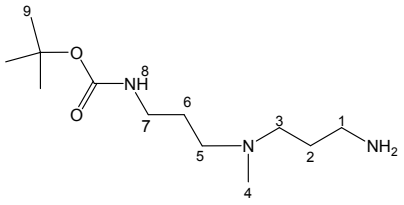
MS (ES) : m/z 298.19 ($[C_{36}H_{50}N_8 + 2H]^{2+}$ /2), m/z 199.22 ($[C_{36}H_{50}N_8 + 3H]^{3+}$ /3)

UV-vis (sodium cacodylate buffer pH6 10 mM, NaCl 10 mM): $\lambda_{max}(\varepsilon)$: 244 (56000), 313 (40000), 328 (48000) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (sodium cacodylate buffer pH6 10 mM, NaCl 10 mM, λ_{exc} = 330 nm): $\lambda_{ém}$ = 424 nm, 445 nm

HPLC (H_2O 97%, CH_3CN 3% TFA 0.1% v/v, 0.5 $mL.min^{-1}$, detection 328 nm) : 1 pic, retention tume 6.6 min.

3-N-[3-(tert-butoxycarbonylamino)propyl]-3'-N-methyldiaminopropane **3** :



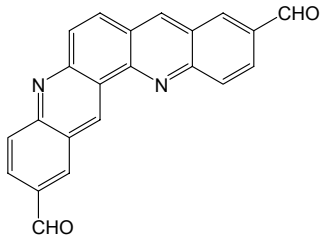
A solution of Boc-anhydride (0.902 g, 4.13 mmol, 1 eq.) in $CHCl_3$ (30 mL) was added dropwise to a solution of 3,3'-diamino-N-methyldipropylamine (3.00 g, 20.66 mmol, 5 eq.) in $CHCl_3$ (45 mL) cooled to 0 °C. The mixture was stirred at rt overnight then filtered. The filtrate was concentrated and purified by flash chromatography (elution CH_2Cl_2 / MeOH / NH_4OH 5 / 4 / 1 v / v) to yield a yellow oil (**3**, 1.26 g, 93 %).

3 $C_{12}H_{27}N_3O_2$ M = 245.4 $g.mol^{-1}$

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 5.33 (broad s, 1H, NH), 3.21 (quadruplet, 2H, J = 6.0 Hz, H_7), 2.80 (t, 2H, J = 6.8Hz, H_1), 2.38-2.45 (m, 4H, H_3 et H_5), 2.23 (s, 3H, H_4), 1.72-1.62 (m, 4H, H_6 et H_2), 1.48 (s, 9H, H_9).

^{13}C NMR ($CDCl_3$):: 156.1, 56.3, 55.6, 42.0, 40.5, 39.8, 30.9, 28.5, 26.9

dibenzo[b,j][1,7]phenanthroline-2,10-dicarboxyaldehyde **4** :



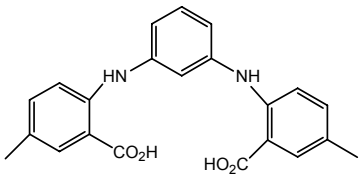
9 (0.500 g, 1.62 mmol, 1 eq.) and selenium dioxide (0.40 g, 3.56 mmol, 2.2 eq.) were mixed with naphtalene (10.0 g). The mixture was refluxed (200-210 °C) for 2 h, and filtered hot. The resulting solid was thoroughly washed with hot $CHCl_3$ / MeOH 1 / 1 v / v. The filtrate was concentrated and the residue was thoroughly washed with pentane to give **4** as a yellow powder (0.409 g, 75 %).

4 $C_{22}H_{12}N_2O_2$ M = 336.3 $g.mol^{-1}$

^{1}H NMR (DMSO): 8.05 (d, 1H, *J* = 9.3 Hz), 8.25-8.40 (m, 4H), 8.50 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 8.94 (s, 1H), 9.17 (s, 1H), 9.36 (s, 1H), 10.29 (s, 1H, CHO), 10.30 (s, 1H, CHO), 10.45 (s, 1H).

MS (CI): *m/z* 337 ($[C_{22}H_{12}N_2O_2+H]^+$)

5,5'-dimethyl-2,2'-(1,3-phenylenediamino)dibenzoic acic **7c**:



Cs_2CO_3 (18.1 g, 55.6 mmol, 3.0 eq.), $Pd(OAc)_2$ (0.166 g, 0.741 mmol, 0.04 eq.), BINAP (0.692 g, 1.112 mmol, 0.06 eq.), 1,3-dibromobenzene (2.24 mL, 18.53 mmol, 1 eq.), 2-amino-5-methylbenzoic acid (7.00 g, 46.3 mmol, 2.5 eq.) et 1,4-dioxane (140 mL) were introduced in a three-necked round-bottom flask under argon and refluxed under argon for 24 h. The mixture was cooled to rt, concentrated and the residue was dissolved MeOH / H_2O 1 / 1 v / v (200 mL). This solution was acidified at pH 5 by addition of concentrated hydrochloric acid. The resulting yellox-grey precipitate was filtered and extracted with ether. Ether was removed under vacuum to give a yellow powder which is a mixture of **7c** and 2-(3-bromo-phenylamino)-5-methyl-benzoic acid. This solid is purified by precipitation in EtOH / H_2O 4 / 1 v / v to give **7c** as a yellow powder (4.06g, 58%).

7c $C_{22}HN_2O_4$ M = 376.4 g.mol^{-1}

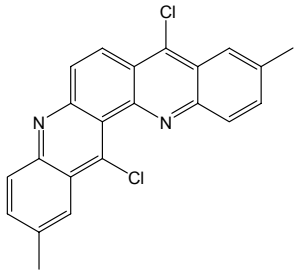
^{1}H NMR (DMSO): 2.23 (s, 6H, CH_3), 6.84 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 2.1Hz, 2H), 7.01 (s, 1H), 7.23-7.28 (m, 5H), 7.71 (s, 2H), 9.42 (broad s, 2H), 13.02 (broad s, 2H).

^{13}C NMR (DMSO): 20.4, 111.9, 113.8, 114.6, 115.6, 127.1, 130.8, 132.1, 135.3, 142.8, 144.6, 170.2

mp > 260°C[1]

[1] Litt : mp ≥ 260 °C (Baudoin O., Teulade-Fichou M.-P., Vigneron J.-P., Lehn J.-M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5458-5470).

8,14-dichloro-2,10-dimethyldibenzo[b,j][1,7]phenanthroline **8**:



$POCl_3$ (60 mL) is added to **7c** (15.65 mmol, 5.89 g) in a three-necked round-bottom flask under argon. The mixture was refluxed for 3h 30, the argon flow being replaced by a $CaCl_2$ gard. $POCl_3$ was then removed under vacuum. The residue was dissolved in CH_2Cl_2 (600 mL) and the resulting black solution was poured dropwise in 15 % aqueous ammoniac (180 mL). The resulting yellow precipitate was filtered and washed with pentane (**8**, 4.14 g, 70 %).

8 $C_{22}H_{14}N_2Cl_2$ M = 377.3 g.mol^{-1}

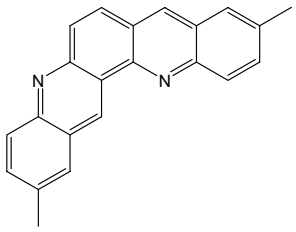
^{1}H NMR ($CDCl_3$): 2.72 (s, 3H, CH_3) , 2.73 (s, 3H, CH_3), 7.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 8.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H) , 8.45 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 8.58 (s, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 22.2, 22.3, 121.5, 122.9, 123.0, 124.4, 124.5, 126.9, 129.2, 130.2, 131.0, 133.0, 133.7, 137.9, 138.6, 138.9, 141.9, 145.3, 147.1, 147.3, 150.9

mp: 260°C[2]

[2] Litt : mp = 260 °C (Baudoin O., Teulade-Fichou M.-P., Vigneron J.-P., Lehn J.-M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5458-5470).

2,10-dimethyldibenzo[b,j][1,7]phenanthroline **9** :



A solution of $LiAlH_4$ (3.33g, 87.7 mmol, 8 eq.) in THF (80 mL) was refluxed under argon and a solution of **8** (4.135 g, 11.0 mmol, 1 eq.) in THF (200 mL) was added dropwise. The mixture was refluxed overnight then cooled 0 °C. Water (3.4 mL), 15 % aqueous NaOH (3.4 mL) and water (10.1 mL) were successively added.[3] The mixture was vigorously stirred for 20 min and filtered. The resulting precipitate was washed with $CHCl_3$ until decoloration. The organic phase, which contained a mixture of **9** and hemireducted products, was concentrated. The resulting solid was refluxed in EtOH (200 mL). A solution of $FeCl_3$, 6 H_2O (9.74 g, 36.3 mmol, 3.3 eq.) in water (35mL) was added and the mixture was refluxed overnight. The solution was cooled to 0 °C and 15 % aqueous ammoniac (10 mL) was added. The resulting precipitate was filtered, the filtrate aqueux was extracted with CH_2Cl_2 (4x100 mL), the precipitate was washed with CH_2Cl_2 (500 mL) Organic phases were gathered, washed with water (3x30 mL), dried on $MgSO_4$ and concentrated. The residue was chromatographed on alumine (elution CH_2Cl_2). The resulting fractions are precipitated in CH_2Cl_2 / to give **9** as a white powder (1.38 g, 41 %).

9 $C_{22}H_{16}N_2$ M = 308.4 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 2.68 (s, 3H, CH_3), 2.69 (s, 3H, CH_3), 7.75 (d, *J* = 8.75 Hz, 2H), 7.85 (s, 1H), 7.98 (s, 2H), 8.03 (s, 1H), 8.24 (d, 1H, *J* = 8.7Hz), 8.34 (d, 1H, *J* = 8.7Hz), 8.58 (s, 1H), 10.15 (s, 1H).

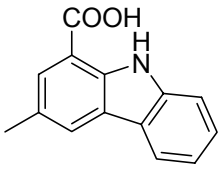
^{13}C NMR ($CDCl_3$): 21.79, 21.83, 124.5, 125.7, 126.4, 127.0, 127.3, 127.5, 128.7, 129.2, 130.6, 132.6, 132.7, 133.2, 134.2, 136.2, 136.3, 146.3, 147.1, 147.7, 150.3

mp : 230°C[4]

[3] Micovic, M. M.; Mihailovic M.L.J.; *J.Org.Chem.* **1953**, *18*, 1190-1200

[4] Litt : mp = 230 °C (Baudoin O., Teulade-Fichou M.-P., Vigneron J.-P., Lehn J.-M. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5458-5470).

3-Methyl-9H-carbazole-1-carboxylic acid **12**



2-amino-5-methylbenzoïc acid (1.60 g, 10.6 mmol, 2.5 eq.), cesium carbonate (6.90 g, 21.2 mmol, 5 eq.), $Pd(OAc)_2$ (0.057 g, 0.254 mmol, 0.06 eq.) and BINAP (0.238 g, 0.382 mmol, 0.09 eq.) were introduced in a three-necked round-bottom flask. The mixture was degassed, dioxane (20 mL) and 1,2-dibromobenzene (0.51 mL, 1.00 g, 4.24 mmol, 1.0 eq.) were added. The mixture was refluxed under argon for 25 h. Dioxane was then removed *under vacuum*, the residue was dissolved in 50 mL of MeOH / H_2O 1/1 v/v and pH was ajusted to 4-5 by adding concentrated hydrochloric acid. The resulting precipitate was extracted with ether. Ether was removed *under vacuum* and the residu was recrystallised in EtOH / H_2O to give **12** as a pale rose solid (0.819 g, 86 % yield).

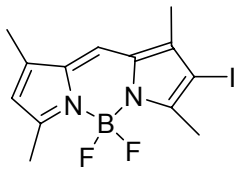
12 $C_{14}H_{11}NO_2$ $M = 225.2\ g.mol^{-1}$

^{1}H NMR (CD_2Cl_2/MeOD): 2.53 (s, 3H, CH_3), 7.20 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 8.04 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.08 (s, 1H), 10.11 (br s, NH).

^{13}C NMR (CD_2Cl_2/CD_3OD): 22.5 (CH_3), 113.0, 113.8, 121.3, 122.0, 124.1, 126.7, 127.4, 128.1, 129.8, 130.6, 140.3, 142.1 (C arom.) 171.2 (COOH).

MS-FAB$^+$: m/z 225 (100 %) [M^+].

4-iodo-3,3',5,5'-tetramethyl-2,2'-pyrromethen-1,1'-BF_2 complex (iodo-BODIPY) **15**



2,4-dimethylpyrrole (0.151 mL, 0.140 g, 1.474 mmol, 1 eq.) was added to a solution of 4-iodo-3,5-dimethyl-1*H*-pyrrole-2-carbaldehyde **18** (0.367 g, 1.474 mmol, 1 eq.) in CH_2Cl_2 / pentane 1/1 v/v (4 mL) cooled to 0-5 °C under argon. Phosphorus oxychloride (0.137 mL, 0.226 g, 1.474 mmol, 1 eq.) was then added dropwise. The mixture was stirred for 5 min, the resulting product was precipitated with pentane and filtrated. ^{1}H NMR shows the formation of the excepted dipyrromethene together with traces of deiodinated product. This compound was dissolved in 20mL of toluene, under argon. Triethylamine (0.616 mL, 0.447 g, 4.421 mmol, 3 eq.) was added, the mixture was stirred for 10 min and $BF_3(OEt)_2$ was added. The reaction mixture was then stirred at rt for 15 min, diluted with ethyl acetate, washed with 2x10 mL of water and dried on Na_2SO_4. The product was purified by flash chromatography (silica gel 25 g, elution from pentane / CH_2Cl_2 3/1 to pentane / CH_2Cl_2 1/1) to give **15** as a red powder (75 mg, 15 % yield).

15 $C_{13}H_{14}IN_2BF_2$ M = 374.0 g.mol^{-1}

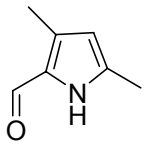
^{1}H NMR ($CDCl_3$): 2.26 (s, 3H, CH_3), 2.30 (s, 3H, CH_3), 2.58 (s, 3H, CH_3), 2.62 (s, 3H, CH_3), 6.15 (s, 1H), 7.11 (s, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 11.4 (CH_3), 13.6 (CH_3), 14.9 (CH_3), 15.5 (CH_3), 80.6 (C-I), 120.1, 120.2, 132.2, 134.1, 142.3, 143.3, 156.2, 159.1

MS (CI): m/z 375 (100%) $[M+H]^+$; m/z 355 (80 %) $[M-F+H]^+$; m/z 248 (30 %) $[M-I+H]^+$

Rf (pentane/CH_2Cl_2 1/1): 0.53

3,5-Dimethyl-pyrrole-2-carbaldehyde **17**



A solution of oxalyl chloride (3.2 mL, 37.8 mmol, 1.1 eq.) in 1,2-dichloroethane (17 mL) was added dropwise to a solution of DMF (2.9 mL, 37.8 mmol, 1.1 eq.) in 1,2-dichloroethane (33mL) at 0°C under nitrogen. The mixture was warmed up to room temperature, stirred for 30 min and cooled to 0 °C. A solution of 2,4-dimethylpyrrole (3.54 mL, 34.4 mmol, 1.0 eq.) in dichloroethane was then added dropwise. The mixture was stirred for 1 h at rt then poured slowly into a cold saturated Na_2CO_3 solution. The aqueous phase was extracted with ether, the organic phase was washed with water, dried on Na_2SO_4. Removal of the solvent under vacuum afforded **17** as a black solid (83 % yield).

17 C_7H_9NO M = 123.1 g.mol^{-1}

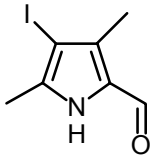
^{1}H NMR ($CDCl_3$): 2.31 (s, 3H), 2.33 (s, 3H), 5.86 (s, 1H), 9.47 (s, 1H, CHO)
^{13}C NMR ($CDCl_3$): 10.6, 13.1, 112.0, 128.8, 134.8, 138.6, 175.9

MS (CI): m/z 124 (100 %) [M+H$^+$] ; m/z 141 (15%) [M+NH_4^+]

mp : 89 °C[5]

[5] Litt 95-99°C (Sigma-Aldrich)

4-Iodo-3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde **18**



A mixture of 3,5-dimethyl-pyrrole-2-carbaldehyde **17** (2.50 g, 20.3 mmol, 1 eq), I_2 (5.67 g, 22.3 mmol, 1.1 eq.) and K_2CO_3 (4.21 g, 30.5 mmol, 1.5 eq.) was cooled to 0 °C. Methanol (50 mL) was added and the mixture was stirred at 0 °C under nitrogen overnight. The mixture was then diluted with ether, washed with satured sodium thiosulfate and dried on Na_2SO_4. The solvent was removed *under vacuum* and the residue was precipitated in a mixture of dichloromethane and hexane to give **18** as a dark powder (3.54 g, 70 %).

18 C_7H_8INO M = 249.1 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 2.32 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 9.54 (s, 1H, CHO)

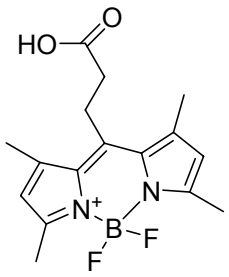
^{13}C ($CDCl_3$): 12.6 (CH_3), 14.4 (CH_3), 72.6 (C-I), 129.1, 136.4, 139.5, 176.2 (CHO)

MS (CI): m/z 250 (100%) [M+H$^+$] ; m/z 267 (20%) [M+NH_4^+].

mp: 166 °C[6]

[6] Litt : mp = 161-163 °C (Wan, C. W.; Burghart, A.; Chen, J.; Bergstrom, F.; Johansson, L. B. A.; Wolford, M. F.; Kim, T. G.; Topp, M. R.; Hochstrasser, R. M.; Burgess, K. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4430-4441.).

4-(4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-yl)butanoïc acid **21**



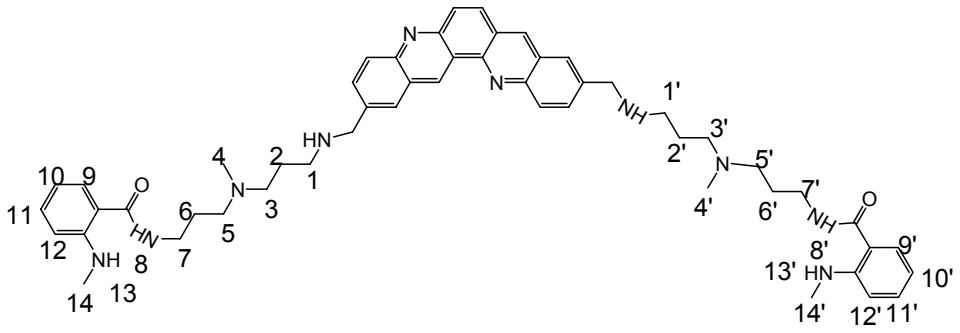
2,4-dimethylpyrrole (1.03 mL, 0.951 g, 10 mmol, 2.0 eq.) was added to a suspension of succinic anhydride (0.500 g, 5 mmol, 1.0 eq.) in dry dichloromethane (83 mL). The mixture darkens as boron trifuoride diethyl etherate (0.89 mL, 0.994 g, 7.0 mmol, 1.4 eq.) was added dropwise. After the end of the addition, the mixture was refluxed under nitrogen for 6 h, then cooled to rt. Boron trifuoride diethyl etherate (4.25 mL, 4.75 g, 33.5 mmol, 6.7 eq.) and triethylamine (3.48 mL, 2.53 g, 25 mmol, 5.0 eq.) were successivly added dropwise. The mixture was stirred at rt overnigth. The reaction was then quenched by addition of water, the mixture was washed with 3x30 mL of water. The organic phase was dried on Na_2SO_4, and the residue was purified by two successive flash chromatographies (silica gel 100 g, elution with hexane / EtOAc from 2/1 to 1/1 then silica gel 2 g elution with hexane / EtOAc 1/1) to give **21** as a dark red powder (52 mg, 3.3 % yield).

21 $C_{16}H_{19}BF_2N_2O_2$ M = 320.1 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 2.48 (s, 3H, CH_3), 2.56 (s, 3H, CH_3), 2.69 (t, 2H, J = 8.7 Hz), 3.36 (t, 2H, J = 8.7 Hz), 6.11 (s, 2H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 14.2, 14.5, 16.3, 23.4, 122.1, 131.2, 140.4, 142.8, 154.9, 177.0

2,10-Di[[(3-N-(3-(2-methylamino-benzamide)-propyl)-3'-N-methyl]propyl)aminomethyl]dibenzo[b,j][1,7]phenanthroline **22 :**



Triethylamine (100 µL) was added to a solution of the chlorhydrate of **2** (0.050 g, 0.0564 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (2 mL). The mixture was protected from light and stirred at rt for 2 h. A solution of N-méthylisatoic anhydride in CH_2Cl_2 (1 mL) was then added. The mixture was stirred for 3 h 30, concentrated and taken up in CH_2Cl_2 (15 mL). The resulting solution was washed with aquous NaOH (pH 9-10, 3x5 mL). The organic phase was then extracted with diluted hydrochloric acid (pH 2, 5 mL). This acidic solution was basified to pH 9-10 by dropwise addition of NaOH 1M and extracted with CH_2Cl_2 (3x15 mL). The organic phase is concentrated to yield **22** (18 mg, 37 %).

22 $C_{52}H_{64}N_{10}O_2$ M = 861.1 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 10.20 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.38 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 8.29 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 8.11 (s, 1H), 8.00 (s, 2H), 7.92 (s, 1H), 7.83 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.37-7.30 (m, 4H), 6.67 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 6.59 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz), 6.58 (t, 1H, *J* = 7.2 Hz), 3.99 (s, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.53-3.47 (m, 4H), 2.88 (d, 3H, *J* = 1.8 Hz), 2.86 (d, 3H, *J* = 1.5 Hz), 2.76 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 2.75 (t, 2H, *J* = 6.6 Hz), 2.60-2.49 (m, 8H), 2.33 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 1.76-1.80 (m, 8H).

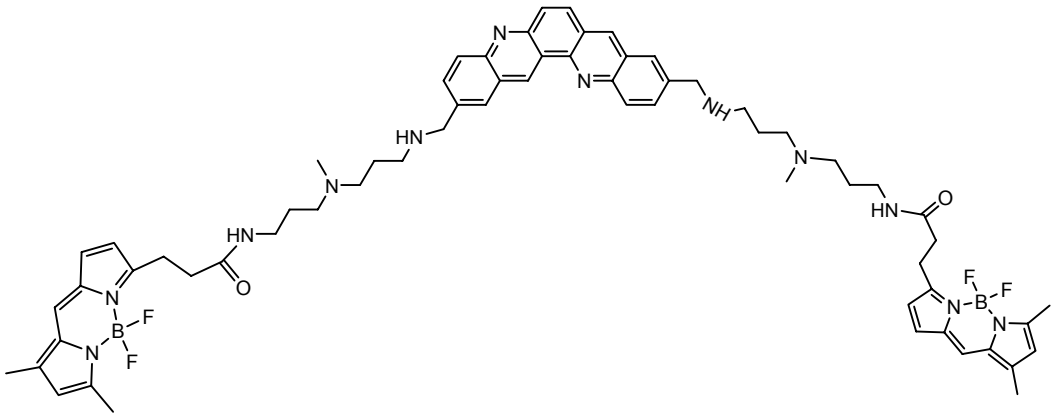
HRMS (ESI) : calculated m/z 861.5214 ($[C_{52}H_{64}N_{10}O_2 + H]^+$), m/z 431.2686 ($[C_{52}H_{64}N_{10}O_2 + 2H]^{2+}$ /2)

Found m/z 861.5305 ($[C_{52}H_{64}N_{10}O_2 + H]^+$), m/z 431.2698 ($[C_{52}H_{64}N_{10}O_2 + H]^{2+}$ /2)

UV/vis (sodium cacodylate buffer pH6 10 mM, NaCl 10 mM) : $\lambda_{max}(\varepsilon)$: 244 (51000), 318 (34000), 328 (41000) nm (cm^{-1}M^{-1}).

Fluorescence (sodium cacodylate buffer pH6 10 mM, NaCl 10 mM, λ_{exc} = 328 nm): $\lambda_{ém}$ = 443 nm.

2,10-Di[[(3-N-(3-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propylamide)-propyl)-3'-N-methyl]propyl)aminomethyl]dibenzo[b,j][1,7]phenanthroline **23 :**



Triethylamine (10 µL) was added to a suspension of **2** (chlorhydrate form, 5.0 mg, 5.64 µmol) in DMF (500 µL). The mixture was protected from light and stirred at rt for 1 h 30 then a solution of succinimidyl ester of 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene-3-propionic acid (Bodipy® FL , SE, 5.0 mg, 12.84 µmol, 2.3 eq.) in DMF (400 µL) was added. The mixture was stirred in the dark at rt for 4 h. Once the reaction completed, as checked by TLC, the reaction mixture was poured in CH_2Cl_2. Organic phase was washed with diluted aqueous NaOH (pH 8-9), concentrated and purified by flash chromatography on silica gel (elution with a gradient from CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2/MeOH/NH_4OH aq. 28% 80/20/2 v/v/v). The resulting fractions were concentrated to yield a red solid (3.4 mg, 53% yield). NMR and mass analysis showed the presence of **23** as the main product, with secondary products.

23 $C_{64}H_{76}B_2F_4N_{12}O_2$ M = 1143.0 g.mol^{-1}

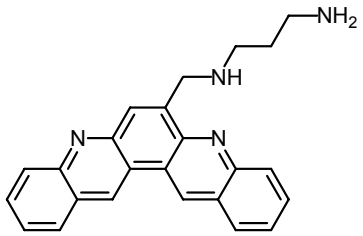
^{1}H NMR ($CDCl_3$): 9.87 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.28-8.31 (m, 2H), 8.14-8.11 (m, 2H), 8.02-7.75 (m, 8H), 7.02 (d), 6.87 (t), 6.30-6.36 (m), 6.07(d), 4.27(s), 4.20(s), 4.17(s), 3.19-3.35 (m), 2.89-3.00(m), 2.65-2.72 (m), 2.53-2.60(m), 2.42(d), 2.29(s), 2.21-2.18 (m), 2.04 (broad s), 1.6 (broad s).

MS (MALDI-TOF): m/z 1047.52 ([$C_{64}H_{76}B_2F_4N_{12}O_2$ –B_2F_4 + 2H]), m/z 1273.56 ([$C_{78}H_{89}B_3F_6N_{14}O_3$ –B_3F_6 + 3H]),m/z 821.42 ([$C_{50}H_{63}BF_2N_{10}O$ –BF_2 + H]).

UV/vis (sodium cacodylate buffer pH6 10 mM, NaCl 10 mM) : $\lambda_{max}(\varepsilon)$: 226 (45000), 246 (46000), 328 (46000), 481 (43000), 507 (44000) nm (cm^{-1}M^{-1}).

Fluorescence (sodium cacodylate buffer pH6 10 mM, NaCl 10 mM, λ_{exc} = 328nm) : $\lambda_{ém}$ = 442 nm, 518 nm.

6-[(3-aminopropyl)aminomethyl]dibenzo[b,j][4,7]-phenanthroline **27:**

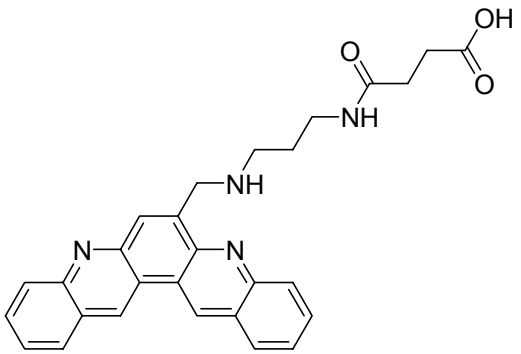


A solution of 6-[bromomethyl]dibenzo[b,j][4,7]-phenanthroline (52.4 mg, 0.140 mmol) in 1,3-diaminopropane was heated for 2 hours at 70°C. The amine was removed under vacuum, the resulting solid was taken up in 10 mL CH_2Cl_2 and washed with 2x2 mL aqueous Na_2CO_3. The aqueous phase was extracted with 5 mL CH_2Cl_2. Organic phases were gathered, solvent was removed *under vacuum* to give **27** as a brown powder (40 mg, 78 % yield), which was used without further purification.

27 $C_{24}H_{22}N_4$ M = 366.5 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1.73 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.01 (br s, NH_2), 2.77-2.83 (m, 4H), 4.35 (s, 2H), 7.53-7.63 (m, 2H), 7.74 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.93-7.99 (m, 3H), 8.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 9.10 (d, *J* = 13.5 Hz, 2H).

6-[3-aminopropyl)aminomethyl]dibenzo[b,j][4,7]-phenanthroline **28**



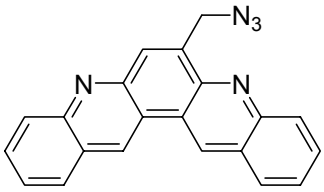
Succinic anhydride (12 mg, 0.120 mmol, 1.1 eq.) was added to a solution of 6-[(3-aminopropyl)aminomethyl]dibenzo[b,j][4,7]-phenanthroline **27** (40 mg, 0.109 mmol, 1 eq.) in DMF (2 mL). The mixture was stirred at rt overnight. DMF was removed under vacuum and the crude product was recrystallised in a mixture of methanol and acetone to give **28** as a yellow brown powder (23 mg, 45 % yield).

28 $C_{28}H_{26}N_4O_3$ M = 466.5 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1.87 (br s, 2H), 2.30 (d, 2H), 2.38 (d, 2H), 3.06 (br s, 2H), 4.63 (s, 2H), 7.61 (m, 2H), 7.77 (d, 2H), 8.06-8.24 (m, 5H), 9.48 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H)

MS (FAB+): m/z 467.2 (100%) $[M+H]^+$

6-[azidomethyl]dibenzo[b,j][4,7]-phenanthroline **29**



A solution of 6-[bromomethyl]dibenzo[b,j][4,7]-phenanthroline **26** (70 mg, 0.188 mmol, 1 eq.) and sodium azide (19 mg, 0.281 mmol, 1.5 eq.) in DMF (1 mL) was heated to 80 °C under argon in the dark during 1 h 15. DMF was removed *under vacuum*, the residue was taken up in 10 mL CH_2Cl_2, washed with 3x2 mL of water, dried with Na_2SO_4. Dichloromethane was removed under vacuum to give **29** as a yellow grey powder (63 mg, quantitative yield).

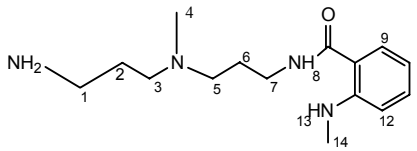
29 $C_{21}H_{13}N_5$ M = 335.4 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 5.23 (s, 2H, CH_2), 7.70-7.76 (m, 2H), 7.92 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 8.30 (s, 1H), 8.36 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 9.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H).
^{13}C NMR ($CDCl_3$): 52.1, 123.3, 123.6, 126.5, 126.6, 126.9, 127.1, 127.9, 128.1, 129.2, 129.8, 130.1, 130.3, 130.4, 130.5, 132.4, 139.0, 147.0, 147.6, 148.3

IR (KBr pellets): 2107 ($\nu_{N\equiv N}$), 2342, 2361 cm^{-1}

MS (CI+): m/z 336 (100%) $[M+H]^+$; m/z 308 (20%) $[M-N+H]^+$; m/z 295 (45%) $[M-N_3+H]^+$

N-{3-[(3-Amino-propyl)-methyl-amino]-propyl}-2-methylamino-benzamide **30**:



A solution of N-methylisatoic anhydride (1.50 g, 8.47 mmol, 1 eq.) in dioxane (80 mL) was added dropwise to a solution of 3,3'–diamino–N-methyldipropylamine (5.53 g, 38.1 mmol, 4,5 eq.) in dioxane (85 mL). The mixture was stirred overnight at RT. Dioxane was removed under vacuum, the residu was taken up in water (120 mL) and filtered. Aqueous phase was extracted with dichloromethane (4x100 mL). Organic phase was washed with water (3x30 mL) and concentrated to yield **30** with traces of disubstitution product, as an orange oil (1.82 g, 77 %). The product was used without further purification.

30 $C_{15}H_{26}N_4O$ M = 278.4 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 8.12 (broad s, 1H, NH), 7.71 (broad s, 1H, NH), 7.30-7.35 (m, 2H), 6.69 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 6.59 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 3.53 (dd, 2H, J_1 = 6.0 Hz, J_2 = 5.1 Hz, H_7), 2.89 (d, 3H, J = 5.1 Hz, H_{14}), 2.73 (t, 2H, J = 9 Hz, H_1), 2.56 (t, 2H, J = 6.0 Hz, H_5), 2.48 (t, 2H, J = 7.3 Hz, H_3), 2.30 (s, 3H, H_4), 1.79 (quintuplet, 2H, J = 6.0 Hz, H_6), 1.65 (quintuplet, 2H, J = 7.2 Hz, H_2).

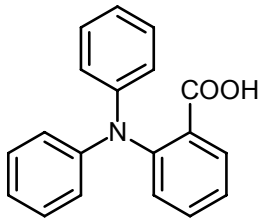
^{13}C NMR ($CDCl_3$): 170.0 (carbonyl), 150.7 (C_{Ar}), 132.5 (C_{Ar}), 127.4 (C_{Ar}), 115.3 (C_{Ar}), 114.3 (C_{Ar}), 111.0 (C_{Ar}), 57.1, 56.4, 42.0, 40.7, 39.6, 29.72, 29.67, 25.6

MS (CI): *m/z* 279 ($[C_{15}H_{26}N_4O+H]^+$)

UV/vis (sodium cacodylate buffer pH 6 10 mM, NaCl 10 mM): $\lambda_{max}(\varepsilon)$: 251 (6100), 331 (2400) nm (cm^{-1}M^{-1}).

Fluorescence (sodium cacodylate buffer pH6 10 mM, NaCl 10 mM, λ_{exc} = 330 nm): $\lambda_{ém}$ = 436 nm.

2-diphenylamino-benzoic acid **48**



A mixture of 2-amino-benzoïc acid (2.00 g, 14.6 mmol, 1.0 eq.), iodobenzene (16.2 mL, 29.6 g, 145 mmol, 10 eq.), copper bronze (0.232 g, 3.65 mmol, 0.25 eq.), CuI (0.557 g, 2.92 mmol, 0.2 eq.), K_2CO_3 (7.04 g, 51.0 mmol, 3.5 eq.) and *n*-pentanol (8 mL) was stirred at 130 °C for 2h30. After removing pentanol and unreacted iodobenzene under vacuum, methanol was added and the mixture was neutralized by adding MeOH, HCl. The methanol was removed and the residue was purified by flash chromatography (silica gel, 150 g, elution with 10 % methanol in dichloromethane). Two fractions were made and recrystallized from ethanol. The first fraction (1.455 g, 38 % yield) gave **48** as bright yellow crystals, the second fraction (0.370 g, 12 % yield) was containing traces of a brown impurity.

48 $C_{19}H_{15}NO_2$ M = 289.3 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (MeOD): 6.92-6.97 (m, 6H), 7.15-7.28 (m, 6H), 7.50 (dt, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.74 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H).

^{13}C NMR (MeOD): 121.8, 122.5, 124.3, 128.6, 129.2, 130.1, 130.9, 132.4, 146.7, 147.9, 169.1

mp: 211 °C[7]

Rf (CH_2Cl_2/MeOH 98/2): 0.12

IR (KBr pellets): 1493 (Ar), 1589 (Ar), 1692 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1}

Microanalysis: calcd for $C_{19}H_{15}NO_2$ C, 78.87 ; H, 5.23 ; N, 4.84

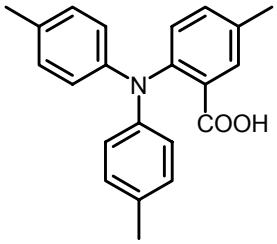
found C, 78.93 ; H, 5.39 ; N, 4.87

UV-vis (EtOH) : λ (ε) = 300 (20400) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (EtOH, λ_{exc} 305nm) λ_{em} 448 nm

[7] litt 208 °C *:* Goldberg I.*, Chem. Ber.* **1907***, 2448*.

5-(di-p-tolyl-amino)-2-methyl-benzoic acid **49**:



A mixture of 2-amino-5-methyl-benzoïc acid (0.25 g, 1.65 mmol, 1.0 eq.), 4-iodotoluene (3.61 g, 16.5 mmol, 10 eq.), copper bronze (0.026 g, 0.414 mmol, 0.25 eq.), CuI (0.063 g, 0.331 mmol, 0.2 eq.), K_2CO_3 (0.800 g, 5.79 mmol, 3.5 eq.) and n-pentanol (8 mL) was stirred under reflux for 4 h. After removing the solvent under vacuum, 10 mL of methanol / water 1/1 v/v were added. The solution was acidified by addition of HCl 1N. The dark precipitate that had appeared was filtered and washed thoroughly with ether. The ether fractions were combined and purified by flash chromatography (silica gel, 30 g, elution with 2 % methanol in dichloromethane). After recrystallization in ethanol, **49** was obtained as bright yellow crystals (0.226 g, 41 % yield).

49 $C_{22}H_{21}NO_2$ M = 331.16 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (MeOD): 2.26 (s, 6H), 2.37 (s, 3H), 6.82 (d, J = 8.4Hz, 4H), 6.98-7.02 (m, 5H), 7.28 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H).

^{13}C NMR (MeOD): 19.5, 122.3, 128.7, 129.0, 130.9, 131.1, 133.0, 133.9, 144.5, 145.7, 169.5

Rf (CH_2Cl_2MeOH 98/2): 0.35

mp: 190 °C

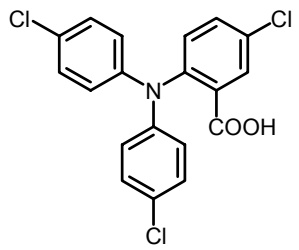
IR (KBr pellets): 1508 (Ar), 1608 (Ar), 1691 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1}

Microanalysis: calcd for $C_{22}H_{21}NO_2$ C, 79.73; H, 6.39; N, 4.23; O, 9.66;
found C, 79.61; H, 6.41; N 4.41

UV-Vis EtOH : λ (ε) = 302 (25200) nm (cm^{-1}M^{-1})
Sodium cacodylate buffer pH 6 10mM : λ (ε) = 299 (19900) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (EtOH, λ_{exc} 300 nm) λ_{em} 467 nm
(Sodium cacodylate buffer pH 6.0 10mM, λ_{exc} 300 nm) λ_{em} 525 nm

2-[Bis-(4-chloro-phenyl)-amino]-5-chlorobenzoïc acid **50:**



A mixture of 2-amino-5-chloro-benzoïc acid (0.700 g, 4.08 mmol, 1.0 eq.), 4-chloroiodobenzene (9.73 g, 40.8 mmol, 10 eq.), copper bronze (0.065 g, 1.02 mmol, 0.25 eq.), CuI (0.156 g, 0.816 mmol, 0.2 eq.), K_2CO_3 (1.97 g, 14.3 mmol, 3.5 eq.) and *n*-pentanol (25 mL) was stirred under reflux for 1 h 30. After removing the solvent under vacuum methanol was added and the mixture was neutralized by adding MeOH, HCl. Methanol was removed and the residue was purified by flash chromatography (silica gel, 85 g, elution with 10 % methanol in dichloromethane). Two fractions were made and recrystallized from acetonitrile. The first fraction (0.876 g, 55 % yield) gave **50** as bright yellow crystals, the second fraction (0.370 g, 23 % yield) was containing traces of a brown impurity.

50 $C_{19}H_{12}Cl_3NO_2$ M = 392.7 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 6.91 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.16 (d, *J* = 8.7Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H), 7.50 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.89 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 123.8, 127.4, 128.9, 130.3, 130.8, 131.0, 132.7, 144.5, 145.9, 167.02

Rf (CH_2Cl_2MeOH 90/10): 0.66

mp: 204 °C

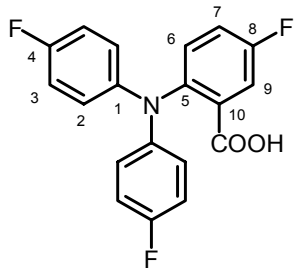
IR (KBr pellets): 1490 (Ar), 1586 (Ar), 1702 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1}

Microanalysis: calcd for $C_{19}H_{12}Cl_3NO_2$ C, 58.12; H, 3.08; N, 3.57
found C, 58.21; H, 3.06; N 3.75

UV-vis: EtOH λ (ε) = 307 (28100) nm (cm^{-1}M^{-1})
Sodium cacodylate buffer pH 6 10 mM λ (ε) = 304 (27800) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (EtOH, λ_{exc} 305 nm) λ_{em} 450 nm
(H_2O, λ_{exc} 305 nm) λ_{em} 513 nm

2-[bis-(4-fluoro-phenyl)-amino]-5-fluorobenzoïc acid **51***:*



A mixture of 2-amino-5-fluoro-benzoïc acid (0.093 g, 0.60 mmol, 1.0 eq.), 4-iodofluorobenzene (1.33 g, 6.0 mmol, 10 eq.), copper bronze (10 mg, 0.15 mmol, 0.25 eq.), CuI (0.023 g, 0.12 mmol, 0.2 eq.), K_2CO_3 (0.29 g, 2.1 mmol, 3.5 eq.) and *n*-pentanol (4 mL) was stirred under reflux for 1h30. After removing the solvent *under vacuum* methanol was added and the mixture was neutralized by adding MeOH, HCl. The methanol was removed *under vacuum*, the residue was dissolved in dichloromethane and filtrated on silica gel to remove traces of copper. The filtrate was evaporated and **51** was obtained as a yellow powder after precipitation in a diethyl ether / pentane mixture, with 48 % yield.

51 $C_{19}H_{12}F_3NO_2$ M = 343.3 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (MeOD): 6.90-6.99 (m, 8H), 7.16-7.27 (m, 2H), 7.46 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 115.2 (C_3, *J* = 22.6 Hz), 117.2 (C_9, *J* = 24.1 Hz), 119.3 (C_7, *J* = 22.6 Hz), 123.7 (C_2 ou C_6), 123.8 (C_2 ou C_6), 131.1 (*J* = 8.3 Hz, C_{10}), 142.7 (*J* = 3.0 Hz, C_5), 144.2 (*J* = 2.2 Hz, C_1), 158.3 (*J* = 240 Hz, C_4), 159.4 (*J* = 229 Hz, C_8), 167.5 (COOH)

Rf (CH_2Cl_2MeOH 95/5): 0.74

mp: 200 °C

MS (CI): m/z 344 (100%) $[M+H]^+$, m/z 326 (10%) $[M-F+H]^+$

IR (KBr pellets) : 1501 (Ar), 1701 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1}

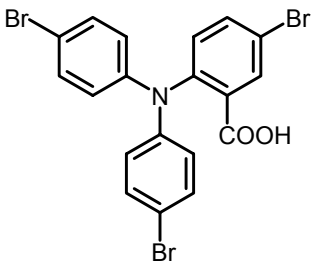
UV-vis: EtOH : λ (ε) = 292 (15900) nm (cm^{-1}M^{-1})

Sodium cacodylate buffer pH 6 10 mM : λ (ε) = 289 (16300) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (EtOH, λ_{exc} 300 nm) λ_{em} 460 nm

(Sodium cacodylate buffer pH 6 10 mM, λ_{exc} 305 nm) λ_{em} 515 nm.

2-[bis-(4-bromo-phenyl)-amino]-5-bromo-benzoic acid **52:**



A mixture of 2-amino-5-bromo-benzoïc acid (1.20 g, 5.55 mmol, 1.0 eq.), 1-bromo-4-iodobenzene (15.7 g, 55.5 mmol, 10 eq.), copper bronze (0.088 g, 1.39 mmol, 0.25 eq.), CuI (0.212 g, 1.11 mmol, 0.2 eq.), K_2CO_3 (2.68 g, 19.4 mmol, 3.5 eq.) and *n*-pentanol (45 mL) was stirred at 130 °C for 3h45. After removing pentanol under vacuum methanol was added and the mixture was neutralized by adding HCl 6 M. The methanol was removed and the residue was washed with pentane to remove insoluble impurities. The pentane was removed and the resulting yellow solid purified by flash chromatography (silica gel, 150 g, elution with dichloromethane) to give a yellow solid containing **52** and a small amount (5% mol. as estimated by ^{1}H NMR) of the mono-iodinated product. This solid was recrystallised in acetonitrile (1.77 g, 60.8 % yield).

52 $C_{19}H_{12}Br_3NO_2$ M = 526.0 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 6.85 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.65 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 115.8, 118.3, 124.4, 131.2, 132.3, 135.2, 137.0, 145.7, 146.1, 168.5

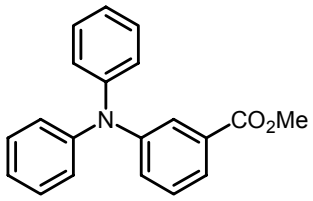
Rf (CH_2Cl_2/MeOH 98/2) : 0.35

IR (KBr pellets) : 1490 (Ar), 1579 (Ar), 1697 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1}

MS (CI): m/z 527.0 (100%) $[M+H]^+$, m/z 574 (15%) $[M-Br+I+H]^+$, m/z 448 (15%)$[M-Br+2H]^+$.

HRMS (DCI+) calcd for $C_{19}H_{13}Br_3NO_2$, 523.8496 ($^{79}Br)_3$, 525.8477 ($^{79}Br)_2$+^{81}Br, 527.8458 ($^{81}Br)_2$+^{79}Br, 529.8441 ($^{81}Br)_3$; found 523.8497, 525.8480, 527.8442, 529.8433

3-Diphenylamino-benzoic acid methyl ester **53:**



Methyl-3-aminobenzoate (3.00 g, 19.85 mmol, 1 eq.), $Pd(OAc)_2$ (0.223 g, 0.993 mmol, 0.05 eq.) and Cs_2CO_3 (9.70 g, 29.77 mmol, 1.5 eq.) were introduced in a reaction flask previously filled with nitrogen. The mixture was degassed for 5 min by sonication under nitrogen, then toluene (44 mL, 2 mL/mmol halide), bromobenzene (2.30 mL, 21.8 mmol, 1.1 eq., degassed prior to use) and $P(^tBu)_3$ (2.43 mL of a 10% wt solution in hexane, 0.794 mmol, 0.04 eq.) were added. The mixture was heated to reflux under argon. The reaction evolution was followed by TLC. After one night, the methyl-3-aminobenzoate was consumed. A second portion of Cs_2CO_3 (1.5 eq.) and bromobenzene (1.1 eq.) was then added. After 24 h, the reaction was completed. The mixture was diluted with ethyl acetate, washed with 2x30 mL HCl 0.1 M and 30 mL of water. The organic layer was concentrated and chromatographed with pentane / CH_2Cl_2 2/1 to give **53** (5.33 g, 88% yield) as a colorless oil.

53 $C_{20}H_{17}NO_2$ M = 303.4 $g.mol^{-1}$

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.89 (s, 3H, OMe), 7.06-7.13 (m, 6H), 7.27-7.36 (m, 6H), 7.69 (dt, *J* = 7.2 Hz, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 52.1, 123.3, 123.5, 124.4, 124.5, 128.1, 129.3, 129.4, 131.4, 147.5, 148.2, 167.0

Rf (pentane/CH_2Cl_2 2/1): 0.30

IR (NaCl disk): 1441 (Ar), 1487 (Ar), 1588 (Ar), 1730 ($\nu_{C=O}$), 3035, 3069 cm^{-1}

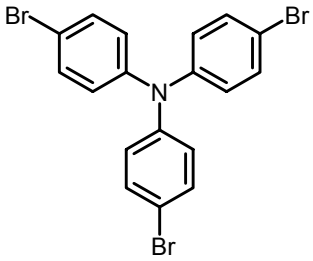
MS (CI): m/z 304 (100%) [$M+H^+$]

HRMS (DCI+) calcd for $C_{20}H_{18}NO_2$, 304.1338; found 304.1331

UV-vis (EtOH) : λ (ε) = 295 (22700) nm ($cm^{-1}M^{-1}$)

Fluorescence (EtOH, λ_{exc} 305 nm) λ_{em} 516 nm

Tris-(4-bromo-phenyl)amine ***56*****:**



A solution of triphenylamine (3.00 g, 12.2 mmol, 1 eq.) and N-bromosuccinimide (7.18 g, 40.4 mmol, 3.3 eq) in $CHCl_3$ was heated under reflux. The reaction evolution was followed by ^1H NMR. After 1h45, the reaction was complete. The chloroform was removed under vacuum and the residue was washed thoroughly with water to afford **56** (5.88 g, quantitative yield) as light brown powder.

56 $C_{18}H_{12}Br_3N$ M = 482.0 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 6.96 (d, *J* = 9.0 Hz, 6H), 7.39 (d, *J* = 9.0 Hz, 6H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 116.1, 125.7, 132.6, 146.10

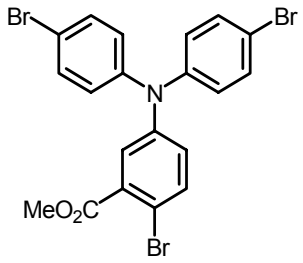
Rf (pentane/CH_2Cl_2 4/1) : 0.74

IR (KBr pellets) : 1486, 1312, 1293, 1288, 509 (C-Br) cm^{-1}

mp: 141 °C (litt. 141-143 °C)

UV-vis (EtOH): λ (ε) = 308 (19500) nm (cm^{-1}M^{-1})

5-[bis-(4-bromo-phenyl)-amino]-2-bromo-benzoic acid methyl ester **57:**



A solution of 3-diphenylamino-benzoic acid methyl ester **53** (5.20 g, 17.1 mmol, 1 eq.) and N-bromosuccinimide (6.71 g, 37.7 mmol, 2.2 eq) in $CHCl_3$ (400 mL) was heated under reflux. The reaction evolution was followed by ^1H NMR. After 1h45, a second portion of N-bromosuccinimide (6.10 g, 34.3 mmol, 2.0 eq.) was added. After two days under reflux, the chloroform was removed *under vacuum* and the residue was filtered on silica gel (elution with CH_2Cl_2 / pentane 1/1) to give **57** (8.78 g, 95 %) as light brown solid. The compound, which purity was estimated by ^1H NMR to be >95%, was used without further purification.

57 $C_{20}H_{14}Br_3NO_2$ M = 540.0 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 3.87 (s, 3H), 6.99 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H), 7.05 (dd, *J* = 8.7 Hz, J = 2.7 Hz, 1H), 7.40-7.46 (m, 5H), 7.54 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 52.4, 114.0, 116.5, 125.5, 126.0, 127.2, 132.6, 133.5, 135.1, 145.7, 146.3, 166.1

Rf (pentane/CH_2Cl_2 1/1): 0.60

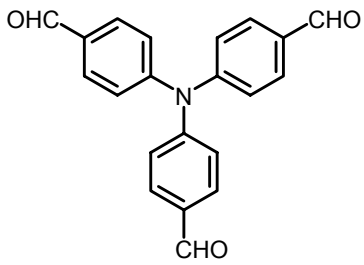
IR (KBr pellets): 1486 (Ar), 1580 (Ar), 1732 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1}

MS (CI): m/z 540 (100%) $[M+H]^+$, m/z 557 (50%) $[M+NH_3]^+$, m/z 462 (55%) $[M-Br+H]^+$, m/z 479 (10%) $[M-Br+NH_3]^+$, m/z 382 (10%) $[M-2Br+2H]^+$

HRMS (DCI+) calcd for $C_{20}H_{15}Br_3NO_2$, 537.8653 ($^{79}Br)_3$, 539.8633 ($^{79}Br_2$+^{81}Br), 541.8614 ($^{81}Br_2$+^{79}Br), 543.8598 ($^{81}Br)_3$; found 537.8661, 539.8623, 541.8602, 543.8574

UV-Vis (EtOH) : λ (ε) = 306 (23600) nm (cm^{-1}M^{-1})

Tri(4-formylphenyl)amine **63:**



Tris-(4-bromo-phenyl)-amine **56** (1.60 g, 3.32 mmol, 1 eq.) was introduced in a reaction flask which was then purged with argon. THF (28 mL) was added and the solution was cooled to –78 °C. *Tert*-butyllithium (13.7 mL of a 1.7 M solution in pentane, 23.2 mmol, 7 eq.) was then added dropwise. The solution turned to a deep red colour. The mixture was stirred at –78 °C under an inert atmosphere for 15 min, then DMF (2.58 mL, 33.2 mmol, 10 eq., dried on 4A molecular sieves beforehand) was added dropwise. The solution was stirred at –78 °C for 15 min after the end of the addition then the mixture was let warm up at rt. After 6 h of stirring under an inert atmosphere, the reaction was quenched by addition of 15 mL of water. The organic layer was decantated and the aqueous layer was extracted with 3x30 mL of CH_2Cl_2. The organic layers were concentrated and chromatographed on silica gel with a gradient from CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2 / MeOH 95/5. Fractions containing the products were evaporated and recrystallised in CH_3CN to give **63** as yellow crystals (first crop, 0.550 g, second crop containing a small amount of impurities 0.148 g, global yield 64 %).

63 $C_{21}H_{15}NO_3$ M = 329.4 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 7.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H), 7.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H), 9.99 (s, 3H, CHO)
^{13}C NMR ($CDCl_3$): 124.6, 131.5, 132.7, 151.2, 190.5

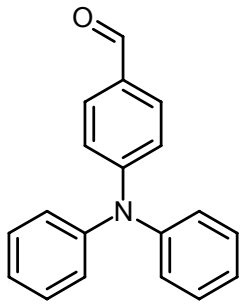
Rf (CH_2Cl_2/EtOAc 95/5): 0.56
mp: 233 °C (litt 230-232 °C)
Microanalysis calcd $C_{21}H_{15}NO_3$, 0.5H_2O: C, 74.54; H, 4.77; N, 4.14 ;
found C, 74.27; H, 4.59; N 4.24

UV-vis: EtOH λ (ε) = 371 (41100) nm (cm^{-1}M^{-1})
$CHCl_3$ λ (ε) =375 (52200) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (EtOH, λ_{exc} 370 nm) λ_{em} 524 nm

($CHCl_3$, λ_{exc} 375 nm) λ_{em} 447 nm

4-Formyltriphenylamine **64:**



$POCl_3$ (0.40 mL, 4.28 mmol, 1.05 eq.) was added dropwise to a solution of triphenylamine (1.00 g, 4.08 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (13 mL) at 0°C. The resulting mixture was stirred at 95-100 °C under nitrogen for 20 h, then cooled to room temperature, poured into ice-water and neutralized with NaOH 1 M. The resulting solid was collected and purified by filtration on silica gel to give **64** (0.461 g, 41 % yield) as a pale yellow powder.

64 $C_{19}H_{15}NO$ $M = 273.3$ g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 7.06 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.20-7.23 (m, 6H), 7.38 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 9.85 (s, 1H, CHO)

^{13}C ($CDCl_3$): 119.4, 125.1, 126.3, 129.2, 129.8, 131.3, 146.2, 153.4, 190.4

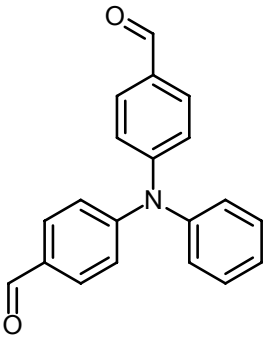
mp: (litt. 129-131°C) 133.5°C

Rf (CH_2Cl_2) : 0.33

UV-vis ($CHCl_3$) : λ (ε) =292 (10300), 363 (24800) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence ($CHCl_3$, λ_{exc} 363 nm) λ_{em} 526 nm

4,4'-Diformyltriphenylamine **65:**



$POCl_3$ (9.1 mL, 97.8 mmol, 12 eq.) was added dropwise to a solution of triphenylamine (2.00 g, 8.15 mmol, 1.0 eq) in dry DMF (19 mL) at 0°C. The resulting mixture was stirred at 95-100 °C under nitrogen for 6 h, then cooled to room temperature, poured into ice-water and neutralized with NaOH 1M. The resulting solid was collected and purified by chromatography on silica gel to give **65** (1.446 g, 58.8 % yield) as a yellow powder. Two other fractions were isolated, one containing monoaldehyde **64** (99 mg, 4.4 %) and one containing a mixture of di- and monoaldehyde (0.369 g).

65 $C_{20}H_{15}NO_2$ M = 301.3 $g.mol^{-1}$

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 7.20-7.24 (m, 6H), 7.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 9.93 (s, 2H, CHO).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 122.8, 126.3, 127.1, 130.2, 131.3, 145.5, 152.0, 190.5

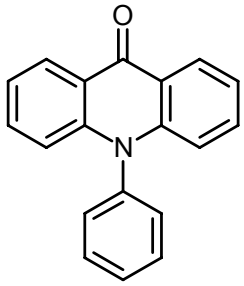
mp: (litt. 141-143°C) 144°C

Rf (CH_2Cl_2/MeOH 99/1): 0.35

UV-vis ($CHCl_3$): λ (ε) =333 (17200), 384 (36500) nm ($cm^{-1}M^{-1}$)

Fluorescence ($CHCl_3$, λ_{exc} 384 nm) λ_{em} 476 nm

N-phenylacridone **67:**



A solution of 2-diphenylamino-benzoic acid **48** (0.40g, 1.38mmol, 1.0eq.) in DMF (2.7 mL) was cooled to 0-5°C. $POCl_3$ (2.7 mL, 2.53 g, 34.6 mmol, 10.5 eq.) was added dropwise. The mixture was then heated to 95-100 °C. After 6 h, the mixture was cooled to rt, poured into ice / water and neutralized with NaOH 2 M. The aqueous phase was extracted with 4x100 mL CH_2Cl_2. The organic phase was washed with 3x20 mL of water, dried and purified by flash chromatography (silica gel 50 g, elution with CH_2Cl_2 then CH_2Cl_2 / MeOH 97/3) to give one fraction containing pure **67** (56 mg, 15.0 % yield) and one fraction containing **67** among impurities, which was not further purified.

67 $C_{19}H_{13}NO$ M = 271.3 $g.mol^{-1}$

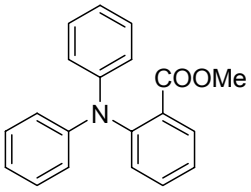
^{1}H NMR ($CDCl_3$): 6.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.32 (td, *J* = 7.8 Hz, *J* = 0.9 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.54 (t, *J* = 7.8Hz, 2H), 7.69-7.78 (m, 3H), 8.64 (dd, *J* = 8.1 Hz, *J* = 1.5 Hz, 2H)
^{13}C NMR ($CDCl_3$): 116.8, 121.6, 121.9, 127.4, 129.6, 130.1, 131.1, 133.3, 139.1, 143.2, 178.2

MS (CI): m/z 272 (100%) $[M+H]^+$
Rf (CH_2Cl_2/MeOH 95/5) : 0.69
mp >260 °C[8]

UV-vis ($CHCl_3$): λ (ε) =253 (6,4.10^4), 378 (1,1.10^4), 395 (1,4.10^4) nm ($cm^{-1}M^{-1}$)
($EtOH$): λ (ε) =251 (5,0.10^4), 378 (8,7.10^3), 397 (1,0.10^4) nm ($cm^{-1}M^{-1}$)
Fluorescence ($CHCl_3$, λ_{exc} 378 nm) λ_{em} 409 nm, 430 nm
($EtOH$, λ_{exc} 379 nm) λ_{em} 415 nm, 437 nm

[8] litt 276 °C *:* Goldberg I.*, Chem. Ber.* **1907***, 2448*.

Methyl 2-diphenylamino-benzoate **68:**



A suspension of 2-diphenylamino-benzoic acid **48** (1.00 g, 3.46 mmol, 1 eq.) and K_2CO_3 (0.526 g, 3.80 mmol, 1.1 eq.) in acetone (23 mL) was stirred for 5 min. Iodomethane (0.86 mL, 1.96 g, 13.8 mmol, 4 eq.) was then added and the mixture was stirred at rt for 5h. Acetone was removed under vacuum, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (60 mL) and washed with 3x15 mL of water. The organic phase was dried on Na_2SO_4, CH_2Cl_2 was removed under vacuum to give **68** as a white solid (0.995 g, 95 % yield).

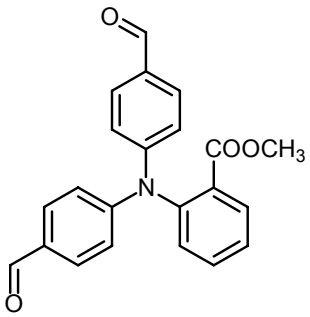
68 $C_{20}H_{17}NO_2$ M = 303.4 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.47 (s, 3H, Me), 6.97-7.06 (m, 6H), 7.19-7.30 (m, 6H), 7.46 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 51.8, 122.4, 122.9, 124.4, 129.1, 129.2, 131.3, 132.7, 146.7, 147.9, 167.8

mp: 130 °C

Methyl 2-[Bis-(4-formyl-phenyl)-amino]-benzoate **69**:



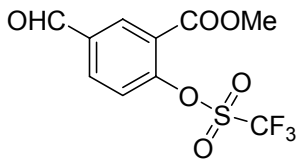
A solution of methyl 2-diphenylamino-benzoate **68** (0.500 g, 1.65 mmol, 1 eq.) in dry DMF (5 mL) was cooled to 0-5 °C. $POCl_3$ (1.85 mL, 3.04 g, 19.8 mmol, 12 eq.) was then added dropwise. After the end of the addition, the mixture was heated to 95-100 °C under nitrogen during 6h. The mixture was then cooled to RT and poored on ice. The resulting solution was neutralized (pH 7-8) with NaOH 2 M. The yellow precipitate that has appeared was filtrated and dried. ^{1}H NMR shows a mixture of two aldehydes. This mixture was dissolved in dry DMF (5 mL) and cooled to 0-5 °C. $POCl_3$ (2 mL, 3.29 g, 21.4 mmol) was then added dropwise. After the end of the addition, the mixture was heated to 95-100 °C during 1 h 40. The mixture was then cooled to RT and poored on ice. The resulting solution was neutralized (pH 7-8) with NaOH 2 M. The yellow precipitate that has appeared was filtrated and dried. The NMR analysis of the crude mixture shows the presence of the diformylated product with traces of the monoformylated compound and no trace of the triformylated product. This crude product was purified by flash chromatography (silica gel 30 g, elution with CH_2Cl_2 then CH_2Cl_2 / MeOH 99/1) to give **69** as a yellow solid (0.40 g, 67 % yield on the two formylation reactions).

69 $C_{22}H_{17}NO_4$ M = 359.4 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.55 (s, 3H, Me), 7.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.46 (td, *J* = 7.5 Hz, *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.63 (td, *J* = 7.7 Hz, *J* = 1.8 Hz), 7.8 (d, *J* = 8. 7 Hz, 4H), 7.94 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.8 Hz, 1H), 9.92 (s, 2H, CHO).

Rf (CH_2Cl_2/MeOH 98/2): 0.2

Methyl 5-formyl-2-(trifluoromethylsulfonyloxy)benzoate **70**:



A solution of methyl 5-formyl-2-hydroxybenzoate **71** (0.410 g, 2.28 mmol, 1 eq.) in dry CH_2Cl_2 (8 mL) under nitrogen was cooled to -78 °C. Pyridine (0.22 mL, 0.216 g, 2.73 mmol, 1.2 eq.) was added, then triflic anhydride (0.415 mL, 0.706 g, 2.50 mmol, 1.1 eq.) was added dropwise. After the addition, the mixture was let slowly warm up to rt and stirred for 21 h at rt under nitrogen. The reaction mixture was then diluted with CH_2Cl_2 (25 mL), washed with 3x5 mL of water and dried on Na_2SO_4 to give **70** as a yellow oil (0.633 g, 89 % yield).

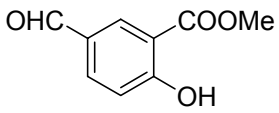
70 $C_{10}H_7F_3O_6S$ M = 312.0 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 4.03 (s, 3H, Me), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.18 (dd, J = 2.1 Hz, J = 8.4 Hz, 1H), 8.61 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 10.11 (s, 1H, CHO).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 52.8 (Me), 118.6 (CF_3, q, J_{C-F}=320Hz) , 123.9, 125.2, 134.1, 134.3, 135.7, 151.4 (C-OTf), 163.1 (COOMe), 189.4 (CHO).

Rf (hexane/EtOAc 4/1): 0.37

Methyl 5-formyl-2-hydroxybenzoate **71**



Sulfuric acid (1.6 mL, 2.95 g, 30.1 mmol, 10 eq.) was added dropwise to a solution of 5-formylsalicylic acid (0.500 g, 3.01 mmol, 1 eq.) in dry methanol (50 mL). The solution was heated under reflux for 15 h. The volume of methanol was then reduced to 10-15 mL, CH_2Cl_2 (100 mL) was added and the solution was washed with water (15 mL) then with aqueous $NaHCO_3$ (5 %, 2x15 mL). The aquous phase was basified and extracted with CH_2Cl_2 (15 mL). Organic phases were gathered and dried on Na_2SO_4 to give **71** as a pale pink solid (0.434 g, 80 % yield).

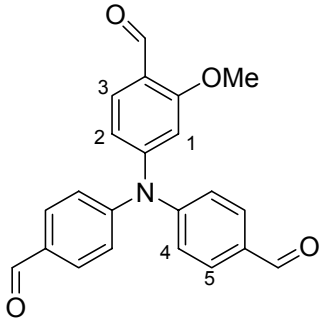
71 $C_9H_8O_4$ M = 180.0 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.92 (s, 3H, Me), 6.97 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.88 (dd, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 9.77 (s, 1H, CHO), 11.22 (br s, 1H, OH).
^{13}C NMR ($CDCl_3$): 52.7 (Me), 112.5, 118.5, 128.6, 133.5, 135.4, 166.1 (C-OH), 169.7 (COOMe), 189.7 (CHO).

Rf (hexane/EtOAc 4/1): 0.47
mp: 80 °C[9]

[9] Litt : mp = 81-83 °C (Filler R.; Lin S.; Zhang Z. ; *J. Fluorine Chem.* **1995**, *74*, 69)

2-methoxy-4-(N,N-bis(4-formylphenyl)amino)benzaldehyde **72**



Red-Al (2.74 mL of a 65 % wt solution in toluene, 9.14 mmol, 4.1 eq.) was introduced in a flask containing toluene (5 mL) and cooled to 0-5 °C, under nitrogen. N-Methyl-Piperazine (1.04 mL, 9.37 mmol, 4.2 eq., previously distilled on CaH_2) was then added dropwise. The mixture was stirred for 30 min at 0-5 °C under nitrogen. A solution of triester **55** (1.00 g, 2.23 mmol, 1 eq.) in toluene (8 mL) was cooled to 0-5 °C. The Red-Al-NMP solution was then added dropwise to the triester solution. The mixture turned immediately to a deep yellow color. After 3 h of stirring at 0-5 °C under nitrogen, the reaction was quenched by adding 4 mL of water. The mixture was then filtrated on Celite, the Celite was washed with CH_2Cl_2. The organic phases were washed with water (3x15 mL) and dried on Na_2SO_4. The product was purified by flash chromatography (silica gel 60 g, elution with hexane / THF 4/1 then 3/1) to give a fraction containing trialdehyde **72** and dialdehyde monoester coming from an incomplete reduction (0.171 g, trialdehyde 0.8 / monoester 0.6) and a fraction containing **72** (97 mg) with traces of monoester. The fractions were washed with aqueous KI to remove peroxydes from the THF and concentrated. The fractions containing dialdehyde monoester were saponified by stirring overnight at RT in a mixture of THF (5 mL) and aqueous LiOH (2 mL, 20 $mg.mL^{-1}$). These fractions were then diluted with CH_2Cl_2, washed with saturated $NaHCO_3$, dried on Na_2SO_4, concentrated and purified by flash chromatography (hexane / THF 3/1). The resulting fractions were washed with aqueous KI, then with aqueous $Na_2S_2O_3$ and concentrated to give **72** as a yellow powder (0.108 g, 12 % yield).

72 $C_{22}H_{17}NO_4$ $M = 359.4\ g.mol^{-1}$

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.81(s, 3H, OMe), 6.71(s, 1H, H_1), 6.77 (dd, J = 8.4 Hz, J = 0.9 Hz, 1H, H_2), 7.29 (d, J = 8.4 Hz, 4H, H_4), 7.84(d, J = 8.4 Hz, 1H, H_3), 7.88(d, J = 8.4 Hz, 4H, H_5), 9.89 (s, 2H, CHO), 10.39 (s, H, CHO).

^{13}C NMR (CD_2Cl_2): 55.8 (OMe), 107.5, 116.8, 121.5, 124.6, 129.8, 131.2, 132.6, 151.3, 152.6, 163.1, 187.8, 190.4

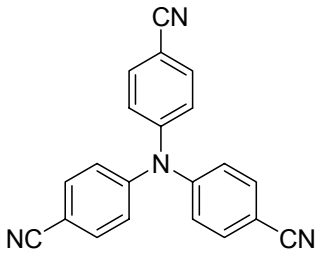
Rf (THF/hexane 3/7) 0.29

IR (KBr pellets): 2841 ($\nu_{C\text{-}OMe}$), 1697 ($\nu_{C=O}$, formyl), 1592 (Ar), 1504 (Ar) cm^{-1}.

mp: 130 °C

MS (CI, NH_3^+) : m/z 360 (100%) [$M+H^+$].

Tris-(4-cyanophenyl)amine **73:**



A mixture of tris-(4-bromophenyl)amine **56** (1.50 g, 3.11 mmol, 1.0 eq.), $K_4[Fe(CN)_6]$, $3H_2O$ (1.31 g, 3.11 mmol, 1.0 eq.), $Pd(OAc)_2$ (11 mg, 1,5% mol.), Na_2CO_3 (0.990 g, 9.34 mmol, 3.0 eq.) and DMAC (6 mL) was degassed and heated at 120-130°C for 3 h 30. The mixture was cooled down to rt, diluted with ethyl acetate and filtrated. The black residue was thoroughly washed with ethyl acetate. The resulting yellow filtrate was washed with water (2x20 mL), aqueous NH_4OH (5%, 20 mL) and water (20 mL), dried under Na_2SO_4. The solvent was removed under vacuum to give a brown product which was a mixture of tris(4-cyanophenyl)amine **73** (80%) and 4,4'-dicyano-4''-bromo-triphenylamine **74** (20%) (0.623 g). The extraction of the black residue with ethyl acetate was repeated to give a white solid corresponding to **73** (52 mg, 95% purity) which was used for measurements without further purification.

73 $C_{21}H_{12}N_4$ M = 320.4 $g.mol^{-1}$

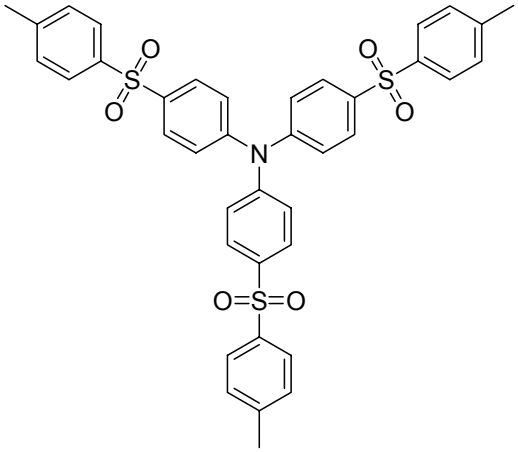
^{1}H NMR ($CDCl_3$): 7.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H), 7.65 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 108.1, 118.3, 133.7, 134.0, 149.3

mp >260°C (*litt 340-342°C)*

UV-vis (EtOH): λ (ε) = 339 (34100) nm ($cm^{-1}M^{-1}$)

Tris-[4-(toluene-4-sulfonyl)-phenyl]-amine **75**



A solution of tris(4-iodophenyl)amine (0.300 g, 0.481 mmol, 1 eq.) in distilled DMF (5 mL) was degassed. CuI (0.413 g, 2.17 mmol, 4.5 eq.) was added and the mixture was stirred at RT under nitrogen for 10min. *Para*-toluene sulfinic acid sodium salt (0.386 g, 2.17 mmol, 4.5 eq.) was added to the resulting white suspension and the mixture was heated to 110 °C for 70 h under nitrogen. The resulting mixture was cooled to rt and diluted with CH_2Cl_2. The white precipitate which appeared upon addition of water was filtrated. The filtrate was washed with water and satured $NaHCO_3$. After removing the solvent under vacuum the pale rose residue was purified by flash chromatography (silica gel, 21 g, elution with CH_2Cl_2 then CH_2Cl_2/MeOH 99/1). The corresponding fractions were recrystallized in cyclohexane / ethyl acetate 1/1 to give **75** as white crystals (98 mg, 29% yield).

75 $C_{39}H_{33}NO_6S_3$ M = 707.9 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 2.46 (s, 9H, Me), 7.11 (d, *J* = 9.0 Hz, 6H), 7.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 6H), 7.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 6H), 7.86 d, *J* = 8.4 Hz, 6H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 21.6, 124.5, 127.8, 129.4, 130.0, 137.6, 138.6, 144.4, 149.8

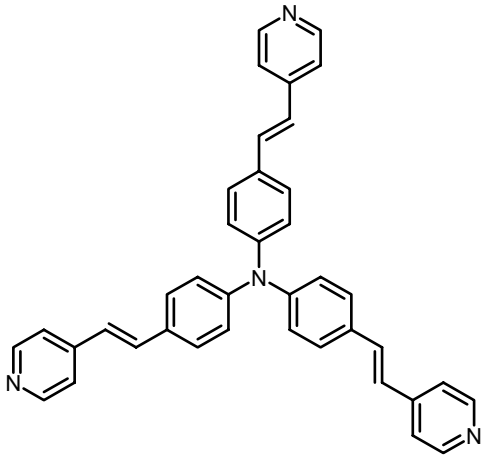
mp: 169 °C

Microanalysis calcd for $C_{39}H_{33}NO_6S_3$: C, 66.17; H, 4.70; N, 1.98;
found C, 65.45; H, 4.69; N, 1.62

UV-vis ($CHCl_3$) : λ (ε) = 344 (48000) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence ($CHCl_3$, λ_{exc} 344 nm) λ_{em} 380 nm

Tris-[4-(2-pyridin-4-yl-vinyl)-phenyl]-amine **76**



Tris-(4-bromotriphenyl)amine (1.00 g, 2.07 mmol, 1 eq.), palladium acetate (23 mg, 0.104 mmol, 0.05 eq.) and tris-*o*-tolylphosphine (95 mg, 0.311 mmol, 0.15 eq.) were introduced in a reactor which was then purged with nitrogen. 4-vinylpyridine (1.00 mL, 0.98 g, 9.32 mmol, 4.5 eq.) and triethylamine / DMF 2 / 1 v / v (5.4 mL) were successively added. The mixture was stirred at 85-90 °C under nitrogen for 25 h. The resulting mixture was cooled to rt, triethylamine was removed under vacuum. The product was diluted with CH_2Cl_2 (120 mL), washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ (3x30 mL) and dried. The volume of CH_2Cl_2 was reduced and the product was precipitated by adding hexane and cooling to 4°C, to give **76** as an orange powder (0.943 g, 85.5% yield).

76 $C_{39}H_{30}N_4$ M = 554.7 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 6.98 (d, J = 16.2Hz, 3H), 7.18 (d, J = 8.7Hz, 6H), 7.31 (d, J = 16.2Hz, 3H), 7.40 (d, J = 5.7Hz, 6H), 7.51 (d, J = 8.7Hz, 6H), 8.61 (d, J = 5.7Hz, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 120.7, 124.4, 124.9, 128.2, 131.4, 132.4, 144.8, 147.3, 150.2

mp: >260°C (*litt 270.5°C.*)

Rf (CH_2Cl_2/MeOH 96/4) : 0.28

IR (KBr pellets) : 1503 (Ar), 1592 (Ar), 1632 ($\nu_{C=C}$) cm^{-1}

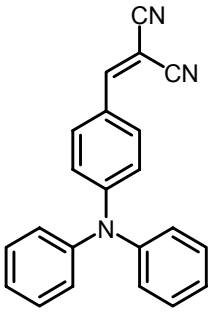
Microanalysis calcd for $C_{39}H_{30}N_4$, $2H_2O$: C, 79.30; H, 5.80; N, 9.48 ; found C, 79.10; H, 5.19; N 9.39

MS (CI, NH_3^+) : m/z 555 (100%) $[M+H]^+$, 480 (10%) $[M- 1Py+H]^+$

UV-vis (CH_2Cl_2) : λ (ε) = 405 (54500) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (CH_2Cl_2, λ_{exc} 405nm) λ_{em} 515 nm

4-(2,2-dicyanovinyl) triphenylamine **82**



Molecular sieves 3A (1.00 g), malononitrile (0.054 g, 0.817 mmol, 1.5 eq.), acetic acid (5 drops) and ammonium acetate (1 crystal) were added to a solution of 4-formyltriphenylamine **64** (0.150 g, 0.549 mmol, 1 eq.) in pyridine (15 mL, dried on 4A molecular sieves beforehand). After a few minutes of stirring at rt, the solution turned red. Once the reaction completed as checked by TLC, pyridine was removed under vacuum, the residue was dissolved in CH_2Cl_2, filtrated on Celite and washed with water (20 mL), brine (20 mL), water (20 mL). The organic phase was dried on Na_2SO_4, concentrated and **82** was obtained as an orange powder (0.098 g, 64% yield) by precipitation in CH_2Cl_2 / pentane.

82 $C_{20}H_{15}N_3$ M = 321.4 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 6.98 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.22-7.30 (m, 6H), 7.42 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H), 7.55 (s, 1H), 7.77 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 75.6, 114.1, 115.2, 118.5, 122.8, 126.1, 126.7, 130.0, 133.0, 145.2, 153.5, 157.9

MS (CI): m/z 322 (100%) $[M+H]^+$, m/z 297 (30%) $[M-CN+H]^+$, m/z 258 (30%) $[M-CH(CN)_2+H]^+$

HRMS (DCI+) calcd for $C_{22}H_{16}N_3$, 322.1344; found 322.1346.

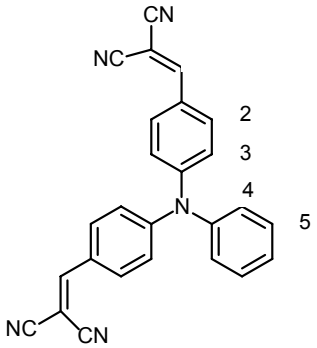
mp: 136 °C

IR (KBr pellets) : 1504 (Ar), 1570 (Ar), 1610 ($\nu_{C=C}$), 2219 (ν_{CN}) cm^{-1}

UV-vis ($CHCl_3$) : λ (ε) = 446 (39400) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence ($CHCl_3$, λ_{exc} 446 nm) λ_{em} 615 nm

4, 4'-di (2,2-dicyanovinyl)triphenylamine **83 :**



Molecular sieves 3A (1.00 g), malononitrile (0.079 g, 1.19 mmol, 2.4 eq.), acetic acid (5 drops) and ammonium acetate (1 crystal) were added to a solution of 4,4'-diformyltriphenylamine **65** (0.150 g, 0.498 mmol, 1 eq.) in pyridine (15 mL, dried on 4A molecular sieves beforehand). After a few minutes of stirring at rt, the solution turned red. Once the reaction completed, as checked by TLC, pyridine was removed under vacuum, the residue was dissolved in CH_2Cl_2, filtrated on Celite and washed with water (20 mL), brine (20 mL), water (20 mL). The organic phase was dried under Na_2SO_4, concentrated and **83** was obtained as a bright red powder (0.207g, 80% yield) by precipitation with pentane.

83 $C_{26}H_{15}N_5$ M = 397.4 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 7.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H, H_3+H_4), 7.38 (t, *J* = 7.5Hz, 1H, H_6), 7.49 (t , 2H, H_5), 7.67 (s, 2H, H_1), 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 4H, H_2)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 79.6, 113.2, 114.3, 122.8, 125.9, 127.45, 127.49, 130.6, 132.7, 144.3, 151.3, 157.8

MS (CI, NH_4^+): m/z 415 (100%) $[M+NH_4]^+$

HRMS (DCI+) calcd for $C_{26}H_{19}N_6$, 415.1671; found 415.1669.

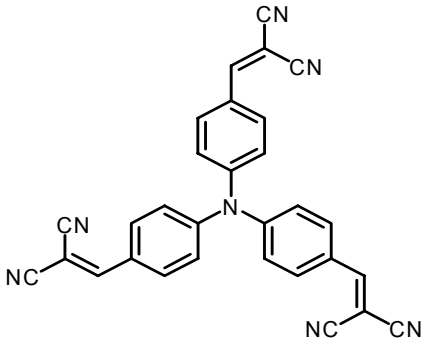
mp: 222 °C

IR (KBr pellets) : 1500 (Ar), 1581 (Ar), 1611 ($\nu_{C=C}$), 2223 (ν_{CN}) cm^{-1}

UV-vis ($CHCl_3$) : λ (ε) = 476 (49000) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence ($CHCl_3$, λ_{exc} 476 nm) λ_{em} 535 nm

Tris[4-(2,2-dicyanovinyl)phenyl]amine **84**



Molecular sieves 3A (1.00 g), malononitrile (0.101 g, 1.53 mmol, 3.6 eq.), acetic acid (5 drops) and ammonium acetate (1 crystal) were added to a solution of tri(4-formylphenyl)amine **63** (0.140 g, 0.430 mmol, 1 eq.) in pyridine (15 mL, dried on 4A molecular sieves beforehand). After a few minutes of stirring at rt, the solution turned red. After 2 h 30 of stirring at rt, pyridine was removed under vacuum, the residue was dissolved in CH_2Cl_2, filtrated under Celite and washed with 3x20 mL of water. The organic phase was dried on Na_2SO_4, the volume was reduced and **84** was obtained as a red powder (0.164 g, 80% yield) by precipitation with hexane.

84 $C_{30}H_{15}N_7$ M = 473.5 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 7.29 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H), 7.73 (s, 3H), 7.96 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 81.70, 112.8, 113.8, 124.9, 127.7, 132.8, 150.1, 157.5

mp (*litt 192-193°C)* 180°C (decomposition).

IR (KBr pellets) : 1497 (Ar), 1581 (Ar), 2222 (ν_{CN}) cm^{-1}

Microanalysis calcd $C_{30}H_{15}N_7$: C, 76.10; H, 3.19; N, 20.71 ; found C, 75.89; H, 3.18; N 20.06

MS (CI, NH_4^+) : 491 ([M+NH_4]$^+$, 100%), 473 ([M+H]$^+$, 15%)

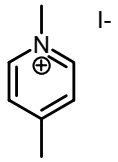
HRMS (DCI+) calcd for $C_{30}H_{16}N_7$, 474.1467; found 474.1458.

UV-vis: EtOH λ (ε) =454 (76100), $CHCl_3$ λ (ε) =461 (82500) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (EtOH, λ_{exc} 454 nm) λ_{em} 591 nm

($CHCl_3$, λ_{exc} 461 nm) λ_{em} 508 nm

4-picolinium iodide **87**

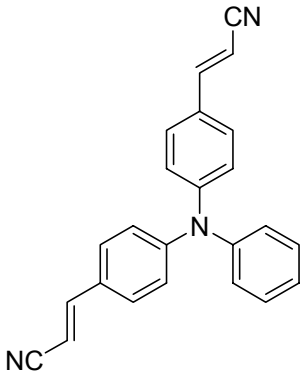


Iodomethane (1.12 mL, 2.56 g, 18.0 mmol, 1.1 eq.) was added to a solution of 4-picoline (1.59 mL, 1.52 g, 16.4 mmol, 1 eq.) in acetone (28 mL). The mixture was stirred at rt overnight. The product was precipitated by addition of ether, filtrated, washed with ether and dried to give **87** as a white powder (3.11 g, 80 % yield).

87 $C_7H_{10}N^+, I^-$ M = 235.1 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 2.71 (s, 3H), 4.66 (s, 3H), 7.90 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 9.17 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H).

4, 4'-di (2-cyanovinyl)triphenylamine **88**



Diethylcyanomethylphosphonate (0.134 mL, 0.147 g, 0.830 mmol, 2.5 eq.) was added to a solution of 4,4'-diformyltriphenylamine **65** (0.100 g, 0.332 mmol, 1 eq.) in CH_2Cl_2 (8 mL, distilled on CaH_2). Potassium *tert*-butoxide (0.112 g, 0.996 mmol, 3e q.) was added and the mixture was stirred at rt under nitrogen for 3h. The reaction was quenched by addition of 1 mL of water. The crude mixture was diluted with CH_2Cl_2, washed with water (3x5 mL) and dried on Na_2SO_4. The product was then purified by flash chromatography (silica gel 15 g, elution with CH_2Cl_2/hexane 1/1). The corresponding fractions (88% yield, E/E 1 Z/E 0.35) were purified on a preparative TLC plate (2 mm, eluant CH_2Cl_2/hexane 1/1) to give the E/E stereoisomer (E/E isomer 90% , Z/E isomer 10%, 54 mg, 47% yield).

88 $C_{24}H_{17}N_3$ M = 347.4 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 5.36 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.17 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.23 (t, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.33-7.39 (m, 8H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 94.2 (C=C-CN), 118.6 (CN), 123.3, 125.5, 126.3, 128.1, 128.7, 129.9, 145.9, 149.50, 149.53 (C=C-CN).

Rf (CH_2Cl_2): 0.49

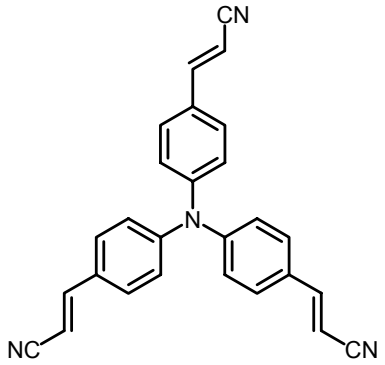
HRMS (DCI+) calcd for $C_{24}H_{18}N_3$, 348.1501; found 348.1495.

IR (KBr pellets) : 1505 (Ar), 1589 (Ar), 1614 ($\nu_{C=C}$), 2212 (ν_{CN}) cm^{-1}

UV-vis (CH_2Cl_2) : λ (ε) = 404 (42600) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (CH_2Cl_2, λ_{exc} 404 nm) λ_{em} 485 nm

Tris[4-(2-cyanovinyl)phenyl]amine **89**



Diethylcyanomethylphosphonate (0.196 mL, 0.215 g, 1.21 mmol, 4.0 eq.) was added to a solution of tris-4-formylphenylamine **63** (0.100 g, 0.304 mmol, 1 eq.) in CH_2Cl_2 (8 mL, distilled on CaH_2). Potassium *tert*-butoxide (0.153 g, 1.37 mmol, 4.5 eq.) was added and the mixture was stirred at rt under nitrogen overnight. The reaction was quenched by addition of water (1 mL). The crude mixture was diluted with CH_2Cl_2, washed with water (3x5 mL) and dried on Na_2SO_4. The product was then purified by flash chromatography (silica gel 30 g, elution with CH_2Cl_2/hexane 80/20). The corresponding fractions (58% yield, E isomer 1 Z isomer 0.17) were purified on a preparative TLC plate (2 mm, eluant CH_2Cl_2/hexane 80/20) to give the E/E/E stereoisomer (E/E/E isomer 90%, Z isomer10%, 33 mg, 27% yield).

89 $C_{27}H_{18}N_4$ M = 398.5 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 5.82 (d, *J* = 16.5 Hz, 3H), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H), 7.38 (d, *J* = 16.5 Hz, 3H), 7.42 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 95.2 (C=<u>C</u>-CN), 118.3 (CN), 124.5, 128.9, 129.3, 148.7, 149.3

IR (KBr pellets): 1505 (Ar), 1591 (Ar), 1620 ($\nu_{C=C}$), 2214 (ν_{CN}) cm^{-1}

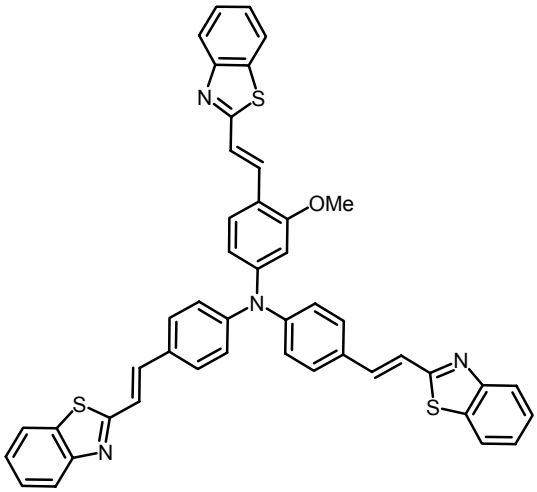
HRMS (DCI+) calcd for $C_{27}H_{19}N_4$, 399.1610; found 399.1615.

Rf: 0.26 (CH_2Cl_2)

UV-vis (CH_2Cl_2) : λ (ε) = 419 (57000) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (CH_2Cl_2, λ_{exc} 419 nm) λ_{em} 479 nm

4-((E)-2-(benzo[d]thiazol-2-yl)vinyl)-N,N-bis(4-((E)-2-(benzo[d]thiazol-2-yl)vinyl)phenyl)-3-methoxyphenylamine **94**



Sodium hydride (21 mg, 60% weigth dispersion, 0.521 mmol, 3.6 eq.) was added to a solution of diethyl benzo[d]thiazol-2-ylmethylphosphonate (0.136 g, 0.477 mmol, 3.3 eq.) in THF (2 mL). After the end of the hydrogen bubbling, a few drops of 15-crown-5 were added. The mixture was stirred at rt under nitrogen for 15 min, then a solution of trialdehyde **72** (52 mg, 0.144 mmol, 1 eq.) in THF (6 mL) was added. The solution, which has taken a deep yellow color, was stirred at rt under nitrogen for 72 h. The reaction was quenched by addition of 1 mL of water. The mixture was diluted with CH_2Cl_2, washed with water and brine, and dried on Na_2SO_4. CH_2Cl_2 was removed under vacuum and the crude product was purified by flash chromatography (silica gel 10 g, elution with CH_2Cl_2 then 1% MeOH in CH_2Cl_2) to give **94** as an orange solid (84 mg, 77% yield).

94 $C_{46}H_{32}N_4OS_3$ M=753.0 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.82 (s, 3H, OMe), 6.74 (s, 1H), 6.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 7.35-7.7.42 (m, 5H), 7.46-7.56 (m, 11H), 7.81 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 8.01 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H).
^{13}C NMR ($CDCl_3$): 53.5, 116.9, 120.1, 121.1, 121.4, 121.5, 121.7, 122.8, 122.9, 124.6, 125.1, 125.3, 126.2, 126.4, 128.7, 129.2, 130.8, 132.7, 134.4, 136.8, 147.6, 148.8, 153.97, 154.03, 158.8, 167.1, 168.3

IR (KBr pellets): 1452 (Ar), 1504 (Ar), 1590 (Ar), 1620 ($\nu_{C=C}$), 2934 (ν_{CH3}) cm^{-1}
mp: 125-130°C
Rf (CH_2Cl_2/MeOH 98/2): 0.35

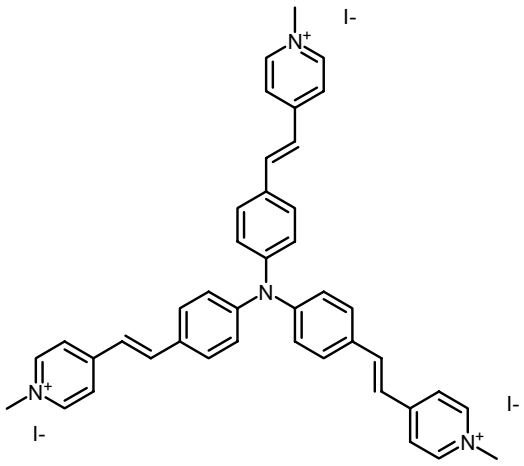
MS (CI) : 754 ($[M+H]^+$, 100%)

HRMS (DCI+) calcd for $C_{46}H_{33}ON_4S_3$, 753.1817; found 753.1818.

UV-vis (CH_2Cl_2): λ (ε) = 432 (94700) nm ($cm^{-1}M^{-1}$)

Fluorescence (CH_2Cl_2, λ_{exc} 432 nm) λ_{em} 542 nm

Tris-[4-(2-N-methylpyridinium-4-yl-vinyl)-phenyl]-amine iodide **95**



Iodomethane (1.5mL, large excess) was added to a suspension of tris-[4-(2-pyridin-4-yl-vinyl)-phenyl]-amine **95** (64 mg, 0.115 mmol) in 1.5mL methanol. The reaction, which has immediately turned to a deep red colour, was let under stirring at room temperature in the dark overnight. The product was then precipitated by addition of ether and filtrated to give **95** as a red solid (0.103 g, 91% yield).

95 $C_{42}H_{39}N_4^{3+}$, $3I^-$ M = 980.5 $g.mol^{-1}$

^{1}H NMR (DMF *d7*): 4.50 (s, 9H, Me), 7.28 (d, *J* = 8.4 Hz, 6H), 7.64 (d, *J* = 16.2 Hz, 3H), 7.90 (d, *J* = 8.7 Hz, 6H), 8.20 (d, *J* = 16.2 Hz, 3H), 8.40(d, *J* = 6.6 Hz, 6H), 9.06 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H).

^{13}C NMR (DMF *d7*): 47.0, 122.3, 123.7, 124.6, 130.1, 131.3, 140.5, 145.3, 148.3, 153.4

mp >260°C

IR (KBr pellets) : 1513 (Ar), 1585 (Ar), 1617 (Ar), 1642 ($\nu_{C=C}$) cm^{-1}

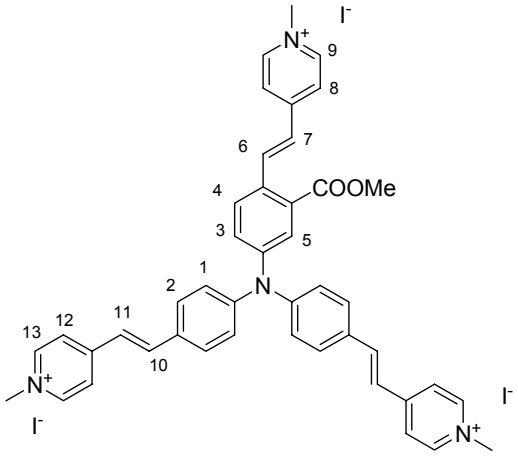
MS (ESI+) : m/z 363.11 (10%) $[C_{42}H_{39}N_4I]^{2+}/2$, m/z 199.75 (100%), $[C_{42}H_{39}N_4]^{3+}/3$

UV-vis (Cacodylate buffer, pH 7.3) : λ (ε) = 474 (59000) nm ($cm^{-1}M^{-1}$)

(glycerol) : λ (ε) = 491 (75000) nm ($cm^{-1}M^{-1}$)

Fluorescence (glycerol, λ_{exc} 490 nm) λ_{em} 665 nm

Methyl 5-(bis(4-((E)-2-(N-methylpyridinium-4-yl)vinyl)phenyl)amino)-2-((E)-2-(N-methylpyridinium-4-yl)vinyl)benzoate **96**



Iodomethane (2 mL, large excess) was added to a suspension of methyl 5-(bis(4-((E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl)phenyl)amino)-2-((E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl)benzoate **79** (70 mg, 0.114 mmol) in methanol (3 mL). The mixture, which turned instantly to a deep red solution, was stirred overnight at rt. The solvent was then removed under vacuum, the product was dissolved in a small volume of methanol, precipitated by addition of ether and dried to give **96** as a dark red powder (103 mg, 87% yield).

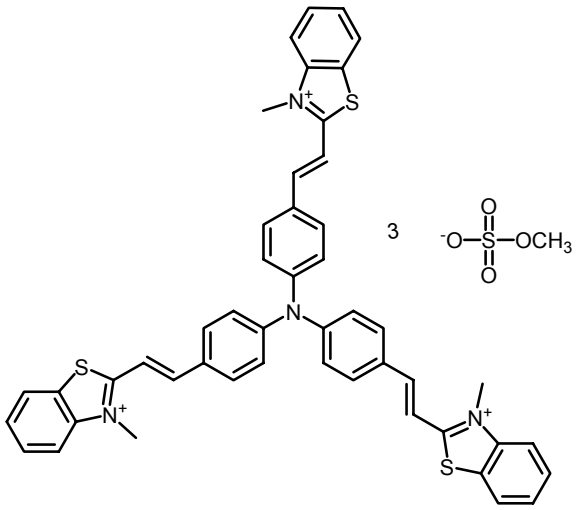
96 $[C_{44}H_{41}N_4O_2]^{3+}$, $3I^-$ M = 1038.5 $g.mol^{-1}$

^{1}H NMR (MeOD): 3.89 (s, 3H, COOMe), 4.33 (s, 6H, Me^+), 4.35 (s, 3H, Me^+), 7.25 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H, H_1), 7.39-7.44 (m, 4H, H_{10}+H_6+H_3), 7.73 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, H_5), 7.80 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H, H_2), 7.94-7.99 (m, 3H, H_4+H_{11}), 8.14-8.18 (m, 6H, H_8+H_{12}), 8.63 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H, H_7), 8.70-8.77 (m, 6H, H_9+H_{13}).

^{13}C NMR (MeOD): 52.3, 65.6, 121.8, 123.6, 124.0, 124.3, 124.6, 125.3, 127.5, 129.3, 129.9, 131.2, 131.3, 138.6, 140.5, 144.5, 144.8, 147.9, 148.0, 153.6, 153.8, 167.4

MS (ESI+): m/z 219.1 (100%) $[M]^{3+}/3$, m/z 321.2 (20%) $[M\text{-}Me^+]^{2+}/2$

Tris-[4-(2-N-methyl-(benzo[d]thiazolinium-2-yl)vinyl)-phenyl]-amine methyl sulphate **100**

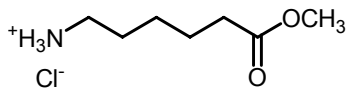


Dimethyl sulfate (47 µL, 0.063 g, 0.498 mmol, 6 eq.) was added to a suspension of tris-[4-(2-N-methyl-(benzo[d]thiazol-2-yl)vinyl)-phenyl]-amine **93** (0.060 g, 0.083 mmol, 1 eq.) in MeOH (10 mL). The reaction medium was refluxed overnight. The product was then cooled to rt, precipitated by addition of ether and filtrated to give **100** as a deep violet powder (91 mg, quantitative yield). The product readily undergoes demethylation in presence of water.

93 $[C_{48}H_{39}N_4S_3]^{3+}$, 3 $CH_3SO_4^-$ M = 1101.3 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (CD_2Cl_2): 3.73 (s, 9H, Me), 7.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 6H), 7.64 (t, *J* = 7.8 Hz, 3H), 7.73 (t, *J* = 7.8 Hz, 3H), 7.81 (d, *J* = 8.4 Hz, 6H), 7.92-8.01 (m, 9H), 8.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 3H).

5-Methoxycarbonyl-pentyl-ammonium chloride **101***:*

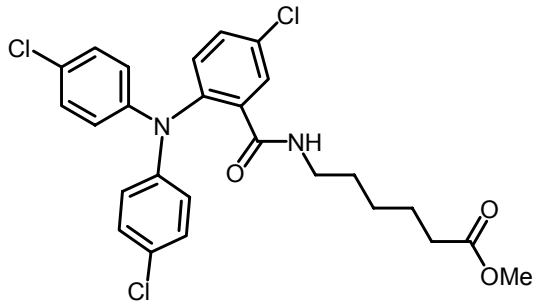


Thionyl chloride (1.67 mL, 22.9 mmol, 1.5 eq.) was added dropwise to a solution of methanol (15 mL) at 0°C under stirring. A suspension of 6-aminocaproïc acid (2.00 g, 15.3 mmol, 1 eq.) in methanol (35 mL) was then added dropwise. After 16h of stirring at rt, the methanol was removed under vacuum to give **101** as a white powder with a quantitative yield.
101 $C_7H_{16}ClNO_2$ M = 181.7 g.mol^{-1}

^{1}H NMR (MeOD): 1.41-1.49 (m, 2H), 1.63-1.74 (m, 4H), 2.38 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.94 (t, *J* = 7.5Hz, 2H), 3.68 (s, 3H).
^{13}C NMR (MeOD): 24.0, 25.5, 26.8, 33.0,39.2, 50.6, 174.2

mp: 114°C (litt 119-123°C (Aldrich catalog))

46-{2-[Bis-(4-chloro-phenyl)-amino]-5-chloro-benzoylamino}-hexanoic acid methyl ester **102:**



A mixture of **50** (0.080 g, 0.204 mmol, 1eq.), **101** (0.044 g, 0.244 mmol, 1.2 eq.), EDCI (0.039 g, 0.204 mmol, 1 eq.), HOAt (0.028 g, 0.204 mmol, 1 eq.), triethylamine (0.062 g, 0.611 mmol, 3 eq.) and DMF (5 mL) was stirred at rt overnight. The mixture was then poured in 25 mL of water, extracted with 3x25 mL of CH_2Cl_2. The organic phases were combined, dried on Na_2SO_4 and evaporated. The residue was recrystallised in acetonitrile to give **102** as white crystals (0.036 g, 34% yield).

102 $C_{26}H_{25}Cl_3N_2O_3$ M = 519.9 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1.15-1.34 (m, 4H), 1.60 (quintuplet , *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.30 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.13 (quadruplet, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.70 (s, 3H, OMe), 6.37 (broad s, 1H, NH) 6.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.09 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.42 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.75 (d, *J* = 2.7Hz, 1H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 24.4, 26.3, 29.0, 33.8, 39.7, 51.5 (OMe), 123.7, 128.4, 129.3, 129.6, 130.6, 130.8, 131.8, 132.1, 134.9, 145.6, 165.2 (C amide), 174.0 (C ester)

mp: 151°C

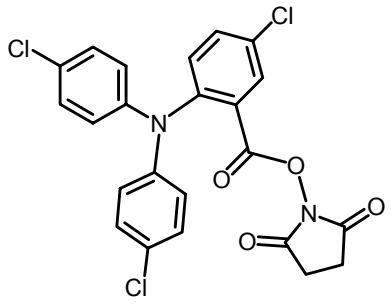
MS (FAB+): m/z 519 (100%) $[M+H]^+$, m/z 375 (90%) $[M+H-(NH-(CH_2)_5-COOMe)]^+$

UV-vis EtOH : λ (ε) = 306 (24000) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence (EtOH, λ_{exc} 305 nm) λ_{em} 481 nm

(Sodium cacodylate buffer pH 6 10 mM, λ_{exc} 305 nm) λ_{em} 456 nm

2-[Bis-(4-chloro-phenyl)-amino]-5-chloro-benzoic acid succinimyl ester **105**



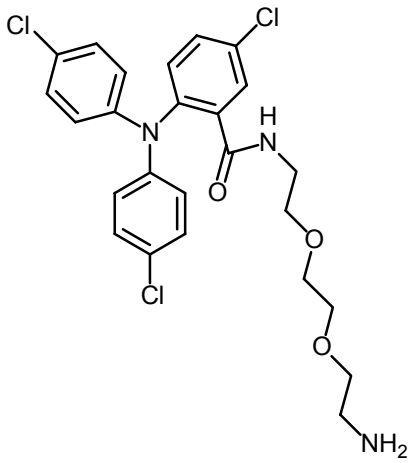
A mixture of **50** (0.080 g, 0.204 mmol, 1 eq.), N-hydroxysuccinimide (0.026 g, 0.225 mmol, 1.1 eq.), EDCI (0.043 g, 0.225 mmol, 1.1 eq.) in CH_2Cl_2 (2 mL) was stirred at rt overnight. The mixture was then diluted with 10 mL of CH_2Cl_2, washed with 3 mL of H_2O and 3x3 mL of brine. The organic layer was dried on Na_2SO_4 and concentrated to give **105** as a yellow solid, with a quantitative yield.

105 $C_{23}H_{15}Cl_3N_2O_4$ M = 489.9 $g.mol^{-1}$

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 2.81 (s, 4H), 6.91 (d, *J* = 9.0Hz, 4 H), 7.19-7.26 (m, 5H), 7.58 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 2.4Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 2.4Hz, 1H)

^{13} C NMR ($CDCl_3$): 25.6, 124.1, 128.6, 129.6, 130.6, 131.1, 132.5, 135.4, 145.5, 146.5, 159.4, 168.5

N-{2-[2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-ethyl}-2-[bis-(4-chloro-phenyl)-amino]-5-chloro-benzamide **103**



A mixture of **50** (0.100 g, 0.255 mmol, 1 eq.), {2-[2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-ethyl}-carbamic acid tert-butyl ester **104** (0.076 g, 0.306 mmol, 1.2 eq.), EDCI (0.049 g, 0.255 mmol, 1 eq.), HOAt (0.035 g, 0.255 mmol, 1 eq.) and DMF (7 mL) was stirred at rt overnight. The DMF was then removed under vacuum and the residue purified by flash chromatography (silica gel, 12 g, elution with CH_2Cl_2/methanol 98/2) to give a yellow oil containing small amount of DMF. The Boc protecting group was removed by stirring the product overnight at rt in $CHCl_3$ / trifluoroacetic acetic acid 4 / 1 v / v. After concentration, **103** was obtained a yellow oil (0.157 g, 97 %).

103 $C_{25}H_{26}Cl_3N_3O_3$ M = 522.9 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.17 (m, 2H), 3.32 (m, 4H), 3.49 (t, *J* = 2.4 Hz, 2H), 3.56 (t, *J* = 2.4 Hz), 3.71 (m, 2H), 6.94 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.09 (d, *J* = 8.4Hz, 1H), 7.12 (br s, 1H, NH amide), 7.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 4H), 7.43 (dd, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.72 (d, *J* = 2.4Hz, 1H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 39.6, 39.7, 66.6, 69.7, 70.1, 70.2, 123.9, 128.4, 129.5, 130.57, 130.64, 131.7, 132.4, 133.8, 142.8, 145.5, 166.1

Rf (Boc-protected compound, CH_2Cl2/MeOH 98/2): 0.25

MS (FAB+): m/z 522 (100%) $[M+H]^+$, m/z 374 (40%) $[M+H-(NH-((CH)_2O)_2-(CH_2)_2-NH_2)]^+$

IR (deprotected coumpound, NaCl disc): 1487 (Ar), 1538 (Ar), 1644 ($\nu_{C=O}$), 2923 (ν_{CH2}), 3064 (ν_{NH3+}) cm^{-1}

UV-vis : EtOH: λ (ε) = 306 (21800) nm (cm^{-1}M^{-1})

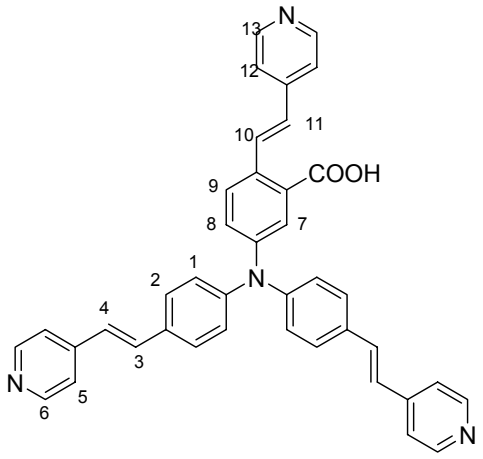
H_2O: λ (ε) = 304 (19800) nm (cm^{-1}M^{-1})

Fluorescence: (EtOH, λ_{exc} 305 nm) λ_{em} 489 nm

(H_2O, λ_{exc} 304nm) λ_{em} 521 nm.

5-(bis(4-((E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl)phenyl)amino)-2-((E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl)benzoic acid

106



The methyl ester **79** (50 mg, $8.2.10^{-2}$ mmol) was dissolved in 2mL THF. Aqueous LiOH (1 mL, 20 $mg.mL^{-1}$) was then added and the mixture was stirred at rt in the dark for 72 h. The solvants were removed under vacuum, the residue was dissolved in ethanol and filtrated. The filtrate was concentrated under vacuum to give **106** as a red powder with a quantitative yield.

106 $C_{40}H_{30}NO_2$ M = 598.7 $g.mol^{-1}$

^{1}H NMR (MeOD): 7.05-7.18 (m, 8H), 7.30 (d, *J* = 2.1Hz, 1H), 7.50 (d, 2H, *J* = 16.2Hz), 7.56-7.62 (m, 10H), 7.77 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 16.2Hz, 1H), 8.45 (m, 6H).

^{13}C NMR (MeOD + D_2O): 121.0, 121.2, 122.7, 123.8, 124.0, 124.1, 124.6, 126.6, 128.1, 128.3, 131.4, 132.2, 133.2, 142.5, 146.2, 146.6, 146.7, 147.3, 148.8, 148.9, 175.6

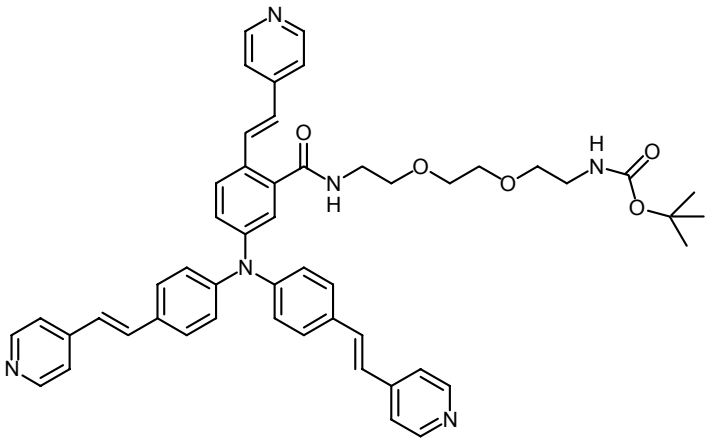
mp > 260 °C

Rf (CH_2Cl_2/MeOH 9/1): 0.09

IR (KBr pellets) : 1505 (Ar), 1587 (Ar), 1630 ($\nu_{C=C}$), 1759 ($\nu_{C=O}$) cm^{-1}

MS (FAB+) : m/z 605.5 ($[M+Li]^+$, 15%), m/z 599 ($[M+H]^+$, 10%), m/z 314.2 ($[M+2Li]^{2+}/2$, 25%)

[2-(2-{2-[5-{Bis-[4-(2-pyridin-4-yl-vinyl)-phenyl]-amino}-2-(2-pyridin-4-yl-vinyl)-benzoylamino]-ethoxy}-ethoxy)-ethyl]-carbamic acid tert-butyl ester **107**



To a solution of the monoprotected diamine **104** (19 mg, 7.65×10^{-2} mmol, 1.2 eq.) in DMF (2 mL) was added the acid **106** (39.5 mg, 6.53×10^{-2} mmol, 1.0 eq.), EDCI (13.7 mg, 7.15×10^{-2} mmol, 1.1 eq.) and HOAt (11 mg, 8.08×10^{-2} mmol, 1.2 eq.). The mixture was stirred at rt in the dark. The mixture was then diluted with 60mL CH_2Cl_2 and washed with 3x15 mL water. The aqueous phase was extracted with 10mL CH_2Cl_2. Organic phases were gathered and dried on Na_2SO_4. The product was dried under vacuum to remove DMF and the purified on preparative TLC plate (SiO_2 2 mm, elution with CH_2Cl_2 / MeOH 95 / 5) to give **107** as an orange solid (16 mg, 30 % yield).

107 $C_{51}H_{52}N_6O_5$ M = 829.00 g.mol^{-1}

^{1}H NMR ($CDCl_3$): 1.44 (s, 9H), 3.22 (br s, 2H), 3.44 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 3.49 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 3.68 (br s, 4H), 4.91 (br s, 1H, NH), 6.43 (br s, 1H, NH), 6.95 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 16.2 Hz, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 7.22 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.27 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 16.2 Hz, 2H), 7.41 (br s, 6H), 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 7.67 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 8.63 (br s, 6H)

^{13}C NMR ($CDCl_3$): 28.4, 39.9, 40.3, 69.7, 39.8, 70.1, 70.3, 79.5, 122.2, 124.7, 125.2, 127.1, 127.6, 128.3, 129.0, 129.9, 131.8, 132.3, 144.7, 146.9, 147.1, 150.1, 155.9

Rf (CH_2Cl_2/MeOH 9/1): 0.27

MS (FAB+): m/z 829.5 (75%) $[M+H]^+$, m/z 729.5 (18%) $[M\text{-}Boc+H]^+$, m/z 581.3 (88%) $[M+H\text{-}(NH\text{-}((CH)_2O)_2\text{-}(CH_2)_2\text{-}NH_2)]^+$

HRMS (DCI+) calc for $C_{51}H_{53}N_6O$ 828.3999 found 829.4048

Fluorescence experiments:

Fluorescence spectra:

Fluorescence spectra were recorded on a FluoroMax-3 (Jobin Yvon) apparatus. Unless specified, fluorescence spectra were recorded in 1 cm x 1cm cuvette (3 mL) and temperature was maintained between 19.9°C and 20.5°C with a thermostated cell holder. Solutions were not degassed prior to measurements. Solvents used were of spectrophotometric grade. Measurements were performed with solutions of OD ≤ 0.1 to avoid reabsorption of the emitted light, and data were corrected with a blank (emission spectra of the solvent alone) and from the variations of the detector (a photomultiplier) with the emitted wavelength.

Measurements of fluorescence quantum yields:[10]

Fluorescence quantum yield were measured using quinine bisulfate in H_2SO_4 1N or Rhodamine 6G in ethanol as references, depending on the emissions wavelengths. Measurements were averaged on six spectra recorded (two dilutions and three excitation wavelengths near the maximum absorption wavelength of the compound). Measurements were performed with solutions of OD < 0.1. Quantum yield was calculated using equation (1), where s stands for the standard and u for the compound to measure, F is the area of the fluorescence spectrum, A the absorbance of the solution and n and n_0 the refraction index of the solvents used for the compound and the standard. Experimental errors can be estimated to +/- 10 %.

$$(1)\ \phi_u = \frac{\left(1-10^{-A_s}\right)F_u n^2}{\left(1-10^{-A_u}\right)F_s n_0^2}\phi_s$$

G4 - binders:

For all the G4-binders tested, stock solutions (from 450 µM to 2 mM depending on the compounds) were prepared in H_2O or in DMSO depending on the product solubility and kept at -18°C.

[10] IUPAC Commision on Photochemistry « Reference Compound for Fluorescence Measurements", November 1986.

Fluorescent DNA binders:

TO is purchased from Aldrich and used without further purification; stock solution (2 mM) is prepared in DMSO and kept at -18°C. **DAPI** and **TO-PRO3** are generous gifts from Marie-Pierre Junier (Laboratoire de Neuropharmacologie, Collège de France).

Quadruplexes and duplex-DNA:

Oligonucleotides are purchased from Eurogentec (Belgium).

22AG is an oligonucleotide mimicking the human telomeric repeat: [5'-$AG_3(T_2AG_3)_3$-3'].

The thrombin binding aptamer sequence (TBA) is: [5'-$G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2$-3'].

Quadruplexes from 22AG and TBA are prepared by heating the corresponding oligonucleotides at 90°C for 5mn in a 10mM sodium cacodylate buffer pH 7.3, 100mM KCl and cooling in ice to favour the intramolecular folding by kinetic trapping. For 22AG in Na^+ buffer, the same protocol is applied in a 10mM sodium cacodylate buffer pH 7.3, 100mM NaCl.

Duplex ds26 is a 26bp autocomplementary sequence used in previous studies which sequence is: [5'- CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG 3'].

The 17bp duplex is a biological sequence used in previous studies. The sequences of the two complementary strands are the following:

[5'- CCAGTTCGTAGTAACCC - 3'] / [5'- GGGTTACTACGAACTGG -3']

Duplex oligonucleotides are prepared by heating the two corresponding complementary strands at 90°C for 5mn in a 10mM sodium cacodylate buffer pH 7.3, 100mM KCl then slowly cooled overday.

Once prepared, all oligonucleotides are stocked overnight at 4°C. Concentrations are evaluated by UV (after thermal denaturation (5mn, 85°C)) before use.

Herring testes DNA is purchased from Sigma (ref D6898, Tm 87.4°C, GC 42.7%). It is prepared by heating the sample at 90°C for 5 mn in a 10 mM sodium cacodylate buffer pH 7.3 then slowly cooled overday.

FRET experiments:

For each experiment, spectra are recorded in the following order: 1- addition of BOQ_1 or MMQ_1 (0.5µM); 2- addition of TO (0.5µM) and then addition of oligonucleotides: 3- 0.1µM; 4- 0.2µM; 5- 0.3µM; 6- 0.4µM; 7- 0.5µM; 8- 0.75µM; 9- 1.0µM; 10- 1.25µM; 11- 1.5µM; 12- 2.0µM and 13- 2.5µM. A fluorescence emission spectrum is recorded at 0 and 5 min after

each addition of DNA (only spectra recorded after 5 min are presented), for both excitation wavelengths 328 and 501nm.

FID experiments:

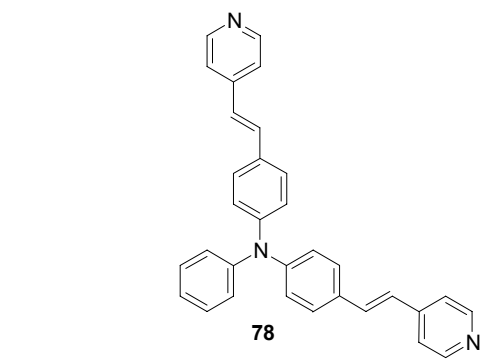
G4-FID experiments are performed as follows: onto a mixture of pre-folded 22AG-quadruplex (0,25µM) and TO (0,50µM), in a 10mM sodium cacodylate pH 7.3, 100mM K^+ buffer, addition of increasing concentration of ligand (from 0.5 to 10 equiv.) is followed by a 3 min equilibration period before the fluorescence spectrum is recorded (excitation wavelength 501nm). The fluorescence area (FA, 510-750nm), converted in percentage displacement (PD, with PD = 100-[(FA/FA_0)×100], FA_0 being FA before addition of ligand), is then plotted *vs* the concentration of added ligand. $^{G4}DC_{50}$ value is designed as the required concentration to displace 50% TO from 22AG ($^{G4}DC_{50}$). Comparative FID experiments are performed under the same conditions, except that 22AG-quadruplex is replaced by 17-mer duplex.

Titration experiments:

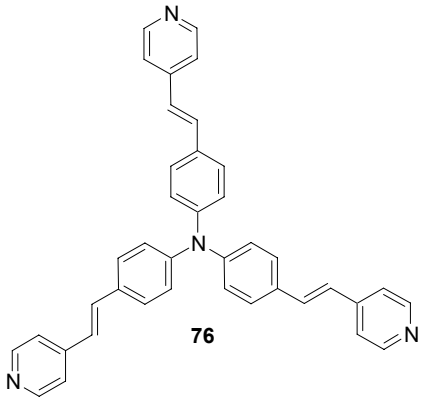
Titration experiments are performed in a 10mM sodium cacodylate buffer pH 7.3 100mM KCl or NaCl. Spectra are recorded in the following order: 1- addition of TO (0.5 or 1.0µM) and then addition of quadruplex (22AG or TBA) until saturation of the fluorescence intensity is reached. Fits are performed using the software Specfit32 version 3.0, *Spectrum Software Associates*, Marlborough, MA, U. S. A.

Annexe A : Récapitulatif des composés testés

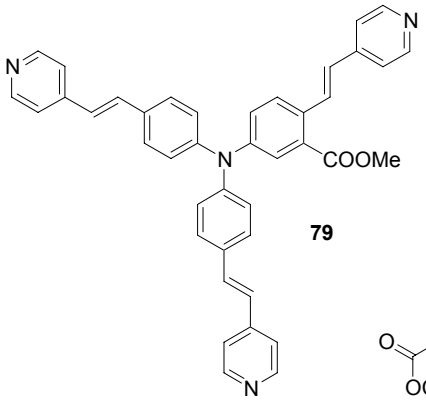
Triphénylamines substituées par des groupements vinylpyridine :



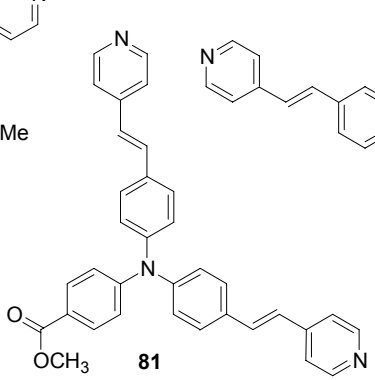
78



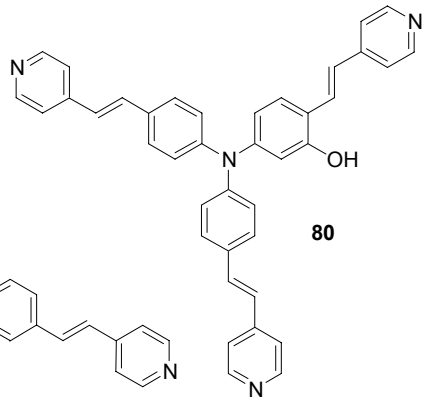
76



79

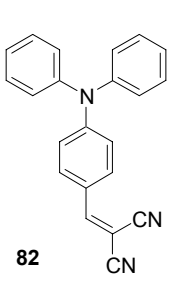


81

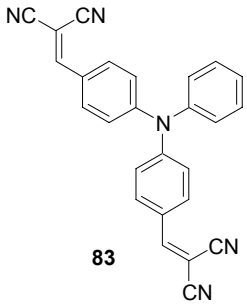


80

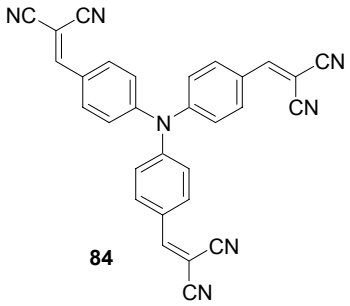
Triphénylamines substituées par des groupements biscyanovinyl :



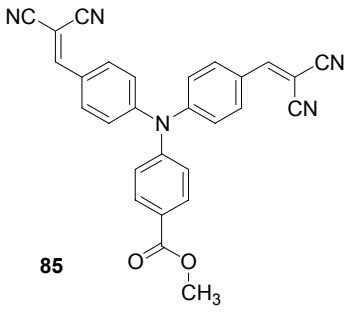
82



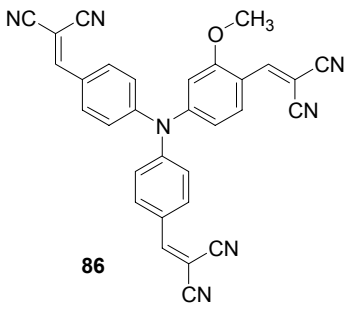
83



84

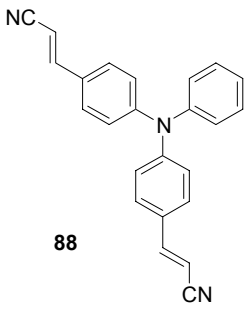


85

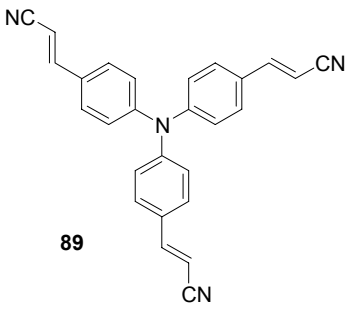


86

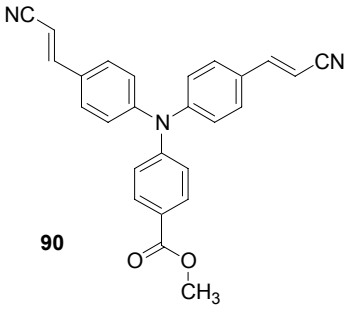
Triphénylamines substituées par des groupements cyanovinyl :



88

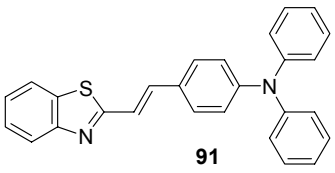


89

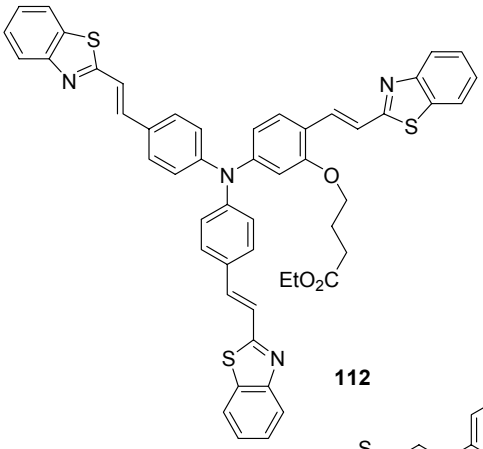


90

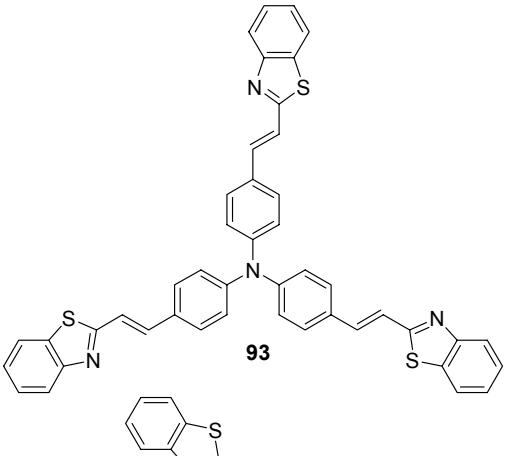
Triphénylamines substituées par des groupements vinylbenzothiazole :



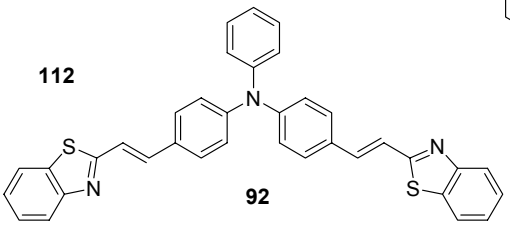
91



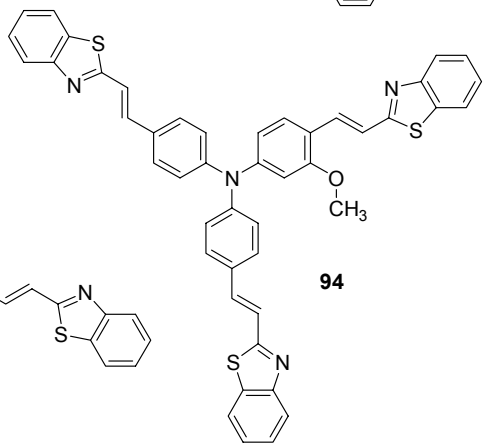
112



93

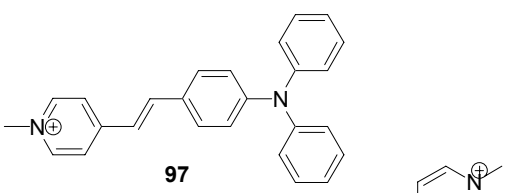


92

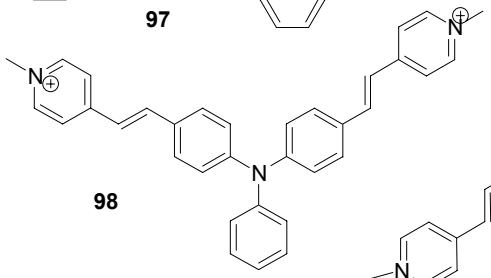


94

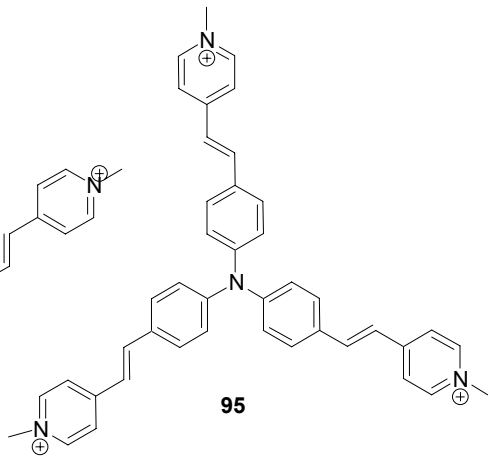
Triphénylamines substituées par des groupements vinylpyridinium :



97

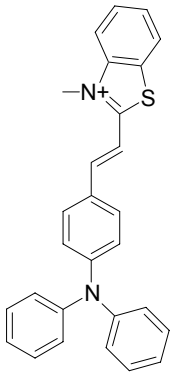


98

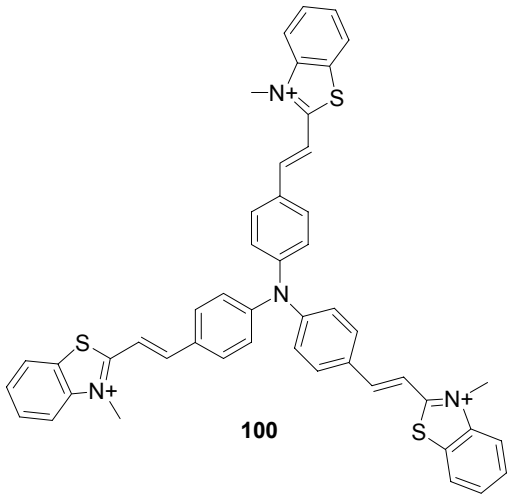


95

Triphénylamines substituées par des groupements vinylbenzothiazolium :

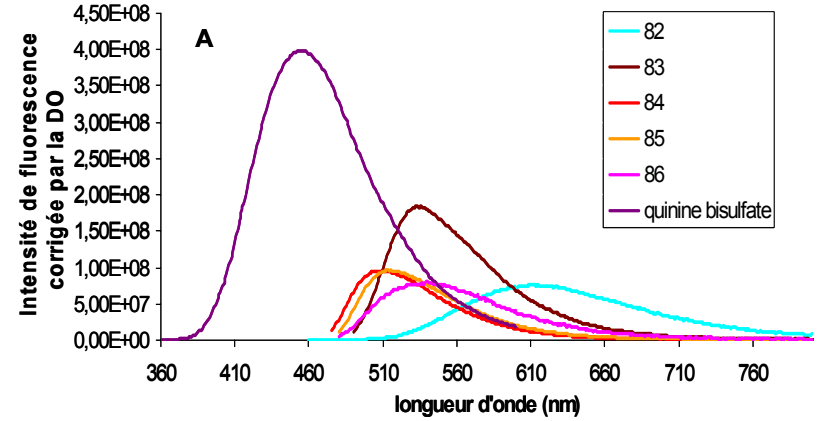


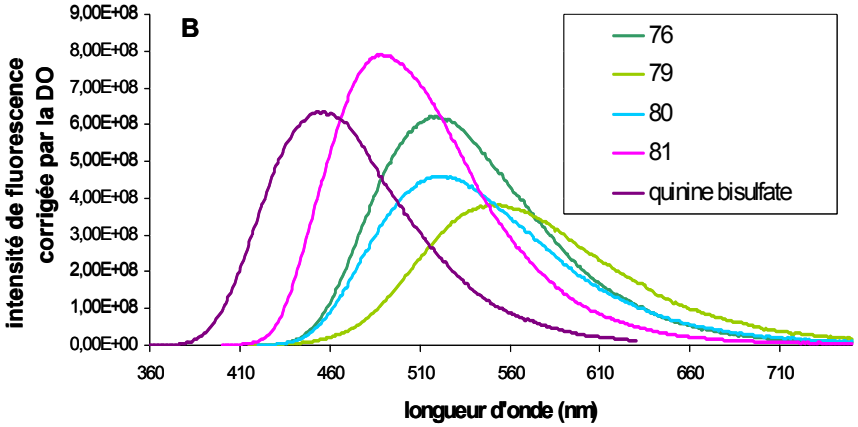
99

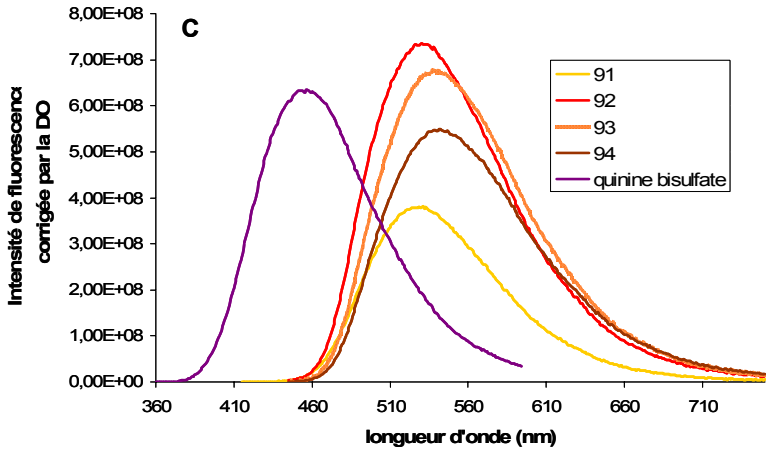


100

Annexe B : Spectres d'émission de fluorescence.







Spectres d'émission de fluorescence (intensité de fluorescence corrigée par la DO à la longueur d'onde d'excitation). La longueur d'onde d'excitation est prise au maximum d'absorption (pour la quinine bisulfate, 345 nm). La quinine bisulfate est en solution dans H_2SO_4 1N, les composés sont en solution dans le dichlorométhane, sauf les composés **82** à **85,** qui sont en solution dans le chloroforme. **A**. triphénylamines substituées par le groupement biscyanovinyl. **B**. triphénylamines substituées par le groupement vinylpyridine. **C**. triphénylamines substituées par le groupement vinylbenzothiazole.

Annexe C : mesures des sections efficaces d'absorption à deux photons.

A. Montage expérimental utilisé.

La figure C1 représente le montage utilisé pour la mesure. Nous avons utilisé un laser de type Titane-Saphir (Tsunami, Spectra Physics), qui délivre des impulsions femtosecondes (de largeur temporelle 90 fs environ, avec un taux de répétition de 76 MHz). La longueur d'onde des impulsions émises est accordable dans l'infrarouge entre 740 et 840 nm. Le faisceau laser est focalisé par une lentille de 20 mm de distance focale dans une cuve à quatre faces polies (de 1 cm de long et 2 mm de large) contenant la solution étudiée. La concentration de celle-ci est comprise entre 10 et 100 µM, et est mesurée au préalable par spectroscopie d'absorption UV-vis. Pour cette gamme de concentration, nous n'observons pas de phénomènes de réabsorption ou de quenching du signal de fluorescence : nous avons vérifié que ce signal variait linéairement avec la concentration en molécules.

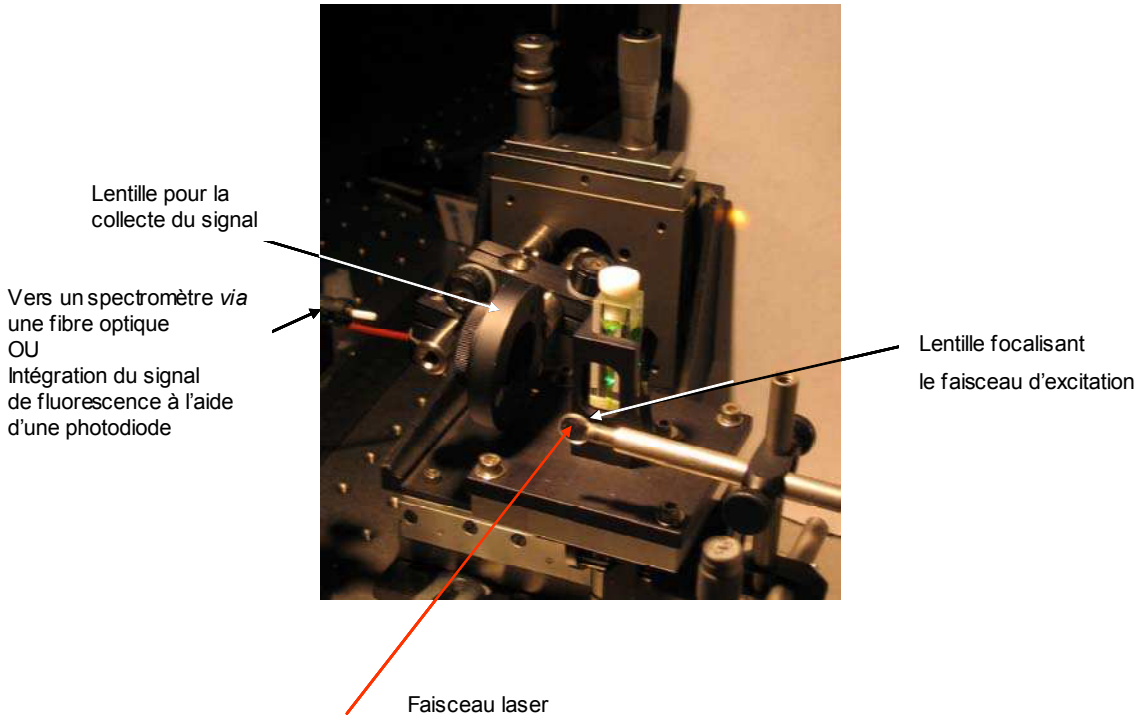


Figure C1 : détail du montage utilisé pour les mesures de section efficace d'absorption à deux photons. Le trait lumineux vert est la fluorescence excitée à 2 photons tandis que le point rouge correspond à la diffusion sur un écran blanc du faisceau fondamental transmis à travers la cellule.

Le signal de fluorescence, mesuré à 90° du faisceau d'excitation, est focalisé sur le détecteur par une lentille de grande ouverture numérique. Comme précisé dans le chapitre II-3, paragraphe III-A de ce manuscrit, la caractérisation des molécules se fait par comparaison de l'intensité de fluorescence émise avec celle d'une molécule référence. La fluorescence de la molécule étudiée étant mesurée juste après celle de la référence, il est possible d'affirmer

que la puissance du faisceau laser ne varie pas. De plus, on considère que l'efficacité de collection de la lumière émise est la même quelle que soit la molécule étudiée. Cette hypothèse est valable car la lentille de collection achromatique dans la gamme de longueurs d'onde étudiée.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé deux détecteurs. Le premier est un spectromètre, sur lequel on envoie le signal de fluorescence *via* une fibre optique. Ce spectromètre présente l'avantage de donner accès au spectre de fluorescence sous excitation à deux photons. Nous avons ainsi pu vérifier que celui-ci est bien identique au spectre de fluorescence sous excitation à un photon. En revanche, la sensibilité du spectromètre, la transmission de la fibre optique et le comportement du réseau contenu dans le spectromètre varient en fonction de la longueur d'onde du signal de fluorescence. L'intégration du signal ainsi collecté donne lieu à des résultats qui peuvent être entachés d'une erreur importante selon la gamme spectrale de l'émission : la comparaison directe des signaux de la référence et du composé testé n'est pas possible. Nous avons donc essentiellement utilisé ce spectromètre pour des mesures qualitatives et des comparaisons des spectres d'émission.

Afin de faire des mesures quantitatives de l'intégralité de la fluorescence émise, ce qui est nécessaire pour déterminer les sections efficaces d'absorption à deux photons, nous avons utilisé un deuxième détecteur. Nous avons choisi une photodiode (Hamamatsu) qui permet de mesurer l'intensité totale de la fluorescence émise avec un rendement quantique identique sur toute la gamme visible testée. La tension aux bornes de la photodiode, mesurée à l'aide d'un oscilloscope, est ainsi directement proportionnelle au nombre de photons détectés par celle-ci. Ceci implique que pour mesurer le signal de fluorescence, il faut éliminer au maximum le bruit provenant de la diffusion du faisceau d'excitation. Pour cela nous avons utilisé deux filtres, un filtre passe-bas (CVI) et un filtre coloré Schott (BG-40). Cependant, ces filtres coupent aussi une partie du signal de fluorescence des molécules qui ont une émission de fluorescence dans le rouge (triphénylamines vinylpyridinium), proche de l'excitation dans le proche-infrarouge. A partir des spectres d'émission de fluorescence sous excitation à un photon et des spectres d'absorption des filtres, nous avons calculé un facteur de correction en estimant la part du signal de fluorescence « perdue » par absorption dans les filtres. La figure C2 superpose les spectres d'absorption UV – Visible des deux filtres aux spectres d'émission de fluorescence des deux triphénylamines vinylpyridinium étudiées.

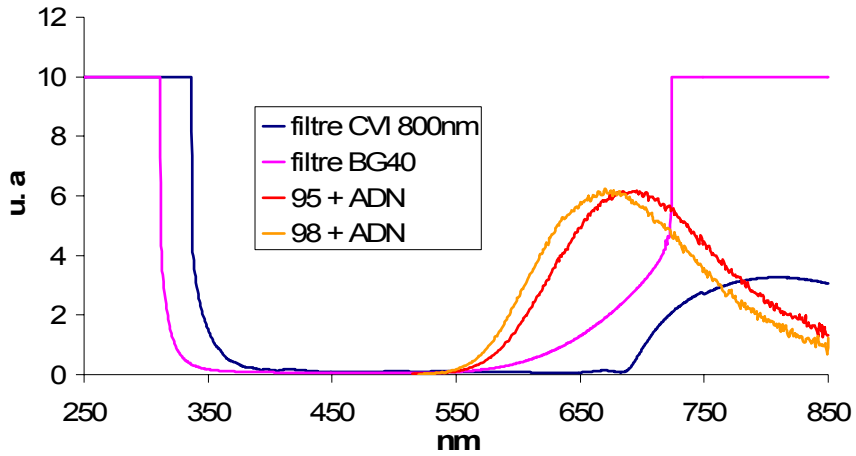


Figure C2 : spectres d'absorption des filtres utilisés pour couper le bruit provenant du faisceau d'excitation.

Par ailleurs, un mesureur de puissance peut être intercalé sur le trajet du faisceau incident pour mesurer la puissance de celui-ci (puissance moyenne donnée en W). Le faisceau laser étant polarisé linéairement, une lame demi-onde suivie d'un polariseur peuvent être placés sur le trajet du faisceau incident pour moduler la puissance d'excitation. Nous avons ainsi pu vérifier que l'intensité de fluorescence dépend bien de manière quadratique de l'intensité d'excitation.

B. Choix de la référence.

Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser la fluorescéine et la Rhodamine B, afin d'avoir des références dont l'émission soit proche de celle des chromophores testés. Toutefois, nous avons observé des écarts assez importants entre les valeurs de section efficace d'absorption à deux photons calculées en prenant l'une ou l'autre référence. Nous avons observé que les propriétés de la Rhodamine B variaient avec la concentration et le pH de la solution, ce qui pourrait expliquer en partie ces différences. De plus, la courbe de référence pour la Rhodamine B[1] est peu précise dans la gamme de longueur d'onde qui nous intéresse. Nous avons donc choisi d'utiliser la Rhodamine 6G à la place de la Rhodamine B. Les valeurs de section efficace d'absorption à deux photons de ces trois chromophores sont résumées dans la figure C3.

Nous avons continué à observer des différences non négligeables (entre 15 et 40 % d'écart) entre les valeurs de section efficace d'absorption à deux photons calculées en utilisant comme référence la fluorescéine d'une part et la rhodamine 6G d'autre part. Une dépendance assez importante, d'environ 40 %, des résultats de mesure en fonction de la référence choisie a déjà été décrite, sans que les auteurs proposent une explication à cette variation.[2] Dans notre

cas, l'écart mesuré entre nos deux références varie avec la longueur d'onde d'excitation, on peut donc supposer qu'il ne provient pas d'une variation de l'efficacité de détection du système. En revanche, cet écart peut provenir d'erreurs de lecture sur la courbe de la rhodamine 6G, du fait de l'échelle log (figure C3). De plus, cette courbe de section efficace d'absorption à deux photons en fonction de la longueur d'onde a elle-même été déterminée relativement à la fluorescéine donc avec une erreur expérimentale de 20-30 %. En outre, la plupart des études publiées se limitent à l'utilisation de la fluorescéine comme référence. Celle-ci semble la molécule la mieux caractérisée, c'est d'ailleurs la seule pour laquelle nous disposons d'un tableau de valeurs (figure C3). Pour toutes ces raisons, nous avons d'utiliser la fluorescéine comme référence pour déterminer les valeurs de section efficace d'absorption à deux photons des composés synthétisés.

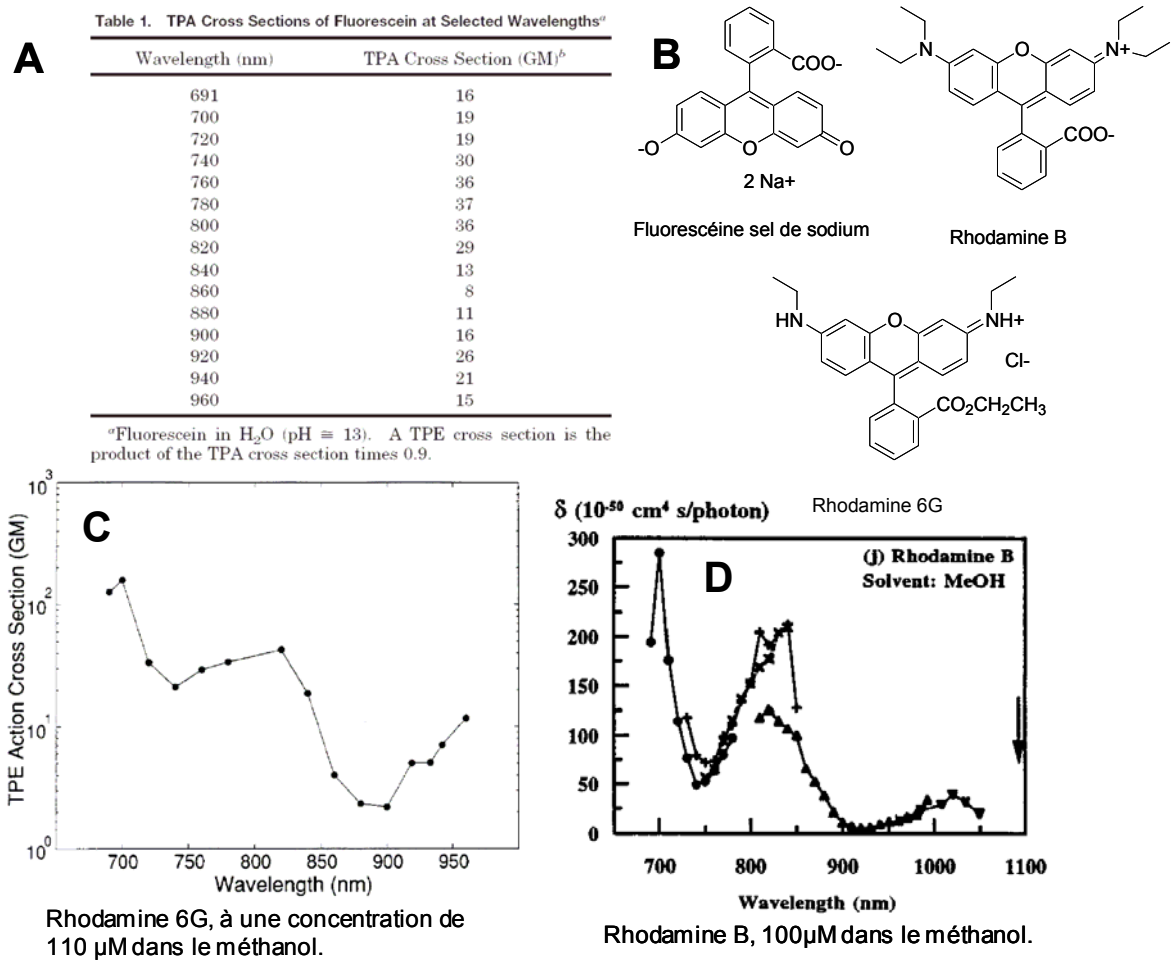


Figure C3 : sections efficaces d'absorption à deux photons en fonction de la longueur d'onde des trois chromophores utilisés comme références lors de ce travail. **A.** Fluorescéine[3] **B.** Structure des trois chromophores utilisés. **C.** Rhodamine 6G[3] **C.** Rhodamine B, les différents symboles correspondent à différents jeux de miroirs sur un laser Titane-Sapphire en mode impulsionnel, sauf les croix (x), qui correspondent au laser utilisé en continu (cw).[1]

Il faut noter que si ces mesures, comme la plupart des mesures d'optique non linéaire, présentent des incertitudes qui peuvent être grandes, elles nous permettent d'atteindre notre

objectif, qui est de comparer nos composés entre eux et avec des marqueurs standard et non pas de réaliser des mesures absolues.

Références bibliographiques :

(1) Xu, C.; Webb, W. W. *J. Opt. Soc. Am. B: Opt. Phys.* **1996**, *13*, 481-491.

(2) Bartholomew, G. P.; Rumi, M.; Pond, S. J. K.; Perry, J. W.; Tretiak, S.; Bazan, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11529-11542.

(3) Albota, M. A.; Xu, C.; Webb, W. W. *Appl. Opt.* **1998**, *37*, 7352-7356.

Annexe D : ADNs fonctionnalisés immobilisés sur des surfaces.

I. Introduction.

Le transfert de charges dans l'ADN est un processus qui a suscité une grande curiosité ces dix dernières années. A l'heure actuelle les mécanismes en sont largement élucidés, mais il subsiste beaucoup de controverses quant à son efficacité et donc à ses applications potentielles, qui semblent limitées à l'utilisation d'oligonucléotides courts. Parmi ces applications, on peut citer la détection électrochimique de défauts dans la structure de l'ADN : l'efficacité du transfert de charge est hautement dépendante de l'intégrité de la structure en double hélice. Le rôle biologique de ce phénomène reste un sujet ouvert en raison des transferts d'électrons qui interviennent dans les systèmes de réparation de l'ADN. En l'état actuel des connaissances, la mise en œuvre de méthodes physiques permettant de mettre en évidence et de mesurer la capacité de conduction d'une molécule unique d'ADN semble particulièrement intéressante pour mieux comprendre ce phénomène et ses implications.

A cet égard, la microscopie à effet tunnel (Scanning Tunneling Microscopy ou STM) semble prometteuse. En effet, les techniques de microscopie en champ proche - AFM (microscopie à force atomique) et STM - se sont révélées être des outils extrêmement puissants pour l'étude des macromolécules biologiques. Ces techniques offrent la possibilité de manipuler une molécule unique *via* la pointe. De plus le STM, dont nous présenterons le principe plus loin, permet la résolution à l'échelle atomique et donne un accès unique aux propriétés électroniques d'objets individuels immobilisés sur une surface.

L'objectif ultime de ce projet est de préparer et de caractériser des monocouches d'ADN organisées sur des surfaces atomiquement planes, puis d'utiliser la pointe du STM pour exciter la luminescence de ces ADNs marqués par des chromophores et étudier les phénomènes de conductivité électrique sur des molécules d'ADN individuelles. Le substrat choisi pour cette étude est une surface d'or (111), classiquement utilisé dans les études STM. En effet, des oligonucléotides modifiés à une extrémité par une fonction thiol, disponibles commercialement, peuvent y être greffés *via* l'interaction SH / or. De plus, ces surfaces sont chimiquement stables, conductrices et présentent de grandes terrasses atomiquement planes (plusieurs centaines de nanomètres). Dans une première étape, il s'agissait d'obtenir des couches organisées d'oligonucléotides sur ces surfaces. L'organisation de la monocouche est en effet essentielle pour l'identification des molécules d'ADN et donc pour l'étude de leurs propriétés.

II. Le principe du STM.

L'effet tunnel est un phénomène connu depuis les débuts de la mécanique quantique. Dans cette théorie, une particule peut aussi être décrite comme une fonction d'onde et possède une probabilité non nulle de franchir une barrière de potentiel d'énergie plus haute que la sienne. Les premières applications expérimentales de ce phénomène datent des années 1960[1] et le premier microscope à effet tunnel date de 1982.[2]

Le principe de ce microscope[3] (figure 1) repose sur l'utilisation d'une pointe métallique très fine, approchée à quelques angströms de la surface de l'échantillon. Une différence de potentiel de quelques millivolts à quelques volts est appliquée entre ces deux électrodes (pointe et surface). Si la pointe est suffisamment proche de la surface – c'est-à-dire en interaction avec les ondes évanescentes des électrons du substrat - elle produit alors un champ électrique local très élevé et un courant tunnel appréciable peut se former entre son extrémité et la surface. Ce courant est mesuré dans un système électronique associé : la pointe constitue alors une sonde locale qui permet de mesurer la densité du nuage électronique environnant la surface. Le principe de l'expérience consiste à déplacer la pointe au-dessus de la surface du film en maintenant le courant tunnel constant par un dispositif d'asservissement. Ainsi la distance pointe-échantillon reste constante et l'enregistrement des déplacements verticaux de la pointe reproduit alors la topographie de la surface. La possibilité d'opérer à hauteur constante en enregistrant les variations du courant tunnel constitue un autre mode d'analyse.

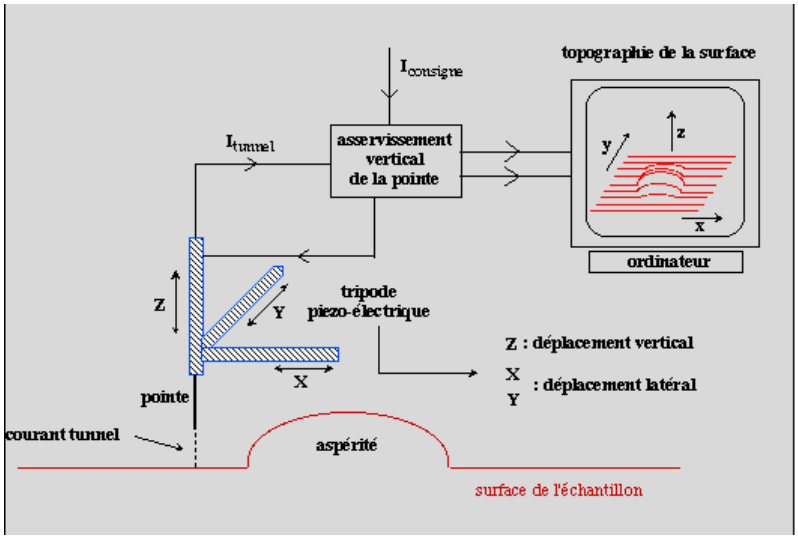


Figure 1 : schéma de principe du STM (extrait de http://www-drecam.cea.fr/Images/astImg/225_1.gif).

Deux grands types de conditions peuvent être utilisées pour imager un échantillon par STM en le protégeant des constituants de l'atmosphère environnante. Le premier consiste à travailler sous ultra-vide (UHV), dans une enceinte permettant d'atteindre des pressions de

l'ordre de 10^{-11} mbar. L'autre possibilité, moins contraignante, consiste à travailler à l'interface liquide-solide : l'échantillon est alors protégé par une goutte de liquide isolant, typiquement un alcane à longues chaînes, par exemple le tétradécane. Par ailleurs, il existe des microscopes à effets tunnels utilisés en conditions électrochimiques, dits STM *in situ*, permettant de travailler directement en milieu aqueux. Nous n'avons pas pu utiliser ce type d'appareil au cours de cette étude, nous n'en développerons donc pas le principe.

Un effet physique particulièrement intéressant pour l'étude envisagée est l'émission de lumière stimulée par la pointe STM : pour des tensions de polarisation V_{BIAS} de quelques volts entre la pointe et la surface, chaque électron injecté possède un excès d'énergie eV_{BIAS} de quelques eV suffisant pour générer un photon dans le domaine visible. L'analyse spectrale[4] et résolue dans le temps[5] de la lumière émise peut alors apporter des informations sur les processus électroniques élémentaires impliqués dans le transfert tunnel local (nature de charges générées, dynamique des processus). Dans le cas d'une monocouche d'oligonucléotides fonctionnalisés par des fluorophores, l'émission de photons stimulée par le STM permet de repérer les molécules fluorescentes, en complément de la topographie de la surface.

III. ADNs immobilisés sur des surfaces.

A. Etudes expérimentales existantes.

Le dépôt d'oligonucléotides modifiés par des thiols sur des surfaces d'or a fait l'objet de plusieurs études par des méthodes physiques caractérisant le dépôt de manière « globale» et non pas à l'échelle de la molécule : spectroscopies XPS[6] et infra-rouge par transformée de Fourier (FT-IR)[6,7], SPR[8], réflectivité de neutrons.[9] La plupart de ces études sont effectuées sur de l'or polycristallin. Ces études mettent en évidence que l'adsorption d'ADN a lieu plus facilement quand le dépôt est fait dans un tampon de force ionique très élevée (de l'ordre de 1 M). L'origine de cet effet de sel n'est pas encore bien compris. Les concentrations des solutions d'oligonucléotides utilisées pour les dépôts sont faibles, de l'ordre de quelques µM. De plus, ces études mettent en évidence un mode d'interaction mixte avec la surface : d'une part interaction entre le thiol et l'or et d'autre part adsorption plus faible, dite « non spécifique » des bases nucléiques sur l'or.[6,7] Une stratégie pour limiter cette adsorption et donc obtenir des dépôts plus organisés a été développée ces dernières années. Elle consiste faire des dépôts mixtes ADN-thiols / mercaptohexanol, qui doivent redresser les molécules d'ADN par rapport à la surface. Il a été montré, en utilisant des oligonucléotides radioactifs, que cette stratégie de dépôts mixtes, dont le principe est représenté figure 2, conduit à une

bien meilleure hybridation des oligonucléotides déposés sur la surface avec le brin complémentaire.[9]

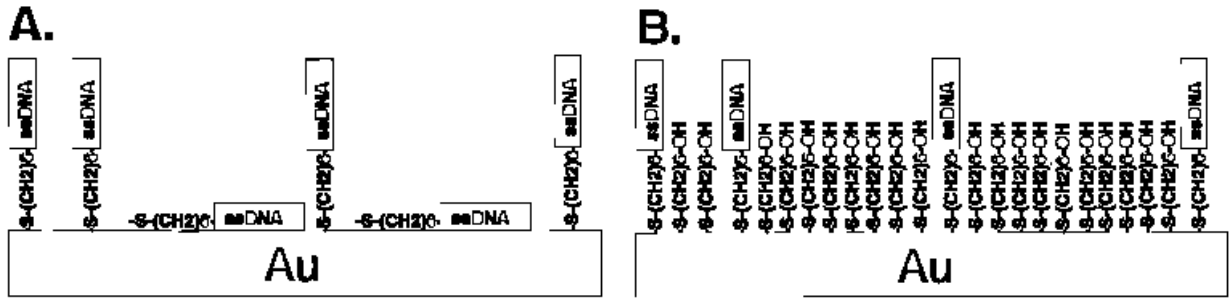


Figure 2 : **A.** dépôt d'ADN-thiol seul. **B.** dépôt mixte ADN-thiol / mercaptohexanol. Image extraite de Tarlov *et al.* [8]

Plusieurs articles décrivent l'imagerie par STM de longs brins d'ADN déposés sur des surfaces.[10-12] En revanche, les dépôts d'oligonucléotides courts (environ 10-30 bases) n'ont quasiment pas été caractérisés de façon directe. Une seule étude, utilisant le STM *in situ*, a décrit des monocouches organisées d'oligonucléotides simples brins.[13] L'organisation de ces monocouches n'apparaît que lorsque le potentiel de la cellule électrochimique dans lequel est effectuée la mesure STM est inférieur à une valeur seuil. Ce système a aussi été utilisé sur des monocouches mixtes ADN-thiol / mercaptohexanol.[14] De façon inattendue, aucune structure organisée n'est observée. Néanmoins l'ajout d'un complexe de ruthénium connu pour interagir avec l'ADN se traduit par l'apparition de points brillants que les auteurs attribuent à des molécules d'ADN en interaction avec le complexe. Enfin, récemment, des mesures de conductance à l'échelle de la molécule unique ont été obtenues par STM sur des oligonucléotides. Toutefois aucune image associée n'est publiée.[15] Cette étude n'apporte donc pas d'informations sur l'organisation des oligonucléotides déposés sur l'or.

En raison de la diversité des techniques employées et d'une certaine confusion des résultats obtenus, nous avons entrepris de simplifier le système et de reproduire certains résultats publiés dans la littérature.

B. Dépôts d'oligonucléotides sur une surface d'or.

Une première étude a été réalisée antérieurement à ce travail et aux publications utilisant le STM *in situ*.[3] La molécule d'ADN utilisée était un duplexe de 10 paires de bases (la mesure d'un courant tunnel nécessite que l'ADN soit de petite taille), où chacun des deux brins complémentaires comportait une extrémité fonctionnalisée. L'un des brins (de séquence 5'-GACGTCAGTC-3') était fonctionnalisé en 3' par une chaîne alkyle à 3 carbones terminée par

une fonction thiol et l'autre brin (de séquence complémentaire 5'-GACTGACGTC-3') était fonctionnalisé en 3' par une molécule de rhodamine, reliée à l'oligonucléotide par une chaîne alkyle à six carbones. L'échantillon d'or a été plongé pendant 24h dans la solution d'ADN (25 μM en double brin, dans un tampon phosphate pH 7,4 dégazé) puis rincé abondamment à l'eau stérile dégazée pour éliminer les sels contenus dans le tampon.

L'échantillon a ensuite été imagé par STM sous ultra-vide : une multitude de petits grains sont observés. Les dimensions latérales de ces grains correspondent à celles attendues pour les molécules d'ADN individuelles. Leur densité électronique fait varier la position verticale de la pointe du STM de façon compatible avec la taille des molécules d'ADN. Aucun motif intramoléculaire caractéristique n'est cependant résolu sur l'image, il n'est donc pas possible conclure de manière définitive sur la nature de ces spots. La topographie de la surface s'est révélée inhomogène et de la même façon, les mesures d'émission de photons induites par STM ont montré une grande inhomogénéité entre les spots. Quelques uns de ces spots ont généré une émission intense lorsque la tension de polarisation V_{BIAS} du STM correspond au maximum d'excitation de la rhodamine, ce qui pourrait correspondre à une recombinaison radiative électron / trou dans le chromophore donc à un transfert de charge au sein de l'ADN. L'inhomogénéité observée entre les spots pourrait être due à une dissociation des deux brins du duplexe, peu stable car composé seulement de 10 paires de bases.

Ce premier essai et les résultats publiés entre temps nous ont incité à poursuivre avec des molécules d'ADN plus simples, dans le but d'une part d'identifier de manière non équivoque des molécules d'ADN individuelles et d'autre part de pouvoir étudier l'influence éventuelle de la séquence et de l'hybridation sur le dépôt des molécules. Dans un premier temps, nous avons donc choisi de nous intéresser à des oligonucléotides simple brin composés exclusivement d'adénines, par analogie avec l'étude réalisée par Ulstrup *et al.*[13] Deux oligonucléotides ont été testés au cours de cette étude : un 10-mer, noté 10A-SH et un 2-mer d'adénines, noté 2A-SH. Pour les deux oligonucléotides, le bras espaceur entre l'extrémité 5' de l'oligonucléotide et la fonction thiol est une chaîne alkyle à 6 carbones.

Les échantillons de Au(111) s'obtiennent en évaporant une couche d'or de ~ 1000 Å sur une feuille de mica fraîchement clivée. Les surfaces préalablement rincées à l'éthanol sont recuites à la flamme d'un chalumeau de poche au propane jusqu'à l'obtention d'une luminescence rouge–orangée (indiquant une température de l'ordre de 450°C). L'image STM de ces échantillons montre alors qu'ils présentent de larges terrasses reconstruites selon une

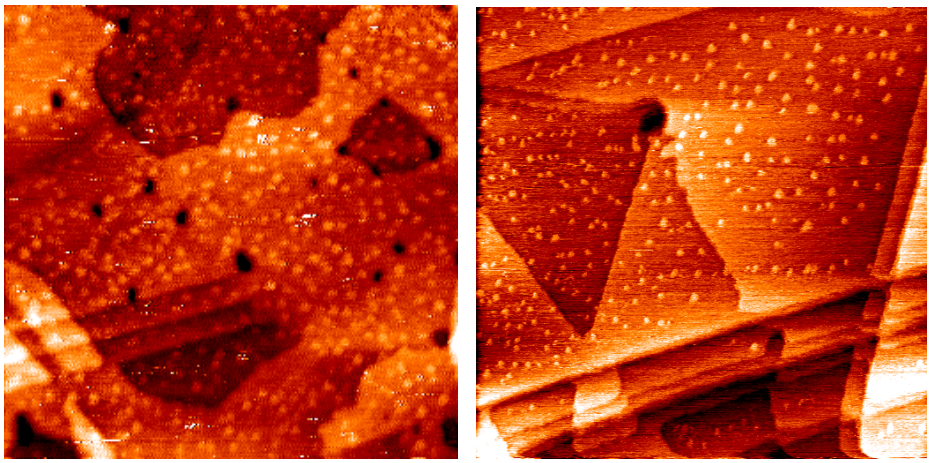
maille en $22 \times \sqrt{3} R30°$ caractéristique des faces Au(111) chimiquement pures. L'observation de cette reconstruction est un préalable à l'utilisation du substrat.

Quatre conditions de dépôts ont été testées avec l'oligonucléotide 10A-SH. Le premier dépôt reprend les conditions utilisées par Ulstrup *et al.*[13]: utilisation d'une solution 1 µM en oligonucléotide, 0,01 M en tampon phosphate pH 6,9. Un bullage d'argon est maintenu dans la solution pendant 1 à 2 h : nous avons travaillé en milieu dégazé pour éviter l'oxydation des fonctions thiols à l'air. La lame d'or est maintenue dans la solution d'oligonucléotide pendant 16 à 18 h. Les images de cet échantillon (imagé à l'air puis protégé par une goutte de dodécanol) montrent que la surface d'or n'est pas altérée par les conditions de dépôt : les terrasses et les marches monoatomiques sont bien visibles. Ceci constitue un résultat encourageant puisqu'on pourrait s'attendre à une disparition de la reconstruction observée pour une surface d'or soumise a une solution saline. Toutefois, on ne voit pas les « etch pits » qui caractérisent l'attaque chimique de l'or par les thiols, c'est-à-dire les trous dans la surface dus au départ d'un thiol chimisorbé entraînant avec lui un atome d'or.

Le deuxième dépôt a été réalisé en utilisant une solution 25 µM en oligonucléotide dans le même tampon, avec le même temps de dépôt, c'est-à-dire en se plaçant dans des conditions analogues à celles utilisées lors de l'étude sur le duplexe. Les images, obtenues à l'interface or-tétradécane montrent une surface d'or en bon état, sans « etchpits » mais avec des protubérances régulièrement espacées. Un dépôt de contrôle a ensuite été effectué, avec la solution tampon uniquement. Les mêmes protubérances que précédemment sont visibles, ce qui semble indiquer que ces protubérances correspondent à des sels adsorbés sur l'or. Ces résultats semblent en contradiction avec les données publiées dans la littérature, qui font état de couches d'oligonucléotides formées à partir de solutions de concentrations inférieures au µM.

Un troisième dépôt a été réalisé, en utilisant la solution mère 500 µM d'oligonucléotides, sans tampon ajouté. Deux images représentatives sont montrées sur la figure 3 : comme précédemment, on y voit des spots, mais en plus grand nombre. Ces spots résistent extrêmement bien aux forts courants et faibles tensions ce qui indique une grande conductivité électrique et une bonne stabilité mécanique. Une série d'images successives de l'échantillon a par la suite montré que ces protubérances évoluaient au cours du temps en coalesçant, formant alors de nouvelles terrasses dont la hauteur de marche est celle des marches d'or (111). On peut donc conclure que les protubérances initiales étaient formées d'atomes d'or redéposés sur la surface. L'ADN thiol a donc fortement réagi avec la surface, toutefois il n'est pas imagé

par STM, ou bien il ne reste pas sur la surface. A ces fortes concentration, des etch-pits sont observés, confirmant la réaction entre les thiols et l'or.



échelle : carré de 250 nm de côté 350 nm de côté

Figure 3 : Images STM du dépôt réalisé avec la solution 500 µM d'oligonucléotides dans l'eau.

Le dernier dépôt a été effectué en trempant un échantillon d'or (111) dans une solution 125 µM en 10A-SH, 7,5 mM en tampon phosphate pH 6,9, pendant une nuit, sous balayage d'argon. L'échantillon est ensuite rincé à l'eau Millipore et séché sous argon. Le spectre FT-IR réalisé sur cet échantillon montre la présence d'ADN. Grâce à l'intensité du signal, il est possible d'estimer que la quantité d'ADN déposée est de l'ordre d'une monocouche d'ADN à plat sur l'or (figure 4).

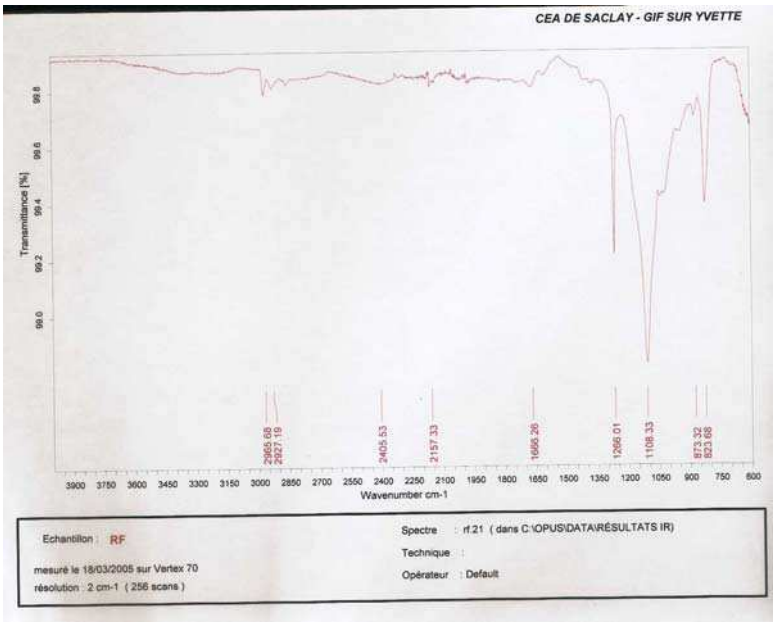


Figure 4 : spectre FT-IR du dépôt d'ADN sur une surface d'or.

Dans les conditions que nous avons utilisées, nous déposons donc de l'ADN sur la surface d'or. Toutefois, nous ne sommes pas parvenus à imager une structure reconnaissable,

ni à visualiser aucune auto-organisation sur la surface. Ceci peut être dû notamment à un étalement des brins d'ADN sur la surface, les bases nucléiques étant susceptibles de s'adsorber sur l'or. Pour limiter l'influence de ce phénomène, nous avons choisi de travailler avec un oligonucléotide plus court, le 2A-SH.

Etant donné qu'il semblait important de travailler à fortes concentrations en sel,[6,8] nous avons choisi d'utiliser un tampon phosphate 1 M, pH 6,9. L'influence du tampon a tout d'abord été étudiée, en préparant trois échantillons : un dans le tampon 1 M seul, un dans une solution 10 µM de 2A-SH, 1 M tampon phosphate et un troisième échantillon dans une solution 10 µM de 2A-SH sans tampon ajouté. La comparaison des échantillons « ADN+tampon » et « tampon seul » montre que la présence du tampon se traduit par la formation de spots sur la surface, très mobiles et qui partent à fort courant. Sur l'échantillon contenant l'ADN et le tampon, imager à fort courant et faible tension (1,1 nA, -400 mV) entraîne la formation de « etchpits ». L'échantillon d'or ayant trempé dans la solution « ADN seul » présente une surface beaucoup plus propre, avec quelques rares trous. On peut supposer en comparant ces trois expériences que la présence du tampon, même si elle se traduit par la présence de spots parasites, favorise l'interaction de l'ADN-thiol avec l'or. Néanmoins, aucune structure organisée ni même aucun élément pouvant être clairement identifié comme des molécules individuelles d'ADN n'est observé.

Dans un deuxième temps, nous avons essayé de former des monocouches mixtes 2A-SH / mercaptohexanol. L'objectif est de repérer les molécules d'ADN qui doivent apparaître comme des spots au milieu du réseau formé par le mercaptohexanol. Pour cela, un échantillon d'or (111) a été introduit dans une solution (préalablement dégazée par bullage d'argon) 40 µM en 2A-SH, 0,95 M en tampon phosphate. Un échantillon contrôle est introduit dans une solution de tampon 1 M. Les deux échantillons sont laissés en solution une nuit, puis plongés dans des solutions aqueuses de mercaptohexanol 60 mM pendant une heure. Les images STM des deux échantillons ne permettent pas de voir le réseau caractéristique du mercaptohexanol. Le passage dans la solution tampon semble donc conduire à un dépôt qui perturbe ensuite l'autoassemblage du mercaptohexanol. Cette stratégie ne semble donc pas permettre d'obtenir des structures auto-organisées pouvant être imagées par STM.

C. Conclusions et perspectives.

Les différents essais effectués nous ont montré que nous déposions effectivement de l'ADN sur l'or : présence de pits caractéristiques de l'interaction thiol-or, spectre infrarouge montrant la présence d'ADN sur la surface. Toutefois aucune structure organisée, ni même

aucun élément pouvant être clairement identifié comme étant une molécule individuelle d'ADN n'a été imagé, même en travaillant dans des conditions douces (courant de quelques pA), *a priori* peu susceptibles de déplacer les molécules lors du passage de la pointe. Aucune explication véritablement satisfaisante ne peut être pour l'instant apportée à cet échec. Plusieurs autres essais peuvent être envisagés : dépôt en présence de TCEP, une phosphine hydrosoluble qui réduit les ponts disulfures, ou dépôt de hairpins, plus stables que les duplexes courts et plus rigides que les simples brins, ce qui doit entraîner une interaction différente avec la surface. Il reste cependant possible qu'il soit nécessaire d'utiliser des conditions beaucoup plus proches du milieu biologique pour imager de l'ADN. Au vu des résultats que nous avons obtenus, il est toutefois étonnant que le STM in-situ, travaillant à beaucoup plus fort courant tunnel (plus élevé de plus de deux ordres de grandeur !), permette d'imager aussi facilement des brins d'ADN. On peut noter qu'aucune image d'échantillon témoin (sans ADN, mais ayant subi les mêmes traitements par ailleurs) n'ait été rapportée dans les articles correspondants…

Références bibliographiques :

(1) Esaki, L. *Phys. Rev.* **1958**, *109*, 603.
(2) Binnig, G.; Rohrer, H. *Helv. Phys. Acta* **1982**, *55*, 726.
(3) Silly, F. thèse de doctorat, Université Paris VI, 2001.
(4) Wu, S. W.; Ogawa, N.; Ho, W. *Science* **2006**, *312*, 1362-1365.
(5) Perronet, K.; Schull, G.; Raimond, P.; Charra, F. *Europhys. Lett.* **2006**, *74*, 313-319.
(6) Petrovykh, D. Y.; Kimura-Suda, H.; Whitman, L. J.; Tarlov, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5219-5226.
(7) Kimura-Suda, H.; Petrovykh, D. Y.; Tarlov, M. J.; Whitman, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9014-9015.
(8) Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8916-8920.
(9) Levicky, R.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J.; Satija, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9787-9792.
(10) Tanaka, H.; Hamai, C.; Kanno, T.; Kawai, T. *Surf. Sci.* **1999**, *432*, L611-L616.
(11) Tanaka, H.; Kawai, T. *Surf. Sci.* **2003**, *539*, L531-L536.
(12) Shapir, E.; Yi, J. Y.; Cohen, H.; Kotlyar, A. B.; Cuniberti, G.; Porath, D. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14270-14274.
(13) Wackerbarth, H.; Grubb, M.; Zhang, J. D.; Hansen, A. G.; Ulstrup, J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 198-203.
(14) Grubb, M.; Wackerbarth, H.; Ulstrup, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7734-7735.
(15) van Zalinge, H.; Schiffrin, D. J.; Bates, A. D.; Haiss, W.; Ulstrup, J.; Nichols, R. J. *Chemphyschem* **2006**, *7*, 94-98.

Annexe E

Cette annexe contient les modes opératoires pour la synthèse de composés obtenus au laboratoire et dont les propriétés de fluorescence et d'absorption à deux photons ont été mesurés au cours de ce travail de thèse, ou bien qui ont servi d'intermédiaires pour la synthèse de composés testés au cours de cette thèse.

Compound **24:**

To a solution of 7 - [(3 – N - (3 – amino – propyl) - 3' – N – methyl] propyl) aminomethyl] dibenzo[*b,j*][*1,7*]phenanthroline (TFA salt, 3.6 mg, 4.6 μmol) and triethylamine (10 μL) in DMF (2 mL) was added a solution of succinimidyl ester of 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene-3-propionic acid (Bodipy® FL , SE, 2.0 mg, 5.1 μmol, 1.1 eq.) in DMF (400 μL). The mixture was stirred overnight at rt in the dark. DMF was removed under vacuum, and the crude mixture was purified in reversed-phase HPLC to give **24** as a red powder. ^{1}H NMR (MeOD, 300 MHz) δ 2.01 (m, 2H), 2.05 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 2.15 (m, 2H), 2.38 (t, *J* = 6.9 Hz, 2 H), 2.59 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.88 (s, 3H), 2.90-2.99 (m, 4H), 3.17 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 5.01 (s, 2H), 5.90 (s, 1H), 6.10 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 6.73 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.78-7.88 (m, 2H), 8.02-8.09 (m, 2H), 8.20-8.33 (m, 2H), 8.44 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 9.19 (s, 1H), 10.30 (s, 1H).

Compound **25:**

To a solution of 2,10-Di[[(3-N-(3-amino-propyl)-3'-N-methyl]propyl)aminomethyl]dibenzo [b,j][1,7]phenanthroline **2** (TFA salt, 5.0 mg, 3.9 μmol) and triethylamine (10 μL) in DMF (2 mL) was added a solution of succinimidyl ester of 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene-3-propionic acid (Bodipy® FL , SE, 0.8 mg, 2.0 μmol, 0.5 eq.) in DMF (400 μL). The mixture was stirred overnight at rt in the dark. DMF was removed under vacuum, and the crude mixture was purified in reversed-phase HPLC to give **25** as a red powder. ^{1}H NMR (MeOD /D_2O, 300 MHz) δ 1.95 (m, 4H), 2.05-2.17 (m, 11H), 2.29 (m, 8H), 2.42 (s, 3H), 2.68 (m, 2H), 2.89 (s, 6H), 3.10 (m, 4H), 4.56 (s, 2H), 4.60 (s, 2H), 6.08 (s, 1H), 6.21 (d, 1H), 6.90 (d, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.96 (d, *J* = 10.2 Hz, 2H), 8.00-8.10 (m, 2H), 8.30-8.43 (m, 2H), 8.47-8.53 (m, 2H), 8.90 (s, 1H), 10.35 (s, 1H).

MS (ESI+) m/z 869.5 (10%) $[M+H]^+$ m/z 435.3 (100%) $[M+H]^{2+}/2$

Methyl, 2-Methoxy, 4-(N,N-bis(4-methoxycarbonylphenyl)amino)benzoate **55 :**

In dry and degassed toluene (30 mL) were introduced palladium acetate (186 mg, 828 µmol, 5%) and tris-*tert*-butylphosphine (7.7 mL, 2.48 mmol, 15 %, 10% in hexanes (*w*/*w*)). After 15 min stirring, were added methyl 4-bromobenzoate (10.7 g, 49.7 mmol, 3 equiv), methyl 2-methoxy,4-aminobenzoate (3.0 g, 16.6 mmol, 1 equiv) and cesium carbonate (13.5 g, 41.4 mmol, 2.5 equiv). The solution was refluxed for 17 h, cooled to rt and diluted with CH_2Cl_2 (100 mL). Crude mixture was filtered on Celite, evaporated to dryness and purified on silica gel column (*n*-hexane/CH_2Cl_2 (2:1) to CH_2Cl_2 gradient) to afford 6.35 g of a light yellow powder (14.8 mmol) in 89% yield. (TLC R_f=0.17, CH_2Cl_2/CH_3OH, 99:1, *v*/*v*). IR (KBr) 2839 ($\nu_{C\text{-}OMe}$), 1719 ($\nu_{C=O}$, ester), 1597 (Ar), 1507 (Ar) cm^{-1}. ^1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 3.76 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.94 (s, 6H), 6.68 (m, 2H), 7.17 (d, 8.7 Hz, 4H), 7.80 (d, 9.0 Hz, 1H), 7.98 (d, 8.7 Hz, 4H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.3, 165.8, 160.6, 151.0, 150.2, 133.2, 131.1, 125.4, 123.8, 116.0, 115.5, 108.0, 56.0, 52.0, 51.8.

HRMS (DCI+) calcd for $C_{25}H_{24}NO_7$, 450.1553; found 450.1548.

Monoarylation product was also obtained as major impurity.

Methyl, 4-(N,N-bis-(4-bromophenyl)amino)benzoate **58:**

To solution of methyl, 4-diphenylaminobenzoate (550 mg, 1.81 mmol) in chloroform (10 mL), NBS was added (708 mg, 3.98 mmol, 2.0 equiv). The reaction mixture was refluxed for 2 h. The cooled down solution was washed with water and brine and dried over magnesium sulphate. The crude product was purified by column chromatography (*n*-hexane/AcOEt; 85:15) to yield title compound as a pale yellow foam (817 mg, 1.77 mmol) in a 98% yield.

Mp 119-120°C

R_f (*n*-hexane/AcOEt; 4:1; *v*/*v*): 0.45; ^1H NMR ($CDCl_3$): 3.97 (s, 3H), 7.07 (d, 8.4 Hz, 6H), 7.50 (t, 8.4 Hz, 4H), 7.96 (d, 8.4 Hz, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 52.0, 117.4, 121.0, 123.6, 126.9, 131.1, 132.8, 145.5, 151.1, 166.6.

4-iodo-triphenylamine

In 6 mL of dry acetonitrile are dissolved 4-iodoaniline (201 mg, 918 µmol, 1.0 equiv) and 2-(trimethylsilyl)benzenetrifluoromethanesulfonate (490 µl, 602 mg, 2.020 mmol, 2.2 equiv). After 1 min stirring, crushed CsF was added (557 mg, 3.670 mmol, 4.0 equiv) and the mixture was kept from light and stirred 3 days at r.t. then, crude mixture was evaporated to dryness, taken up in *n*-hexane and filtered on a short plug of silica. Evaporation of mother liquor gave 326 mg of a white powder (878 µmol) in a 96 % yield.

mp 108 – 110 °C. (TLC R_f=0.63, *n*-hexane/Et_2O 95:5, *v*/*v*). IR (KBr) 1582 (Ar), 1489 (Ar) cm^{-1}. ^1H NMR (acetone-d_6) δ 6.82 (d, 7.5 Hz, 2H), 7.05 - 7.14 (m, 6H), 7.30 - 7.36 (m, 4H), 7.59 (d, 7.5 Hz, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) □147.8, 147.3, 138.1, 129.4, 125.3, 124.6, 123.4, 84.8. MS (DCI): 372 ($[M+H]^+$, 100), 246 ($[M-I+H]^+$, 37).

4,4'-diiodo-triphenylamine

As above, except that 4,4'-diiododiphenylamine (406 mg, 1.00 equiv), 2-(trimethylsilyl)benzenetrifluoromethanesulfonate (244 µl, 1.04 equiv) and CsF (295 mg, 2.01 equiv) were used. Title compound was obtained in a 86 % yield..

mp 88 – 90 °C. (TLC R_f=0.63, *n*-hexane/Et_2O 95:5, *v*/*v*). IR (KBr) 1572 (Ar), 1489 (Ar) cm^{-1}. ^1H NMR (acetone-d_6, 300 MHz) δ 6.87 (d, 7.5 Hz, 4H), 7.08 - 7.16 (m, 3H), 7.36 (t, 7.5 Hz, 2H), 7.63 (d, 7.5 Hz, 4H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) □147.2, 146.8, 138.3, 129.6, 125.8, 124.9, 124.0, 85.8. MS (DCI): 498 ($[M+H]^+$, 100), 372 ($[M-I+H]^+$, 94), 246 ($[M-2I+H]^+$, 11).

2-Bromo, 5-(N,N-bis-(4-bromophenyl)amino)phenyl acetate **61:**

3-(*N*,*N*-Diphenylamino)phenyl acetate (153 mg, 525 µmol) was dissolved in chloroform (3 mL) cooled at 0°C and bromine (79 µL, 1.54 mmol) in solution in chloroform (5 mL) was dropwise added over one hour. Reaction mixture is stirred at r.t during 2h. Then, it was dissolved in dichloromethane and washed by a $Na_2S_2O_3$ solution, then $NaHCO_3$ solution and water. Organic layers were collected, dried and evaporated to afford 225 mg (426 µmol) of a light green powder in a 81 % yield.

IR (KBr) 2839 ($\nu_{C\text{-}OMe}$), 1719 ($\nu_{C=O}$, ester), 1597 (Ar), 1507 (Ar) cm^{-1}. ^1H NMR (acetone-d_6, 300 MHz) δ 2.27 (s, 3H), 6.89 (dd, 2.7 Hz, 8.4 Hz, 1H), 7.07 (d, 9.0 Hz, 4H), 7.51 (d, 9.0 Hz, 4H), 7.56 (d, 8.4 Hz, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 166.3, 165.8, 160.6, 151.0, 150.2, 133.2, 131.1, 125.4, 123.8, 116.0, 115.5, 108.0, 56.0, 52.0, 51.8.

HRMS (DCI+) calcd for $C_{25}H_{24}NO_7$, 450.1553; found 450.1548.

2-Iodo, 5-(N,N-bis-(4-iodophenyl)amino)phenyl acetate **62:**

To a well stirred solution of 3-(*N*,*N*-Diphenylamino)phenyl acetate (77 mg, 254 µmol) in dichloromethane, were added 7 equiv iodine (449 mg, 1.77 mmol). After complete dissolution, 7 equiv red mercury oxide (384 mg, 1.77 mmol) were added and solution was stirred for 3 d at rt. Suspension was filtered through a short pad of Celite and washed by 0.1

M $Na_2S_2O_3$ and water. Organic phase was dry on Na_2SO_4, filtered on silica gel and evaporated.

mp 74°C; ^{1}H NMR (Acetone-d_6) δ 2.28 (s, 3H), 6.77 (dd, 8.7 Hz, 2.7 Hz, 1H), 6.89 (d, 2.7 Hz, 1H), 6.94 (d, 9.0 Hz, 4H), 7.69 (d, 9.0 Hz, 4H), 7.75 (d, 8.7 Hz, 1H).

Alternatively, compound **62** was prepared from 3-(*N*,*N*-Diphenylamino)phenyl acetate (100 mg, 330 mol) and silver(I) trifluoroacetate (219 mg, 991µmol, 3 equiv) and iodine (251 mg, 989 mol, 3 equiv) in stirred chloroform (5 mL) three days at r.t. Yield was 80%

Methyl, 4-(N,N-bis-(4-formylphenyl)amino)benzoate **66:**

DMF (2.9 ml, 37.5 mmol) were cooled down to 0°C and phosphorus oxichloride (3.7 ml, 40 mmol) dropwise added under nitrogen atmosphere. The mixture was stirred for 1 h at 0°C and in case it became solid, warmed until melted. To this mixture methyl, 4-diphenylaminobenzoate (500 mg, 1.6 mmol) was added and stirred vigorously during the addition. The reaction was carried out at 95°C for 4 h. After cooling to room temperature, the reaction mixture was poured on ice and neutralized by addition of sodium hydroxide pellets. The product was extracted using CH_2Cl_2. The organic phase was washed with brine and dried over sodium sulphate. The crude product was purified by column chromatography (*n*-hexane/AcOEt; 3:1; *v/v*). Expected product was obtained as orange foam (205 mg, 553 µmol) in 35 % yield and mono-formylated derivative as a yellow oily major byproduct (358 mg, 1.04 mmol) in 65% yield.

Mp 129°C

R_f (*n*-hexane/AcOEt; 3:2; *v/v*): 0.38; ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.96 (s, 3H), 7.27 (m, 6H), 7.85 (d, 8.7 Hz, 4H), 8.04 (d, 8.7 Hz, 2H), 9.96 (s, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 52.2, 124.0, 124.8, 126.6, 131.4 (2C), 132.2, 149.8, 151.4, 166.3, 190.5

4-[bis(4-formylphenyl)amino]-2-methoxybenzaldehyde **72:**

To a solution of **73** (27 mg, 74 µmol) in DCM (2mL) was added MnO_2 (40 mg, 444 µmol). The resulting suspension was stirred 48h at r.t. and filtered. Solids were well washed with DCM and the filtrate was concentrated to afford product as a yellow solid (25mg, yield : 91%).

(4-{bis[4-(hydroxymethyl)phenyl]amino}-2-methoxyphenyl)methanol **73:**

To a slurry of $LiAlH_4$ (1.7 g, 45 mmol, 15 equiv) in dry THF (30 mL) was added dropwise a solution of **55** (1.35 g, 3 mmol) in THF (20mL) at -78°C. The reaction mixture was allowed

to warm at rt and then was stirred at reflux for 1h. The mixture was recooled at -78°C and diluted in dichloromethane and water (10mL) was added. The solids were filtered and well washed with dichloromethane and the filtrate was washed with water and brine, dried and concentrated to afford a green paste (1.05g, 2.88 mmol) in a 97% yield.

mp 138 °C, (TLC R_f=0.47, hexane/AcOEt, 4:1, v/v). ^{1}H NMR (Acetone-d_6) δ 3.67 (s, 3H), 3.90 (t, 5.7 Hz, 1H), 4.17 (t, 5.7 Hz, 2H), 4.59 (s, 4H), 4.61 (s, 2H), 6.57 (dd, 1.8 Hz, 8.1 Hz, 1H), 6.67 (d, 1.8 Hz, 1H), 7.00 (d, 8.4 Hz, 4H), 7.29 (d, 8.4 Hz, 4H), 7.30 (d, 8.1 Hz, 1H). ^{13}C NMR (Acetone-d_6) δ 54.8, 59.0, 63.5, 106.4, 115.8, 123.7, 125.2, 127.8, 128.4, 136.9, 146.8, 148.1, 157.5.

4-(2-((E)-pyridin-4-yl)vinyl)-triphenylamine **77:**

In 3 mL of a dry and degassed TEA/DMF (2:1, *v/v*) mixture, palladium acetate (7 mg, 10%) and tris-*o*-tolylphosphine (20 mg, 20%) were introduced and stirred for 15 min. Mixture was degassed again by gentle bubbling of nitrogen and 4-iodo-triphenylamine (111 mg, 1.0 equiv) and 4-vinylpyridine (43 µL, 1.3 equiv) were added. The mixture is stirred at 85-90°C under nitrogen for 3 h. The resulting mixture is cooled to r.t, TEA is removed *in vacuo*. Crude mixture was diluted by dichloromethane and washed by water and saturated $NaHCO_3$. After concentration, residue was purified on column chromatography (CH_2Cl_2/MeOH; 100:0 to 92:8). Fractions were collected and, after concentration, residue was triturated in Et_2O/*n*-pentane to afford title compound as a yellow powder in a 64 % yield.

mp 74 - 76 °C. (TLC R_f=0.30, CH_2Cl_2/MeOH 95:5, *v/v*). IR (KBr) 1630 ($\nu_{C=C}$), 1586 (Ar), 1490 (Ar) cm^{-1}. ^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 300 MHz) δ : 8.55 (d, 4.8 Hz, 2H), 7.45 (d, 8.4 Hz, 2H), 7.28-7.40 (m, 7H), 7.14 (d, 8.1 Hz, 4H), 7.08 (t, 8.1 Hz, 4H), 6.94 (d, 16.5 Hz, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ : 150.0, 148.5, 147.3, 145.1, 132.8, 129.8, 129.4, 128.0, 124.9, 123.9, 123.5, 122.8; MS (DCI): 349 ([M+H]$^+$, 100).

4,4'-bis(2-((E)-pyridin-4-yl)vinyl)-triphenylamine **78:**

As above, except that following starting materials and quantities were used: 4,4'-diiodo-triphenylamine (108 mg, 1 equiv), 4-vinylpyridine (70 µL, 3.0 equiv). Title compound was obtained as a yellow powder in a 80% yield.

mp 86 - 88 °C. (TLC R_f=0.22, CH_2Cl_2/MeOH 95:5, *v/v*). IR (KBr) 1630 ($\nu_{C=C}$), 1587 (Ar), 1505 (Ar) cm^{-1}. ^{1}H NMR (CD_2Cl_2, 300 MHz) δ : 8.55 (d, 5.7 Hz, 4H), 7.50 (d, 8.7 Hz, 4H), 7.28-7.41 (m, 8H), 7.10-7.21 (m, 7H), 6.98 (d, 16.5 Hz, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ :

150.1, 147.8, 146.8, 144.8, 132.5, 130.7, 150.6, 128.1, 125.4, 124.5, 124.1, 123.8, 120.7; MS (DCI): 452 ($[M+H]^+$, 100)

5-{N,N-bis-{4-[(E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl]phenyl}}amino,2-[(E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl]phenyl acetate **79:**

Coumpound was obtained as for compound **76** except that work-up was modified as follow: Mixture was refluxed 60 h at 80°C and cooled at rt. After evaporation to dryness, residue is washed by pentane, diisopropyl ether and pentane again. The resulting red powder was purified on column (CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2/MeOH 95:5, *v/v*).

Orange powder (76 %) mp 130 °C (dec) (TLC R_f=0.59, CH_2Cl_2/MeOH, 9:1 *v/v*) IR (KBr) 1715 ($\nu_{C=O}$),1631 ($\nu_{C=C}$), 1588 (Ar), 1504 (Ar) cm^{-1}. ^1H NMR (CD_2Cl_2, 300 MHz) δ 3.88 (s, 3H), 6.95 (d, 16.2 Hz, 1H), 7.02 (d, 16.2 Hz, 2H), 7.17 (d, 8.7 Hz, 4H), 7.32 (s, 1H), 7.32 (dd, 2.7 Hz, 8.4 Hz, 1H), 7.36-7.46 (m, 7H), 7.55 (d, 8.7 Hz, 4H), 7.70 (d, 2.7 Hz, 1H), 7.73 (d, 8.4 Hz, 1H), 8.15 (d, 16.2 Hz, 1H), 8.58 (br, 6H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 167.2, 150.2, 147.0, 146.8, 144.8, 144.6, 132.6, 132.2, 131.8, 131.1, 130.3 128.3, 127.7, 127.6, 125.6, 125.2, 124.4, 121.0, 120.7, 52.4.

HRMS (DCI+) calcd for $C_{41}H_{33}N_4O_2$, 613.2604; found 613.2599.

3-hydroxy, 4-{4-[(E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl]phenyl}, N,N-bis-{4-[(E)-2-(pyridin-4-yl)vinyl]phenyl}aniline **80:**

Brown powder (43 %) mp 195°C (dec). (TLC R_f=0.49, CH_2Cl_2/MeOH, 9:1 *v/v*) IR (KBr) 1630 ($\nu_{C=C}$), 1588 (Ar), 1505 (Ar) cm^{-1}. ^1H NMR (CD_2Cl_2, 300 MHz) δ 6.56 (d, 1.8 Hz, 1H), 6.60 (dd, 1.8 Hz, 8.4 Hz, 1H), 6.94 (d, 16.2 Hz, 1H), 7.02 (d, 16.2 Hz, 2H), 7.10 (d, 8.7 Hz, 4H), 7.30 (d, 16.2 Hz, 2H), 7.37-7.50 (m, 11H), 7.63 (d, 16.2 Hz, 1H), 8.33-8.43 (m, 6H). ($CDCl_3$/CD_3OD, 3:1, 75MHz) δ 156.5, 149.3, 149.0, 148.2, 147.5, 145.6, 133.1, 131.1, 129.8, 127.1, 124.3, 124.1, 123.9, 121.0, 119.0, 116.0, 111.2.

HRMS (DCI+) calcd for $C_{39}H_{31}N_4O$, 571.2498; found 571.2492.

Methyl, 4-[N,N-bis-(4-(2-(pyridin-4-yl)vinyl)phenyl)]aminobenzoate **81:**

To a solution of **58** (138 mg, 300 µmol) in dry TEA (10 ml) and dry DMF (5ml) 4-vinylpyridine (94.6 mg, 900 µmol, 3 equiv), palladium acetate (10 mg, 40 µmol, 13%) and tris-o-toloylphosphine (40.7 mg, 130 µmol, 43%) were added under nitrogen. The reaction mixture was refluxed over night. The solvents were removed under reduced pressure and the residue dissolved in dichloromethane. The solution was washed with water and brine and

dried over magnesium sulphate. The crude product was purified by column chromatographies (CH_2Cl_2/MeOH; 95:5; *v/v*) to yield the title compound as a yellow powder (90 mg, 81 µmol) in a 59 % yield.

Mp 85-88°C

R_f (CH_2Cl_2/MeOH; 9:1; *v/v*): 0.41; ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.94 (s, 3H), 6.99 (d, 16.2 Hz, 2H), 7.17 (m, 6H), 7.31 (d, 16.2 Hz, 2H), 7.39 (d, 5.7 Hz, 4H), 7.52 (d, 8.7 Hz, 4H), 7.96 (d, 8.7 Hz, 2H), 8.61 (d, 5.1 Hz, 4H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 51.9, 120.8, 121.9, 124.7, 126.2 (2C), 128.2, 128.3, 131.1, 132.2, 144.6, 146.8, 150.2, 151.1, 166.2; HRMS (ESI+) calcd for $C_{34}H_{28}N_3O_2$, 510.2182; found 510.2166.

Methyl, 4-[N,N-(4-(2,2-dicyanovinyl)phenyl)amino)benzoate **85:**

To a solution of **66** (50 mg, 140 µmol) in dry pyridine (5 mL) 3Å crushed molecular sieve (333 mg), malononitrile (27.5 mg, 420 µmol, 3 equiv), one drop acetic acid and one crystal ammonium acetate were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was filtered through celite and washed with methylene chloride. The solution was washed with water and brine and dried over sodium sulphate. The crude product was purified by two column chromatographies (Using a gradient 25% to 40% AcOEt gradient in *n*-hexane). The product was obtained as an orange powder (61 mg, 134 µmol) in a 96% yield.

R_f (*n*-hexane/AcOEt; 3:2; *v/v*): 0.48; ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.98 (s, 3H), 7.25 (dd, 8.7, 3.0 Hz, 6H), 7.71 (s, 2H), 7.92 (d, 8.7 Hz, 4H), 8.11 (d, 8.7 Hz, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$): 52.4, 80.5, 113.0, 114.1, 123.8, 125.9, 126.7, 128.1, 131.8, 132.8, 148.6, 150.8, 157.7, 166.0.

HRMS (MALDI) calcd for $C_{28}H_{17}N_5O_2$, 455.13822; found 455.13625.

2-(4-{Bis-[4-(2,2-dicyano-vinyl)-phenyl]-amino}-2-methoxy-benzylidene)-malononitrile **86 :**

As above, except that trialdehyde **72** (61 mg, 1 equiv) was used. Title compound was obtained as a red powder in a 62 % yield.

mp 125 °C. IR (KBr pellet): 1503 (Ar), 1573 (Ar), 2224 (ν_{CN}) ^{1}H NMR (CD_2Cl_2) : 8.26 (s, 1H), 8.25 (d, *J*= 8.4 Hz, 1H), 7.95 (d, *J*= 8.7 Hz, 4H), 7.77 (s, 2H), 7.29 (d, *J*= 8.4 Hz, 4H), 6.83 (dd, *J*= 8.7 Hz, 2.9 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 3.80 (s, 3H). ^{13}C ($CDCl_3$): 56.3, 80.3, 81.6, 107.0, 112.8, 113.4, 113.8, 114.6, 117.4, 117.5, 124.8, 127.6, 130.5, 132.7, 150.0, 151.9, 152.1, 157.5, 160.4.

Methyl, 4-[N,N-(4-(2-(E)-cyanovinyl)phenyl)amino)benzoate **90:**

To a solution of **66** (100 mg, 280 µmol) and Diethylphosphonoacetonitrile (119 mg, 670 µmol, 110 µl, 2.4 equiv) in dry methylene chloride (10 ml), *t*BuOK (103 mg, 910 mmol, 3.3 equiv) was added. The reaction mixture was stirred for two days at room temperature. The reaction was quenched with water and the aqueous phase extracted with methylene chloride. The organic layer was washed with brine and dried over sodium sulphate. The crude product was purified by column chromatography (*n*-hexane/AcOEt; 3:2; *v/v*) to yield title compound (58 mg, 143 µmol) in a 51% yield.

R_f (*n*-hexane/AcOEt; 3:2; *v/v*): 0.48; ^{1}H NMR ($CDCl_3$): 3.93 (s, 3H), 5.82 (d, 16.5 Hz, 2H), 7.14 (d, 8.7 Hz, 6H), 7.39 (m, 6H), 7.98 (dd, 6.9, 2.1 Hz, 2H); HRMS (ESI+) calcd for $C_{26}H_{19}N_3O_2Na$, 428.1375; found 428.1359;

N-{4-[(E)-2-(benzothiazol-2-yl)vinyl]phenyl}-N-phenylaniline **91:**

In dry THF (5 mL) were dissolved diethyl(2-benzothiazolylmethyl)phosphonate (230 mg, 806 µmol, 1.1 equiv), sodium hydride (60% dispersion, 32 mg, 806 µmol, 1.1 equiv) and one drop of 15-crown-5. To this red solution, was added dropwise **64** (200 mg, 732 µmol, 1 equiv) in 8 mL dry THF. After 3 h stirring, phosphonate consumption was noticed by TLC and solution turned toward yellow greenish fluorescence. Reaction was quenched by NH_4Cl 1M, diluted by diethyl ether, decanted and washed by water. After evaporation, resulting yellow powder contained about 7% of unreacted starting material. Both compounds are virtually inseparable by air-opened column chromatography. They were dissolved in 1 mL of an ethanol / toluene / acetic acid mixture (6:1:0.1, *v/v/v*) with Girard's reagent P (18 mg) and refluxed for 3 h. Resulting solution was diluted by dichloromethane and washed by sodium saturated bicarbonate solution, brine and water. Filtration through a short pad of silica gel affords 190 mg of title compound as a yellow powder (470 µmol) in a 64 % yield. mp 155°C (dec) (TLC R_f=0.60, CH_2Cl_2). IR (KBr) 1629 ($\nu_{C=C}$), 1586 (Ar), 1509 (Ar), 1488 (Ar). ^{1}H NMR (Acetone-d_6, 300 MHz) δ 7.04 (d, 9.0 Hz, 2H), 7.14 (m, 2H), 7.15 (m, 3H), 7.34-7.44 (m, 6H), 7.51 (dt, 7.2 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.62 (d, 16.2 Hz, 1H), 7,66 (d, 8,4 Hz, 2H), 7.94 (d, 7.8 Hz, 1H), 8.01 (d, 7.8 Hz, 1H). ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 167.5, 154.0, 149.2, 147.1, 137.3, 134.3, 129.5, 128.5, 126.2, 125.2, 125.1, 124.3, 123.8, 122.7, 122.3, 121.4, 119.9. HRMS (DCI+) calcd for $C_{27}H_{21}N_2S$, 405.1425; found 405.1422.

N,N-bis-{4-[(E)-2-(benzothiazol-2-yl)vinyl]phenyl}aniline **92:**

Title compound was prepared following similar conditions.

Orange powder (59 %). mp 114°C (dec) IR (KBr) 1625 ($\nu_{C=C}$), 1590 (Ar), 1506 (Ar), 1487 (Ar) cm^{-1}. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 7.05 (d, 8.7 Hz, 4H), 7.15 (d, 7.5 Hz, 2H), 7.20 (t, 7.5 Hz, 1H), 7.38-7.55 (m, 8H), 7.62 (d, 16.2 Hz, 2H), 7.73 (d, 8.7Hz, 4H), 7.95 (d, 7.8 Hz, 2H), 8.08 (d, 7.8 Hz, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ167.3, 154.0, 148.3, 146.6, 137.0, 134.3, 129.9, 129.7, 128.6, 126.3, 125.8, 125.2, 124.6, 123.6, 122.8, 121.5, 120.5; HRMS (DCI+) calcd for $C_{36}H_{26}N_3S_2$, 564.1568; found 564.1559.

{4-[(E)-2-(benzothiazol-2-yl)vinyl]}-N,N-bis-{4-[(E)-2-(benzothiazol-2-yl)vinyl]phenyl} aniline **93:**

As **91**, except that crude mixture afford pure product, without any trace of aldehyde.

Orange powder (94%). mp 154°C (dec) IR (KBr) 1625 ($\nu_{C=C}$), 1591 (Ar), 1505 (Ar), 1454 (Ar) cm^{-1}. ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ 7.14 (d, 8.7 Hz, 6H), 7.43 (dt, 1.2 Hz, 8.1 Hz, 3H), 7.51 (dt, 1.2 Hz, 8.1 Hz, 3H), 7.53 (d, 16.2 Hz, 3H), 7.65 (d, 16.2 Hz, 3H), 7.78 (d, 8.7 Hz, 6H), 7.96 (d, 7.8 Hz, 3H), 8.09 (d, 7.8Hz, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 167.1, 154.0, 147.7, 136.8, 134.4, 130.1, 128.7, 126.3, 125.3, 124.5, 122.9, 121.5, 121.0.

HRMS (DCI+) calcd for $C_{45}H_{31}N_4S_3$, 723.1702; found 723.1721.

4-(2-((E)-pyridin-4-yl)vinyl)-triphenylamine methiodide **97:**

A large excess of iodomethane (1.5 mL) is added to a suspension of **77** (29 mg, 82 mmol) in 1.5 mL MeOH. Reaction immediately turned to a deep red colour and is stirred at r.t in the dark overnight. The product is then precipitated by addition of diethyl ether and filtrated to give **97** as a red solid (38 mg) in a 94% yield.

mp 224 °C. IR (KBr) 1641 ($\nu_{C=C}$), 1619 (Ar), 1583 (Ar), 1505 (Ar) cm^{-1}. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ : 8.77 (d, 6.6 Hz, 2H), 8.13 (d, 6.6 Hz, 2H), 7.93 (d, 16.2 Hz, 1H), 7.62 (d, 8.7 Hz, 2H), 7.39 (t, 7.8 Hz, 4H), 7.29 (d, 16.2 Hz, 1H), 7.18 (d, 7.8 Hz, 2H), 7.12 (d, 7.8 Hz, 4H), 6.95 (d, 7.8 Hz, 2H) , 4.21 (s, 3H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 75 MHz) δ : 153.3, 149.9, 146.7, 145.2, 141.0, 130.3, 130.1, 128.5, 125.9, 125.0, 123.4, 121.2, 121.0, 47.2.

4,4'-bis(2-((E)-pyridin-4-yl)vinyl)-triphenylamine) bis-methiodide **98:**

As above, except that **78** was used (37 mg, 82 mmol). Title compound was obtained as a deep red solid (52 mg) in a 87% yield.

mp >260 °C. IR (KBr) 1643 ($\nu_{C=C}$), 1619 (Ar), 1580 (Ar), 1503 (Ar) cm^{-1}. ^1H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ : 8.80 (d, 6.6 Hz, 4H), 8.17 (d, 6.6 Hz, 4H), 7.97 (d, 16.2 Hz, 2H), 7.70 (d, 8.7 Hz, 4H), 7.35 – 7.46 (m, 4H), 7.08 – 7.28 (m, 7H), 4.23 (s, 6H). ^{13}C NMR (DMSO-d_6, 75 MHz) δ : 153.1, 148.8, 146.2, 145.4, 140.6, 130.6, 130.2, 126.6, 125.8, 123.6, 123.5, 122.0, 47.2.

Methyl N-{4-[(E)-2-(benzothiazolium-2-yl)vinyl]phenyl}-N-phenylaniline chloride **99:**
Compound **91** was dissolved in iodomethane (3 mL) and refluxed for 3 days. The mixture was concentrated, ether was added and the resulting precipitate was filtered. This precipitate was dissolved in CH_2Cl_2 (50 mL), the resulting solution was washed with saturated aqueous NaCl (2 x 50 mL), dried on Na_2SO_4 and concentrated to give **99** as a red solid (40 mg, 96 % yield).
^1H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz) δ: 8.39 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.19 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 8.13 (d, J = 15.6 Hz, 1 H), 7.93 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 7.86-7.72 (m, 3 H), 7.44 (t, J = 7.8 Hz, 4 H), 7.27-7.19 (m, 6H), 6.91 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 4.30 (s, 3H).

4-[bis(4-formylphenyl)amino]-2-hydroxybenzaldehyde **109:**
To a suspension of $AlCl_3$ (575mg, 4.31mmol, 5 equiv) in DCM (10 mL) at -10°C was added dropwise a solution of **72** (310 mg, 860 µmol) in DCM (5 mL). the mixture was stirred at reflux overnight then poured into a ice/water bath and vigorously stirred for 10 min. The mixture was extracted with DCM. The combined organic layers were washed with water and brine, dried (Na_2SO_4) and concentrated to afford crude solid which was triturated in *n*-hexane to give a yellow powder (260mg,754 µmol) in a 87% yield.
mp 242-244 °C, ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 6.64 (d, 1.8 Hz, 1H), 6.71 (dd, 1.8, 8.4 Hz, 1H), 7.30 (d, 8.4 Hz, 4H), 7.49 (d, 8.4 Hz, 1H), 7.88 (d, 8.4 Hz, 4H), 9.78 (s, 1H), 9.97 (s, 2H), 11.33 (s, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 110.9, 115.0, 117.1, 125.4, 131.5, 133.1, 135.1, 150.8, 153.3, 163.4, 190.5, 194.3.

Ethyl 4-{5-[bis(4-formylphenyl)amino]-2-formylphenoxy}butanoate **110:**
To a solution of **109** (280 mg, 810 µmol) in dry DMF (12 mL) was added K_2CO_3 (1.1 g, 8.0 mmol, 10 equiv). The reaction was stirred for 15 min and ethyl bromobutanoate (175 µL, 1.22 mmol, 1.5 equiv) was added slowly. The mixture was stirred 24h at r.t and concentrated. The residue was taken up in DCM and water and extracted with DCM. The combined organic layers were washed with water and brine, dried (Na_2SO_4) and concentrated to afford crude

solid purified on silica gel column (elution with a MeOH gradient 0 to 1 % in CH_2Cl_2) to afford product as an orange powder (275 mg, 530 µmol) in a 75% yield.

mp 80 °C, ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.23 (t, 6.6 Hz, 3H), 2.12 (quint, 6.6 Hz, 2H), 2.50 (t, 6.6 Hz, 2H), 3.96 (t, 6.6 Hz, 2H), 4.11 (q, 6.6 Hz, 2H), 6.69 (br, 1H), 6.73 (br, d, 8.4 Hz, 1H), 7.25 (br, dd, 8.7 Hz, 4H), 7.77 (d, 8.1 Hz, 1H), 7.84 (d, 8.7 Hz, 4H), 9.93 (s, 2H), 10.35 (s, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.2, 24.2, 30.5, 60.6, 67.5, 108.1, 117.0, 121.7, 122.8, 124.6, 130.1, 131.4, 132.6, 151.1, 152.5, 162.3, 172.8, 187.9, 190.5

Ethyl 4-{5-[bis(4-[(E)-2-(1,3-benzothiazol-2-yl)vinyl]phenyl)amino]-2-[(E)-2-(1,3-benzothiazol-2-yl)vinyl]phenoxy}butanoate **111:**

To a suspension of NaH (60% dispersion, 51 mg, 1.26 mmol, 3.60 equiv) and diethyl(2-benzothiazolylmethyl)phosphonate (328 mg, 1.15 mmol, 3.3 equiv) in THF (10mL) was added dropwise a solution of **110** (160 mg, 348 µmol) in THF (12 mL). The mixture was stirred at r.t for 3 days, then diluted with DCM, washed with water and brine, dried (Na_2SO_4) and concentrated to afford crude solid. The crude extract was triturated in pentane to give title compound as an orange powder (220 mg, 257 µmol) in a 74 % yield.

mp 120 °C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.27 (t, 6.9, 3H), 2.24 (quint, 6.9 Hz, 2H), 2.60 (t, 6.9 Hz, 2H), 4.00 (t, 6.9 Hz, 2H), 4.19 (q, 6.9 Hz, 2H), 6.72 (d, 1.8 Hz, 1H), 6.79 (dd, 1.8 Hz, 8.4 Hz, 1H), 7.22 (d, 8.4 Hz, 4H), 7.33-7.65 (m, 16H), 7.83 (d, 16.2 Hz, 1H), 7.89 (m, 3H), 8.01 (d, 8.4 Hz, 1H), 8.03 (d, 8.4 Hz, 2H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 14.2, 24.5, 30.8, 60.6, 67.5, 108.0, 117.1, 120.3, 121.0, 121.4, 121.5, 122.5, 122.7, 122.8, 124.6, 125.1, 125.3, 126.2, 126.3, 128.7, 130.8, 132.4, 134.3, 136.8, 147.6, 148.8, 154.0, 154.1, 157.8, 167.1, 168.2, 173.0.

4-{5-[bis(4-[(E)-2-(1,3-benzothiazol-2-yl)vinyl]phenyl)amino]-2-[(E)-2-(1,3-benzothiazol-2-yl)vinyl]phenoxy}butanoic acid **(112)**

mp 146-149 °C, (TLC R_f=0.47, hexane/AcOEt, 4:1, v/v). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 2.32 (br, 2H), 2.59 (br, 2H), 4.01 (t, 6.0 Hz, 2H), 6.67 (d, 1.8 Hz, 1H), 6.75 (dd, 1.8 Hz, 8.4 Hz, 1H), 7.21 (d, 8.4 Hz, 4H), 7.30-7.65 (m, 16H), 7.86-7.91 (m, 3H), 8.01-8.04 (m, 3H), 8.14 (d, 15.0 Hz, 1H).. ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 25.0, 32.0, 68.6, 107.5, 116.9, 119.4, 120.1, 121.0, 121.5, 122.2, 122.8, 124.6, 125.0, 125.2, 126.5, 128.5, 128.7, 130.9, 132.8, 134.1, 134.3, 137.0, 147.5, 149.0, 153.1, 153.9, 158.1, 167.2, 168.7