

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R. DE CHIMIE

THESE

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université de Lille I

Discipline : Chimie Organique et Macromoléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Géraldine VERQUIN

Le 15 Octobre 2004

**DERIVES DU SALENE :
SYNTHESE, ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET
ACTIVITE BIOLOGIQUE**

Directeur de thèse : Pr. Jean-Luc BERNIER

Jury

Président : Pr. Jean-Pierre HENICHART
Rapporteurs : Dr. Christian BAILLY
Pr. Alexandre S. BOUTORINE
Examineurs : Pr. Antoine ABOUKAÏS
Pr. Jean-Luc BERNIER
Dr. Gaëlle FONTAINE

A mes parents

A ma famille

A mes amis

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe "molécules pro- et antioxydantes" du Laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire (UMR CNRS 8009), à l'Université des Sciences et Technologies de Lille. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Jean-Luc BERNIER, qui a dirigé ce travail, pour son encadrement, sa constante disponibilité et ses conseils avisés au cours de ces trois années.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères à Mademoiselle Gaëlle FONTAINE, Maître de Conférences à l'ENSCL, pour avoir co-encadré ce travail. Merci pour ton soutien permanent au quotidien, à la paillasse comme au cours de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Jean-Pierre HENICHART, Professeur à l'Université de Lille 2, Directeur de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol, pour avoir accepté de juger ce travail et de présider ce jury de thèse.

L'aboutissement de ce travail, à l'interface synthèse organique / analyse physico-chimique / biologie moléculaire, témoigne de l'interdisciplinarité de la recherche scientifique. Pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de leurs équipes respectives et pour les discussions très enrichissantes que j'ai pu avoir avec chacun d'entre eux, j'adresse donc mes plus vifs remerciements à :

- Monsieur le Docteur Christian BAILLY, Directeur de Recherche INSERM U524, Directeur du Département de Cancérologie Expérimentale, Centre de Recherche Pierre Fabre à Castres. Je vous remercie de votre accueil à l'Institut de Recherche sur Le Cancer de Lille (IRCL, INSERM U524 et Laboratoire de Pharmacologie Antitumorale du Centre Oscar Lambret). Merci également d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'en être rapporteur.
- Monsieur le Professeur Alexandre S. BOUTORINE, Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris. Merci pour votre accueil à l'Unité de Régulation et Dynamique des Génomes (Laboratoire de Biophysique, INSERM U565, CNRS UMR 5153). Merci également d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur.
- Monsieur le Professeur Antoine ABOUKAÏS, Professeur à l'Université du Littoral-Côte d'Opale. Je vous remercie de votre accueil au Laboratoire de Catalyse et Environnement (EA 2598) à Dunkerque. C'est un très grand plaisir de vous compter parmi les membres de ce jury. Merci d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier chaleureusement tous les membres des différents laboratoires où j'ai eu le plaisir de travailler, et notamment :

- A Lille 1 : Jacqueline LUANGSIVILAY et Amélie RUFFINI qui ont contribué à ce travail dans le cadre de leur Diplôme Universitaire Sciences du Médicament et Sciences Biologiques. Merci pour votre aide et surtout pour votre amitié et votre bonne humeur.
Fariza HADJAZ et Min-Jeong CHOI, pour tous les agréables moments passés en leur compagnie.
Anne MOREAU, Cédric MAURIN et Gwenaëlle LIBERGE, qui suivent le même parcours que moi depuis l'ENSCL.
Eric DENIAU, pour tous ses conseils éclairés en synthèse organique.
Marc BRIA, pour sa disponibilité pour les études de spin-trapping.
- A l'IRCL : Christèle TARDY, William LAINE, Brigitte BALDEYROU, Nathalie DIAS. Merci de m'avoir initiée avec autant de patience et de gentillesse aux techniques de biologie moléculaire.
- A l'Unité de Régulation et Dynamique des Génomes : Ludovic HALBY. Merci pour tes conseils pratiques, notamment pour l'utilisation de l'HPLC.
- Au Laboratoire de Catalyse et Environnement : Edmond ABI-AAD et Elena ZHILINSKAYA. Merci pour votre contribution à ce travail et pour m'avoir initiée à la RPE.

Je tiens aussi à remercier Nathalie AZAROUAL, Maître de Conférences à l'Université de Lille 2, pour sa collaboration à l'étude par RMN d'une partie des produits décrits dans ce mémoire.

Mes remerciements sont également adressés au CNRS et à la Région Nord / Pas-de-Calais, qui ont financé ce projet.

A titre plus personnel, je remercie les membres du Laboratoire de Catalyse Hétérogène de L'USTL, pour leur sympathie et l'accueil chaleureux qu'ils m'ont toujours réservé lors des pauses déjeuner sportives ou ludiques ("un esprit sain dans un corps sain"...). Mille mercis à Jacqueline et Laëtitia, pour leur soutien moral, notamment dans les moments de doute. Enfin et surtout, je remercie de tout cœur mes parents, pour leur soutien sur tous les plans. Merci pour l'amour et la confiance que vous m'avez toujours accordés.

ABREVIATIONS

ΔT_m :	Différence de température de fusion
A :	Adénine
Ac :	Acétate de cuivre
Acac :	Acétylacétonate
AcOEt :	Acétate d'éthyle
ADN :	Acide désoxyribonucléique
APF :	2,5-bis(4-amidinophényl)furane
APS :	Persulfate d'ammonium
ARN :	Acide ribonucléique
ARN TAR :	"Trans-Activation Response ARN"
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
Asc :	Acide ascorbique
ATP :	Adénosine triphosphate
BET :	Bromure d'éthidium
BMOV :	Bis(maltolato)oxovanadium (IV)
Boc :	<i>tert</i> -butyloxycarbonyle
BOP :	Hexafluorophosphate de benzotriazololyoxytris(diméthylamino)- phosphonium
bp :	Paire de base
bpV :	<i>bis</i> peroxovanadium
C :	Cytosine
C_{Ar} :	Carbone aromatique
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CTAB :	Bromure de cetyltriméthylammonium
d :	Doublet
DAPI :	4',6-diamidino-2-phénylindole
DCC :	Dicyclohexylcarbodiimide
dd :	Doublet de doublet
Ddd :	Doublet de doublet dédoublé
DMAP :	Diméthylaminopyridine
DMF :	Diméthylformamide
DMPO :	5,5-diméthyl-1-pyrroline- <i>N</i> -oxyde
DMS :	Diméthylsulfate

DMSO :	Diméthylsulfoxyde
dt :	Doublet de triplet
DTT :	Dithiothréitol
EDCI :	Chlorhydrate de 1-[3-(diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide
EDTA :	Acide éthylènediamine tétraacétique
éq.	Equivalent
ESI :	"Electrospray Ionisation"
exp :	expérimental
G :	Guanine
Gly :	Glycine
GSH :	Glutathion
HATU :	Hexafluorophosphate de O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tétraméthyluronium
HEPES :	Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthanesulfonique
HFS :	Structure hyperfine
His :	Histidine
HOBT :	Hydroxybenzotriazole
Hp :	3-hydroxypyrrole
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance
Im :	Imidazole
IR :	Infrarouge
Lin :	"Linear"
LNA :	"Locked Nucleic Acid"
m :	Multiplet
MALDI :	"Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation"
MES :	Acide 2-(N-morpholino)éthanesulfonique
MGB :	"Minor Groove Binder"
MMPP :	Monoperoxyphthalate de magnésium
MPA :	Acide 3-mercaptopropionique
MS :	Spectrométrie de masse
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
Nck :	"Nicked"
PBD :	Pyrrlobenzodiazépine
Pf :	Point de fusion
Phen :	Phénanthroline
PNA :	"Peptide Nucleic Acid"
Protéine Tat :	"Trans-activator of transcription protein"
PTK :	Protéine tyrosine kinase

PTP :	Protéine tyrosine phosphatase
Py :	Pyrrole
(PyS) ₂ :	Disulfure de dipyridyle
q :	Quadruplet
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
RPE :	Résonance paramagnétique électronique
RX :	Rayons X
s :	Singulet
Sacch :	Saccharide
Salène :	<i>N,N'</i> -bis(salicylidène)éthylènediamine
Sc :	"Supercoiled"
SIDA :	Syndrome d'immunodéficience acquise
sim :	simulé
sl :	Singulet large
T :	Thymine
t :	Triplet
T _{amb} :	Température ambiante
Tampon BPE :	Tampon Bisphosphate-EDTA
Tampon TBE :	Tampon Tris-Borate-EDTA
Tampon TN :	Tampon Tris-NaCl
TEA :	Triéthylamine
TEMED :	Tétraméthyléthylènediamine
TFA :	Acide trifluoroacétique
TFO :	"Triplex Forming Oligonucleotide"
THF :	Tétrahydrofurane
T _m :	Température de fusion
TM :	Tamis moléculaire
TMPyP :	<i>meso</i> -tétrakis(4- <i>N</i> -méthyl-pyridiniumyl)porphyrine
Tris :	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
U :	Uracile
UV :	Ultraviolet
VIH :	Virus de l'immunodéficience humaine
Z :	Benzyloxycarbonyle

SOMMAIRE

INTRODUCTION	14
CHAPITRE I : ACIDES NUCLEIQUES, LIGANDS DES ACIDES NUCLEIQUES ET NUCLEASES CHIMIQUES	18
A. ADN ET ARN.....	19
B. LIGANDS DES ACIDES NUCLEIQUES.....	21
I. Agents alkylants	21
II. Agents intercalants	22
III. Ligands du petit sillon de l'ADN.....	24
1. Sélectivité pour les séquences A-T.....	25
2. Reconnaissance des bases G-C et de séquences spécifiques.....	28
IV. Oligonucléotides et dérivés.....	32
1. Stratégies "antisens" et "antigène".....	32
2. Analogues d'oligonucléotides formant une triple hélice.....	34
3. Applications des oligonucléotides.....	36
C. LES NUCLEASES	38
I. Nucléases d'origine naturelle.....	38
II. Nucléases synthétiques	39
1. Mécanisme d'action.....	40
2. Molécules hybrides.....	45
3. Applications.....	47
4. Les salènes.....	48
CHAPITRE II : SALENES A VANADIUM	54
A. GENERALITES SUR LE VANADIUM.....	55
I. Rôle du vanadium en biologie, Applications thérapeutiques.....	55
II. Composés du vanadium et coupure d'ADN.....	58
1. Vanadium (III).....	58
2. Vanadium (IV).....	59

3. Vanadium (V).....	61
III. Salènes à vanadium : applications en catalyse	63
B. SYNTHÈSE ET ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES SALÈNES À VANADIUM	65
I. Synthèse des ligands : salène et dérivés hydroxylés.....	65
II. Synthèse des complexes de vanadyle.....	66
III. Étude physico-chimique des salènes à vanadium.....	67
1. Spectroscopie infrarouge.....	67
2. Résonance Paramagnétique Electronique.....	69
C. ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES SALÈNES À VANADIUM.....	75
I. Étude de la liaison à l'ADN	75
1. Étude par spectroscopie d'absorption UV-Visible.....	75
2. Étude par dénaturation thermique de l'ADN.....	75
II. Étude de coupure de plasmide.....	77
1. Étude de l'activité nucléasique en absence d'agent activateur.....	78
2. Étude de l'activité nucléasique en présence d'un agent réducteur	78
3. Étude de l'activité nucléasique en présence d'un agent oxydant.....	79
4. Conclusions.....	80
III. Étude de coupure d'un fragment d'ADN marqué au ³² P	82
D. ELUCIDATION DES MÉCANISMES DE COUPURE	84
I. Résonance Paramagnétique Electronique.....	84
1. Étude par RPE de la réaction du complexe avec l'Oxone®.....	84
2. Étude par RPE de la réaction du complexe avec l'eau oxygénée.....	90
3. Étude par RPE de la réaction du complexe avec le MPA	91
II. Spin-trapping.....	91
1. Expériences de spin-trapping en présence d'Oxone®.....	92
2. Expériences de spin-trapping en présence d'eau oxygénée.....	94
3. Expériences de spin-trapping en présence de MPA	96
III. Discussion	96
1. Étude de l'activation par le MPA.....	96

2. Etude de l'activation par l'eau oxygénée.....	96
3. Etude de l'activation par l'Oxone®.....	97
CONCLUSION	100
CHAPITRE III : SALENES A CUIVRE FONCTIONNALISES	101
A. SYNTHÈSE DES SALENES A CUIVRE FONCTIONNALISES.....	104
I. Protection des précurseurs.....	104
II. Couplage peptidique et synthèse des ligands.....	105
III. Complexation des ligands saléniques et déprotection.....	107
B. ETUDE DES SALENES A CUIVRE FONCTIONNALISES PAR RPE	109
C. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES SALENES A CUIVRE FONCTIONNALISES.....	116
I. Etude de la liaison à l'ADN	116
II. Etude de coupure de plasmide.....	117
III. Etude de coupure d'ADN marqué.....	121
1. Coupure du fragment 117-3'.....	121
2. Coupure du fragment HIV-Loop	123
IV. Expériences de Footprinting	126
1. Etude de l'interaction avec un TFO.....	127
2. Etude de l'interaction avec un MGB.....	129
D. CONJUGAISON DES SALENES A CUIVRE A DES LIGANDS DE L'ADN.....	130
I. Conjugaison à un oligonucléotide formant une triple hélice.....	130
1. Méthode de couplage.....	131
2. Essai de coupure du fragment HIV-Loop par les conjugués	133
II. Conjugaison à un ligand du petit sillon	136
CONCLUSION	138
CHAPITRE IV : BIS-IMINES DERIVEES DU SALENE, AGENTS POTENTIELS DE	
 LIAISON A L'ADN.....	141
A. SYNTHÈSE DES IODURES DE N,N'-BIS[(2-TRIMETHYL-AMMONIUMETHOXY)BENZY-	
LIDENE]BENZENEDIAMINE	146
B. ETUDE DES BIS-IMINES PAR RMN	149

C. INTERACTION DES BIS-IMINES AVEC L'ADN.....	152
I. Etude par spectroscopie d'absorption UV-Visible	152
II. Etude par la technique de dénaturation thermique.....	155
III. Etude par la technique de footprinting.....	155
CONCLUSION	157
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	158
PARTIE EXPERIMENTALE	162
A - SYNTHÈSE ORGANIQUE	163
CONDITIONS GÉNÉRALES	163
<i>N,N'</i> -bis(salicylidène)éthylènediamine (1a)	165
<i>N,N'</i> -bis(3-hydroxysalicylidène)éthylènediamine (1b).....	166
<i>N,N'</i> -bis(4-hydroxysalicylidène)éthylènediamine (1c).....	167
<i>N,N'</i> -bis(5-hydroxysalicylidène)éthylènediamine (1d).....	167
Complexe de vanadyle de la <i>N,N'</i> -bis(salicylidène)éthylènediamine (2a).....	168
Complexe de vanadyle de la <i>N,N'</i> -bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine (2b)	170
Complexe de vanadyle de la <i>N,N'</i> -bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine (2c).....	171
Complexe de vanadyle de la <i>N,N'</i> -bis(5-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine (2d)	172
<i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)éthylènediamine (3a).....	173
<i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1,4-butanediamine (3b)	173
<i>N</i> -(<i>tert</i> -butyloxycarbonyl)-1,6-hexanediamine (3c)	174
Acide D,L-2,3-di(benzyloxycarbonylamino)propanoïque (4).....	175
2,3-di(benzyloxycarbonylamino)- <i>N</i> -(2- <i>tert</i> -butyloxycarbonylaminoéthyl)propionamide (5a).....	176
2,3-di(benzyloxycarbonylamino)- <i>N</i> -(4- <i>tert</i> -butyloxycarbonylaminoéthyl)propionamide (5b).....	177
2,3-di(benzyloxycarbonylamino)- <i>N</i> -(6- <i>tert</i> -butyloxycarbonylaminoéthyl)propionamide (5c).....	178
2,3-diamino- <i>N</i> -(2- <i>tert</i> -butyloxycarbonylaminoéthyl)propionamide (6a).....	179
2,3-diamino- <i>N</i> -(4- <i>tert</i> -butyloxycarbonylaminoéthyl)propionamide (6b).....	180

2,3-diamino- <i>N</i> -(6- <i>tert</i> -butyloxycarbonylaminohexyl)propionamide (6c).....	180
2,3- <i>Bis</i> -[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]- <i>N</i> -(2- <i>tert</i> -butyloxycarbonylaminoéthyl)propionamide (7a).....	181
2,3- <i>Bis</i> -[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]- <i>N</i> -(4- <i>tert</i> -butyloxycarbonylamino-butyl)propionamide (7b).....	182
2,3- <i>Bis</i> -[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]- <i>N</i> -(6- <i>tert</i> -butyloxycarbonylaminohexyl)propionamide (7c).....	183
Complexe de cuivre (II) du 2,3- <i>Bis</i> -[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]- <i>N</i> -(2- <i>tert</i> -butyloxycarbonylamino-éthyl)propionamide (8a).....	184
Complexe de cuivre (II) du 2,3- <i>Bis</i> -[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]- <i>N</i> -(4- <i>tert</i> -butyloxycarbonylamino-butyl)propionamide (8b).....	185
Complexe de cuivre (II) du 2,3- <i>Bis</i> -[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]- <i>N</i> -(6- <i>tert</i> -butyloxycarbonylamino-hexyl)propionamide (8c).....	185
Sel trifluoroacétique du complexe de cuivre (II) du 2,3- <i>Bis</i> -[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]- <i>N</i> -(2-aminoéthyl)propionamide (9a).....	186
Sel trifluoroacétique du complexe de cuivre (II) du 2,3- <i>Bis</i> -[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]- <i>N</i> -(4-aminobutyl)propionamide (9b).....	187
Sel trifluoroacétique du complexe de cuivre (II) du 2,3- <i>Bis</i> -[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]- <i>N</i> -(6-aminohexyl)propionamide (9c).....	187
Conjugués des complexes 9b et 9c avec différents oligonucléotides (HIV _T , HIV _T L3, HIV _T L6).....	188
Conjugués du complexe 9b avec différents MGB.....	189
3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzaldéhyde (10).....	191
4-(2-diméthylaminoéthoxy)benzaldéhyde (11).....	192
<i>N,N'</i> - <i>bis</i> [3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,3-diamine (12).....	193
<i>N,N'</i> - <i>bis</i> [3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,4-diamine (13).....	194
<i>N,N'</i> - <i>bis</i> [4-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,3-diamine (14).....	195
<i>N,N'</i> - <i>bis</i> [4-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,4-diamine (15).....	196
Iodure de <i>N,N'</i> - <i>bis</i> [3-(2-triméthylammoniuméthoxy)benzylidène]-benzène-1,3-diamine (16).....	197
Iodure de <i>N,N'</i> - <i>bis</i> [3-(2-triméthylammoniuméthoxy)benzylidène]-benzène-1,4-diamine (17).....	198

Iodure de <i>N,N'</i> -bis[4-(2-triméthylammoniuméthoxy)benzylidène]-benzène-1,3-diamine (18).....	199
Iodure de <i>N,N'</i> -bis[4-(2-triméthylammoniuméthoxy)benzylidène]-benzène-1,4-diamine (19).....	199
B - ACTIVITE BIOLOGIQUE : PROTOCOLES	201
I. Spectroscopie d'absorption UV-Visible.....	201
II. Dénaturation thermique de l'ADN.....	201
III. Coupure de plasmide.....	202
IV. Coupure d'ADN marqué.....	203
1. Coupure d'un fragment d'ADN de 117-bp.....	203
2. Coupure du fragment HIV Loop.....	204
3. Remarque : gel d'acrylamide dénaturant pour électrophorèse.....	206
V. Expériences de footprint.....	206
1. Expériences de footprint sur le fragment HIV-Loop.....	206
2. Footprint à la DNase I sur le fragment 117-3'.....	206
C - RPE ET SPIN-TRAPPING	208
I. RPE.....	208
1. RPE en présence d'Oxone®.....	208
2. RPE en présence d'eau oxygénée.....	209
3. RPE en présence de MPA.....	209
II. Spin-Trapping.....	210
1. Réaction de Fenton.....	210
2. Spin-trapping en présence d'Oxone®.....	210
3. Spin-trapping en présence d'eau oxygénée.....	211
4. Spin-trapping en présence de MPA.....	211
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	212

INTRODUCTION

L'ADN, acide désoxyribonucléique, est la principale forme de stockage de l'information génétique rencontrée chez la plupart des organismes vivants. Le génome humain est constitué de vingt-trois chromosomes et d'approximativement trois milliards de paires de bases d'ADN, qui permettent de coder cent mille gènes.¹ Chacun d'entre eux doit être transcrit en ARNm (acide ribonucléique messenger) avant que la protéine correspondante ne puisse être synthétisée. Une seule mutation dans la structure d'un de ces gènes, la perte d'un ARNm ou la dégradation d'une protéine essentielle risquent d'avoir de graves répercussions sur l'organisme. Etant donnée l'importance évidente de maintenir l'intégrité du code génétique, la nature a recours aux liaisons phosphodiester pour joindre les nucléosides dans l'ADN et l'ARN. La stabilité cinétique de ces biopolymères est remarquable. La demi-vie pour l'hydrolyse des liaisons phosphodiester dans l'ADN à pH neutre et 25°C a été estimée à cent trente mille ans.² Dans l'ARN, la liaison phosphodiester est hydrolysée plus facilement à cause de la présence du groupement hydroxyle en position 2' du ribose. La demi-vie est estimée à quatre ans dans les mêmes conditions.³ Cependant, cette stabilité cinétique peut également se révéler problématique. Par exemple, un ADN étranger, après avoir été reconnu, doit être détruit. Des mutations au niveau de l'ADN natif doivent être excisées et réparées. L'ARN messenger doit être hydrolysé pour que la protéine qu'il code ne soit pas synthétisée inutilement. Les nucléases constituent une classe d'enzymes naturelles dont le rôle est d'accomplir cette tâche, à une échelle de temps adaptée aux conditions physiologiques.

Actuellement, il y a donc un intérêt considérable au développement de nucléases synthétiques. L'utilité de tels composés s'étend de leur emploi comme outils en biologie moléculaire au développement de nouveaux médicaments potentiels à visée anticancéreuse ou antivirale.

Les dérivés du salène, *N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine (Figure 1), complexés à différents métaux tels que le cuivre, le fer ou le nickel, constituent un exemple de nucléases artificielles étudié au laboratoire. Des études précédentes ont révélé que la nature du métal conduit à des activités nucléasiques très différentes.

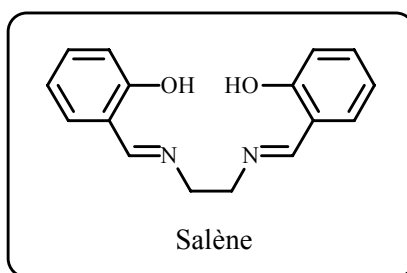


Figure 1 : *N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine

De nombreux salènes à vanadium ont été étudiés pour des applications en chimie comme catalyseurs de réactions diverses. En revanche, ces complexes n'ont, à notre connaissance, jamais été étudié dans le cadre de la coupure d'ADN. La première partie de nos travaux décrit donc la synthèse des salènes à vanadium **2a-d** (Figure 2) ainsi que l'étude de leur activité nucléasique.

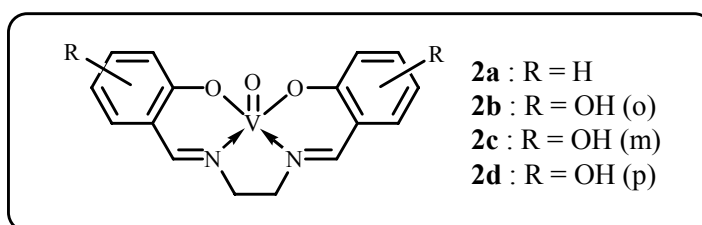


Figure 2 : Complexe de vanadyle de la *N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine **2a** et ses dérivés hydroxylés **2b-d**

La majorité des nucléases chimiques coupe l'ADN sans spécificité de séquence. Cependant, une telle nucléase peut être transformée en une nucléase spécifique, par couplage de l'entité réactive à une molécule capable de reconnaître une séquence particulière de l'ADN double-brin. C'est le concept que nous avons appliqué dans la deuxième partie de nos travaux par l'étude des salènes à cuivre fonctionnalisés **9a-c** (Figure 3). Leur chaîne latérale équipée d'un groupement amino terminal permet la conjugaison à divers agents se liant à l'ADN, notamment à des oligonucléotides capables de former une triple hélice avec un ADN double-brin, ou encore à des ligands du petit sillon. De tels conjugués, potentiellement capables de reconnaître et de couper l'ADN au niveau de séquences particulières, pourraient donc éventuellement trouver une application en tant que régulateurs spécifiques de l'expression de gènes choisis pour cibles.

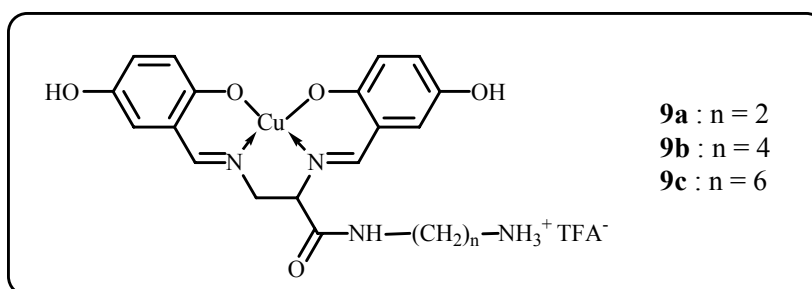


Figure 3 : Salènes à cuivre fonctionnalisés **9a-c**

Dans la troisième et dernière partie de nos travaux, nous nous sommes concentrés sur le ligand salénique lui-même. Celui-ci a été modifié dans l'optique d'obtenir des composés capables d'interagir avec l'ADN, plus particulièrement au niveau du petit sillon. L'ADN représente en effet une cible biologique de choix, non seulement pour des composés capables de le couper mais aussi pour des produits capables d'interagir efficacement avec lui, bloquant ainsi potentiellement la réplication ou la transcription. Nous nous sommes donc intéressés à la synthèse des dérivés **16-19** (Figure 4) ainsi qu'à l'étude de leur capacité à interagir avec l'ADN.

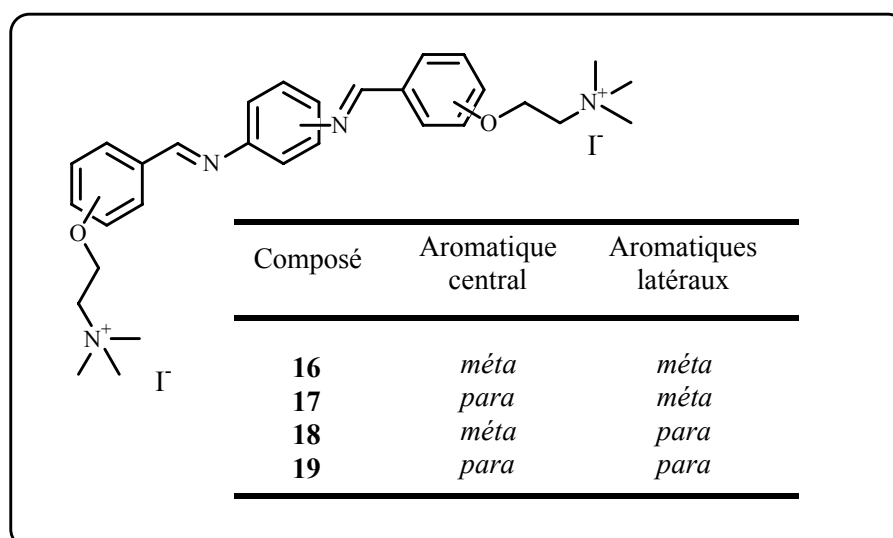


Figure 4 : Iodures de *N,N'*-bis[2-triméthylammoniuméthoxy]benzylidène]-benzènediamine **16-19**

CHAPITRE I :
ACIDES NUCLEIQUES,
LIGANDS DES ACIDES NUCLEIQUES
ET NUCLEASES CHIMIQUES

A. ADN ET ARN

Les acides nucléiques, ADN et ARN, sont des macromolécules biologiques dont le but est la conservation et le transfert de l'information génétique. Il s'agit respectivement de polymères de désoxyribonucléotides ou de ribonucléotides, reliés entre eux par des liaisons phosphodiester (Figure 5).

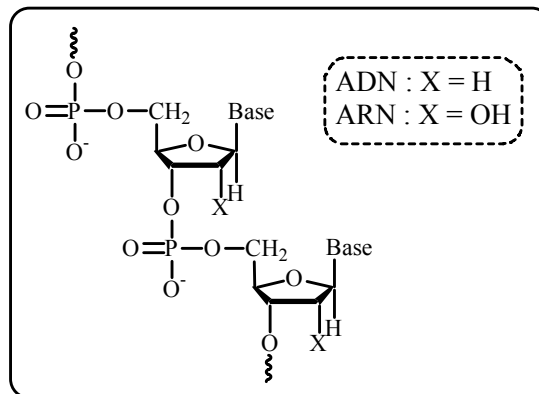


Figure 5 : Structure des acides nucléiques

Les différentes bases nucléiques entrant dans la constitution de l'ADN ou de l'ARN sont répertoriées dans le Tableau 1 ci-dessous :

Bases puriques		Bases pyrimidiques		
Adénine (A)	Guanine (G)	Cytosine (C)	Thymine (T)	Uracile (U)

Tableau 1 : Bases nucléiques

L'ADN est constitué de deux chaînes polynucléotidiques reliées par des liaisons hydrogène entre les bases. L'appariement des bases se fait selon le modèle de Watson et Crick, deux liaisons hydrogène entre l'adénine et la thymine, trois entre la guanine et la cytosine. Les deux chaînes polynucléotidiques sont hélicoïdales antiparallèles et s'enroulent autour d'un même axe, formant alors une double hélice (Figure 6⁴) constituée d'un grand et d'un petit sillon.

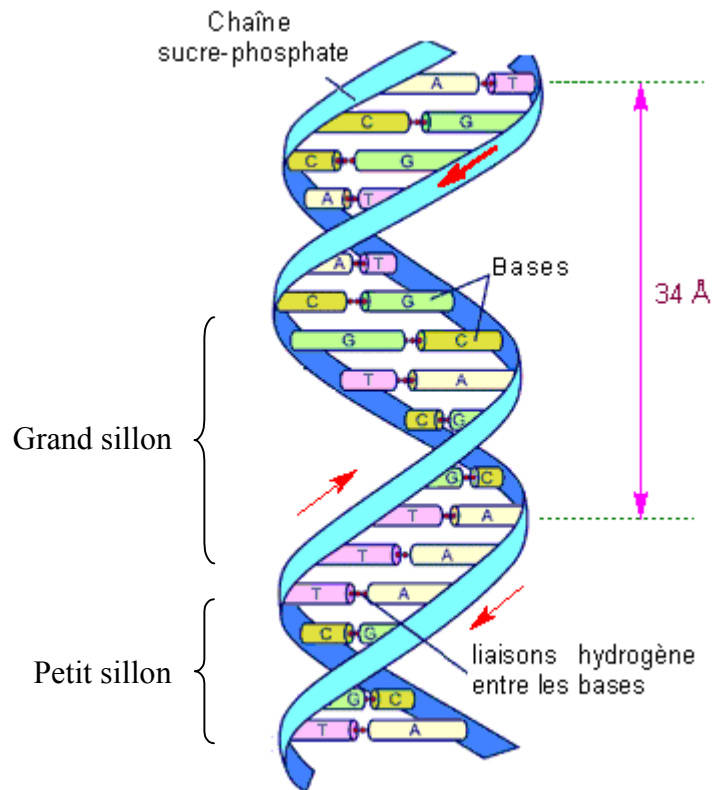


Figure 6 : Double hélice d'ADN

L'ARN est en général simple brin, mais les brins peuvent se replier en boucle par des appariements A-U et G-C, et ce de façon étendue, créant ainsi des structures secondaires et tertiaires importantes. On distingue les ARN messagers (ARNm, sous forme simple brin), les ARN ribosomiaux (ARNr, qui s'associent avec des protéines pour former les ribosomes) et les ARN de transfert (ARNt, ayant une structure en feuille de trèfle). Au pH physiologique (7,2), l'ADN et l'ARN sont des polyanions.

B. LIGANDS DES ACIDES NUCLEIQUES

La possibilité de cibler des séquences définies sur une molécule d'ADN présente un intérêt considérable dans le traitement des maladies humaines. En effet, sous la séquence nucléotidique se cachent non seulement les instructions pour la synthèse des protéines et des ARN, mais aussi les informations assurant la régulation de leur production. L'expression d'un gène spécifique dépend d'une multitude de facteurs de transcription qui doivent reconnaître et se lier à des séquences spécifiques de la molécule d'ADN pour permettre la formation du complexe de transcription. La réplication de l'ADN lors de la division cellulaire est aussi dépendante de l'interaction de séquences spécifiques, les origines de réplication, avec des protéines se liant à l'ADN pour former les complexes de réplication multi-composants. Ces divers processus ont un point commun : des séquences nucléotidiques plus ou moins longues qui servent de sites de reconnaissance spécifiques pour des protéines se liant à l'ADN.

Ainsi, en terme de maladie humaine, l'ADN représente une cible à la fois omniprésente et extrêmement spécifique pour d'éventuels médicaments. Les paragraphes suivants décrivent les différents types d'agents interagissant avec l'ADN, les recherches actuelles étant principalement axées vers la découverte de ligands de plus en plus spécifiques, c'est-à-dire capables de reconnaître des séquences d'ADN particulières.

I. AGENTS ALKYLANTS

Les agents alkylants⁵ établissent des liaisons covalentes avec les acides nucléiques de la cellule. Ce sont généralement des composés électrophiles qui peuvent être attaqués par les bases de l'ADN selon une réaction de substitution nucléophile ayant pour conséquence le remplacement d'un proton d'une base par un groupe alkyle. Ils réagissent donc avec tout donneur d'électron du voisinage, tel que les groupements amine ou hydroxyle. La plupart des alkylants utilisés en thérapeutique sont bifonctionnels, ils possèdent deux groupes alkyles, pouvant lier deux nucléotides adjacents. Un agent bifonctionnel étant capable de réagir avec deux nucléotides, il formera des ponts intra- ou inter-caténaires rendant ainsi la transcription ou la réplication de l'ADN impossible. L'azote N(7) de la guanine est probablement la cible moléculaire principale de l'alkylation.

Cette classe pharmacologique comprend un très grand nombre de substances utilisées en thérapeutique, parmi lesquelles (Figure 7) :

- les moutardes à l'azote comme la chlorméthine (Caryolysine®),
- les nitroso-urées comme la carmustine (Bicnu®),
- les alkylsulfonates tels que le busulfan (Misulban®),
- les éthylène-imines comme l'altrétamine (Hexastat®),
- les dérivés du platine tels que le cisplatine (Cisplatyl®).

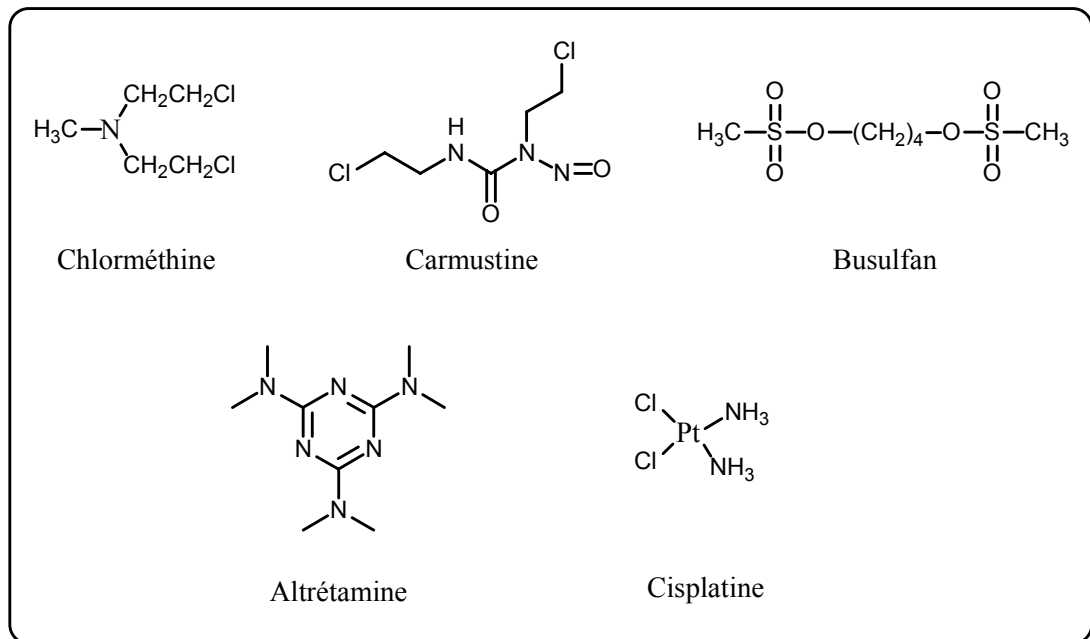


Figure 7 : Exemples d'agents alkylants

L'activité antitumorale de la plupart des agents alkylants réside dans leur capacité à tuer rapidement les cellules en division plutôt que dans une éventuelle sélectivité pour la cellule tumorale. Ils sont en effet capables d'établir des liaisons covalentes avec l'ADN de toutes les cellules, normales ou tumorales, surtout celles qui se reproduisent rapidement. Leur effet est donc peu spécifique et c'est pourquoi ces composés causent de nombreux dommages collatéraux aux cellules en division dans les tissus normaux. Ceux-ci se manifestent par les effets secondaires de la chimiothérapie (perte de cheveux, stérilité...).

II. AGENTS INTERCALANTS

Il s'agit de molécules caractérisées par plusieurs noyaux aromatiques condensés.⁵ Leur dimension et structure permettent l'insertion entre deux plans de bases de l'ADN par "stacking" (liaison non covalente), ce qui provoque une détorsion de la double hélice

d'ADN. Cette détorsion empêche la progression de l'ADN et de l'ARN polymérase, impliquant une inhibition de la réplication et de la transcription. La plupart de ces composés sont également capables d'inhiber les topoisomérases. Ces enzymes cellulaires jouent un rôle au niveau de la spiralisation / déspiralisation de l'ADN. Après avoir créé des coupures transitoires de l'un ou des deux brins d'ADN (topoisomérases I ou II respectivement), elles assurent leur religation. Elles permettent ainsi une relaxation des forces de torsion générées au moment de la réplication. Par association aux topoisomérases, qui empêche l'étape de religation, certains intercalants induisent donc des coupures mono- et bicaténares de l'ADN. Pour certains intercalants, les coupures peuvent également provenir de leur capacité à générer des radicaux libres.

Les agents intercalants regroupent cinq familles de molécules (Figure 8) :

- les anthracyclines (doxorubicine),
- les ellipticines (9-hydroxyellipticine),
- les actinomycines (dactinomycine),
- les acridines (amsacrine),
- les aminoanthraquinones (mitoxantrone).

Ces composés, tout comme les agents alkylants, ne sont pas sélectifs d'une séquence particulière de l'ADN.

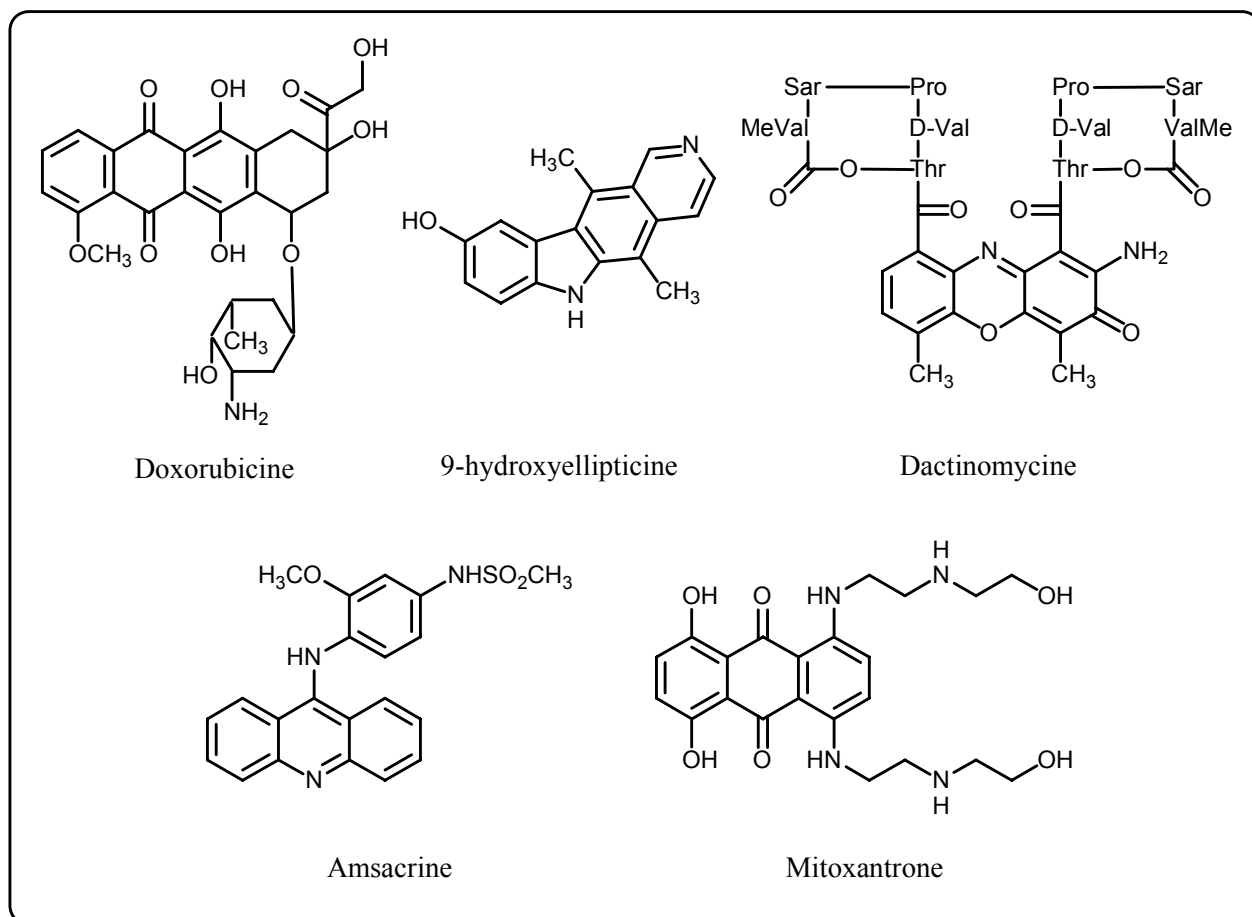


Figure 8 : Exemples d'agents intercalants

III. LIGANDS DU PETIT SILLON DE L'ADN

Il existe de nombreux composés, naturels ou synthétiques, capables de se lier dans le petit sillon de l'ADN. La séquence d'ADN est représentée dans le petit sillon par un ensemble de groupes donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène spécifiques de chaque base, par des variations du potentiel électrostatique moléculaire, par des variations dans les contacts de Van der Waals, ainsi que par des variations de l'hydrophobicité. Les ligands du petit sillon, constitués de cycles aromatiques, possèdent une structure en forme de croissant, coïncidant avec le rayon de courbure du petit sillon de l'ADN. Ils incluent également dans leur structure des charges cationiques, responsables de l'affinité pour les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN, ainsi que des atomes donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène.⁶ Ces composés ont tendance à se lier dans le petit sillon sans entraîner de forte distorsion du squelette phosphate, et stabilisent la conformation usuelle de l'ADN (ADN-B).

1. Sélectivité pour les séquences A-T

La grande majorité des ligands du petit sillon se lie de façon sélective au niveau des séquences d'ADN riches en paires de bases A-T. En effet, le petit sillon est beaucoup plus étroit au niveau de ces sites, de telle sorte que les ligands peuvent s'y introduire et former des contacts de Van der Waals stabilisant l'association. Le potentiel électrostatique du petit sillon varie aussi en fonction de la séquence des bases. Il est le plus électronégatif au niveau des séquences riches en paires de bases A-T, ce qui favorise l'affinité des ligands du petit sillon chargés positivement. De plus, ces paires de bases possèdent deux groupes accepteurs de liaisons hydrogène, l'oxygène O(2) de la thymine et l'azote N(3) de l'adénine, qui peuvent renforcer l'association des ligands dotés de groupes donneurs de liaisons hydrogène.⁷

a Ligands d'origine naturelle

Les ligands du petit sillon de l'ADN ont pour chefs de file deux antibiotiques d'origine naturelle : la nétropsine et la distamycine (Figure 9). Il s'agit de polypyrrolocarboxamides qui forment des liaisons hydrogène avec les adénines et les thymines par l'intermédiaire des fonctions amide. Les charges cationiques terminales permettent également de renforcer l'interaction avec l'ADN par liaison électrostatique avec les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN.

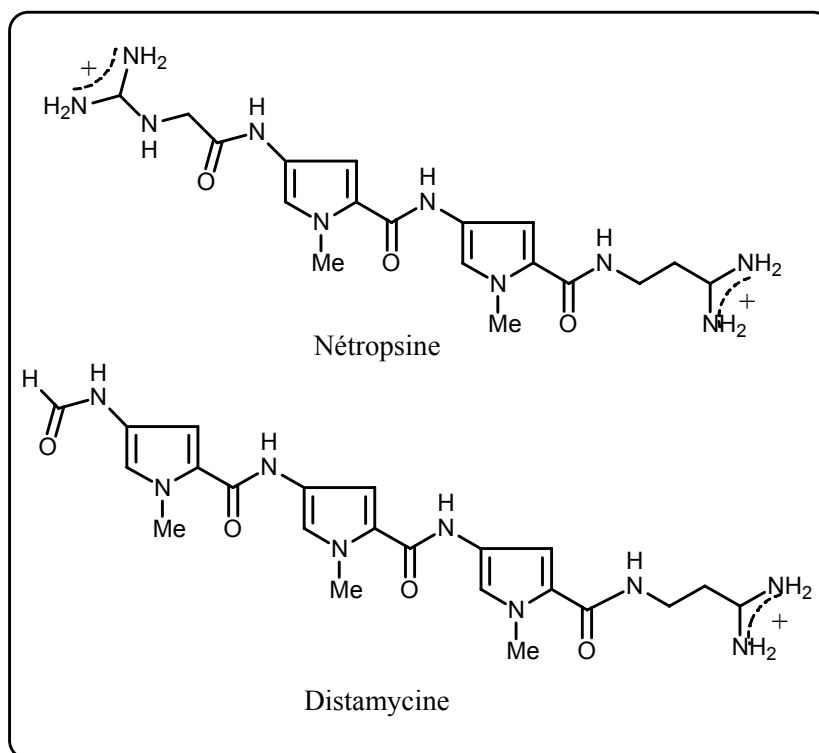


Figure 9 : Ligands du petit sillon d'origine naturelle

b Ligands synthétiques

Un nombre considérable de dérivés inspirés des structures de la nétropsine et de la distamycine ont été synthétisés. Les variations portent sur le nombre de motifs *N*-méthylpyrrole, la formation de dimères de nétropsine ou de distamycine reliés par des bras espaceurs de natures et longueurs diverses... Ces composés constituent la famille des lexitropsines.⁸

D'autres composés synthétiques de structures variées (Figure 10) ont également été proposés comme ligands du petit sillon.⁸ On peut citer notamment :

- le composé Hoechst 33258 qui est un colorant synthétique contenant un motif bis-benzimidazole, semblable à la nétropsine et à la distamycine en terme de courbure et de position des groupes donneurs de liaisons hydrogène,
- des composés de type diamidine, comme le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), l'APF (2,5-bis(4-amidinophényl)furane ou furamidine), le Bérénil ou la pentamidine,
- des composés de type benzanilide comme le SN 6999.⁹

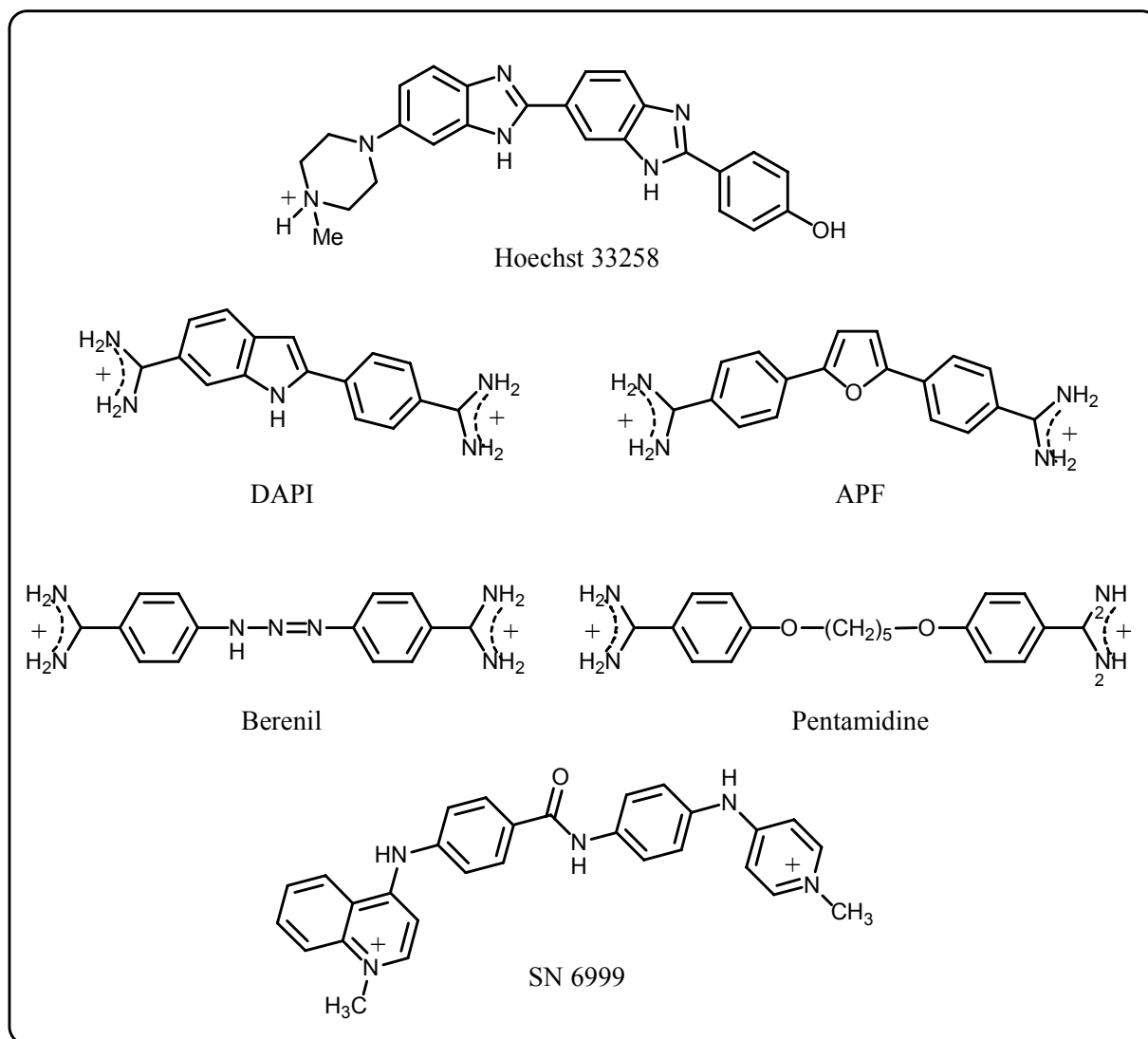


Figure 10 : Ligands du petit sillon cationiques

Les composés décrits ci-dessus sont tous de nature cationique mais des ligands neutres⁸ ont également été proposés (Figure 11) :

- le composé CC-1065, antibiotique antitumoral très puissant isolé de *Streptomyces zelensis*, constitué de trois sous-unités pyrroloindole : l'une, contenant le motif cyclopropyl-pyrroloindole, est responsable de l'alkylation de l'ADN tandis que les deux autres permettent des interactions non covalentes avec l'ADN,
- les antibiotiques antitumoraux de la famille des pyrrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazépines PBD comme l'antramycine. Ils sont produits par des souches variées de *Streptomyces*. Ils possèdent en position 10-11 un centre électrophile, imine ou éther méthylique de carbinolamine, responsable de l'alkylation de l'ADN. La configuration (S) du carbone C_{11a}

de la plupart des PBD naturelles leur fournit la structure tridimensionnelle adaptée au petit sillon de l'ADN-B.

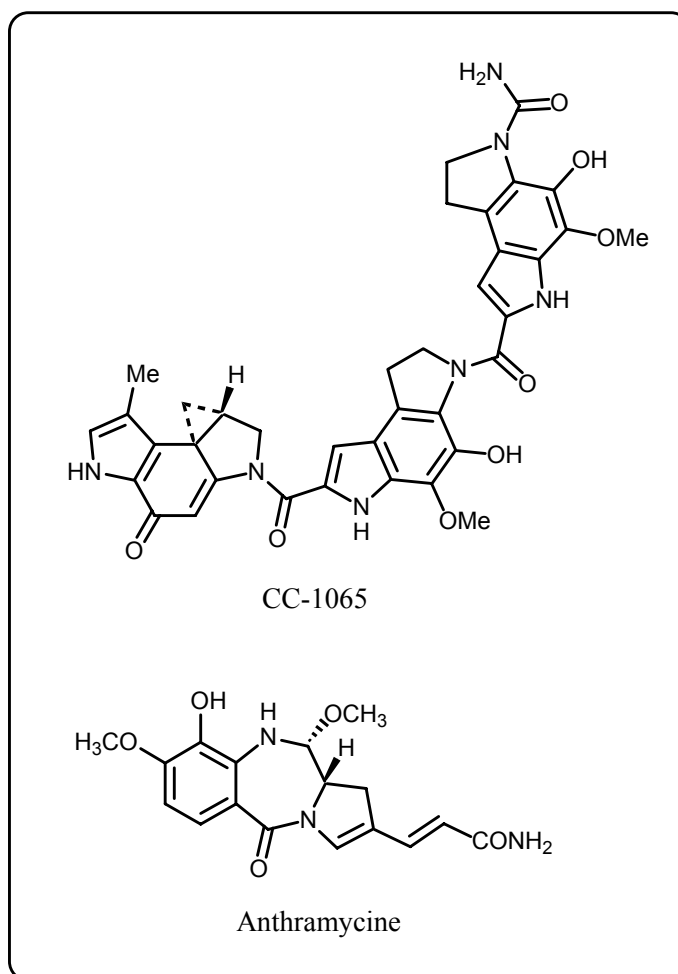


Figure 11 : Ligands du petit sillon neutres

2. Reconnaissance des bases G-C et de séquences spécifiques

Contrairement au grand nombre de ligands du petit sillon qui se lient sélectivement à l'ADN riche en paires de bases A-T, les composés se liant aux séquences d'ADN riches en paires de bases G-C, ou encore aux séquences mixtes, sont relativement rares. Néanmoins, de telles molécules présentent un intérêt considérable. En effet, des composés capables de cibler des séquences spécifiques de l'ADN pourraient potentiellement contrôler l'expression de gènes particuliers.

a Polyamides en épingle à cheveux

Les travaux de Dervan et ses collaborateurs ont permis de découvrir des composés capables de cibler spécifiquement les quatre paires de bases de l'ADN-B.¹⁰⁻¹⁵

Des études structurales des complexes formés entre la distamycine et l'ADN riche en paires de bases A-T ont révélé que deux molécules de distamycine peuvent s'associer côte à côte dans le petit sillon de façon antiparallèle, et que ce sillon normalement étroit au niveau de ces séquences peut s'élargir considérablement. Les paires de bases G-C et C-G ont pu être ciblées par modulations de la structure de base de la distamycine au niveau de sites-clefs impliqués dans la formation de liaisons hydrogène avec l'ADN.

Ainsi, les polyamides contenant des acides aminés *N*-méthylpyrrole et *N*-méthylimidazole sont des ligands synthétiques qui présentent une affinité et une spécificité pour l'ADN comparable à celle des protéines naturelles se liant à l'ADN. La reconnaissance de l'ADN dépend de l'appariement de ces acides aminés dans le petit sillon. L'appariement antiparallèle d'un imidazole (Im) en face d'un pyrrole (Py) reconnaît une paire de bases G-C, alors qu'une combinaison Py-Im reconnaît C-G. Une paire Py-Py est dégénérée et reconnaît soit A-T soit T-A.¹¹

Le groupement amide qui joint les hétérocycles aromatiques (pyrroles et imidazoles) fournit l'affinité pour l'ADN par formation de liaisons hydrogène avec les atomes N(3) des purines ou O(2) des pyrimidines, alors que la spécificité pour les paires de bases G-C est rendue possible par l'établissement d'une liaison hydrogène spécifique entre l'azote N(3) de l'imidazole et le groupe N(2)-H exocyclique de la guanine. Cette liaison peut se former si l'imidazole se trouve en face d'un pyrrole qui élargit le sillon et positionne l'imidazole de façon adéquate.

La distinction entre une paire de bases A-T et T-A est également rendue possible, là encore par modification du motif pyrrole. Deux pyrroles côte à côte ciblent à la fois une paire A-T ou T-A sans sélectivité, mais la présence d'un groupe hydroxyle en position 3 sur un des deux motifs pyrrole permet la reconnaissance des thymines. L'atome O(2) des thymines peut en effet former deux liaisons hydrogène, l'une avec l'hydrogène du groupe amide et l'autre avec le groupement hydroxyle de l'hydroxypyrrole. Le groupe hydroxyle interfère également stériquement avec l'adénine, contrairement au motif pyrrole simple. Ainsi, un hydroxypyrrole à côté d'un pyrrole cible sélectivement T-A, alors que la paire inverse cible une paire de bases A-T (Figure 12).^{12, 13, 14}

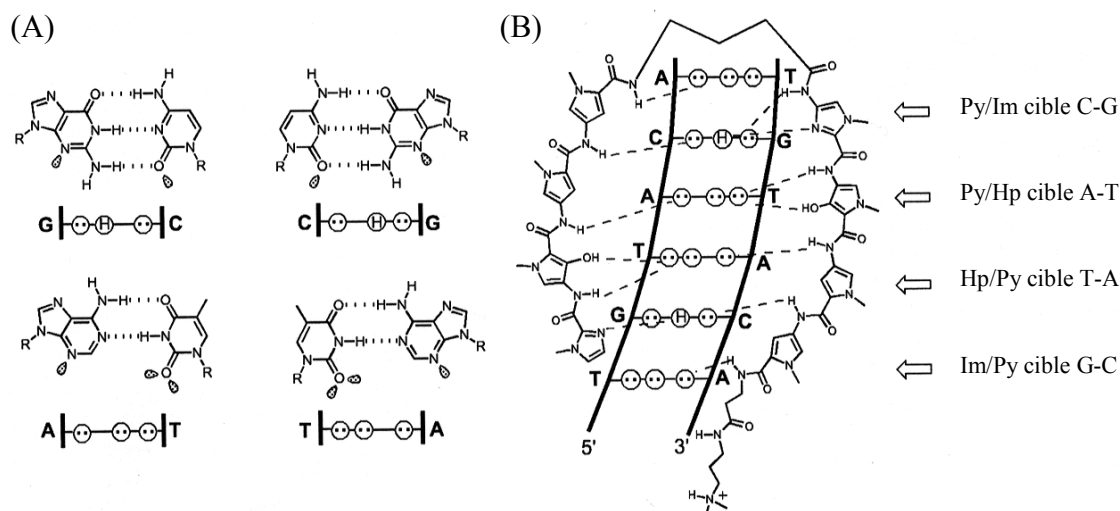


Figure 12 : Reconnaissance moléculaire du petit sillon de l'ADN¹²

- (A) Schéma des liaisons hydrogène entre les bases G-C et A-T, selon le modèle de Watson-Crick. Les cercles contenant des points représentent les doublets libres des atomes N(3) des purines et O(2) des pyrimidines, et les cercles contenant un H représentent le groupe amino en position 2 de la guanine. Les groupes R représentent le squelette sucre-phosphate de l'ADN.
- (B) Modèle de liaison pour le complexe formé entre ImHpPyPy- γ -ImHpPyPy- β -Dp et une séquence 5'-TG TACA-3'. Les liaisons hydrogène sont indiquées par des pointillés. γ : bras de liaison acide γ -aminobutyrique, β : résidu β -alanine, Dp : ((diméthylamino)propyl)amide.

La formulation de ces règles d'appariement simples pour la reconnaissance du petit sillon de la double hélice (Tableau 2) permet la conception de composés capables de se lier à des séquences prédéterminées d'ADN. Ces règles ont d'ailleurs été utilisées pour cibler une grande variété de séquences, de longueurs variant entre 5 et 13 paires de bases.

Paire	G-C	C-G	T-A	A-T
Im/Py	+	-	-	-
Py/Im	-	+	-	-
Hp/Py	-	-	+	-
Py/Hp	-	-	-	+

Tableau 2 : Code d'appariement pour la reconnaissance du petit sillon par les polyamides de Dervan

Ainsi, la liaison spécifique à la séquence est totalement dépendante de la formation de dimères. Cependant, l'affinité et la spécificité de dimères non liés à trois cycles aromatiques restent modestes. Pour entrer en compétition avec les protéines naturelles, telles que les facteurs de transcription, l'affinité de ces composés synthétiques a donc été améliorée, par association des extrémités carboxyle et amino de deux de ces molécules grâce à un connecteur de type acide γ -aminobutyrique. Ces molécules se lient à l'ADN dans une conformation en épingle à cheveux, conservant l'alignement côte à côte des sous-unités Im et Py. Ces structures en épingle à cheveux présentent une affinité et une spécificité très importante, d'autant plus que le nombre d'unités hétérocycliques augmente. D'autres modifications ont aussi permis de favoriser la liaison de ce type de composés, notamment l'incorporation de l'acide aminé flexible β -alanine, qui permet de cibler de plus longues séquences d'ADN.¹⁵

b Le DB 293, dérivé asymétrique de la furamidine

La furamidine, composé cationique comportant deux motifs de type phénylamidine reliés par un cycle furane interagit en tant que monomère avec les séquences A-T de l'ADN. Un dérivé asymétrique, le DB 293, dans lequel un des groupements phényle de la furamidine est remplacé par un benzimidazole (Figure 13), a montré une plus forte affinité pour les sites contenant des bases G-C que pour les séquences A-T pures.¹⁶ Il a été démontré que ce composé se lie dans le petit sillon au niveau de séquences spécifiques contenant des bases G-C par formation d'un dimère antiparallèle, de telle sorte que le cycle phényle d'une molécule se retrouve en face du groupe amidine du benzimidazole de l'autre. La formation de ce dimère dans le petit sillon est très sensible à la structure du composé. En effet, une modification de la structure du DB 293 inhibe la formation du dimère. Ainsi, aucun des deux analogues symétriques du DB 293 (bisphényle ou bisbenzimidazole) ne se lie de façon significative aux séquences contenant les bases G-C. Seule la conversion des groupes amidine en guanidine préserve le dimère.^{17, 18}

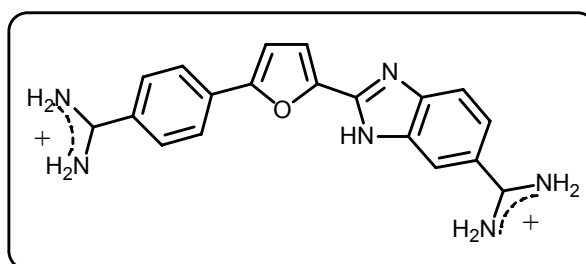


Figure 13 : Formule du DB 293

Le DB 293 a été identifié comme étant le premier dication aromatique, différent des polyamides, capable de former des dimères dans le petit sillon de l'ADN contenant des séquences G-C. La formation de complexes 2 : 1 avec l'ADN avait déjà été décrite précédemment pour certains dérivés monocationiques tels que la distamycine et les polyamides qui en dérivent (lexitropsines), mais pas pour des dications ni pour des composés autres que des polyamides.

IV. OLIGONUCLEOTIDES ET DERIVES

Les études actuelles sont orientées vers la recherche de ligands présentant une sélectivité suffisamment importante pour reconnaître une séquence unique dans l'ADN double-brin d'une cellule vivante. La taille du génome des organismes vivants va de quelques millions de paires de bases chez les bactéries (4.5×10^6 chez *Escherichia coli*, la bactérie qui colonise l'intestin humain) à quelques milliards pour les systèmes plus évolués, eucaryotes (environ 3×10^9 paires de bases dans l'ADN humain).¹⁹ Le seul ligand des acides nucléiques, connu à l'heure actuelle, capable d'atteindre un tel degré de spécificité reste l'acide nucléique lui-même.

1. Stratégies "antisens" et "antigène"

Depuis la découverte en 1953 de la structure double-hélice de l'ADN, le modèle de Watson-Crick de la formation des paires de bases a fourni un code pour la reconnaissance d'une séquence d'acide nucléique mono-brin particulière. Deux liaisons hydrogène permettent la reconnaissance de l'adénine par la thymine ou l'uracile et trois liaisons hydrogène sont impliquées dans la reconnaissance de la guanine par la cytosine. Ces règles de reconnaissance sélective permettent d'élaborer un oligonucléotide capable de reconnaître une séquence de bases définie sur un acide nucléique mono-brin cible. C'est le fondement de la stratégie "antisens". En se liant à un ARN messager par exemple, l'oligonucléotide antisens empêche la séquence du gène cible d'être traduite en protéine, bloquant ainsi l'action du gène. De nombreux gènes, connus pour leur importance dans la régulation de l'apoptose, la croissance cellulaire, la métastase et l'angiogenèse, ont été validés comme cibles moléculaires dans le cadre de la thérapie antisens. Des oligonucléotides antisens sont à l'étude en essais cliniques.²⁰

Les oligonucléotides peuvent également se lier au grand sillon de l'ADN double-hélice en formant une triple hélice locale (Figure 14) par formation de liaisons hydrogène de type Hoogsteen spécifiques de la séquence.²¹ Il s'agit dans ce cas de la stratégie "antigène".

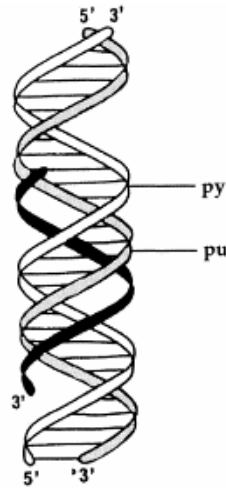


Figure 14 : Représentation schématique de la triple hélice intermoléculaire

Les séquences-cibles optimales doivent présenter des purines consécutives sur le même brin car seules les bases puriques sont capables d'établir deux liaisons hydrogène de type Hoogsteen dans le grand sillon de l'ADN (Figure 15) : c'est la principale restriction au répertoire des sites-cibles potentiels. La liaison est fortement dépendante du pH car les cytosines doivent être protonées pour former deux liaisons hydrogène avec les guanines (Figure 15).

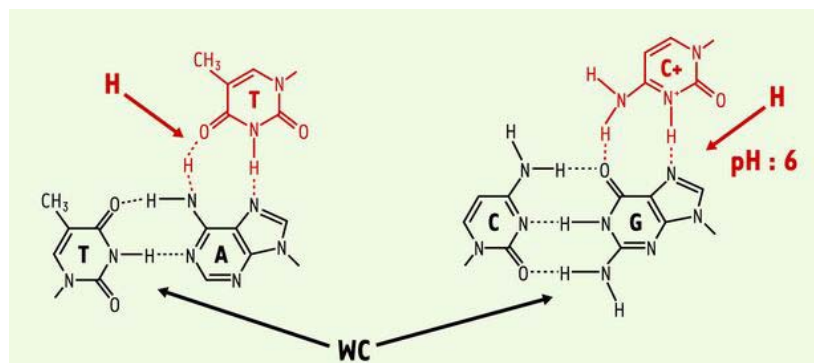


Figure 15 : Liaisons hydrogène de type Watson-Crick (WC) et de type Hoogsteen (H)

Le fait de cibler les oligonucléotides directement au niveau des gènes présente un avantage comparé aux oligonucléotides "antisens" qui sont dirigés vers les ARN messagers. En effet, il existe seulement deux copies (deux allèles) du gène ciblé dans la cellule tandis qu'il peut y avoir des milliers de copies d'un ARN messager. Bloquer la traduction d'un ARNm n'empêche pas le gène correspondant d'être transcrit, reformant

ainsi le stock d'ARNm. Au contraire, empêcher la transcription du gène permet de diminuer la concentration d'ARNm de façon plus efficace et durable, en fonction du temps de résidence de l'oligonucléotide antigène sur sa séquence-cible et de sa durée de vie, déterminée par sa sensibilité aux nucléases.

2. Analogues d'oligonucléotides formant une triple hélice

La possibilité de concevoir une nouvelle génération de régulateurs spécifiques de l'expression des gènes, basée sur la reconnaissance de l'ADN par des oligonucléotides formant une triple hélice (TFO), apporte un intérêt considérable à la chimie et la biologie des analogues d'oligonucléotides. La recherche d'analogues de nucléotides, impliquant des modifications des bases, des sucres ou du squelette, ou encore l'association à un autre ligand de l'ADN, est régie par plusieurs buts : améliorer la stabilité du triplex tout en préservant la spécificité, surmonter la dépendance au pH, étendre le répertoire des séquences-cibles potentielles.^{19, 21} Le temps de résidence d'un TFO sur sa cible d'ADN est un paramètre déterminant pour observer une réponse biologique. Les constantes de dissociation de certaines triples hélices sont du même ordre que celles de certains facteurs de transcription, permettant une compétition avec des régulateurs naturels de l'expression de gènes. La présence d'un agent intercalant, ou d'un ligand spécifique pour la triple hélice, tout comme des modifications de squelette, permettent de diminuer la constante de dissociation et d'augmenter la durée de vie du complexe.

a Modification des bases

Des modifications au niveau des bases sont réalisées afin d'améliorer la liaison à l'ADN dans les conditions physiologiques mais aussi pour étendre la diversité des séquences de reconnaissance. Par exemple, le remplacement de la cytosine par la 5-méthylcytosine, ou encore de la thymine par la 5-bromouracile, permet de stabiliser la triple hélice.

b Modification du squelette ose-phosphate

Lorsque le désoxyribose est remplacé par le ribose, une stabilisation de la triple hélice est observée. Les oligoribonucléotides pyrimidiques se lient plus fortement au duplexe d'ADN que les oligodésoxyribonucléotides correspondants. Les dérivés alkylés en position 2' se lient plus fortement que les oligoribonucléotides non substitués.

Les acides nucléiques naturels sont construits avec les anomères β des unités nucléotidiques. Il est possible de synthétiser les anomères α , et par conséquent de construire des α -oligonucléotides, dans lesquels toutes les unités présentent la configuration α , sans trop d'incidence sur la stabilité du triplex. Ces oligomères α sont résistants à la fois aux endo- et aux exonucléases. La résistance aux nucléases des α -oligonucléotides les rend attrayants pour le développement de régulateurs de transcription de gènes *in vivo*.

D'autres modifications du squelette ont également été exploitées pour optimiser la stabilité du triplex tout en maintenant la spécificité de séquence et aussi pour concevoir des oligonucléotides résistants à la dégradation par les nucléases cellulaires. A ce propos, plusieurs familles de dérivés ont été étudiées, parmi lesquelles les phosphoramidates, phosphorothioates, méthylphosphonates ou encore les PNA, "Peptide Nucleic Acids" (Figure 16). Dans le dernier cas, la chaîne phosphodiester est remplacée par une chaîne pseudo-peptidique polyamidique sur laquelle sont attachées les nucléobases.

c Association à des intercalants ou des ligands du petit sillon

Des agents intercalants attachés à l'extrémité 5'- ou 3'- des oligonucléotides ont été développés dans le but d'améliorer l'affinité des TFO pour l'ADN et ainsi stabiliser les triples hélices. Un site préférentiel d'intercalation est en effet formé à la jonction entre le triplex et le duplexe. Des dérivés de l'ellipticine, de l'acridine ou encore des intercalants de type anthracycline (Figure 8 page 24) ont donc été greffés sur divers oligonucléotides.^{21, 22, 23}

Dans le même ordre d'idée, des ligands du petit sillon de type polyamides avec une structure secondaire en épingle à cheveux ont également été associés aux oligonucléotides.^{24, 25} Ces composés ont montré des propriétés de stabilisation comparables à celles des agents intercalants, avec l'avantage de se lier spécifiquement sur une séquence particulière d'ADN, ce qui permet d'accroître considérablement la séquence cible de reconnaissance. Les conjugués "TFO-ligand du petit sillon" sont d'ailleurs capables de se lier simultanément au grand et au petit sillon de l'ADN.

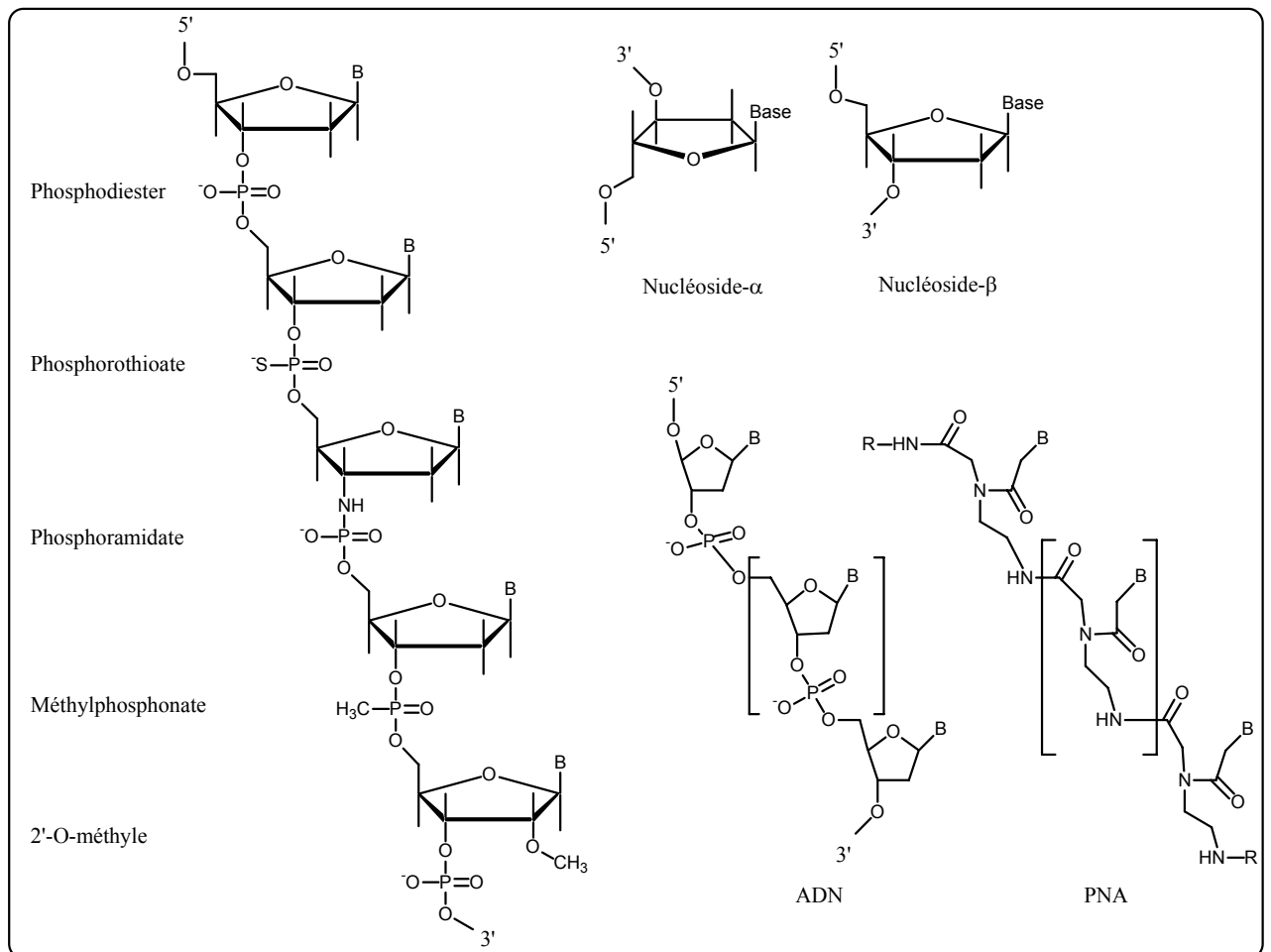


Figure 16 : Modifications du squelette conférant stabilité envers les nucléases intracellulaires et utilisées dans la stratégie antigène

La principale limitation de la stratégie "triplexe" reste la nécessité d'une séquence-cible oligopurine dans l'ADN. Il existe, comme indiqué ci-dessus, plusieurs moyens d'étendre la diversité des séquences de reconnaissance mais la conception d'analogues de nucléotides qui reconnaîtraient les quatre paires de bases de l'ADN dans le grand sillon (A-T, T-A, C-G, G-C), de façon similaire aux polyamides en épingle à cheveux, reste encore un challenge à l'heure actuelle.

3. Applications des oligonucléotides

a Biologie moléculaire

Le fait que les oligonucléotides soient capables de reconnaître le grand sillon de l'ADN de façon séquence-spécifique a permis des applications intéressantes dans des domaines variés en biologie moléculaire et cellulaire. On peut citer par exemple la

chromatographie d'affinité basée sur la formation des triples hélices, l'utilisation comme sondes de séquences d'ADN...

b Contrôle de l'expression de gènes

Le TFO peut recouvrir les sites de reconnaissance et de liaison d'un ou plusieurs composants du complexe de réplication ou de transcription, les empêchant ainsi de se lier à leur cible d'ADN. La perturbation de la liaison de facteurs protéiques et/ou d'enzymes peut induire l'inhibition ou l'activation de processus enzymatiques, selon les facteurs inhibés (facteurs activateurs ou inhibiteurs respectivement).

C. LES NUCLEASES

Le terme de nucléase se réfère aux agents capables de couper les acides nucléiques. La coupure induite par une nucléase peut avoir lieu à différents niveaux de l'enchaînement des nucléotides :

- ✓ au niveau des liaisons phosphodiester (coupure hydrolytique).¹ C'est essentiellement le cas des nucléases enzymatiques, ainsi que celui des nucléases chimiques à activité hydrolytique (relativement rares).
- ✓ au niveau des liaisons C-H du sucre (coupure oxydante).²⁶ L'abstraction d'un atome d'hydrogène du ribose ou du désoxyribose produit un radical qui par réarrangement peut aboutir à la scission du brin d'acide nucléique. C'est le mécanisme d'action de certaines nucléases chimiques à activité oxydante.
- ✓ au niveau des bases nucléiques.²⁷ Les hétérocycles puriniques et pyrimidiques, riches en électrons, sont des cibles de choix pour les réactions avec des agents électrophiles (agents oxydants, alkylants...). Ces réactifs fournissent rarement une coupure directe ou franche, mais permettent lors d'une seconde étape chimique le clivage de l'ADN ou de l'ARN sur un site spécifique. Cette seconde étape implique généralement un traitement par la chaleur, par une base ou par une enzyme ce qui assure la réaction de coupure par formation d'un site abasique suivi d'une β -élimination. Généralement, c'est le traitement à la pipéridine qui est le plus utilisé. Il permet de révéler les sites abasiques et les bases modifiées chimiquement.

I. NUCLEASES D'ORIGINE NATURELLE

Les liaisons phosphodiester sont très stables devant l'hydrolyse, car la cinétique d'hydrolyse est lente. Dans la nature, le rôle des enzymes appelées nucléases est donc de catalyser l'hydrolyse de la fonction phosphodiester des acides nucléiques. Ces enzymes se retrouvent dans les cellules de tous les êtres vivants. On distingue deux types de nucléases enzymatiques : les endonucléases qui hydrolysent les fonctions phosphodiester à l'intérieur d'une chaîne d'ADN ou d'ARN et les exonucléases qui hydrolysent les fonctions phosphodiester aux extrémités 3'- ou 5'- de l'acide nucléique

en élaguant un par un les résidus nucléotidiques. Les nucléases peuvent agir spécifiquement soit sur l'ARN (ribonucléases) soit sur l'ADN (désoxyribonucléases). Elles présentent en outre de grands niveaux de spécificité, ce qui permet leur utilisation pour le séquençage des acides nucléiques.

Il existe également des nucléases issues de produits naturels (Figure 17 page 40) tels que :

- les antibiotiques dérivés de la bléomycine : ils peuvent lier divers ions métalliques tels que le fer, le cobalt ou le cuivre. Les complexes sont pentadentés : la complexation du métal s'effectue dans un plan de base défini par 4 atomes d'azote (amine secondaire de la portion β -aminoalanine, azote du noyau pyrimidine, azote de fonction amide et azote du noyau imidazole du résidu β -hydroxyhistidine) ainsi que par un atome d'azote supplémentaire (amine primaire de la portion β -aminoalanine) constituant un donneur axial (Figure 17, les atomes coordonnant le métal sont indiqués en gras et soulignés),
- les porphyrines : on peut citer par exemple les complexes de manganèse ou encore de cuivre,
- des peptides : c'est le cas notamment des métallotriptides XXH à nickel ou à cuivre, avec une fonction amino terminale, un groupement histidine en troisième position et deux azotes peptidiques déprotonables, permettant la chélation des métaux.

II. NUCLEASES SYNTHETIQUES

L'acide éthylènediamine tétraacétique (EDTA) est connu pour complexer très fortement les cations métalliques, son complexe de fer constitue une nucléase très utilisée. Des complexes de la phénanthroline (cuivre, ruthénium, rhodium) sont également employés ainsi que certains dérivés du salène, *N,N'*-bis(salicylidène)-éthylènediamine, complexés par le fer, le cuivre, le manganèse, le cobalt, le chrome, le nickel... (Figure 17).

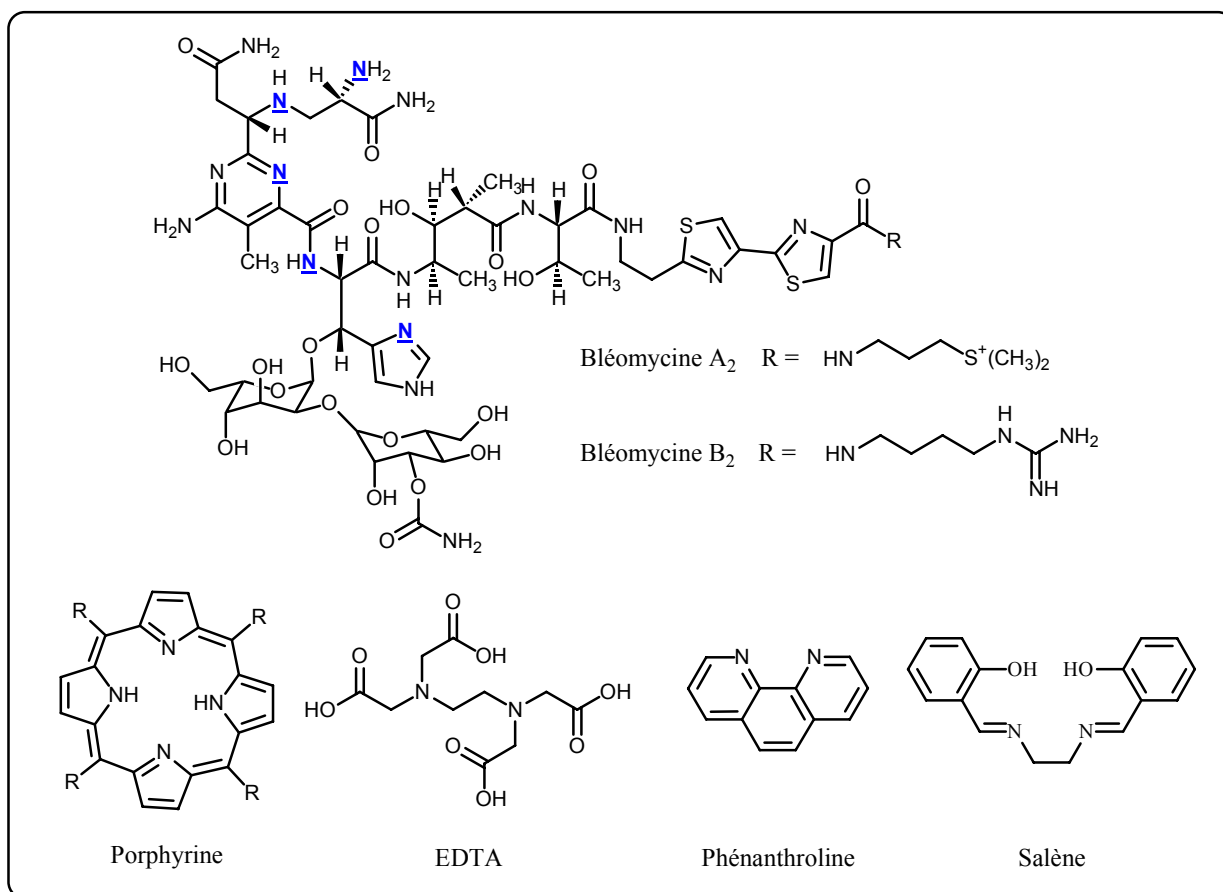


Figure 17 : Exemples de ligands de nucléases

Ainsi, ces nucléases non enzymatiques sont principalement des complexes de métaux de transition pour lesquels le ou les ligands modulent, d'une part, les propriétés oxydantes responsables du mécanisme de coupure (charge du métal, potentiel rédox) et, d'autre part, les propriétés d'affinité entre le complexe et l'acide nucléique (encombrement stérique, charge globale du complexe, groupements donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène portés par les ligands...). La nature du métal lui-même influence aussi fortement l'activité nucléasique.²⁸

1. Mécanisme d'action

Il existe peu de nucléases chimiques à activité hydrolytique véritablement efficaces et la recherche s'est axée principalement vers la coupure oxydante. Le fonctionnement d'une nucléase chimique à activité oxydante est représenté sur le Schéma 1. Le mécanisme d'action de ces complexes **LM** repose sur une activation par un agent extérieur (chimique, photochimique ou électrochimique) conduisant à la formation d'espèces oxydantes. Les espèces ainsi formées peuvent être radicalaires, métalliques ou photoexcitées. Elles sont produites près de l'acide nucléique et oxydent les sucres,

conduisant à une coupure directe et aléatoire, et/ou les bases nucléiques, induisant une coupure indirecte et sélective.

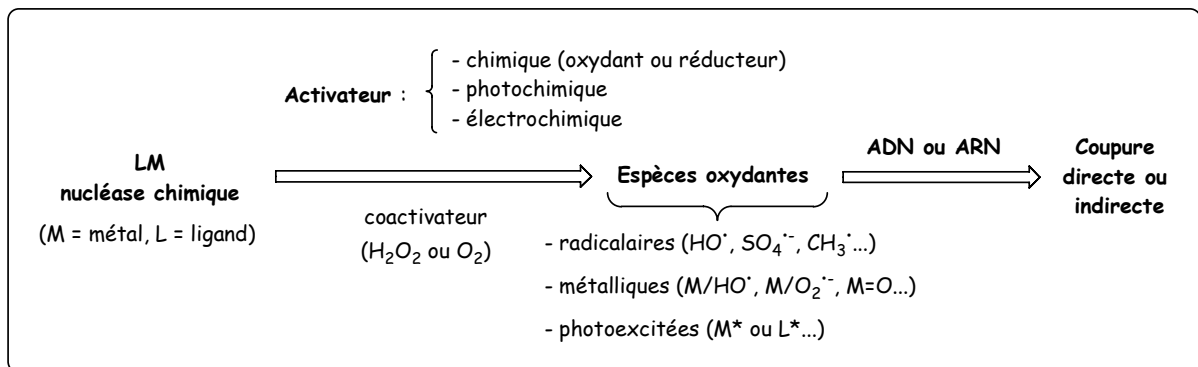


Schéma 1 : Mode d'action d'une nucléase chimique

L'affinité d'un composé pour l'acide nucléique est importante pour son activité nucléasique : l'espèce oxydante doit en effet être générée près de sa cible sinon elle est rapidement inactivée par le milieu et ne peut donc pas oxyder l'ADN. Les complexes métalliques à activité nucléasique peuvent interagir avec les acides nucléiques soit par liaison électrostatique (avec les groupements phosphate), soit par liaison de surface (dans le petit et le grand sillon), soit par intercalation (entre les plans de bases), ou encore par liaison covalente (au niveau des bases nucléiques).

Afin d'induire une coupure, les nucléases chimiques doivent la plupart du temps être activées au préalable par un agent extérieur. Il existe différents types d'activation : chimique, photochimique, électrochimique. En ce qui concerne l'activation chimique, différents agents activateurs peuvent être utilisés selon le métal employé. Ces agents peuvent être des agents réducteurs tels que l'acide ascorbique, l'acide 3-mercapto-propionique (MPA) ou encore le dithiothréitol (DTT) ou bien des agents oxydants comme l'hydrogénopersulfate de potassium KHSO₅ ou le monoperoxyphthalate de magnésium (MMPP) (Figure 18). L'oxygène ainsi que les espèces activées de l'oxygène (O₂^{•-}, H₂O₂) participent aussi souvent à l'activation.

L'utilisation de ces agents activateurs permet d'amorcer la production d'espèces oxydantes, responsables de la coupure des acides nucléiques. Dans le cadre d'une activation chimique, ces espèces oxydantes peuvent être des espèces radicalaires (O₂^{•-}, HO[•], RO[•], ROO[•], SO₃^{•-}, SO₄^{•-}, SO₅^{•-}, radicaux organiques) ou des métaux de transition à haut degré d'oxydation (espèce métal-oxo ou peroxy). Ces espèces engendrent les coupures des acides nucléiques par oxydation des sucres et/ou des bases.

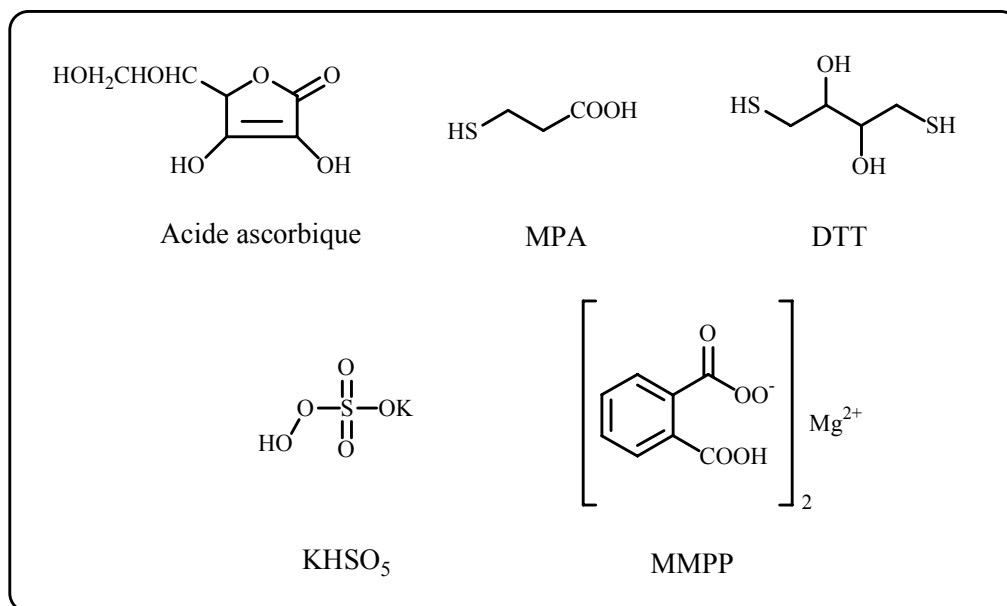


Figure 18 : Agents activateurs réducteurs et oxydants

a Activation en milieu réducteur

Les phénanthrolines à cuivre (Figure 19) constituent un exemple de nucléases activées en milieu réducteur.²⁹ L'activité nucléasique nécessite uniquement la présence d'un réducteur en milieu aérobie ou la présence simultanée d'un réducteur et de peroxyde d'hydrogène exogène en milieu anaérobie. $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$ est d'abord réduit par un réducteur extérieur (ascorbate, MPA...) en $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{phen})_2$ qui se lie à l'ADN. Le complexe $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{phen})_2/\text{ADN}$ est alors oxydé par le peroxyde d'hydrogène, pour générer l'espèce oxydante responsable de la coupure des acides nucléiques. La nature de cette espèce oxydante est encore sujet de débat : radicaux hydroxyle libres HO^\cdot , espèce "crypto" $\text{Cu}^{\text{II}}\text{OH}$ ou espèce métal-oxo $\text{Cu}^{\text{III}}=\text{O}$. L'oxydation de l'acide nucléique s'effectue essentiellement au niveau des sucres. D'autres complexes avec d'autres ions métalliques, comme le fer (III) ou le cobalt (III), agissent également en milieu réducteur.³⁰

b Activation en milieu oxydant

De nombreux complexes de nickel (II) induisent des modifications de l'ADN spécifiquement au niveau des guanines les plus exposées en présence de KHSO_5 ou de MMPP.³¹ Le mécanisme semble faire intervenir un complexe intermédiaire de nickel (III) qui se lie au niveau des résidus guanine et entraîne l'oxydation des bases puis la coupure de l'acide nucléique après traitement à la pipéridine.²⁷ L'exemple d'un tétraaza-macrocycle à nickel, NiCR^{2+} , est représenté Figure 19.

Les porphyrines complexées par du manganèse peuvent aussi être activées par un agent oxydant. Un des systèmes nucléasiques les plus étudiés est $Mn^{III}(TMPyP)$ (*meso-tétrakis(4-N-méthyl-pyridiniumyl)porphyrine-manganèse (III)*) activé par $KHSO_5$ (Figure 19).³² L'activation fournit dans ce cas une espèce métal-oxo $Mn^V=O$. La coupure passe, comme dans le cas des phénanthrolines à cuivre, par une oxydation des sucres.

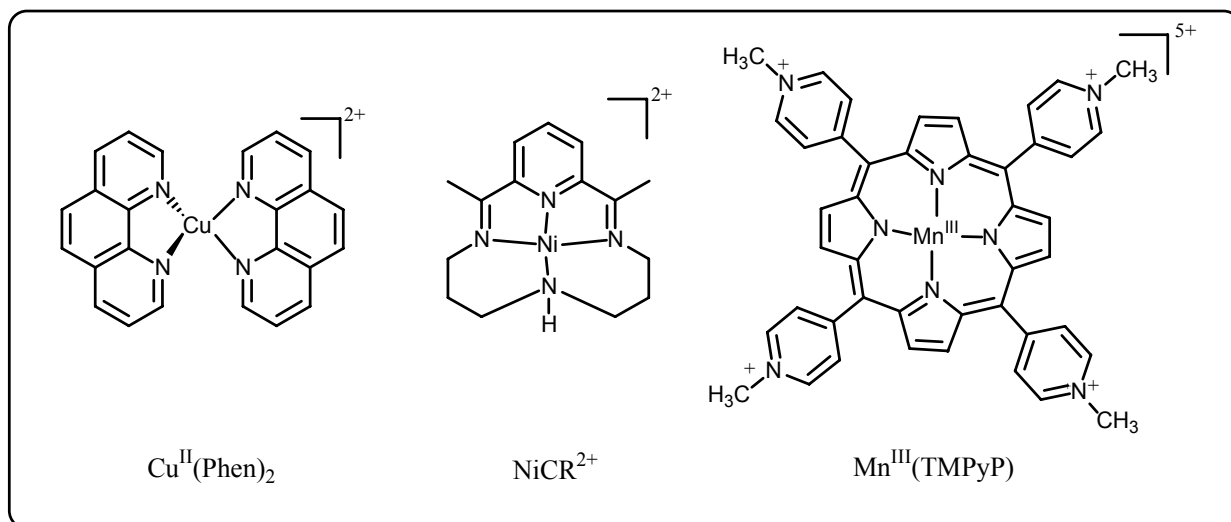


Figure 19 : Exemples de nucléases activées en milieu réducteur ou oxydant

c En absence d'agent activateur

Il existe également des composés capables de couper l'ADN en absence d'agent activateur extérieur mais ils sont plus rares. C'est le cas notamment de composés naturels de type 4-méthoxy-2,2'-bipyrrole, comme la tambjamine E (Figure 20), qui se lie efficacement à l'ADN et induit le clivage de ce dernier en présence de $Cu(II)$ et d'oxygène moléculaire.³³

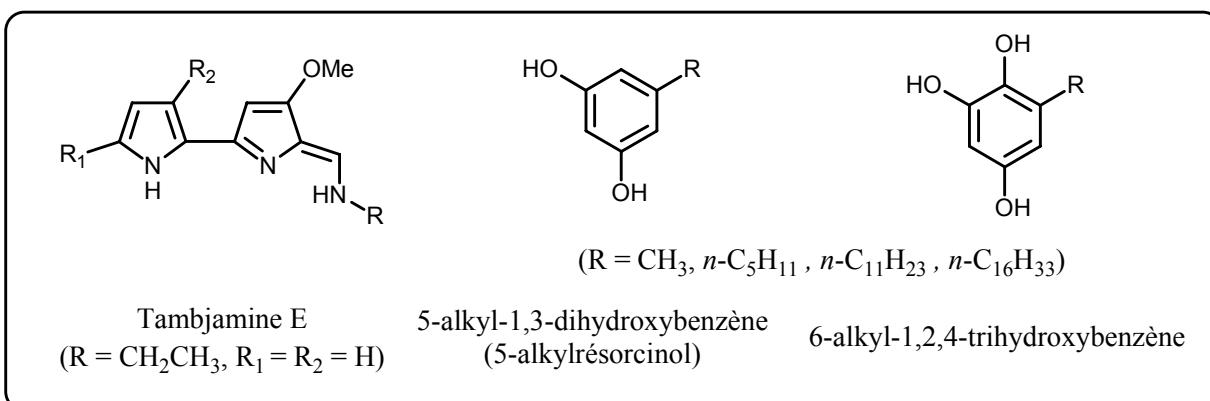


Figure 20 : Exemples de nucléases ne nécessitant pas d'agent activateur

Le mécanisme suivant a été postulé (Schéma 2) : la source d'électron pour la réduction de Cu(II) en Cu(I) est le noyau bipyrrole qui s'oxyde pour générer un radical cation en présence de sels de cuivre. Le radical cation de la tambjamine se dimérise alors et libère 2 Cu(I). L'oxydation de Cu(I) par O₂ fournit l'anion superoxyde, qui donne à son tour H₂O₂ par dismutation. Enfin, l'oxydation de Cu(I) par l'eau oxygénée génère une espèce cuivre-oxo qui initie le clivage de l'ADN.

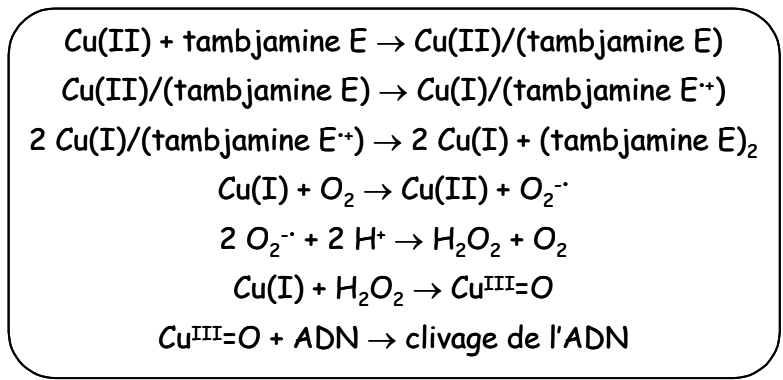


Schéma 2 : Mécanisme de clivage de l'ADN par la tambjamine E en présence de Cu(II) et d'oxygène moléculaire

D'autres dérivés tels que les 5-alkyl-1,3-dihydroxybenzènes et les 6-alkyl-1,2,4-trihydroxybenzènes (Figure 20) induisent également une coupure de l'ADN en présence de Cu(II) et d'oxygène.³⁴ Un mécanisme proposé (Schéma 3) implique l'oxydation à un électron du 5-alkylrésorcinol, suivie de la réaction avec O₂ pour former un radical hydroperoxyde. Le réarrangement de cet intermédiaire puis le clivage homolytique de la liaison peroxyde fournit une hydroxyquinone ainsi que des radicaux hydroxyle, capables d'induire la coupure d'ADN.

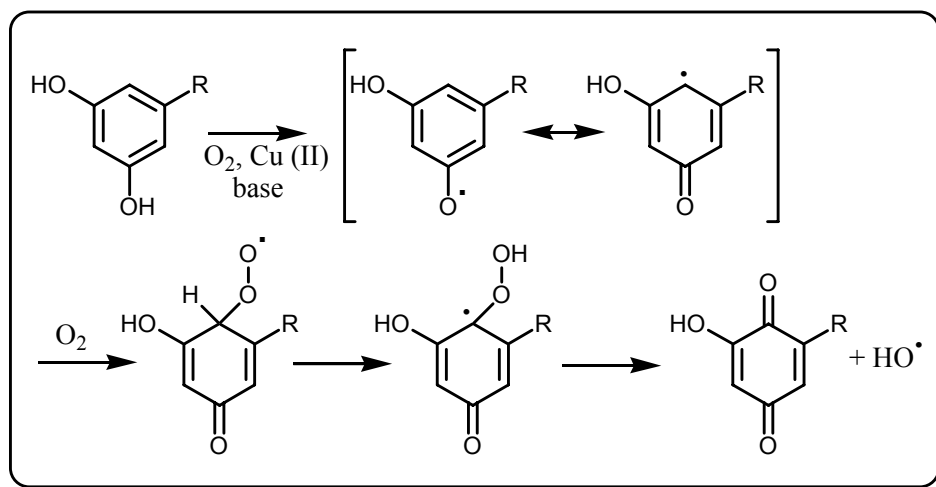


Schéma 3 : Mécanisme d'oxydation du 5-alkylrésorcinol

Des études réalisées au laboratoire ont aussi montré une activité nucléasique en absence d'agent activateur pour des dérivés du salène, comportant un système de type hydroquinone ou catéchol (4 - Les salènes, page 48).

2. Molécules hybrides

Le concept d'association, visant à créer des molécules hybrides possédant une fraction affine pour l'acide nucléique et une fraction capable de le couper a engendré l'élaboration d'un nombre considérable de nouvelles nucléases. Ce couplage permet de renforcer l'affinité pour l'acide nucléique et ainsi d'améliorer l'efficacité des nucléases synthétiques. On peut notamment citer l'exemple des métalloporphyrines associées à différents vecteurs, tels que des intercalants ou encore des ligands du petit sillon.^{35, 36}

Les oligonucléotides capables de former une triple hélice avec une séquence spécifique d'ADN peuvent également être employés comme vecteurs, afin de cibler l'activité nucléasique au niveau de sites particuliers.³⁷ Des nucléases artificielles présentant une spécificité de séquence élevée ont ainsi été développées (Figure 21).

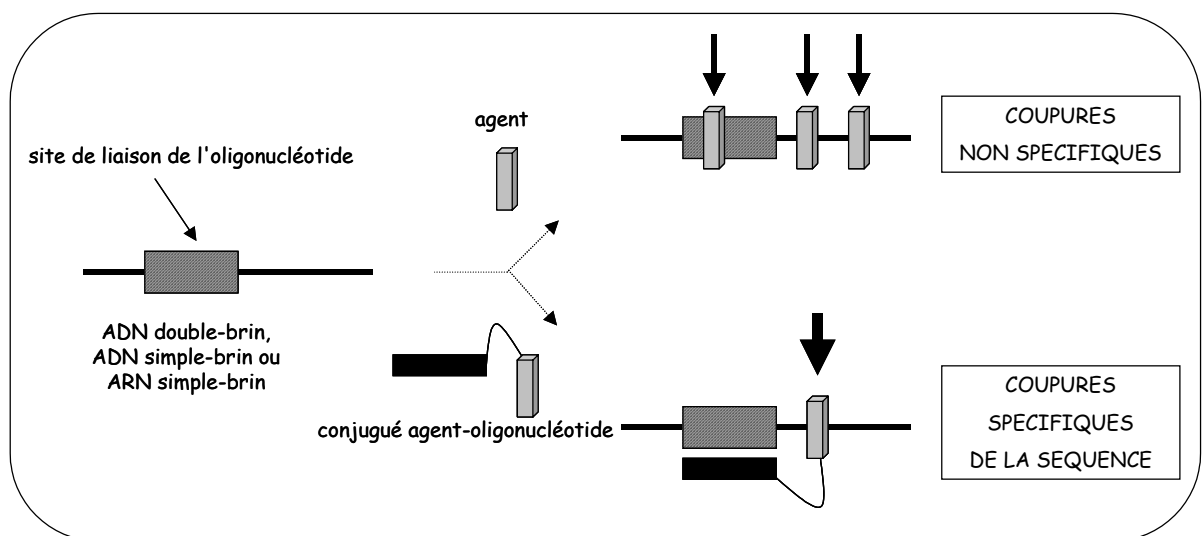


Figure 21 : Ciblage sélectif de réactions de coupure au niveau de sites spécifiques d'acides nucléiques par conjugaison de l'agent de clivage à un oligonucléotide

Comme nous l'avons vu précédemment (B.IV - Oligonucléotides et dérivés, page 32), la stratégie antigène vise à contrôler l'expression de gènes particuliers. Cependant, généralement, la liaison réversible des oligonucléotides à leur cible double-brin n'est pas assez forte pour affecter de façon significative la fonction du gène dans la cellule. Un moyen d'améliorer l'efficacité est d'attacher à ces oligonucléotides des agents synthétiques, afin d'induire un dommage chimique irréversible au niveau du site

visé.³⁸ Diverses nucléases ont donc été attachées à des oligonucléotides. Différents cas de nucléases exerçant leur action par activation photochimique sont notamment répertoriés dans la littérature.^{39, 40, 41, 42, 43} En ce qui concerne les nucléases nécessitant une activation chimique, de nombreux complexes conjugués à des oligonucléotides variés ont déjà été étudiés. On peut citer par exemple des complexes de fer ou de manganèse avec des ligands de type porphyrine,^{44, 45} le complexe de cuivre de la phénanthroline,⁴⁶ le complexe de fer de l'EDTA,⁴⁷ ou encore le tripeptide Gly-Gly-His complexé au nickel⁴⁸ ou au cuivre.⁴⁹

Cependant, l'utilisation potentielle *in vivo* de ces agents liés aux TFO est limitée par cette nécessité d'être activés, chimiquement ou photochimiquement. Le recrutement, par la formation du triplex, d'une nucléase à ADN cellulaire qui cliverait l'ADN spécifiquement au niveau du site du triplex représente une option attractive pour des applications biologiques. C'est le cas notamment des topoisomérases. La réaction de la topoisomérase I avec l'ADN double-brin produit un adduit 3'-phosphorotyrosyl covalent, généralement connu sous le nom de complexe de clivage. Sous conditions physiologiques, l'intermédiaire covalent est à peine détectable, car une étape rapide de religation se produit après relaxation des contraintes de l'ADN. Un certains nombres de composés, tels que la camptothécine (alcaloïde antitumoral) ou les analogues indolocarbazoles de la rébeccamycine (un antibiotique), peuvent convertir la topoisomérase I en poison pour la cellule. Ils sont en effet capables de bloquer l'étape de religation, favorisant ainsi l'accumulation de coupures d'ADN persistantes responsables de la mort cellulaire. La Figure 22 présente la structure de ces composés, conjugués à des oligonucléotides (TFO).^{50, 51, 52}

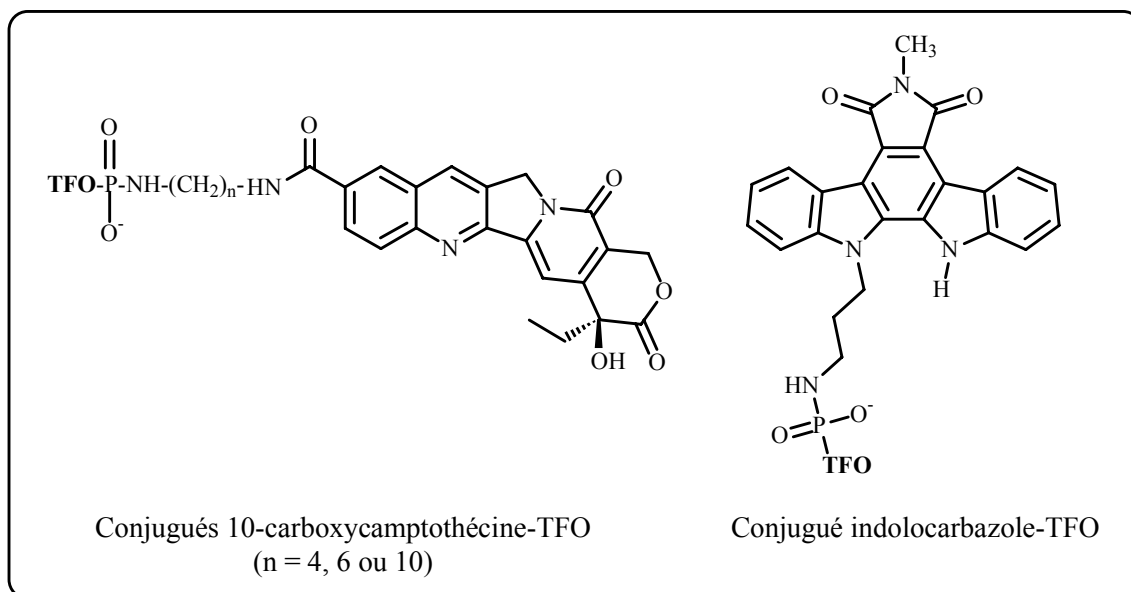


Figure 22 : Inhibiteurs de topoisomérase I conjugués à des TFO

3. Applications

Les possibilités d'application des nucléases chimiques sont nombreuses. Elles peuvent en effet être utilisées comme anticancéreux ou antiviraux en médecine mais elles trouvent surtout une application en biologie moléculaire comme agents de footprinting pour déterminer les interactions acide nucléique/protéine ou comme sondes pour étudier les conformations locales de l'ADN et les multiples structures tridimensionnelles des ARN.

a Applications thérapeutiques

Les bléomycines constituent l'exemple le plus connu d'application des nucléases dans le domaine des anticancéreux.⁵³ Il s'agit d'agents cytotoxiques dégradant l'ADN, après fixation d'ion ferreux et formation de radicaux libres. Elles induisent des coupures mono- ou bicaténares de l'ADN.

b Utilisation en tant qu'agents de footprinting

Le principe du footprinting est simple : la présence d'une protéine liée à l'acide nucléique bloque l'accès de ce domaine à la nucléase, qui ne peut donc pas induire de coupure à cet endroit. Ceci se visualise alors par une empreinte, une zone d'absence de bandes de coupure sur un gel de séquence obtenu après migration électrophorétique. Pour être un bon agent de footprinting, une nucléase chimique ne doit donc avoir aucune

spécificité de coupure. L'agent le plus couramment utilisé est le complexe Fe^{II} -EDTA.⁵⁴ On peut citer également le complexe de cuivre de la phénanthroline.⁵⁵

c Utilisation comme sondes structurelles

Les nucléases chimiques à affinité spécifique constituent des sondes de choix, pour marquer chimiquement un site sur un acide nucléique.⁵⁶ En visualisant où se situent les coupures le long de la chaîne d'un acide nucléique, on détermine la position de sites particuliers. Les nucléases chimiques, utilisées comme sondes structurelles, permettent donc d'examiner la topologie des hélices d'ADN généralement responsable des fonctions biologiques. Elles permettent également d'étudier les structures tertiaires compliquées des ARN (régions simples et doubles brins reliées par des boucles...).

d Application en affinité de coupure

Dans ce cas, la nucléase est attachée à la molécule dont on veut étudier l'affinité avec l'acide nucléique.^{56, 57} La coupure induite par le système permet de déterminer le site de reconnaissance. Cette méthode présente certains avantages par rapport aux autres méthodes d'étude des interactions acide nucléique/protéine. En effet, une coupure unique sur un acide nucléique long de plusieurs kilobases est très facile à détecter par électrophorèse. A l'opposé, les petites régions de non-coupure (footprinting) sont difficiles à observer sur de longs acides nucléiques. L'affinité de coupure est donc une méthode de choix pour détecter les sites de liaison d'une molécule avec les acides nucléiques. Cette méthode présente cependant des limites : la nucléase doit être condensée sur la molécule à étudier (généralement une protéine) sans que cette modification n'altère l'affinité de la molécule pour sa cible.

Au laboratoire, dans l'optique d'obtenir des molécules pour les applications décrites ci-dessus, les différents travaux menés depuis quelques années sont axés sur la synthèse de dérivés du salène, *N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine, complexés à différents métaux. Les paragraphes suivants décrivent les diverses molécules synthétisées ainsi que les principaux résultats obtenus.

4. Les salènes

Ces molécules sont connues pour être de bons chélateurs des métaux. En effet, la déprotonation des deux fonctions phénol du ligand salénique fournit une double charge négative qui, avec des cations doublement chargés, permet d'obtenir des complexes

neutres. Des aménagements fonctionnels peuvent être réalisés au niveau du noyau aromatique et/ou sur la fraction éthylènediamine, le but étant de préparer des composés possédant non seulement une affinité pour les acides nucléiques, mais aussi capables d'induire des coupures spécifiques.

Ainsi, les premières études menées au laboratoire⁵⁸ ont été effectuées sur des composés de structure **I** (Figure 23). L'introduction de la chaîne aminobutane (R_2), sous forme de sel d'acide trifluoroacétique, visait à conférer aux salènes une meilleure affinité pour les acides nucléiques.

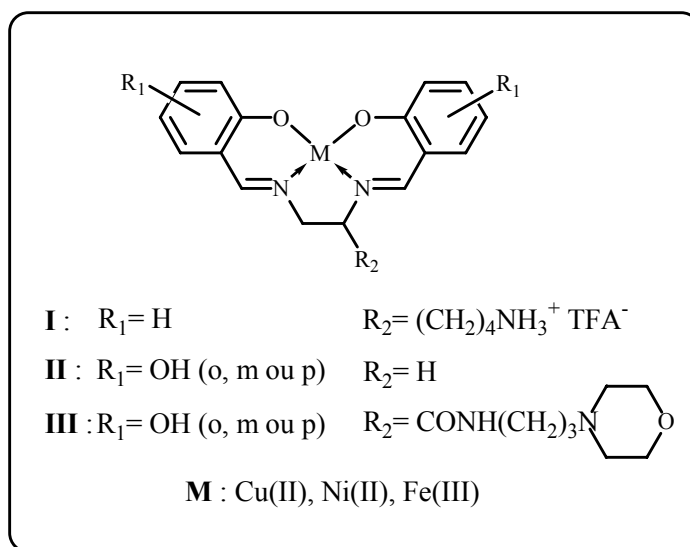


Figure 23 : Structure des dérivés du salène synthétisés au laboratoire

Tout d'abord, des analyses ont été effectuées sur le complexe de cuivre de ce salène fonctionnalisé.⁵⁹ Le mode de liaison de ce complexe à différents types d'ADN (ADN de thymus de veau, poly(dA-dT)·poly(dA-dT), poly(dG-dC)·poly(dG-dC)) a été étudié par des techniques variées (spectroscopie UV-Visible, fluorescence, dichroïsme circulaire, viscosimétrie). Il s'avère que le composé interagit préférentiellement avec les séquences AT plutôt que GC, et les hypothèses s'orientent plutôt vers un mode d'interaction par liaison dans un des sillons de la double hélice d'ADN, et plus particulièrement le grand sillon. Des expériences de coupure de plasmide ont montré que le complexe de cuivre peut induire des clivages de l'ADN en présence d'un agent réducteur (MPA). Des études sur des fragments d'ADN marqués ont révélé une coupure sans spécificité de séquence. Le mécanisme postulé pour le clivage de l'ADN par ce complexe implique la réduction de Cu(II) en Cu(I) qui réagit avec O_2 pour donner l'anion superoxyde O_2^- , suivie de la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , qui se

décompose alors pour générer des radicaux hydroxyle capables de réagir avec les unités désoxyribose de l'ADN.

Le même type de salène a également été complexé au nickel.⁶⁰ Dans un premier temps, l'analyse de la coupure d'ADN a été menée sur des fragments de restriction double-brin, mais pratiquement aucun clivage n'a alors pu être détecté. Des oligonucléotides formant des structures stables en épingle à cheveux ont alors été utilisés. Le complexe de nickel seul s'est révélé incapable de couper l'ADN mais la réaction de clivage peut être initiée en présence de composés donneurs d'oxygène comme le monopersulfate de potassium (KHSO_5) ou le monoperoxyphthalate de magnésium (MMPP). Dans ce cas, la réaction est spécifique aux guanines accessibles (guanines non appariées les plus exposées). Le mécanisme proposé passe plutôt, dans ce cas, par la fixation du complexe Ni(III) sur la guanine suivie d'une oxydation de la base.

Puis, le dérivé du salène a été conjugué à des ligands de l'ADN par l'intermédiaire de la chaîne latérale butylamine. Comme nous l'avons vu précédemment, cette stratégie a pour but d'améliorer la reconnaissance de l'ADN et d'induire ainsi une meilleure coupure, ou bien une coupure plus sélective. Des hybrides ont donc été synthétisés, associant le salène de type **I**, complexé au cuivre, à la mitoxantrone, un agent antitumoral (dérivé de type anthraquinone dont le mécanisme d'action est triple : intercalation, inhibition de topoisomérase, production de radicaux libres).⁶¹ Les conjugués entre le complexe et la mitoxantrone présentent une cytotoxicité réduite en comparaison à celle de la mitoxantrone non conjuguée. Cependant, de meilleures propriétés de clivage ont été obtenues. Or, les conjugués présentent également une capacité réduite à interférer avec la topoisomérase II, par rapport aux dérivés de l'anthraquinone non conjugués. Ceci pourrait expliquer leur potentiel cytotoxique réduit. La cytotoxicité semble donc essentiellement liée à l'inhibition de la topoisomérase et non à l'affinité ou à la capacité de coupure de l'ADN.

D'autres molécules ont également été développées dans la même optique, notamment un hybride associant le salène complexé par le cuivre à un fragment de type distamycine.⁶² Cette association visait à vectoriser le salène dans le petit sillon de l'ADN. La molécule hybride se lie préférentiellement aux séquences riches en bases AT. Cependant, le clivage de l'ADN en présence d'un agent réducteur reste efficace mais faiblement sélectif.

La phénanthroline, un intercalant, a aussi été modifiée en 2,9-bis(2-hydroxyphényl)-1,10-phénanthroline afin d'obtenir un complexe métallique à géométrie plan

carrée (Figure 24).⁶³ Grâce à ce concept, le bras espaceur (la chaîne latérale butylamine) est supprimé au profit d'une molécule compacte. Les complexes de Cu(II), Ni(II), Co(II) et Mn(III) ont été étudiés. Il en résulte que l'interaction avec l'ADN dépend du métal et la meilleure stabilisation est obtenue avec le complexe de cobalt. En ce qui concerne l'activité de coupure, les complexes de cuivre et de nickel se sont révélés inactifs alors que le complexe de cobalt coupe efficacement l'ADN en présence d'un agent réducteur (MPA). Le clivage par le complexe de manganèse quant à lui peut avoir lieu soit en présence d'un agent réducteur (acide ascorbique) par production de radicaux oxygénés soit en présence d'un oxydant tel que KHSO₅. Dans les deux cas, la coupure est très efficace.

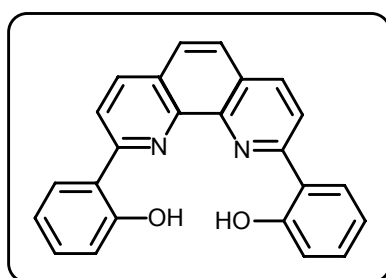


Figure 24 : 2,9-bis(2-hydroxyphényl)-1,10-phénanthroline

Des composés de formule générale **II** (Figure 23 page 49) ont ensuite été synthétisés, comportant des groupes hydroxyle supplémentaires (R₁) sur le noyau aromatique. La série de complexes de cuivre de la bis(hydroxysalicylidène)éthylènediamine (hydroxy-salènes) a donc tout d'abord été étudiée.⁶⁴ Le groupe hydroxyle en position *ortho*, *mé*ta ou *para* sur chaque unité salicylidène a été ajouté afin de renforcer la stabilité du complexe de cuivre et de créer un système hydroquinone coopérant avec le système rédox du cuivre pour faciliter la formation spontanée de l'espèce oxydante Cu(III). Les tests ont révélé que tous les complexes cuivriques étaient capables d'induire des coupures oxydantes de l'ADN circulaire de plasmide en présence d'un agent réducteur extérieur (MPA). La capacité des complexes à cliver l'ADN en absence d'agent activateur a également été testée.⁶⁵ L'isomère *mé*ta ne génère pas de radicaux oxygénés et ne peut donc pas couper l'ADN. Au contraire, l'isomère *para* et, à un degré moindre, l'isomère *ortho* présentent une activité nucléasique en relation avec leur capacité à produire des radicaux oxygénés. Ainsi, seuls les complexes présentant un système de type hydroquinone (deux fonctions hydroxyle en position *para*) ou catéchol (deux fonctions hydroxyle en position *ortho*) induisent des coupures. L'activité nucléasique est également liée à la capacité à former l'espèce oxydante Cu(III), l'électrochimie ayant permis de détecter la formation d'une espèce Cu(III) avec les

isomères *ortho* et *para* mais pas avec l'isomère *méta*. Un système hydroquinonique peut donc coopérer avec le système rédox d'un métal pour favoriser la coupure de l'ADN et la conception de métallo(hydroxy-salènes) constitue une voie originale dans le développement de nucléases chimiques auto-activées.

Les mêmes hydroxy-salènes ont également été complexés par le fer.⁶⁶ Le complexe *para* présente la plus haute affinité pour l'ADN. Ce composé se révèle également considérablement plus efficace en coupure d'ADN de plasmide que les isomères *ortho* et *méta*, en absence d'agent réducteur. D'autre part, l'activité nucléasique du complexe de fer *para* s'est révélée supérieure à celle de son homologue cuivrique. La coupure se fait plus rapidement et de manière totale (aucune spécificité) ce qui fait de ce complexe un excellent agent de footprinting.

Par ailleurs, la capacité de certains complexes à couper l'ARN a également été testée. Les ARN possèdent des structures tertiaires très variées incluant des bases appariées, des boucles, des bases exposées, des sillons... ce qui permet une reconnaissance spécifique par des protéines de régulation. Le mécanisme de trans-activation de l'expression génétique du virus du SIDA de type 1 (VIH-1) nécessite l'interaction de la protéine Tat (riche en acides aminés basiques) avec une région réponse d'un ARN appelé TAR. L'inhibition de l'interaction Tat-TAR constitue une nouvelle approche pour une thérapeutique anti-SIDA. Des nucléases s'attaquant spécifiquement à cet ARN propre au virus épargneraient la cellule hôte et bloqueraient la réplication du virus. Des métallo-salènes **III** (Figure 23 page 49) comportant une chaîne latérale basique ont donc été préparés. Les complexes cuivriques comportant un système catéchol ou hydroquinone coupent spécifiquement l'ARN TAR du VIH-1 sur l'uracile en position 40 qui est située dans la zone d'interaction de l'ARN TAR avec la protéine Tat. Cette coupure se fait en absence d'agent activateur.⁶⁷ Des études complémentaires ont montré que les mêmes complexes cuivriques, mais sans chaîne latérale (type **II**), exerçaient la même action sur l'ARN TAR.⁶⁸

Plus récemment, les salènes de type **II** complexés par le manganèse (II) ont été synthétisés.⁶⁹ Tous les composés ont montré une forte production d'anions superoxyde en solution dans le DMSO. La formation de radicaux oxygénés résulte d'un processus d'oxydation à un électron de l'espèce Mn(II) induisant la formation de Mn(III). En condition réductrice en présence d'acide ascorbique, la réduction de Mn(III) en Mn(II) aboutit à la formation de radicaux hydroxyle pour les complexes *ortho* et *para*. Cependant, les expériences de coupure de plasmide ont révélé que les complexes

hydroxy-salènes à manganèse sont incapables d'induire de clivage de l'ADN en absence d'agent activateur : un agent réducteur est impérativement nécessaire.

Au regard de ces différents résultats, il s'avère que la nature du métal conduit à des activités nucléasiques très différentes. Cela nous a donc conduit à élaborer de nouveaux complexes de type **II** avec d'autres métaux. Notre étude s'est orientée vers la synthèse de salènes complexés au vanadium, et c'est ce dont nous allons discuter dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II :
SALENES A VANADIUM

A. GENERALITES SUR LE VANADIUM

I. ROLE DU VANADIUM EN BIOLOGIE, APPLICATIONS THERAPEUTIQUES

Le vanadium est le premier élément du cinquième groupe dans le tableau périodique. Il existe dans des états d'oxydation s'étalant de -I à +V, préférentiellement +III, +IV (notamment sous forme de vanadyle VO^{2+}) et +V (sous forme cationique VO_2^+ ou encore sous forme anionique, vanadate, $H_2VO_4^-$).

Il fait partie du site actif de certaines enzymes.^{70, 71} Deux classes d'enzymes au vanadium ont été découvertes jusqu'à présent : les nitrogénases à vanadium de certaines bactéries qui catalysent la conversion de N_2 en NH_3 et les haloperoxydases vanadate-dépendantes trouvées dans certaines algues marines et lichens qui, elles, catalysent l'oxydation d'un halogénure par le peroxyde d'hydrogène. Le vanadium est également présent à l'état de trace dans l'organisme, il peut prendre part aux processus biologiques sous ses divers états d'oxydation, à la fois sous forme anionique ou cationique. Le vanadium exerce alors des actions métaboliques variées : sous sa forme anionique, vanadate ($H_2VO_4^-$), il présente une ressemblance avec les ions phosphate. Il peut donc interférer avec les enzymes faisant intervenir l'entité phosphate et ainsi réguler les phosphorylations enzymatiques par action au niveau des kinases ou des phosphatases. Sous forme cationique (VO^{3+} , VO_2^+ , VO^{2+} et V^{3+}), ce métal de transition peut interagir avec des ligands d'origine biologique comme les protéines, les sucres ou encore les acides nucléiques.⁷²

Etant donnée son importance en tant que "bioméтал", la synthèse de molécules à base de vanadium connaît depuis quelques années un développement considérable. Il est en effet indéniable que la nature ambivalente du vanadium permet à cet élément de remplir de nombreuses tâches de régulation dans l'organisme : d'une part, sous sa forme anionique, il constitue un compétiteur du phosphate dans son métabolisme et d'autre part, sous ses formes cationiques, il joue un rôle central dans l'interaction avec les biomolécules.

Les effets pharmacologiques des composés du vanadium sont nombreux,^{73, 74} ils incluent notamment la baisse du taux de cholestérol et de glucose, un effet diurétique, la contraction des vaisseaux sanguins ainsi que l'amélioration de l'affinité de l'hémoglobine et de la myoglobine pour l'oxygène. L'activité antitumorale de certaines molécules a aussi été étudiée.

De nombreux dérivés du vanadium ont notamment été proposés comme insulino-mimétiques dans le traitement du diabète : il s'agit de composés capables de mimer les effets de l'insuline. Diverses molécules sont à l'étude, parmi lesquels le BMOV (Bis(Maltolato)-OxoVanadium (IV)), qui a passé les essais cliniques de phase 2 chez l'homme, ou encore le complexe bis(picolinato)-vanadium (V), utilisé avec succès dans le traitement de chats naturellement diabétiques (Figure 25).

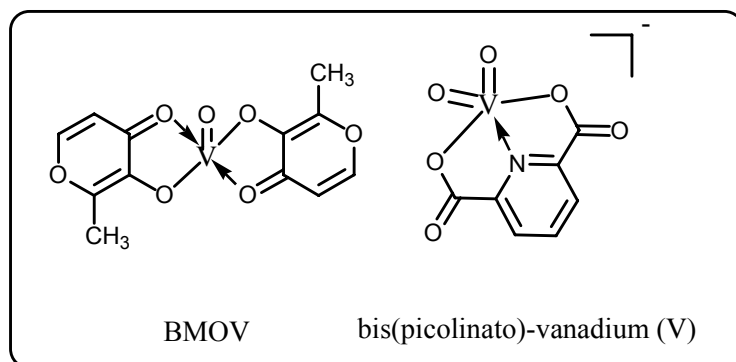


Figure 25 : Composés du vanadium étudiés dans le cadre du traitement du diabète

Quelques dérivés du vanadium ont également été étudiés dans le cadre du traitement du cancer. Le traitement anticancéreux idéal doit répondre à certains critères et exercer, de manière sélective sur les cellules malignes, les effets suivants : réduction de la vitesse de croissance cellulaire (effet antiprolifératif), actions cytotoxique et/ou cytostatique exprimées par la mort cellulaire nécrotique ou programmée (apoptose), réduction et/ou inhibition du potentiel invasif et/ou métastatique des cellules et capacité réduite ou absente à induire une résistance cellulaire. Certains composés du vanadium possèdent ces propriétés, par l'intermédiaire de mécanismes cellulaires variés⁷⁵ (Schéma 4).

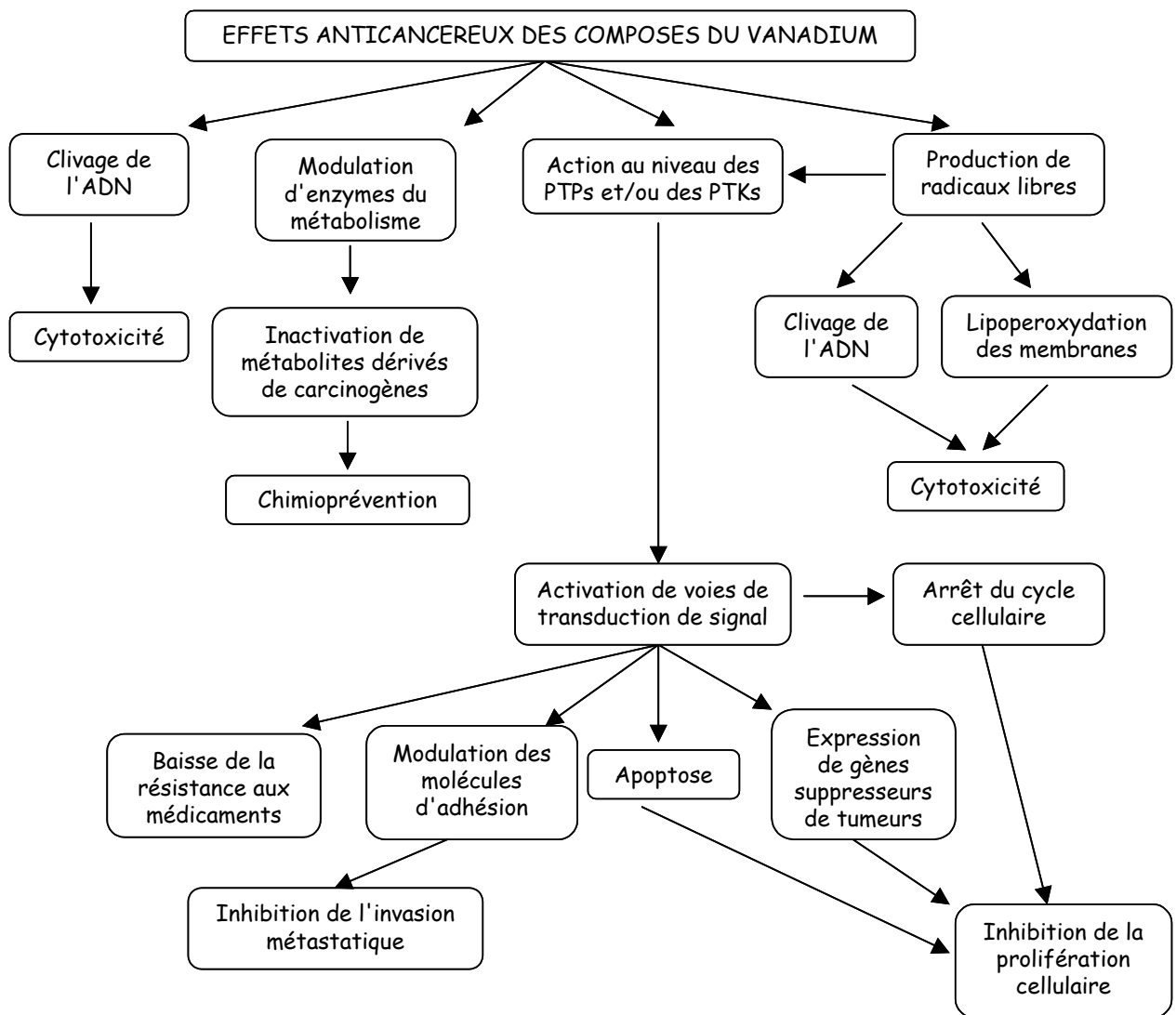


Schéma 4 : Effets antitumoraux du vanadium (PTPs : Protéines Tyrosine Phosphatases, PTKs : protéines Tyrosine Kinases)

La Figure 26 présente les structures de deux composés étudiés pour cette application, le dichlorure de vanadocène, Cp_2VCl_2 , ainsi qu'un bisperoxovanadate, $VO(O_2)_2(oxalate)^{3-}$.

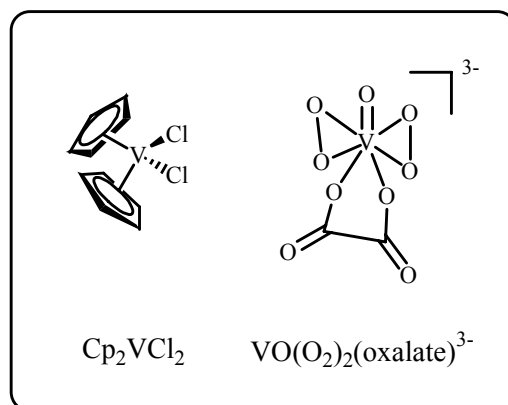


Figure 26 : Composés du vanadium étudiés dans le cadre du traitement du cancer

II. COMPOSES DU VANADIUM ET COUPURE D'ADN

De nombreux auteurs ont étudié l'activité nucléasique de différents composés du vanadium. Ce chapitre constitue un bref rappel bibliographique des divers résultats observés en fonction de l'état d'oxydation du vanadium.

1. Vanadium (III)

Une activité de clivage d'ADN de plasmide a été observée pour des complexes dimériques de vanadium (III) à pont oxygène, sans nécessiter l'ajout d'oxydant ou de réducteur exogène.⁷⁶ Dans ces complexes, de type $[(\text{VL}_2\text{Cl})_2\text{O}]^{2+}$ (L = bipyridine ou α -phénanthroline), l'unité V-O-V est relativement flexible et facilement distordue en fonction d'interactions faibles telles que le π -stacking ou les liaisons hydrogène. De tels dimères semblent donc s'adapter à la conformation des sillons de l'ADN de façon à maximiser ces interactions. Ces composés se révèlent non seulement de meilleurs agents de coupure que les espèces monomériques correspondantes, mais aussi ils ne requièrent la présence d'aucun agent extérieur (comme le peroxyde d'hydrogène).

Par ailleurs, les mécanismes en présence et en absence d'eau oxygénée semblent différents.^{77,78} Ainsi, lorsque H_2O_2 est ajouté au milieu d'incubation, le dimère comme le monomère donnent le même résultat, à savoir un clivage important du plasmide. Ce résultat est attribué au fait que, en présence d'eau oxygénée, le dimère de vanadium (III) est rapidement oxydé en vanadium (IV). Or, des complexes de vanadyle de types variés sont connus pour générer des radicaux hydroxyle en présence d'un excès de peroxyde *via* une réaction de type Fenton (voir paragraphe suivant).

La nature exacte du clivage par les dimères de vanadium (III) reste à élucider, mais il semble impliquer une oxydation des bases, les guanines en particulier.⁷⁹

2. Vanadium (IV)

a Sulfate de vanadyle VOSO₄

✓ Réaction avec KHSO₅

En présence de KHSO₅ et après traitement à la pipéridine, le sulfate de vanadyle produit une oxydation sélective des guanines sur un fragment de restriction de l'ADN de 167 paires de bases.⁸⁰ Des expériences ont été menées en présence d'éthanol ou d'alcool tertiobutylique afin de déterminer l'espèce responsable du clivage aux guanines. Aucun quenching de la réaction de clivage de l'ADN n'a été observé. L'implication du radical hydroxyle peut donc être éliminée car la réaction de coupure ne serait pas base-spécifique, elle aurait lieu sans traitement à la pipéridine et ce radical serait quenché efficacement à la fois par l'éthanol et l'alcool tertiobutylique. L'implication d'un radical sulfate libre peut également être écartée car celui-ci réagirait et serait quenché par l'éthanol, ce qui diminuerait l'oxydation de l'ADN. Le radical monopersulfate SO₅^{-•}, en revanche, est relativement inerte vis-à-vis des alcools. C'est pourquoi l'espèce oxydante catalysant la réaction avec l'ADN semble correspondre soit à un radical monopersulfate, soit à un radical sulfate lié au métal ("crypto-radical").

Le mécanisme suivant (Schéma 5) a été proposé pour le clivage de l'ADN : il implique l'oxydation du vanadium (IV) en vanadium (V) et la réduction concomitante de l'hydrogénopersulfate.

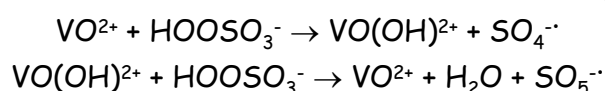


Schéma 5 : Réaction de VOSO₄ avec KHSO₅

Dans la première étape, l'ion vanadyle (V(IV)) est oxydé en V(V) et il y a production de radical sulfate. Au cours de la seconde étape, l'ion vanadium (V) réagit avec l'hydrogénopersulfate HSO₅⁻ pour générer le radical monopersulfate SO₅^{-•} et la production radicalaire devient catalytique. Les deux types de radicaux réagissent avec l'ADN pour causer des dommages oxydatifs aux guanines et par conséquent le clivage de l'ADN après traitement basique, à la pipéridine par exemple.

✓ Réaction avec H_2O_2

Le sulfate de vanadyle en présence d'eau oxygénée induit des coupures sans sélectivité de séquence en accord avec un mode de clivage direct au niveau des sucres de l'ADN par des radicaux hydroxyle, probablement par un mécanisme de type Fenton (Schéma 6) :^{81,82}

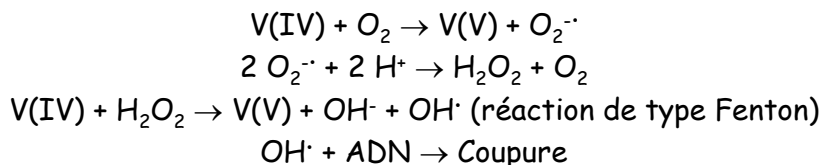


Schéma 6 : Réaction de VO_2SO_4 avec H_2O_2

✓ Réaction avec l'hydroperoxyde de *t*-butyle

La réaction de VO_2SO_4 avec l'hydroperoxyde de *t*-butyle génère des radicaux libres, dérivés de l'hydroperoxyde, qui induisent le clivage de l'ADN.^{81, 82} Les adduits détectés en spin-trapping sont du type DMPO-R (avec R^{\cdot} = radical alkyle dérivé de l'hydroperoxyde), DMPO-OR (RO^{\cdot} = radical alcoyle) et DMPO-OH (HO^{\cdot} = radical hydroxyle).

b Complexe de vanadyle de la bléomycine

Comme de nombreux ions de métaux de transition, l'ion vanadyle (IV) forme un complexe 1:1 avec la bléomycine. Celui-ci est capable de couper efficacement l'ADN en présence d'eau oxygénée.^{83,84} Un mécanisme plausible propose la formation d'une espèce bléomycine-peroxovanadium (V). D'autre part, des expériences de spin trapping en présence du complexe et d' H_2O_2 indiquent la formation de radicaux hydroxyle.

c Complexe de vanadyle de la phénanthroline

Le complexe 1:1 vanadyle-1,10-phénanthroline $VO(\text{phen})^{2+}$ s'est révélé capable de couper efficacement un plasmide en présence d'eau oxygénée.⁸⁵ Ce complexe présente une haute affinité pour l'ADN, vraisemblablement par intercalation, et induit une inhibition de la croissance cellulaire pour les cellules KB de carcinome de nasopharynx humain. Afin d'examiner les espèces actives intervenant dans le clivage de l'ADN, des expériences de spin-trapping ont été effectuées et, là encore, une production de radicaux hydroxyle a été détectée.

d Complexes de vanadyle avec des sucres

Bandwar et Rao⁸⁶ ont étudié l'interaction avec l'ADN d'une série de complexes VO²⁺-saccharide de type Na₂[VO(sacch)₂(OH)Cl] (sacch = glucose, fructose, galactose, xylose, ribose). Les cinq complexes testés conduisent au clivage de l'ADN de plasmide et les coupures sont amplifiées en présence d'H₂O₂, ce qui suggère un mécanisme impliquant des radicaux hydroxyle, formés par une réaction de type Fenton. Cette série de complexes constitue donc une série d'agents de clivage de l'ADN efficaces en présence d'eau oxygénée. La bonne solubilité dans l'eau des saccharides, leur faible pouvoir immunogène, leur faible toxicité et l'intérêt biologique des interactions métal de transition-saccharides font de ces complexes des composés intéressants en biologie.

e Complexes de vanadyle avec des acides hydroxamiques

Hashimoto et ses collaborateurs ont élaboré des conjugués d'acides hydroxamiques (R-CONHOH) avec des ligands du petit sillon (nétropsine, distamycine), capables de se lier à l'ADN et pouvant induire sa coupure en formant des complexes avec des métaux.^{87, 88} En présence d'eau oxygénée, les complexes de vanadyle se sont révélés capables de cliver l'ADN de plasmide. Il semble, ici encore, que le radical hydroxyle soit impliqué dans le clivage de l'ADN (réaction de type Fenton).

3. Vanadium (V)

a Ion vanadate

L'ion vanadate peut être utilisé dans le traitement du diabète. Or, celui-ci est réduit *in vivo* par des composants cellulaires tels que les saccharides, l'acide ascorbique ou le glutathion, pour générer une espèce de vanadium (IV). Cette espèce est à l'origine d'effets néfastes pour la cellule : clivage de l'ADN, peroxydation des lipides, cytotoxicité, apoptose, inhibition de la synthèse de protéines.⁸⁹ Cette réduction intracellulaire est donc vraisemblablement à l'origine de la toxicité observée dans les cellules traitées par le vanadate (Figure 27). En effet, la propriété de coupure de l'ADN des complexes de vanadyle est intéressante dans le cadre d'un médicament anticancéreux, à condition qu'ils puisse être dirigé sur les cellules cancéreuses uniquement. En revanche, elle pourrait avoir de sérieuses implications pour l'utilisation de divers complexes de vanadium dans le traitement à long terme du diabète. La production excessive d'espèces réactives de l'oxygène comme le radical hydroxyle

contribue en effet aux complications secondaires telles que la microangiopathie, l'athérosclérose ou la neuropathie.

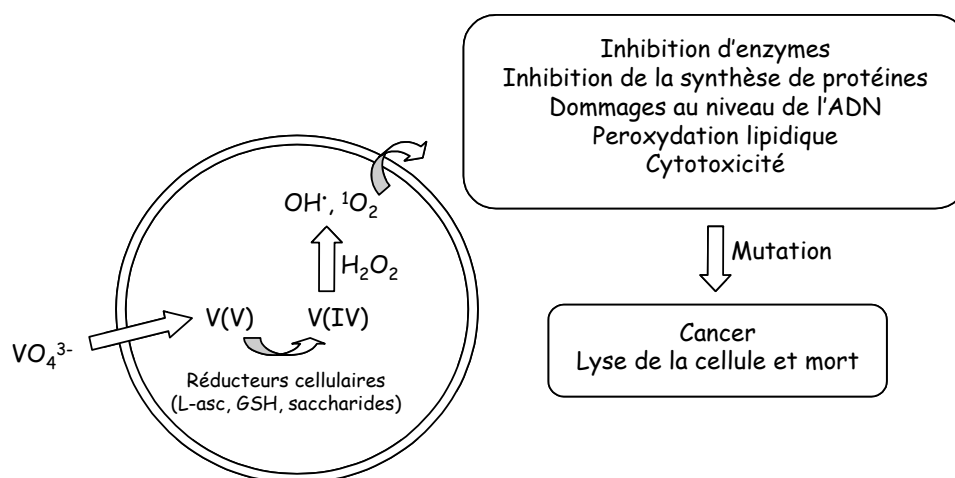


Figure 27 : Toxicité causée par un traitement au vanadate dans une cellule (L-asc : acide ascorbique, GSH : glutathion)⁸⁹

b Complexes bisperoxovanadium (V) (bpV)

Kwong et ses collaborateurs ont examiné le photoclivage de l'ADN par quinze complexes de type bisperoxovanadium (V) ($\text{NH}_4[\text{VO}(\text{O}_2)_2(\text{L-L})] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, avec L-L un ligand dérivé de la 2,2'-bipyridine ou encore de la 1,10-phénanthroline).⁹⁰ Un mécanisme est proposé pour ces activités de photoclivage, impliquant l'oxygène singulet produit par photolyse des complexes.

Le clivage de l'ADN induit de façon chimique ou photochimique par le composé insulino-mimétique bpV(phen) (avec L-L = 1,10-phénanthroline) a plus particulièrement été étudié.⁹¹ Il semblerait que l'espèce responsable du clivage soit un complexe de vanadium intermédiaire, qui pourrait être une espèce V(IV) formée durant la photoréduction et la décomposition subséquente de bpV(phen). En absence d'activation photochimique, le clivage peut également être initié par un réducteur chimique, tel que le NADPH. La réduction chimique de bpV(phen) produit donc également des espèces capables de couper l'ADN, ce qui laisse supposer l'intervention d'une espèce V(IV) .

III. SALÈNES À VANADIUM : APPLICATIONS EN CATALYSE

Outre leurs applications en biologie en tant que nucléases, les salènes complexés par différents métaux sont surtout utilisés en chimie comme catalyseurs de nombreuses réactions. Par ailleurs, le vanadium, associé à des ligands variés, est utilisé en catalyse dans la transformation rédox de divers composés.⁹² Ainsi, de nombreux salènes à vanadium ont été synthétisés pour être étudiés en tant que catalyseurs de diverses réactions chimiques, et notamment :

- l'addition asymétrique du cyanure de triméthylsilyle sur des aldéhydes,⁹³
- l'électroréduction de O_2 en H_2O ,⁹⁴⁻⁹⁶
- l'oxydation énantiosélective de sulfures en sulfoxydes,⁹⁷⁻¹⁰³
- l'époxydation des oléfines.¹⁰⁴

Différents complexes de vanadyle (VO^{2+}) ont été étudiés pour ces applications en catalyse. En particulier, le vanadium a été associé à des ligands de type base de Schiff polydentate, obtenus par condensation du carbohydrazide,¹⁰⁵ d'acides aminés,^{106, 107} ou de diamines aliphatiques^{108, 109, 110} ou aromatiques^{94, 104} sur des aldéhydes aromatiques. Dans le cas des diamines, les complexes obtenus sont de la forme **IV** (Figure 28).

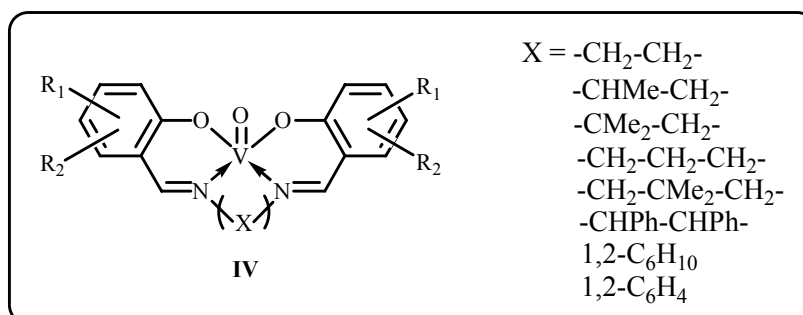


Figure 28 : Complexes de vanadyle avec des ligands de type base de Schiff

Les dérivés du salène appartiennent à cette catégorie (X = -CH₂-CH₂-). Cependant, malgré leurs nombreuses utilisations en catalyse, les complexes de vanadyle de ces ligands n'ont, à notre connaissance, jamais été étudié en coupure d'ADN. C'est pourquoi il nous a paru intéressant, dans le cadre de la thématique du laboratoire visant à étudier et développer de nouvelles nucléases synthétiques, de concevoir et d'étudier l'activité biologique de nouveaux salènes à vanadium. Le choix du ligand s'est porté sur le salène lui-même ainsi que ses dérivés hydroxylés en position *ortho*, *mé*ta et *para*. En effet, cette série de ligands, déjà testée précédemment, complexée au cuivre⁶⁵ ou au fer,⁶⁶ a permis de découvrir de nouvelles nucléases chimiques auto-activées, capables d'engendrer des coupures des acides nucléiques en absence de tout agent activateur. Il

semble alors intéressant de tester cette capacité d'auto-activation en faisant varier la nature du métal. D'autre part, l'intérêt des complexes de vanadyle, vanadium (IV), dans l'étude de leur activité nucléasique potentielle réside dans le fait que ceux-ci peuvent être réduits en vanadium (III) mais aussi oxydés en vanadium (V). On peut donc s'attendre à l'induction d'une activité de coupure aussi bien par un agent activateur réducteur que par un agent oxydant. La suite de ce chapitre est donc consacrée à l'étude des dérivés du salène complexés à l'ion vanadyle.

B. SYNTHÈSE ET ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES SALÈNES À VANADIUM

I. SYNTHÈSE DES LIGANDS : SALÈNE ET DÉRIVÉS HYDROXYLÉS

Notre travail s'est axé sur l'étude de quatre ligands (Figure 29) : le salène (*N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine) **1a** ainsi que les salènes **1b-d** substitués par un groupe hydroxyle en position *ortho* (*N,N'*-bis(3-hydroxysalicylidène)éthylènediamine), en position *méta* (*N,N'*-bis(4-hydroxysalicylidène)éthylènediamine), ou en position *para* (*N,N'*-bis(5-hydroxysalicylidène)éthylènediamine), ceci afin de pouvoir étudier l'influence de la position des groupements hydroxyle sur le cycle benzénique du salène.

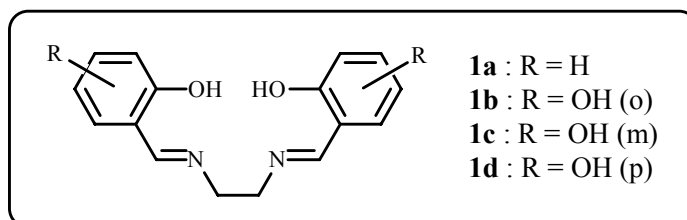


Figure 29 : Salène et dérivés hydroxylés

Ces bases de Schiff **1a-d** sont obtenues par condensation du salicylaldéhyde ou de ses dérivés hydroxylés sur l'éthylènediamine selon le schéma général suivant (Schéma 7) :

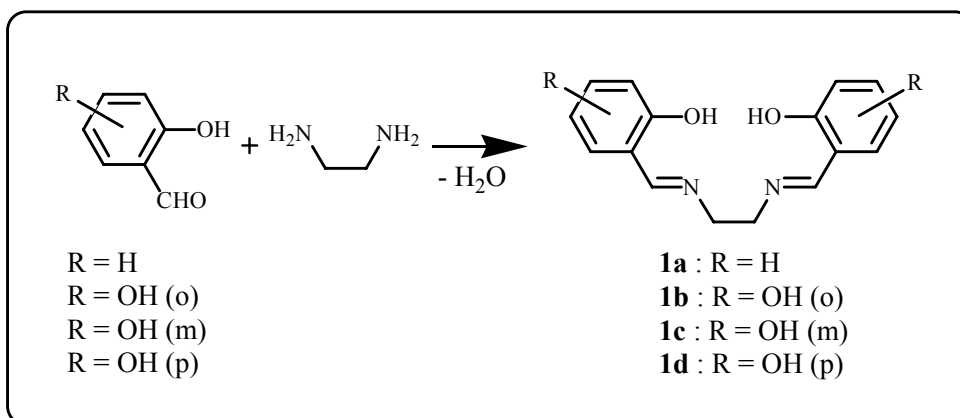


Schéma 7 : Synthèse des bases de Schiff **1a-d**

Dans un premier temps, les ligands ont été synthétisés selon une procédure déjà mise en œuvre au sein du laboratoire.⁶⁴ La réaction entre le dérivé de l'aldéhyde salicylique et l'éthylènediamine, dans le toluène, est effectuée dans un montage de type Dean-Stark, afin d'éliminer l'eau formée. Pour les dérivés hydroxylés, un chauffage à

reflux de 3 heures dans le toluène, sous agitation vigoureuse, nous a permis d'obtenir les ligands correspondants avec des rendements supérieurs à 90 %. En revanche, le ligand **1a** est soluble dans le toluène. Il est donc obtenu après évaporation du solvant et recristallisation dans l'éthanol avec un rendement de 80 %. La littérature¹¹¹ décrit le même type de réaction dans l'éthanol à reflux pendant une demi-heure. Après recristallisation, on obtient le ligand **1a** avec un rendement de 75 %. Cette méthode a été appliquée également à la synthèse du ligand **1b**, celui-ci étant obtenu à partir du 2,3-dihydroxybenzaldéhyde avec un excellent rendement (98 %).

II. SYNTHÈSE DES COMPLEXES DE VANADYLE

La préparation des complexes peut être réalisée par l'intermédiaire de divers sels de vanadium tels que le sulfate de vanadyle hydraté, $V^{IV}OSO_4 \cdot x H_2O$,^{104, 108, 112, 113} le diacétylacétonate de vanadyle, $V^{IV}O(acac)_2$ avec $acac = [CH_3COCH=C(O^-)CH_3]$,^{104, 108, 109} ou le triacétylacétonate de vanadium, $V^{III}(acac)_3$.^{104, 114, 115} En ce qui nous concerne, notre choix s'est porté sur le sulfate de vanadyle.

Le complexe **2** est formé par réaction entre le ligand **1** et $VOSO_4$ dans le méthanol en présence de pyridine, pendant 1 heure à 60°C (Schéma 8).¹¹² Les composés **2a**, **2b** et **2d** sont obtenus avec des rendements compris entre 60 et 80 %, et se présentent sous forme de poudre verte. En revanche, le composé **2c** est de couleur marron et le rendement n'est que de 15 %.

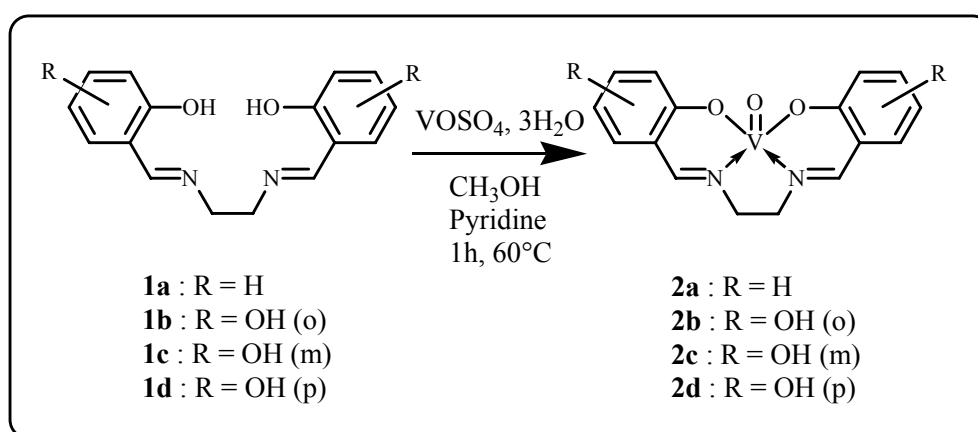


Schéma 8 : Synthèse des complexes de vanadyle

Etant données les nombreuses méthodes de complexation décrites dans la littérature, nous avons étudié l'influence de différents paramètres sur la synthèse des complexes, en se limitant pour cela aux composés **1a** et **1b** (hydroxyle en position *ortho*). En effet, dans certaines publications, la pyridine, utilisée pour capter les protons

libérés lors de la complexation, est remplacée par la triéthylamine,¹⁰⁸ ou par l'acétate de sodium.¹¹⁰ D'autres auteurs encore effectuent le même type de réaction mais sans avoir recours à un accepteur de proton.^{93, 113} De plus, la pyridine peut, par l'intermédiaire du doublet non liant de l'atome d'azote, se lier au complexe pour compléter la sphère de coordination du vanadium.¹⁰⁷ Elle peut également poser problème notamment pour les systèmes catéchol et hydroquinone, particulièrement instables en milieu basique. D'autre part, pour certains auteurs, les réactions sont menées sous atmosphère inerte, avec des solvants secs,¹⁰⁸ alors que pour d'autres, elles sont effectuées à l'air,¹¹⁵ et même parfois en solution aqueuse.¹¹⁰

La complexation des ligands **1a** et **1b** a donc été effectuée sous plusieurs conditions : présence ou non de pyridine, sous atmosphère inerte ou non, avec solvant et pyridine préalablement distillés et dégazés ou non. Finalement, le complexe attendu est obtenu dans tous les cas, avec des rendements sensiblement équivalents. L'emploi de conditions inertes, la distillation, le dégazage du méthanol et de la pyridine permettent simplement d'améliorer légèrement le rendement.

III. ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES SALENES A VANADIUM

Dans l'ion vanadyle VO^{2+} , le vanadium, de configuration $[Ar]3d^1$, possède un électron célibataire dans la couche 3d. Les composés **2a-d** sont donc paramagnétiques, ce qui rend leur caractérisation par RMN difficile. En effet, les spectres de RMN 1H des molécules paramagnétiques se traduisent généralement par des déplacements chimiques peu prévisibles et variant sur une grande plage de valeurs (-100 à +100 ppm contre 0 à 10 ppm pour les molécules diamagnétiques ordinaires), ainsi que par un net élargissement des raies.^{116, 117} Ainsi, les spectres des complexes **2a-d** présentent un large pic d'allure gaussienne dans la région des protons aromatiques, empêchant leur caractérisation par RMN. D'autres techniques ont donc été utilisées afin de caractériser les complexes synthétisés.

1. Spectroscopie infrarouge

Les produits synthétisés ont été étudiés par spectroscopie infrarouge afin de repérer deux bandes d'absorption caractéristiques : celle correspondant à la liaison imine et celle correspondant à la liaison $V=O$. Les fréquences de vibration de la liaison imine $\nu_{C=N}$ observées pour les ligands **1a-d** ainsi que pour les complexes **2a-d** sont reportées dans le Tableau 3.

Ligand	$\nu_{C=N}$ (cm ⁻¹)	Complexe	$\nu_{C=N}$ (cm ⁻¹)
1a	1630	2a	1620
1b	1630	2b	1620
1c	1640	2c	1610
1d	1640	2d	1620

Tableau 3 : Fréquences de vibration de la liaison imine

On constate que la coordination de l'atome d'azote au métal entraîne un déplacement de la fréquence de vibration vers des valeurs plus faibles. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature.¹⁰⁵

Nous avons également analysé une bande d'absorption caractéristique des complexes, la fréquence de vibration de la liaison V=O. Cette bande a été tout particulièrement étudiée dans la littérature, notamment dans la distinction de la nature mononucléaire ($\nu_{V=O} \approx 980$ cm⁻¹) ou polynucléaire ($\nu_{V=O} \approx 860$ cm⁻¹) des complexes de vanadyle avec des bases de Schiff.¹⁰⁸ En effet, certains complexes ont plutôt tendance à former des oligomères à l'état solide. C'est le cas notamment lorsque le 1,2-diaminoéthane est remplacé par le 1,3-diaminopropane pour former les bases de Schiff.¹¹⁸ Dans ces complexes oligomériques, l'atome d'oxygène du groupement vanadyle d'une molécule interagit avec un site de coordination d'une molécule voisine, résultant en une chaîne linéaire (V=O...V=O)_n. Le transfert d'électrons π de la liaison V=O vers le second centre métallique entraîne une diminution de la fréquence de vibration de la liaison V=O.¹¹⁵

Les fréquences de vibration de la liaison V=O observées pour les complexes **2a-d** sont présentées dans le Tableau 4.

Complexe	2a	2b	2c	2d
$\nu_{V=O}$ (cm ⁻¹)	990	970	970	960

Tableau 4 : Fréquences de vibration de la liaison V=O

Ces valeurs, comprises entre 960 et 990 cm⁻¹, sont en accord avec l'obtention de complexes à l'état mononucléaire.¹⁰⁸ Ce résultat est confirmé par des analyses de spectrométrie de masse.

2. Résonance Paramagnétique Electronique

a Principe

La RPE^{119, 120} est une spectroscopie très utilisée en chimie de coordination. Cette technique repose sur l'interaction entre un champ magnétique et un moment magnétique permanent d'origine électronique. Ne peuvent donc être étudiées par cette méthode que des molécules paramagnétiques comme les radicaux ou certains complexes d'ions de métaux de transition ou de terres rares. Cette spectroscopie permet de tirer divers renseignements sur les composés étudiés, en particulier sur leur géométrie et leur structure électronique.

✓ L'effet Zeeman électronique et le tenseur [g]

Le champ magnétique H créé par l'électro-aimant du spectromètre de RPE possède une direction fixe dans l'espace. Le spin électronique étant quantifié et en choisissant comme axe de quantification la direction du champ magnétique, on déduit les niveaux d'énergie du système, appelés niveaux Zeeman :

$$E(m_s) = g\beta H m_s \text{ avec } m_s = \pm 1/2$$

où g désigne le facteur spectroscopique et β le magnéton de Bohr ($9,2740 \cdot 10^{-24} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$).

Outre le champ magnétique H, le spectromètre de RPE comporte un dispositif (klystron) engendrant une onde électromagnétique de fréquence ν . Le Tableau 5 donne quelques exemples de fréquences utilisées, la plus répandue correspondant à la bande X.

Bande	S	X	K	Q
Fréquence (GHz)	3,2	9,5	25	35

Tableau 5 : Fréquences utilisées en RPE

Lorsque le champ magnétique H prend une amplitude telle que l'écart entre les deux niveaux Zeeman coïncide avec le quantum d'énergie $h\nu$ de l'onde électromagnétique, cette dernière est absorbée par le système et il se crée un phénomène de résonance. On a donc l'équation fondamentale de la RPE :

$$h\nu = g\beta H_{rés} \text{ avec } H_{rés} \text{ le champ résonnant et } h \text{ la constante de Planck } (h = 6,62 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s})$$

Dans la pratique, la fréquence utilisée est mesurée à l'aide d'un fréquencemètre, le champ résonnant $H_{rés}$ est déterminé expérimentalement : on peut donc en déduire le facteur spectroscopique g caractéristique du système étudié.

Ainsi, pour chaque centre paramagnétique, l'interaction électronique Zeeman est exprimée par l'intermédiaire du tenseur g . On distingue trois valeurs principales de g (g_x , g_y et g_z), orthogonales les unes aux autres. La déviation de ces valeurs de g par rapport au cas de l'électron libre ($g = 2,0023$) apporte des informations concernant la structure électronique du composé étudié.

✓ *La structure hyperfine des spectres de RPE*

Quand un ou plusieurs électrons sont au voisinage d'un noyau de spin nucléaire non nul, il y a interaction entre les moments magnétiques des électrons et du noyau. On observe un couplage hyperfin qui se traduit par une multiplication des raies du signal de RPE : on obtient ainsi $(2I+1)$ raies de même intensité, avec I le spin nucléaire. Cette interaction entre le spin électronique S et le spin nucléaire I du métal est exprimée par une constante A appelée constante de couplage hyperfin. Cette constante est également un tenseur caractérisé par trois valeurs principales orthogonales les unes aux autres.

L'hamiltonien de spin H , correspondant à l'énergie d'interaction d'une substance paramagnétique dans un champ magnétique H , peut alors s'écrire de la façon suivante, avec une composante attribuée à l'énergie Zeeman (H_{Zeeman} , interaction spin électronique - champ magnétique statique) et une composante attribuée au couplage hyperfin (H_{HFS} , interaction spin électronique - spin nucléaire) :

$$H = H_{Zeeman} + H_{HFS} = \sum (\beta g_j S_j H_j + A_j S_j I_j)$$

où j représente la composante selon chacun des trois axes x , y , z .

✓ *L'interaction superhyperfine*

Une interaction dite superhyperfine impliquant les atomes coordinants peut parfois être observée. Si l'atome coordinant possède un spin nucléaire non nul (comme ^{14}N par exemple pour lequel $I = 1$), un couplage avec cet atome peut alors être observé. Cependant, comme l'intensité de couplage est nettement plus faible avec les atomes coordinants qu'avec le noyau métallique, le couplage superhyperfine est rarement résolu sur les spectres.

✓ *Effet de la symétrie sur les valeurs de g et A*

Selon la géométrie des complexes étudiés, il existe des relations entre les différentes valeurs de g , et entre les différentes valeurs de A .¹²¹ Le Tableau 6 présente le cas des systèmes isotropes, axiaux et rhombiques.

Système	Tenseur g	Tenseur A
Isotrope	$g_x = g_y = g_z$	$A_x = A_y = A_z$
Axial	$g_x = g_y \neq g_z$	$A_x = A_y \neq A_z$
Rhombique	$g_x \neq g_y \neq g_z$	$A_x \neq A_y \neq A_z$

Tableau 6 : Effet de la symétrie sur les valeurs de g et A

✓ *Observation d'un signal de RPE*

Il est difficile d'observer un signal de RPE résolu sur un échantillon pur en poudre ou en solution à température ambiante. Dans de nombreux cas, il est nécessaire de diluer l'échantillon paramagnétique en l'incorporant dans une matrice diamagnétique isomorphe et de l'étudier à basse température (77 K). La dilution permet de réduire les interactions d'échange avec les ions paramagnétiques voisins. En effet, si l'échantillon n'est pas assez dilué, les raies individuelles correspondant à la structure hyperfine s'élargissent, se chevauchent pour finalement produire une large bande unique, rendant toute interprétation impossible.

b Etude RPE des salènes complexés par le vanadium

La présence d'un électron célibataire (configuration $[Ar]3d^1$), l'abondance naturelle du ^{51}V (99,76 %) ainsi que son haut spin nucléaire ($I = 7/2$) font des complexes de vanadyle des espèces particulièrement intéressantes pour une étude par spectroscopie de RPE.^{122, 123} Pour cela, des solutions de chacun des complexes **2a-d** dans le DMSO, à la concentration de 1 mM, ont été préparées. Les spectres ont été enregistrés en solution gelée à 77 K sur un spectromètre Brüker ESC 106 fonctionnant en bande X (~ 9,5 GHz), au Laboratoire de Catalyse et Environnement (EA 2598, Université du Littoral-Côte d'Opale, MREID, Dunkerque). Les spectres expérimentaux obtenus pour les complexes **2a-d** sont rassemblés Figure 30. Ils présentent tous une allure similaire, on peut donc en déduire que ces quatre complexes possèdent tous la même géométrie.

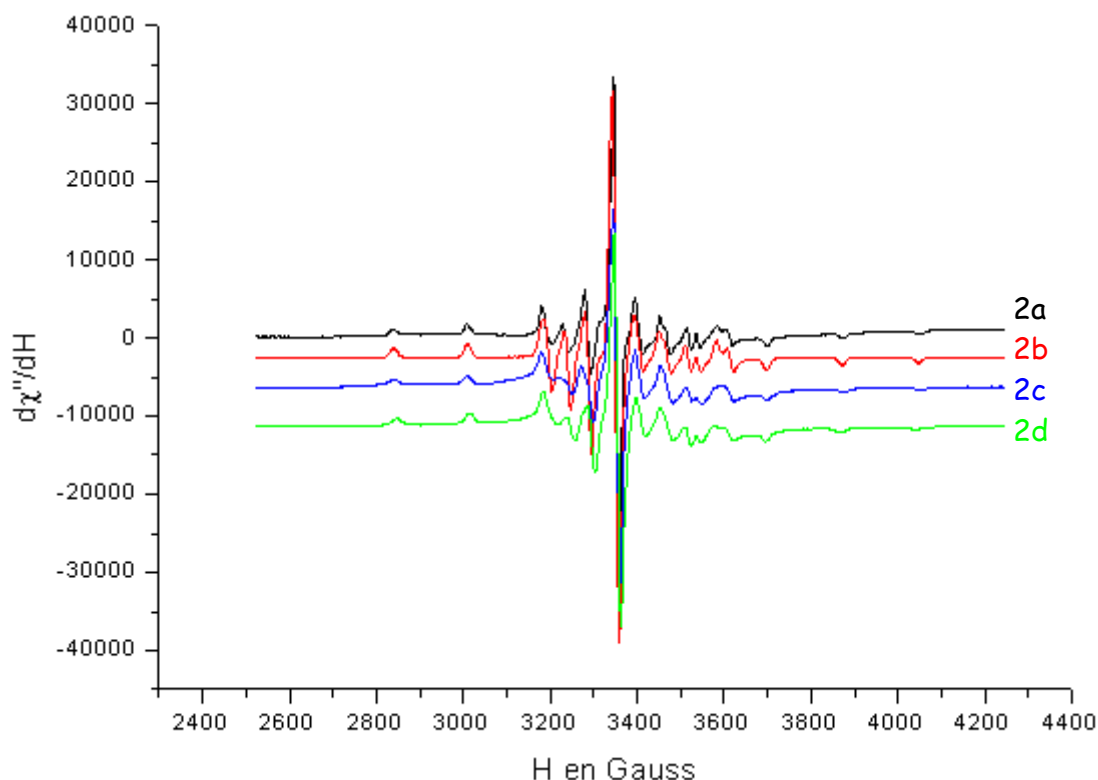


Figure 30 : Spectres expérimentaux des complexes **2a-d** (1mM dans DMSO, 77 K)

Un système isotrope conduirait à un spectre constitué de 8 raies, correspondant au couplage du spin électronique avec le spin nucléaire du vanadium, $I = 7/2$ ($(2I+1) = 8$ raies). Dans le cas d'un système axial, on aurait deux systèmes de raies : un système de 8 raies avec une valeur de $g_{//}$ (g_z) et la valeur de $A_{//}$ (A_z) correspondante, ainsi qu'un autre système de 8 raies avec une valeur de g_{\perp} ($g_x = g_y$) et A_{\perp} ($A_x = A_y$). Enfin, pour un système rhombique, trois valeurs différentes seraient obtenues pour les paramètres g et A .

Or, le spectre calculé du complexe **2a**, simulé sur le logiciel Brüker SIMFONIA, (Figure 31) donne les paramètres g et A présentés dans le Tableau 7. La meilleure corrélation a été obtenue pour des valeurs de $g_x \neq g_y$ et $A_x \neq A_y$: il s'agirait donc de systèmes rhombiques. Cependant, il faut noter que nous n'avons pas de moyen direct d'assigner un élément tensoriel donné à une direction particulière. Pour cela, une étude détaillée de cristaux par RX s'avèrerait nécessaire. Des valeurs identiques ont été retrouvées pour les trois dérivés hydroxylés **2b-d** indiquant qu'il n'y a pas d'influence des groupements hydroxyle sur la géométrie du complexe. L'examen des valeurs des paramètres de RPE obtenus permettent de proposer une géométrie de type pyramide à base carrée pour ce type de complexe.¹²⁴

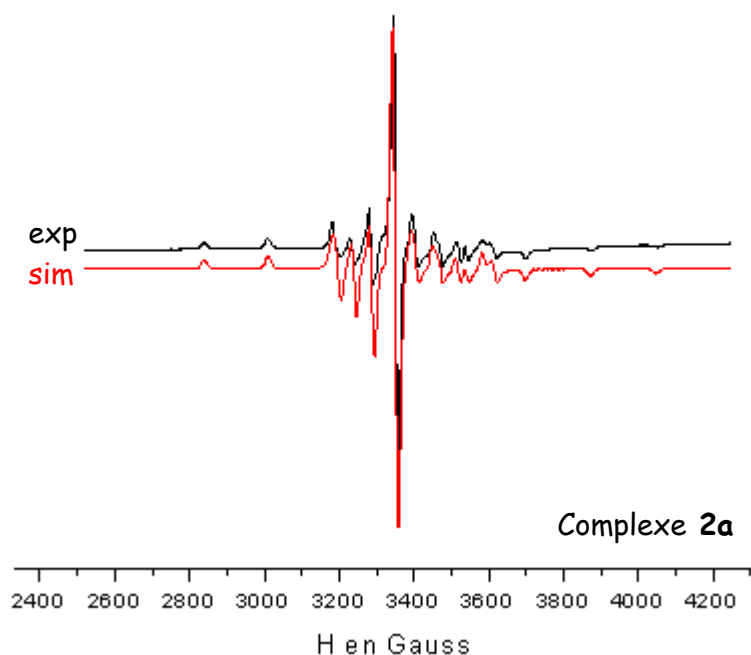


Figure 31 : Spectre expérimental (exp) et simulé (sim) du complexe **2a**
(1mM DMSO, 77 K)

	2a-d	VOSO_4
g_z	1,9587	1,9340
g_x ou g_y	1,9750	1,9755
g_y ou g_x	1,9840	1,9770
A_z (G)	171,7	199
A_x ou A_y (G)	60	70,5
A_y ou A_x (G)	53	74,5

Tableau 7 : Paramètres de RPE déterminés par simulation

Le sulfate de vanadyle a également été étudié par RPE pour comparaison. Le spectre du sel en solution dans un mélange DMSO/H₂O 90/10, enregistré à 77 K, est représenté Figure 32. Les constantes spectrales calculées par simulation (Tableau 7) diffèrent de celles obtenues pour les composés **2a-d**. Les paramètres de RPE de l'ion vanadyle en solution gelée ont déjà été décrits précédemment par Albanese et Chasteen.¹²⁵ Le spectre avait été enregistré dans l'eau, en présence de 50 % de glycérine, et les paramètres obtenus pour l'ion $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ étaient les suivants : $g_{//} = 1,933 \pm 0,001$; $g_{\perp} = 1,978 \pm 0,002$; $A_{//} = (182,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ (202,1 G) ; $A_{\perp} = (70,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ (78,2 G). Ces valeurs sont en accord avec celles reportées dans le Tableau 7. Cependant, il est important de noter que $\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5^{2+}$ présente en

théorie une symétrie axiale et ne devrait donc pas exhiber d'anisotropie dans le plan (x, y) . Pourtant, afin d'obtenir une bonne adéquation entre le spectre expérimental et le spectre simulé, une légère anisotropie a été considérée. La différence entre les valeurs de g_x et g_y ($\Delta g \approx 0,002$) pourrait s'expliquer par des effets de matrice dus à la solution gelée.

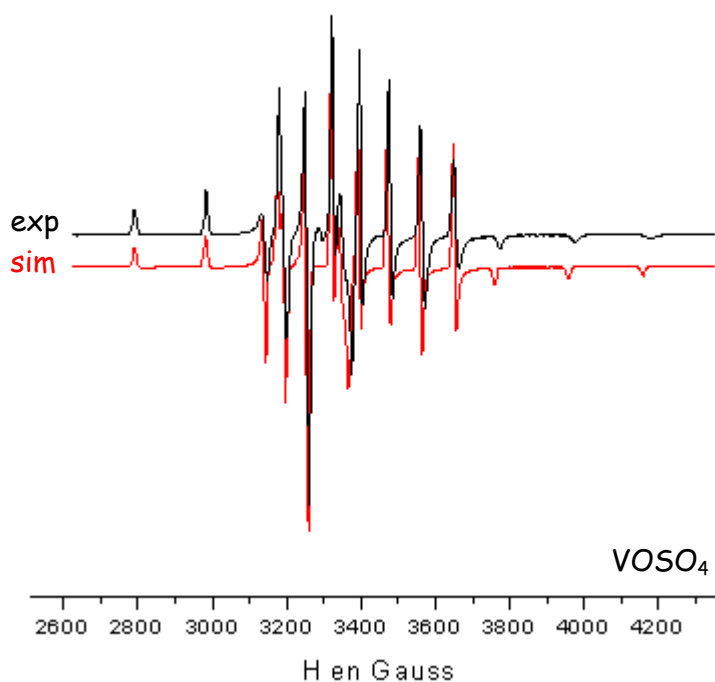


Figure 32 : Spectre expérimental (exp) et simulé (sim) de VOSO_4 (1mM DMSO/ H_2O 90/10, 77 K)

C. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES SALENES A VANADIUM

Les tests biochimiques (étude de l'interaction avec l'ADN et de l'activité nucléasique potentielles) ont été effectués au laboratoire de pharmacologie antitumorale de l'unité INSERM U524, à l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille (IRCL).

I. ETUDE DE LA LIAISON A L'ADN

Deux techniques ont été utilisées pour étudier les interactions des salènes complexés au vanadium **2a-d** avec l'ADN : la spectroscopie d'absorption UV-Visible ainsi que la technique de dénaturation thermique de l'ADN.

1. Etude par spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les complexes **2a-d** et l'ADN possèdent des bandes d'absorption électronique différentes. Lorsqu'un ligand est lié à l'ADN, celui-ci voit son spectre perturbé. Il s'ensuit alors un déplacement des bandes d'absorption vers les grandes ou vers les faibles longueurs d'onde (effet *batho-* ou *hypsochrome*) ainsi qu'une augmentation ou une diminution de l'intensité d'absorption (effet *hyper-* ou *hypochrome*).

Dans un premier temps, on enregistre le spectre du complexe seul. Quel que soit le composé **2a-d**, on observe une bande d'absorption dans la région 300-400 nm. Puis, on enregistre à nouveau le spectre du composé en présence d'ADN de thymus de veau. Cependant, on ne note aucune perturbation du spectre du complexe induite par l'ajout d'ADN, et ce pour les quatre composés **2a-d**. Ces résultats suggèrent donc qu'il y a peu ou pas d'interaction des salènes complexés au vanadium avec l'ADN.

2. Etude par dénaturation thermique de l'ADN

Des mesures de température de fusion de l'ADN (T_m , "melting Temperature") ont également été effectuées. La technique de dénaturation thermique permet en effet de déterminer la "température de fusion" d'un ADN, qui représente la température à laquelle 50 % de l'ADN est présent sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin.

Les courbes de dénaturation (ou de fusion) de l'ADN sont obtenues en enregistrant l'évolution de l'absorbance à 260 nm d'une solution d'ADN en fonction de la

température. L'augmentation de température induit un désappariement des bases de l'ADN (destruction des ponts hydrogène entre les paires de bases), entraînant une augmentation de l'absorbance (hyperchromicité). La température de demi-transition (ou température de fusion de l'ADN, T_m) correspond à la température à laquelle 50 % de l'ADN se trouve dénaturé, c'est-à-dire au point d'inflexion de la sigmoïde de transition hyperchrome. Elle correspond donc au maximum de la dérivée première de la courbe représentant l'absorbance en fonction de la température. Cette température de fusion dépend de la composition de l'ADN considéré. Les séquences riches en paires A-T, possédant seulement 2 ponts hydrogène par paire de bases, sont plus facilement dénaturables que les séquences riches en paires G-C, qui possèdent 3 ponts hydrogène par paire de bases. Ainsi, plus l'ADN contient un pourcentage important de paires de bases G-C, plus sa stabilité thermique sera élevée. Par ailleurs, comme la température de fusion dépend également des conditions expérimentales, il est important de travailler en milieu tamponné. Les mesures sont donc effectuées dans un tampon BPE (Bis Phosphate EDTA, pH = 7,1).

La comparaison des T_m obtenues pour un type d'ADN en absence et en présence des composés **2a-d** nous permet d'apprécier leur affinité pour cet ADN. En effet, l'interaction de substances avec l'ADN (intercalants ou ligands du petit sillon) entraîne une stabilisation de la double hélice d'ADN vis-à-vis de la dénaturation thermique. Ainsi, la différence, ΔT_m , entre la température de fusion de l'ADN complexé au ligand et celle de l'ADN seul caractérise le pouvoir de stabilisation du ligand étudié :

$$\Delta T_m = T_m^{(\text{complexe ligand-ADN})} - T_m^{(\text{ADN seul})}$$

Par ailleurs, les valeurs de ΔT_m obtenues sur des ADN de compositions variables permettent d'estimer le degré de sélectivité globale du ligand pour certains ADN. C'est pourquoi deux séries d'expériences ont été menées, en utilisant deux types d'ADN : de l'ADN de thymus de veau ($T_m \approx 64^\circ\text{C}$) d'une part, et un polynucléotide poly(dA-dT) ($T_m \approx 44^\circ\text{C}$) d'autre part. L'ensemble des résultats (valeurs de T_m en $^\circ\text{C}$) figure dans le Tableau 8.

	ADN seul	+ 2a	+ 2b (o)	+ 2c (m)	+ 2d (p)
ADN de thymus de veau	63,6	64,4	63,6	64,4	65,3
Poly(dA-dT)	44,2	44,2	44,2	43,2	43,2

Tableau 8 : Valeurs de T_m ($^\circ\text{C}$)

On constate que les valeurs de ΔT_m obtenues, quel que soit le composé testé, sont très faibles : $|\Delta T_m| < 2^\circ\text{C}$. Ces variations ne sont pas significatives d'interaction des composés avec l'ADN, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment par spectroscopie d'absorption UV-Visible.

II. ÉTUDE DE COUPURE DE PLASMIDE

L'ADN utilisé pour tester l'activité nucléasique potentielle des complexes **2a-d** est un plasmide bactérien, c'est-à-dire un ADN circulaire superenroulé. L'activité nucléasique est analysée en suivant la conversion de cet ADN plasmidique superenroulé (forme I, *Supercoiled*, *Sc*) en ADN circulaire relâché (forme II, *Nicked*, *Nck*), par coupure simple brin, et en ADN linéaire (forme III, *Linear*, *Lin*), par coupure double brin, ou par accumulation de coupures simple brin (Figure 33).

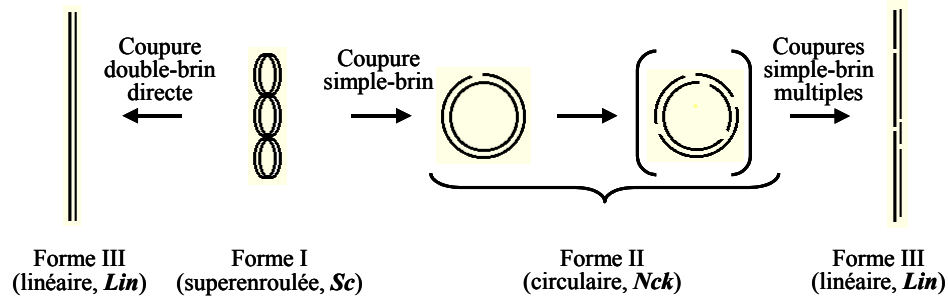


Figure 33 : Coupure du plasmide

L'identification, sur gel d'électrophorèse, de ces différentes formes de l'ADN est fonction de leur taille et de leur volume : la forme circulaire superenroulée migre le plus loin, la forme circulaire relâchée le moins loin et l'ADN linéaire en position intermédiaire (Figure 34).

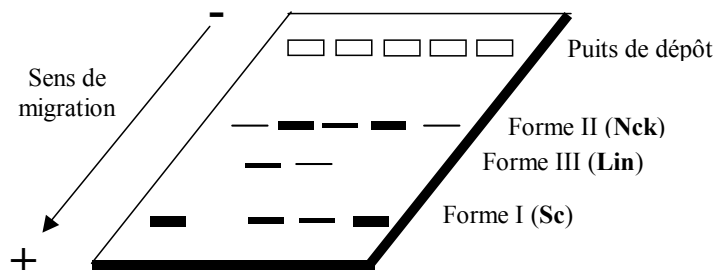


Figure 34 : Identification par électrophorèse des 3 formes du plasmide

1. Etude de l'activité nucléasique en absence d'agent activateur

Les résultats obtenus pour deux séries d'expériences (50 μM , incubation une heure à 37°C ou une nuit à température ambiante) ont montré qu'aucun des composés **2a-d** ne présente d'activité nucléasique dans les conditions testées en absence d'agent activateur. En effet, dans tous les cas, les proportions de formes I et II de l'ADN (forme superenroulée et forme relâchée) sont identiques à celles des contrôles (ADN seul). Contrairement aux mêmes salènes à cuivre ou à fer, les salènes à vanadium **2a-d** ne constituent donc pas des nucléases auto-activées.

Or, le vanadium, au degré d'oxydation (IV) dans les complexes synthétisés, peut à la fois être réduit en vanadium (III) ou oxydé en vanadium (V). De nouveaux tests de coupure ont donc été effectués dans deux conditions : présence d'un agent réducteur ou bien oxydant.

2. Etude de l'activité nucléasique en présence d'un agent réducteur

En présence d'acide 3-mercaptopropionique (MPA), les quatre complexes **2a-d** induisent des coupures monobrins de l'ADN superenroulé en ADN relâché, après incubation pendant 20 h à température ambiante (Figure 35). Pour ces composés, on observe en effet une augmentation de la forme II (relâchée) au détriment de la forme superenroulée I de l'ADN. Le complexe **2d** est le plus efficace puisque l'on observe la forme III (linéaire) de l'ADN, par accumulation de coupures monobrins. Des contrôles ont été effectués afin de déterminer l'activité nucléasique potentielle intrinsèque du sulfate de vanadyle ainsi que celle des ligands **1a-d** en présence de MPA. La capacité de coupure de l'ADN de ces composés dans ces conditions s'avère très faible, voire inexistante.

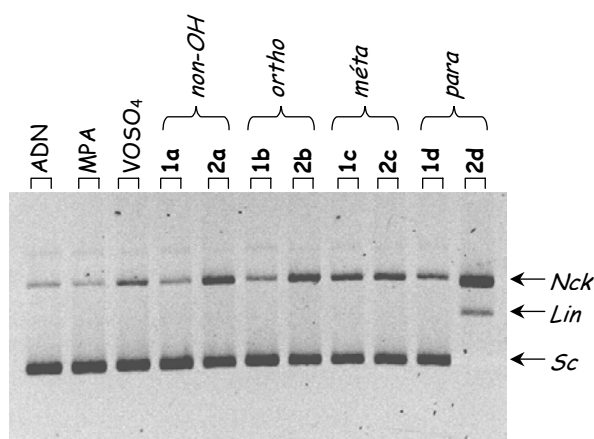


Figure 35 : Coupure de plasmide en présence de MPA

3. Etude de l'activité nucléasique en présence d'un agent oxydant

a Activation par l'Oxone®

Le composé donneur d'oxygène utilisé ici est l'hydrogénopersulfate de potassium, commercialisé sous forme d'un mélange stable $2 \text{KHSO}_5, \text{K}_2\text{SO}_4, \text{KHSO}_4$ (Oxone®). Dans ce cas, l'activité de coupure de plasmide s'est révélée beaucoup plus efficace qu'en présence de l'agent réducteur pour les quatre composés testés **2a-d**, après 18 h d'incubation à température ambiante (Figure 36). En effet, dans chaque cas, la forme superenroulée de l'ADN est presque totalement convertie en formes relâchée et linéaire. L'isomère *para* **2d** reste ici encore le composé le plus actif. Il est toutefois important de noter que les ligands **1a-d** présentent une activité nucléasique non négligeable en présence d'Oxone®, même si celle-ci reste inférieure à celle des complexes correspondants. Le sulfate de vanadyle a également été testé en présence de KHSO_5 pour contrôle et son activité de coupure est également bien moins importante que celle des différents complexes **2a-d**. L'efficacité de la réaction avec l'ADN augmente avec la concentration en agent activateur (150 ou 200 μM) ainsi qu'avec celle des complexes (10, 20, 50 μM) (résultats non présentés).

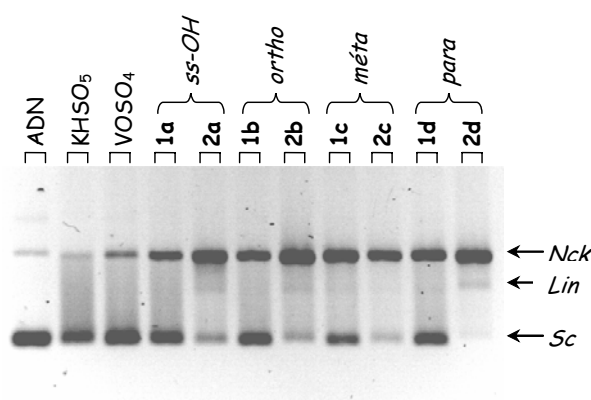


Figure 36 : Coupure de plasmide en présence d'Oxone®

b Activation par l'eau oxygénée

De nombreuses publications évoquent le clivage de l'ADN par divers complexes de vanadyle en présence d'eau oxygénée. Les différents auteurs expliquent dans ce cas la coupure par un mécanisme de type Fenton (A.II.2. page 60). Il a donc paru intéressant d'étudier le comportement de nos complexes **2a-d** en présence d'eau oxygénée, et de le comparer à celui observé en présence d'Oxone®. Chacun des quatre complexes, ainsi que

le sulfate de vanadyle, a donc été testé à deux concentrations (10 et 50 μM) en présence d'un excès d' H_2O_2 (2 mM) et incubé 1 heure à 37°C.

Les résultats obtenus indiquent que seul le système sulfate de vanadyle - H_2O_2 induit la coupure du plasmide (Figure 37). L'effet est d'ailleurs dépendant de la concentration en VO_2SO_4 , puisque la proportion de forme relâchée (II) de l'ADN augmente avec la concentration. En revanche, aucun des complexes étudiés n'induit de coupure d'ADN en présence d'eau oxygénée dans ces conditions.

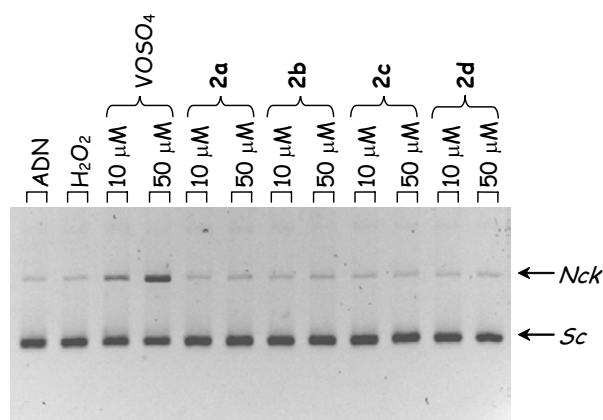


Figure 37 : Coupure de plasmide en présence d'eau oxygénée

4. Conclusions

La Figure 38 récapitule les résultats décrits ci-dessus. Outre les trois contrôles à chaque extrémité (ADN seul, KHSO_5 et MPA), elle présente les activités du sulfate de vanadyle, d'un des ligands (1d, *para*) ainsi que des quatre complexes 2a-d respectivement traités en absence d'agent activateur, en présence d'Oxone® et en présence de MPA. Les produits ont été testés à une concentration finale de 50 μM , avec les agents activateurs en excès (200 μM), dans un tampon Tris-NaCl (1 mM), et incubés une nuit à température ambiante.

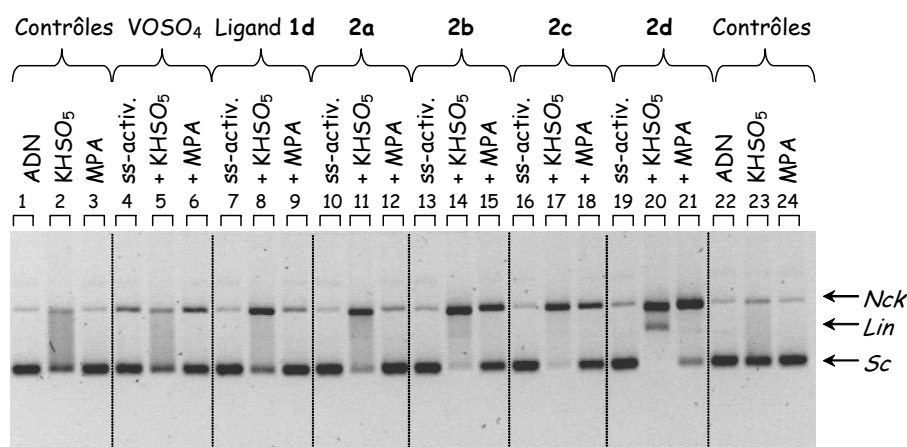


Figure 38 : Récapitulatif de la coupure de plasmide

Les complexes **2a-d** sont incapables d'induire de coupure du plasmide en absence d'agent activateur extérieur (lignes 10, 13, 16, 19). Ceux-ci ne constituent donc pas des nucléases auto-activées.

En revanche, en présence de MPA, ils sont capables de couper l'ADN, notamment les dérivés polyhydroxylés (lignes 15, 18, 21), dans l'ordre **2d** (deux hydroxyle en position *para*, système hydroquinone) > **2b** (deux hydroxyle en position *ortho*, système catéchol) > **2c**. Une activité de coupure très faible est détectée pour le sulfate de vanadyle dans ces conditions, et aucune activité pour le ligand **1d**.

C'est l'activation par l'Oxone® (lignes 11, 14, 17, 20) qui semble la plus efficace. En effet, pour chaque complexe, l'ADN superenroulé est quasiment totalement transformé en ADN relâché, et on observe même l'apparition de la forme linéaire, par accumulations de coupures monobrins, surtout pour le composé **2d**. Cependant, on détecte déjà une activité de coupure loin d'être négligeable pour le ligand **1d** utilisé pour la formation de ce complexe (ligne 8), ainsi que pour le sulfate de vanadyle (ligne 5). L'activité des complexes est toutefois bien plus importante comparée à celle des composés pris isolément. Il faut également noter que la présence de KHSO₅ semble induire des traînées sur le gel, correspondant à la digestion du plasmide qui résulte en une diffusion dans le gel. L'effet est notamment assez marqué pour un des deux contrôles (ligne 2). L'autre contrôle (ligne 23) est plus correct. L'effet observé pour le sulfate de vanadyle risque donc plutôt d'être dû à cet artéfact.

Ainsi, les complexes étudiés, et notamment celui possédant un système hydroquinonique (**2d**), présentent un intérêt pour leur capacité à induire des coupures d'ADN aussi bien en présence d'un agent réducteur qu'en présence d'un agent oxydant. Les mécanismes par lesquels la coupure s'effectue restent à élucider.

III. ÉTUDE DE COUPURE D'UN FRAGMENT D'ADN MARQUÉ AU ³²P

Une autre technique permet d'évaluer l'activité nucléasique des composés testés : il s'agit de la coupure de fragments d'ADN de longueurs définies marqués au ³²P. Ce test a été effectué avec un fragment de restriction de l'ADN de 117 paires de base marqué à son extrémité 3'. Ce fragment a été préparé à partir d'un ADN de plasmide pBS digéré par les enzymes de restriction *EcoRI* et *PvuII*. La séquence en paires de bases de ce fragment étant connue, cette technique a pour intérêt de déterminer si les coupures observées se font de manière spécifique ou non. Sa résolution permet de discerner les différents fragments d'ADN formés à une paire de base près.

Les produits à tester (50 μ M) sont incubés avec l'ADN marqué, en présence de MPA ou de KHSO_5 (200 μ M). Après 20 h d'incubation à température ambiante, les échantillons sont précipités par l'éthanol absolu. La moitié d'entre eux est soumise à un traitement à la pipéridine. L'intégrité de l'ADN est alors analysée par électrophorèse sur gel d'acrylamide, en conditions dénaturantes.

Les résultats obtenus (Figure 39) indiquent que, avec ou sans traitement à la pipéridine, le clivage en milieu réducteur est beaucoup moins efficace qu'en milieu oxydant. Les coupures sont en effet faiblement marquées en présence de MPA et sans traitement à la pipéridine (lignes 2 à 8). On distingue toutefois un profil de coupures aléatoires (coupures non spécifiques le long du fragment d'ADN marqué), surtout pour le complexe **2d**, le plus actif (ligne 8). Le traitement alcalin (lignes 18 à 24) permet de révéler les coupures de façon plus intense (pour le composé **2d** par exemple, comparaison des lignes 8 et 24).

En revanche, en présence de KHSO_5 , les coupures, qui ont lieu essentiellement au niveau des guanines, bases les plus facilement oxydables (le témoin "G", ligne 16, permet de repérer les guanines le long du fragment d'ADN), sont beaucoup plus marquées, même en absence de traitement à la pipéridine (lignes 9 à 15). Les contrôles (KHSO_5 seul, $\text{VOSO}_4 + \text{KHSO}_5$, Ligand para **1d** + KHSO_5 , lignes 9 à 11) témoignent déjà d'une activité nucléasique non négligeable mais celle-ci est amplifiée en présence du composé **2d** (ligne 15). Le traitement alcalin permet encore simplement dans ce cas d'obtenir un gel de séquence mieux résolu, les coupures étant un peu plus marquées (lignes 25 à 31).

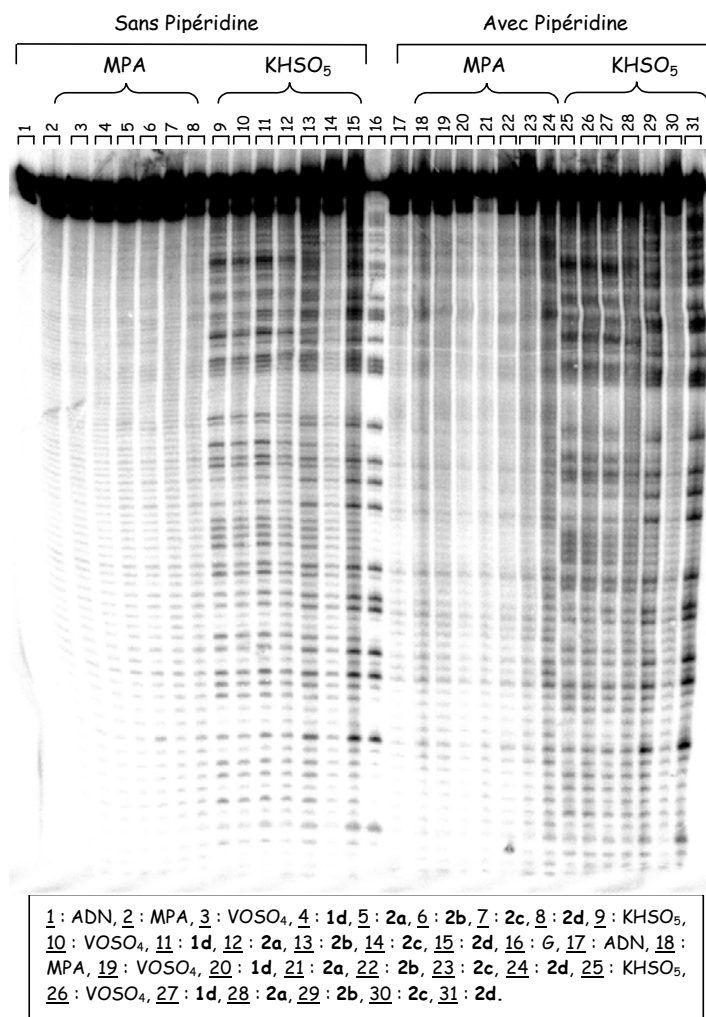


Figure 39 : Coupure d'un fragment d'ADN marqué (117-3')

Finalement, on constate ici encore que, dans les deux cas (milieu réducteur ou oxydant), c'est le complexe possédant le système hydroquinonique qui semble le plus actif. Cette étude a également permis de déterminer que les coupures sont plus marquées au niveau des guanines, qui sont les bases les plus facilement oxydables. Le traitement alcalin n'est pas indispensable, il permet seulement d'accentuer les coupures déjà observées en son absence.

Les coupures à guanine sont généralement significatives d'une oxydation radicalaire de la base : Guanine + Agent oxydant → [Guanine][•]. Le traitement alcalin permet de favoriser la coupure de la base et donc de mettre en évidence de manière plus significative son oxydation.

D. ELUCIDATION DES MECANISMES DE COUPURE

I. RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

Afin d'élucider les mécanismes de coupure de l'ADN et de déterminer les intermédiaires réactionnels intervenant dans ces mécanismes, des expériences de RPE ont été effectuées. L'étude de l'activité nucléasique a révélé que le composé *para 2d* est le plus actif, que ce soit en présence d'agent oxydant ou d'agent réducteur. C'est pourquoi nous avons choisi de réaliser l'étude de RPE avec ce composé.

1. Etude par RPE de la réaction du complexe avec l'Oxone®

L'activation par l'Oxone® donne les meilleurs résultats de coupure. Nous avons donc voulu étudier l'évolution du spectre du complexe **2d** en présence d'un excès de KHSO_5 .

a. Spectres à température ambiante

La Figure 40 (haut) montre le spectre du complexe **2d** enregistré à température ambiante, à la concentration de 1 mM, dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ 80/20. Il s'agit d'un signal constitué de 8 raies attribué à l'espèce $\text{V}(\text{IV})$. En effet, on observe la structure hyperfine due au couplage du spin électronique avec le spin nucléaire du vanadium, $I = 7/2$ ($(2I+1) = 8$ raies). On constate que les 8 raies de la structure hyperfine ne sont pas équivalentes en intensité, indiquant que le signal n'est pas isotrope. Des signaux similaires ont été obtenus par Wilson et Kivelson, pour l'acétylacétonate de vanadyle dans le toluène et la cause de l'asymétrie observée a été attribuée à la température trop basse.¹²⁶ En effet, les auteurs ont démontré que le spectre de RPE est plus symétrique à température élevée (~ 384 K) qu'à basse température (~ 297 K). Selon eux, à plus haute température, les mouvements rotationnels en solution sont plus complets et les paramètres de RPE (g et A) sont mieux moyennés, conduisant alors à un spectre plus isotrope.

Afin de vérifier que le complexe est stable en solution, des spectres sont enregistrés au cours du temps. Aucune modification n'est observée, si ce n'est une légère baisse d'intensité du signal au bout de 24 h. L'ion vanadyle s'oxyde en effet en solution aqueuse, mais à une vitesse assez lente pour que cette oxydation puisse généralement être considérée comme négligeable.¹²³ Cette étude permet de déterminer $g_{\text{iso}} = 1,9763$ et $A_{\text{iso}} = 92,3$ G (Tableau 9 page 90).

La réaction du complexe **2d** avec l'Oxone® a ensuite été suivie par RPE. Afin de respecter le rapport des concentrations entre l'oxydant et le complexe utilisé dans les études de coupure d'ADN, quatre équivalents d'Oxone® sont ajoutés. Dès l'ajout de KHSO_5 , un nouveau signal apparaît (Figure 40) et le spectre de RPE correspond à la superposition de deux signaux différents. L'intensité du signal du complexe **2d** diminue rapidement pour disparaître complètement, alors que l'intensité du nouveau signal augmente. La nouvelle espèce possède une constante de couplage hyperfin plus grande : $A_{\text{iso}} = 114,3 \text{ G}$ au lieu de $92,3 \text{ G}$ et $g_{\text{iso}} = 1,9656$ (Tableau 9). Son apparition est très rapide et elle semble stable, sur une période de 24 h.

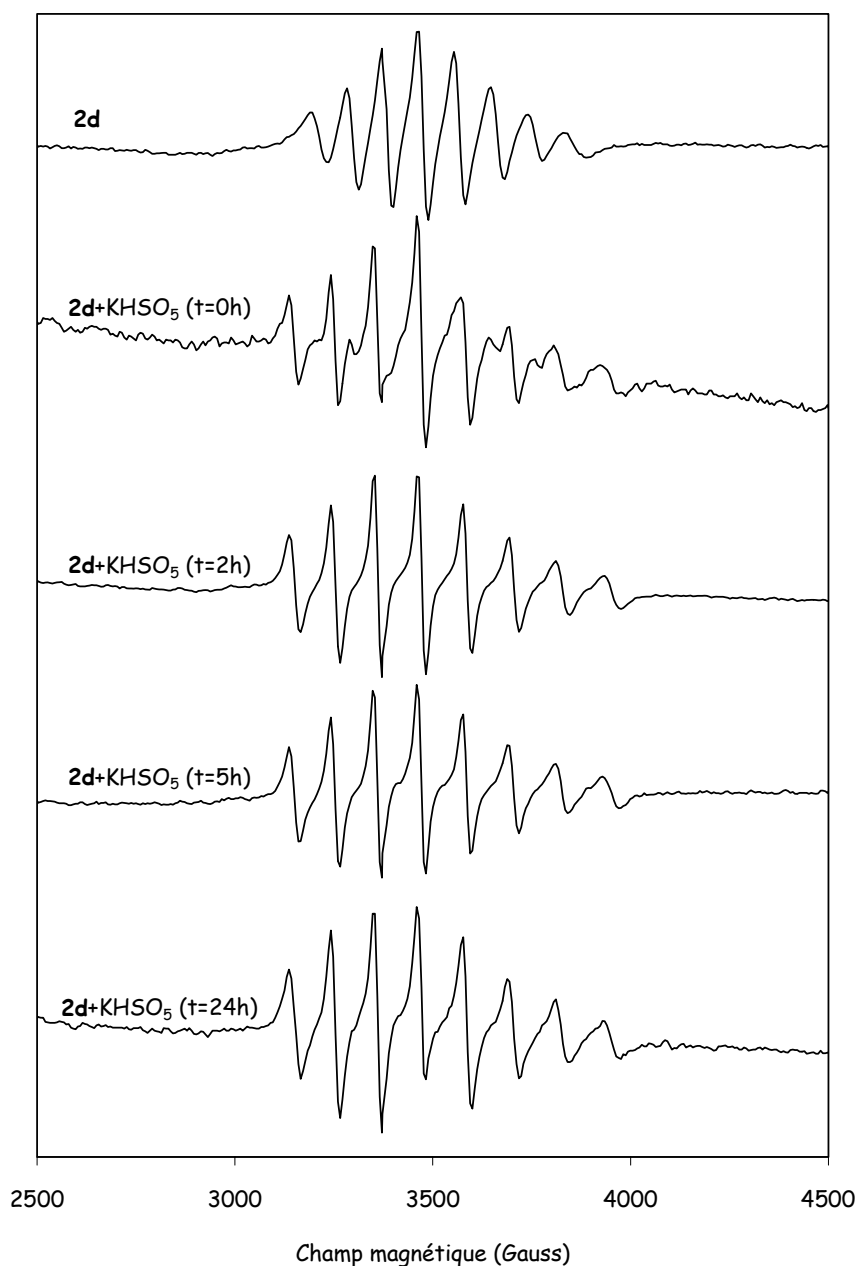


Figure 40 : Evolution du spectre de RPE du complexe **2d**, à 293 K, par réaction avec KHSO_5

b Spectres en solution gelée à 77 K

Afin de caractériser les deux espèces décrites ci-dessus plus précisément, la même étude a été effectuée en solution gelée, les échantillons étant refroidis dans l'azote liquide à 77 K. Le spectre du complexe seul, à la concentration de 1 mM dans un mélange DMSO/H₂O 90/10 a donc été enregistré (Figure 41, haut). Les trois composantes du tenseur g ainsi que les trois composantes de la constante de couplage hyperfin A ont été déterminées à partir du spectre et confirmées par simulation (on retrouve les valeurs de g et A décrites précédemment, Tableau 7 page 73 et Tableau 9).

Lors de l'ajout d'Oxone®, un second signal apparaît (Figure 41), correspondant à la nouvelle espèce de vanadium (IV) observée à température ambiante. La contribution de chaque signal dans le spectre de RPE peut être estimée. Ainsi, le spectre obtenu une heure après l'addition de KHSO₅ peut être considéré comme la superposition de 50 % du signal du complexe **2d** et de 50 % de celui de la nouvelle espèce. Après 24 h, le spectre est composé de 10 % du signal de **2d** et de 90 % de celui de la nouvelle espèce. Après 48 h de réaction, le signal de RPE relatif à **2d** a quasiment complètement disparu et seul le signal de la nouvelle espèce est observé (Figure 42).

Des résultats similaires ont déjà été décrits dans la littérature : Nakajima et ses collaborateurs¹⁰² ont étudié la réaction d'un salène (*N,N*-bis(3-méthoxysalicylidène)-(*R,R*)-1,2-cyclohexylènediamine) complexé par l'ion vanadyle avec un excès d'hydroperoxyde de cumène (hydroperoxyde de 1-méthyl-1-phényléthyle), dans le dichlorométhane à 25°C. Cette réaction a été suivie par RPE en solution gelée. Il s'avère que l'intensité du signal initial diminue progressivement et qu'un nouveau signal apparaît de façon concomitante, l'aspect du nouveau signal étant semblable à celui du signal original. Après 24 h, le milieu réactionnel est devenu inactif en RPE, ce qui indique que toutes les espèces de vanadium (IV) ont été oxydées en vanadium (V) (ce qui n'est pas le cas dans nos travaux). Les auteurs n'ont cependant pas réussi à isoler et identifier l'espèce intermédiaire.

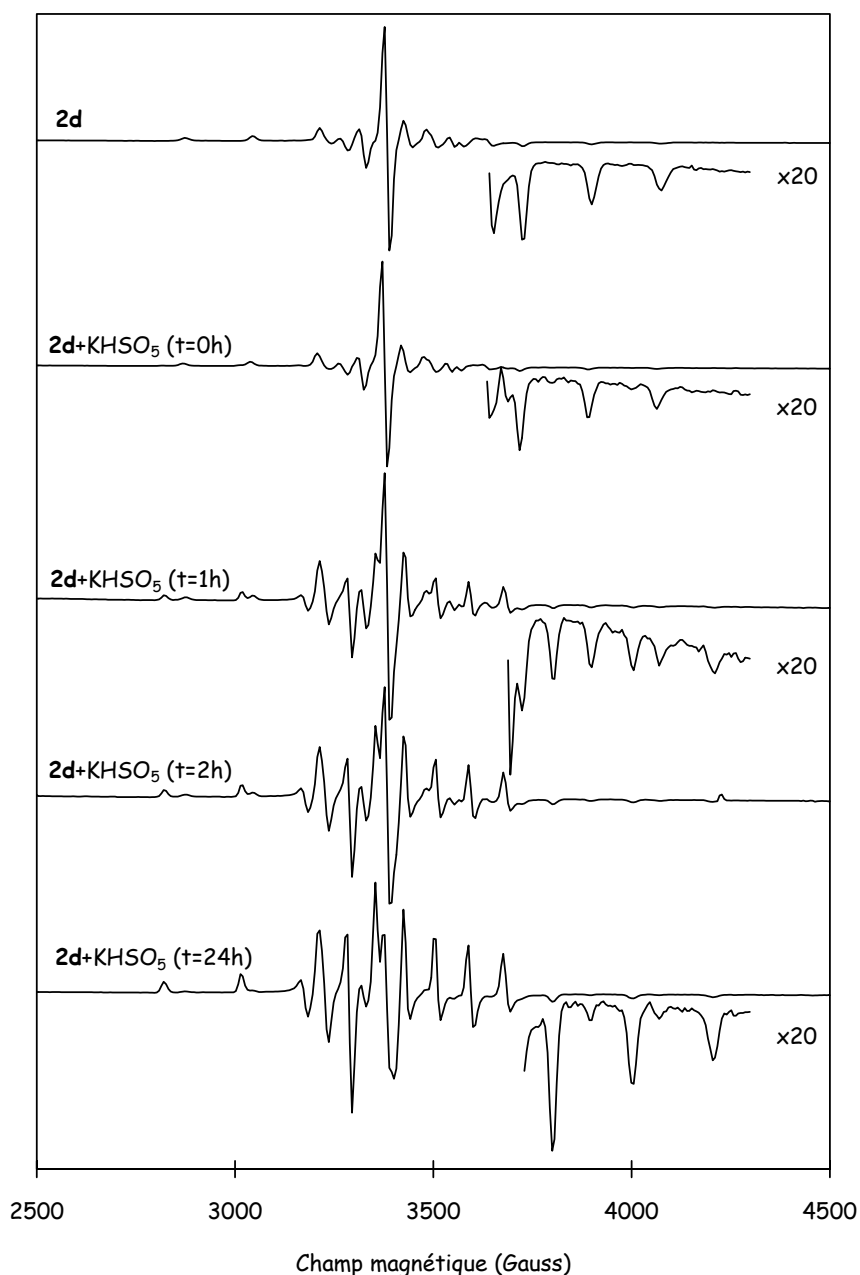


Figure 41 : Evolution du spectre de RPE du complexe **2d**, à 77 K, par réaction avec KHSO_5

Il faut noter que la même expérience a été réalisée pour le complexe **2a** ne possédant pas de groupement hydroxyle supplémentaire sur les cycles aromatiques, et que le même phénomène a été observé. En effet, on note l'apparition d'une nouvelle espèce, qui semble d'ailleurs correspondre à la même espèce que celle observée avec le composé **2d**. Cependant, dans ce cas, le phénomène semble plus lent car après 48 h les deux espèces sont toujours en mélange.

Comme une activité de coupure de l'ADN a également été détectée pour le sulfate de vanadyle, il a paru intéressant d'étudier l'évolution du spectre de $VOSO_4$ en présence de $KHSO_5$. En absence de $KHSO_5$, on retrouve le spectre décrit précédemment (Figure 42, bas, B.III.2.b page 74 et Tableau 9). La réaction de $VOSO_4$ avec $KHSO_5$ ne se traduit pas sur le spectre de RPE par l'apparition d'une nouvelle espèce, contrairement aux cas des complexes **2a** et **2d**. Les spectres en présence ou en absence d'oxydant sont identiques, mais leur intensité varie légèrement au cours du temps. Juste après l'ajout de l'oxydant, l'intensité du signal de vanadium (IV) diminue puis elle augmente à nouveau progressivement pour se stabiliser à l'intensité de départ (avant ajout d'oxydant). Ce résultat suggère donc la formation intermédiaire d'une espèce de vanadium à l'état d'oxydation V, muette en RPE car ne possédant plus d'électron célibataire, puis la régénération de l'espèce V(IV). Ceci est en accord avec le mécanisme proposé par Stemmler et Burrows⁸⁰ pour l'oxydation de l'ADN par le sulfate de vanadyle en présence de $KHSO_5$ (Schéma 5 page 59). Dans la première étape, l'ion vanadyle (IV) est oxydé en vanadium (V) et le radical sulfate est produit. La production radicalaire devient catalytique avec la seconde étape, dans laquelle le vanadium (V) réagit avec l'hydrogénopersulfate pour générer le radical monopersulfate et régénérer VO^{2+} . Pour confirmer ce mécanisme, il faudrait mener des études de piégeage de radicaux libres (spin-trapping) afin de détecter, par la formation d'adduits avec un spin trap, les radicaux $SO_4^{\cdot -}$ et $SO_5^{\cdot -}$ formés au cours des réactions décrites ci-dessus.

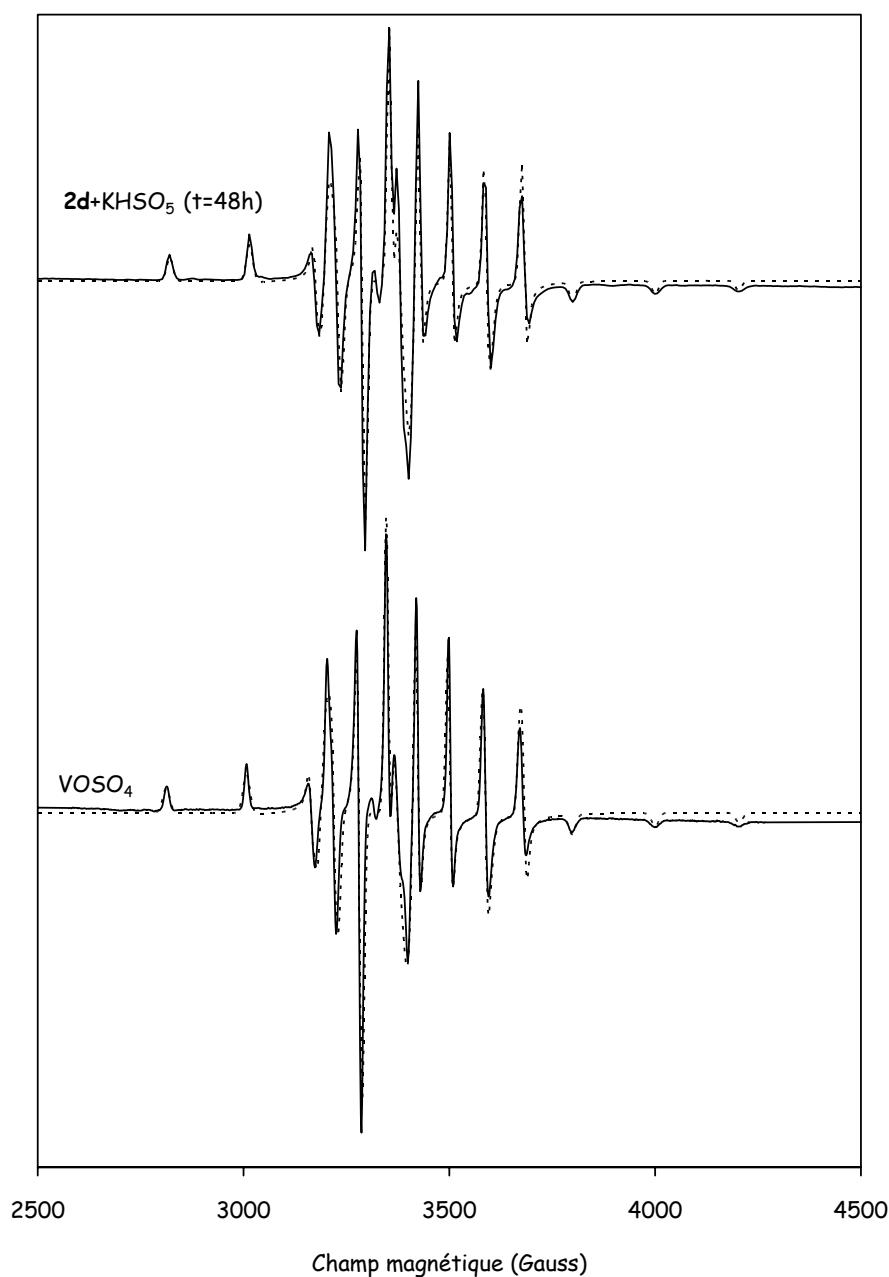


Figure 42 : Spectres de RPE expérimentaux (ligne continue) et calculés (ligne pointillée) du complexe **2d** après 48 h de réaction avec KHSO_5 (haut) et de VOSO_4 (bas)

Par ailleurs, la nouvelle espèce formée lors de la réaction de KHSO_5 avec les complexes de salène peut être attribuée sans ambiguïté au sulfate de vanadyle. En effet, le spectre obtenu après 48 h de réaction entre le complexe **2d** et KHSO_5 est fortement similaire à celui du sulfate de vanadyle (Figure 42). La meilleure corrélation obtenue par simulation du spectre expérimental pour la nouvelle espèce utilise des paramètres g et A proches de ceux obtenus pour VOSO_4 (Tableau 9).

Echantillon	g_x	g_y	g_z	g_{iso}	A_x	A_y	A_z	A_{iso}
2d (293 K)	---	---	---	1,9763	---	---	---	92,3
2d + KHSO ₅ (24 h, 293 K)	---	---	---	1,9656	---	---	---	114,3
2d (77 K)	1,9840	1,9750	1,9587	1,9726	53	60	171,7	94,9
2d + KHSO ₅ (48 h, 77 K)	1,9740	1,9720	1,9320	1,9593	73	70	197,5	113,5
VOSO ₄ (77 K)	1,9770	1,9755	1,9340	1,9621	74,5	70,5	199	114,6

Tableau 9 : Paramètres de RPE du complexe 2d avant et après réaction avec KHSO₅ (293 et 77 K) ainsi que du sulfate de vanadyle (77 K)

Il semble donc qu'au cours de la réaction, l'ion vanadyle VO²⁺ perd son ligand salénique pour reformer du VOSO₄ (les ions SO₄²⁻ proviendraient de l'Oxone®, mélange stable 2 KHSO₅, K₂SO₄, KHSO₄). Le mécanisme permettant de passer du complexe à VOSO₄ reste cependant à élucider. On peut supposer une modification du ligand (Schéma 9) puisque, au départ, le complexe est formé en mettant en présence le salène et VOSO₄.

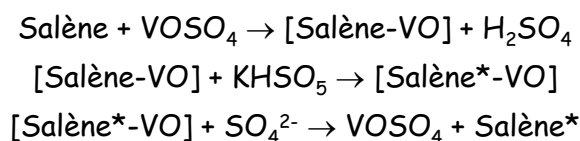


Schéma 9 : Formation du complexe de vanadyle puis réaction avec KHSO₅ (Salène* = Salène modifié)

2. Etude par RPE de la réaction du complexe avec l'eau oxygénée

L'effet de l'eau oxygénée sur le complexe 2d a également été étudié. L'expérience a été menée pour une concentration en H₂O₂ quatre fois plus importante que celle du complexe. On observe progressivement une baisse d'intensité du signal du vanadium (IV), très lente, sans apparition d'une nouvelle espèce, laissant présager l'oxydation de V(IV) en V(V), que l'on ne détecte plus par RPE, car il ne possède plus d'électron célibataire (système 3d⁰). Une augmentation de la concentration en H₂O₂ semble favoriser la formation de V(V), la diminution de l'intensité du signal semblant plus rapide. Ce résultat serait *a priori* compatible avec un mécanisme de type Fenton, dans lequel le vanadium (IV) serait oxydé en vanadium (V) tandis que l'eau oxygénée formerait un radical hydroxyle OH[•] et un ion hydroxyle OH⁻. Des expériences de spin-trapping permettraient de confirmer cette hypothèse par la détection de radicaux hydroxyle. Cependant, si ce mécanisme était vérifié, il serait en contradiction avec les

résultats obtenus en coupure de plasmide : aucune activité de coupure n'a pu être décelée pour les complexes **2a-d**, avec un rapport $H_2O_2/Complexé = 40$.

3. Etude par RPE de la réaction du complexe avec le MPA

En présence de l'agent réducteur, aucun changement n'a pu être détecté dans le spectre de RPE du complexe : on n'observe ni l'apparition d'une nouvelle espèce, ni de variation significative de l'intensité du signal initial.

II. SPIN-TRAPPING

La formation de radicaux libres peut être détectée en RPE si leur durée de vie est suffisamment longue. En revanche, la mise en évidence d'espèces radicalaires transitoires, de courte durée de vie, nécessite l'emploi de la technique de piégeage de radicaux libres ou "spin-trapping". Cette technique utilise la propriété de composés diamagnétiques, capables de capter des radicaux libres produits dans le milieu réactionnel, pour former un adduit paramagnétique stable et facilement détectable en RPE. Notre étude a été effectuée en utilisant le DMPO (5,5-diméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde, Figure 43) comme agent de spin-trapping. Selon le radical capté, l'adduit formé présente une structure et un spectre de RPE particuliers. Les caractéristiques des spectres des principaux adduits obtenus avec un agent piègeur donné sont connues et répertoriées dans la littérature, ce qui permet d'identifier rapidement les radicaux formés.

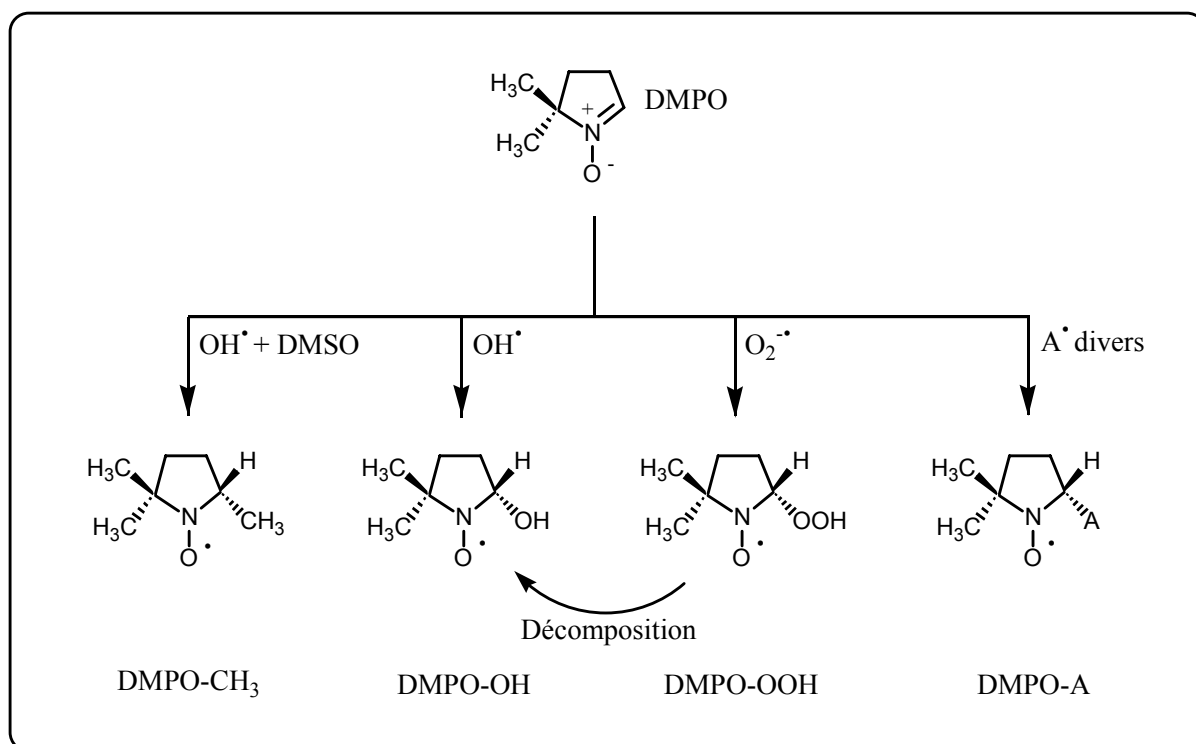


Figure 43 : Adduits entre le DMPO et divers radicaux

L'utilisation de cette technique a donc pour but la détection des espèces radicalaires éventuellement formées au cours des réactions avec les différents agents activateurs.

1. Expériences de spin-trapping en présence d'Oxone®

a Etude du complexe 2d

On essaie de détecter l'éventuelle formation de radicaux libres lors de la réaction du complexe *para* 2d avec l'Oxone®. La réaction de 2d (100 μM) avec l'Oxone® (400 μM) en présence de DMPO (9 mM), dans le tampon Tris-NaCl (1 mM), à température ambiante, n'a cependant pas permis de détecter de radical. Ce résultat serait en accord avec l'hypothèse d'un intermédiaire dans lequel le vanadium serait lié à un radical (tel que OH^\bullet ou $\text{SO}_4^{\bullet-}$), formant ainsi un "crypto-radical".

b Etude de VOSO_4

La réaction de VOSO_4 avec l'Oxone®, en revanche, donne des résultats différents. Dans les mêmes conditions, un signal correspondant à l'adduit DMPO-OH (signal de 4 raies, d'intensités relatives 1 : 2 : 2 : 1, $a_N = a_{H\beta} = 14,9 \text{ G}$) a été observé (Figure 44).

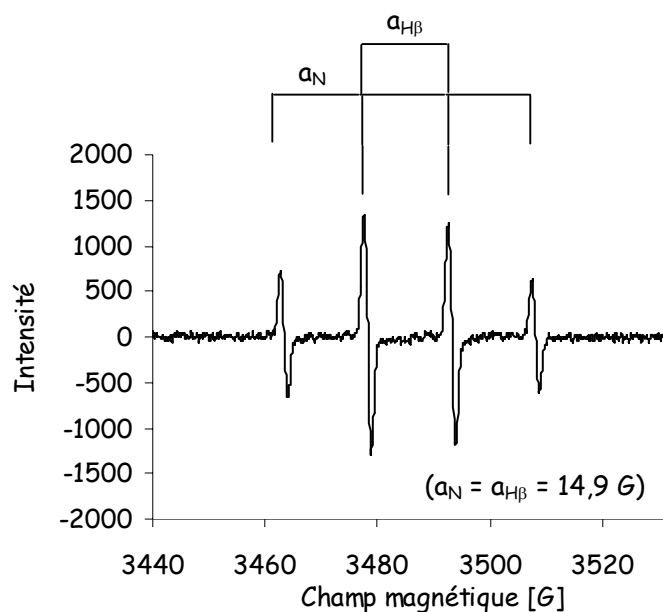


Figure 44 : Adduit DMPO-OH détecté lors de la réaction entre VO_2SO_4 et KHSO_5 en présence de DMPO

Ce signal n'est pas spécifique des radicaux hydroxyle, il peut en effet également être attribué au radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou au radical sulfate $\text{SO}_4^{\cdot-}$, car les adduits correspondant aux radicaux superoxyde et sulfate sont instables et se décomposent rapidement en DMPO-OH.^{127, 128} Le DMSO ($\text{CH}_3\text{-SO-CH}_3$) est fréquemment utilisé afin de déterminer l'origine de l'adduit DMPO-OH observé (génération à partir de radicaux hydroxyle plutôt qu'à partir d'une transformation d'autres adduits). En effet, lorsque du DMSO est présent dans le milieu, les radicaux hydroxyle peuvent réagir avec lui pour former des radicaux méthyle qui seront alors piégés par le DMPO. Il en résulte la formation de l'adduit DMPO- CH_3 qui présente un signal composé de 6 raies d'égale intensité ($a_N = 16 \text{ G}$, $a_{H\beta} = 23 \text{ G}$).¹²⁹ Or, le spectre figurant ici (Figure 44) a été enregistré en présence de DMSO. Comme on n'observe que l'adduit DMPO-OH et non DMPO- CH_3 , l'hypothèse de formation de radicaux hydroxyle peut être écartée et cela suggère plutôt une implication de radicaux superoxyde ou sulfate dans l'oxydation des guanines observée pour le sulfate de vanadyle.

c Etude du ligand para 1d

Il faut aussi noter que le même spectre a été obtenu par réaction du ligand **1d** avec l'Oxone®, le signal DMPO-OH étant dans ce cas environ cinq fois moins intense (Figure 45).

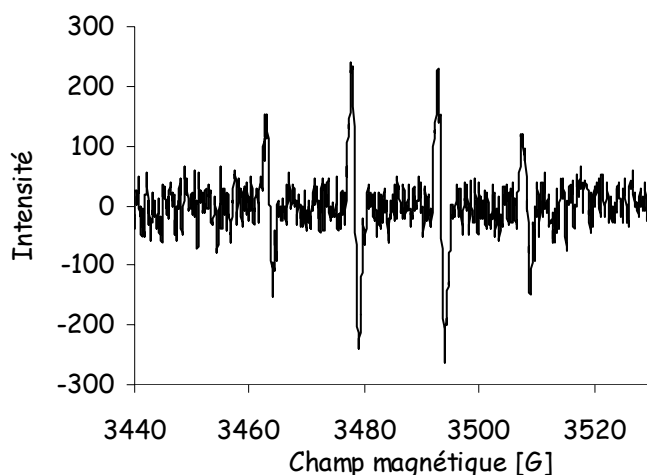


Figure 45 : Adduit DMPO-OH détecté lors de la réaction entre le ligand **1d** et KHSO_5 en présence de DMPO

2. Expériences de spin-trapping en présence d'eau oxygénée

a Etude du complexe 2d

L'effet de l'eau oxygénée sur le complexe est également testé. L'eau oxygénée est introduite à la concentration de 3,5 mM. Pour une concentration en complexe de 0,1 mM, c'est-à-dire pour un excès important d' H_2O_2 , aucun radical n'est détecté. Par contre, avec une concentration en complexe dix fois plus importante (1 mM) mais avec la même concentration en eau oxygénée, un signal composé de 6 raies d'égale intensité est détecté, correspondant à l'adduit DMPO- CH_3 ($a_N = 16 \text{ G}$, $a_{\text{H}\beta} = 23 \text{ G}$), que l'on observe lorsque l'on forme des radicaux hydroxyle en présence de DMSO (Figure 46).

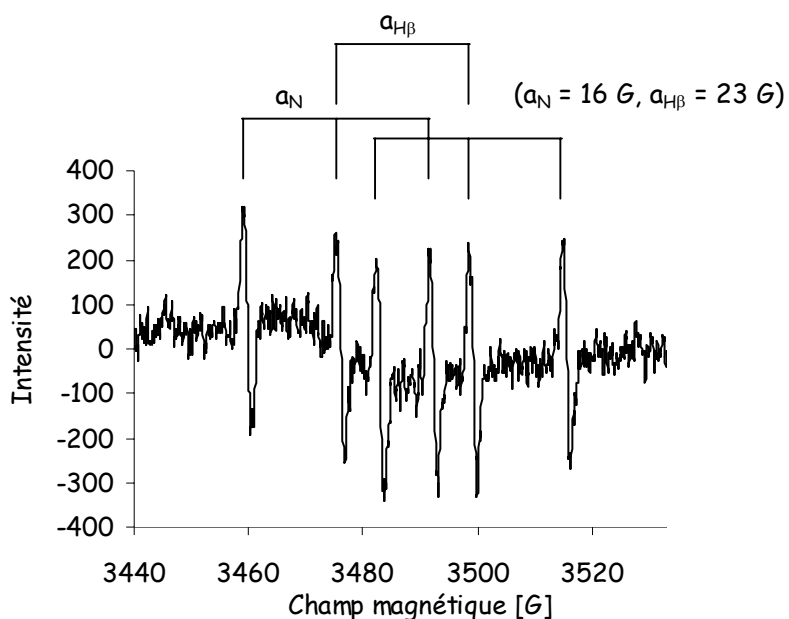


Figure 46 : Adduit DMPO-CH₃ détecté lors de la réaction entre le complexe **2d** et H₂O₂ en présence de DMPO

b Etude de VOSO₄

En présence d'H₂O₂ (3,5 mM), pour une concentration en sulfate de vanadyle de seulement 0,1 mM, un signal très intense, correspondant à l'adduit DMPO-OH est observé (en absence de DMSO), contrairement à la même expérience avec le complexe **2d** à la même concentration (Figure 47).

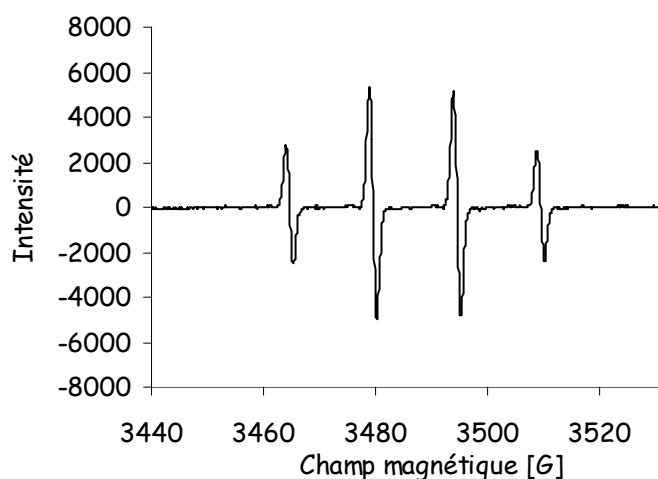


Figure 47 : Adduit DMPO-OH détecté lors de la réaction entre VOSO₄ et H₂O₂ en présence de DMPO

3. Expériences de spin-trapping en présence de MPA

Les expériences de spin-trapping pour le complexe **2d** en présence de MPA n'ont pas permis de détecter de radical, aucun adduit n'a été décelé.

III. DISCUSSION

1. Etude de l'activation par le MPA

Les études de RPE et de spin-trapping n'ont pas permis d'isoler d'intermédiaires réactionnels impliqués dans le mécanisme de coupure de l'ADN par les complexes en présence de l'agent réducteur. En effet, en RPE, le signal de vanadium (IV) du complexe **2d** semble stable dans le temps en présence de MPA et, en spin-trapping, aucune espèce radicalaire n'a été décelée.

2. Etude de l'activation par l'eau oxygénée

L'activité nucléasique observée après activation par H_2O_2 a déjà été étudiée intensivement dans la littérature, notamment pour divers complexes de vanadyle (A.II.2.a page 59 et suivantes). Les différents auteurs expliquent cette activité de coupure par un mécanisme de type Fenton ($V(IV) + H_2O_2 \rightarrow V(V) + OH^- + OH^\cdot$).

En ce qui nous concerne, les résultats obtenus en spin-trapping sont en adéquation avec ceux obtenus dans l'étude de coupure de plasmide, et en accord avec le mécanisme de type Fenton proposé dans la littérature. En effet, en coupure de plasmide, une activité nucléasique a pu être détectée pour le sulfate de vanadyle, alors que les quatre complexes **2a-d** se sont révélés inactifs. Dans des conditions similaires, un adduit DMPO-OH a été observé en spin-trapping lors de la réaction de $VOSO_4$ avec H_2O_2 mais aucun radical n'a pu être piégé pour le complexe **2d**. Cet adduit peut être attribué à la formation de radicaux hydroxyle selon le mécanisme décrit ci-dessus, et ces radicaux seraient responsables de la coupure de l'ADN.

En spin-trapping, une augmentation de la concentration en complexe **2d** a permis de détecter un adduit DMPO- CH_3 , signe de la production de radicaux hydroxyle en présence de DMSO. Cependant, ce signal est beaucoup moins intense que l'adduit DMPO-OH observé avec $VOSO_4$ à une concentration dix fois plus faible. Dans ces conditions, en RPE, on observe une baisse lente de l'intensité du signal de vanadium (IV), laissant présager la formation d'une espèce de vanadium (V) muette en RPE (système $3d^0$). L'ensemble des résultats concorderaient là encore avec le mécanisme décrit ci-dessus.

Quoiqu'il en soit, concernant l'activité de coupure de l'ADN en présence d' H_2O_2 , le sulfate de vanadyle s'est révélé bien plus efficace que chacun des complexes **2a-d**.

3. Etude de l'activation par l'Oxone®

La réactivité avec l'ADN s'est révélée bien plus importante quand KHSO_5 est utilisé comme agent activateur. La première étape dans l'oxydation d'un ion métallique par HSO_5^- consiste en la formation de radicaux sulfate ou hydroxyle,²⁷ selon le Schéma 10, appliqué au vanadium :

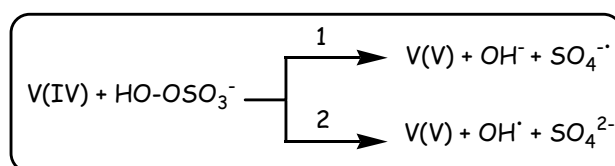


Schéma 10 : Oxydation de V(IV) par HSO_5^-

L'oxydation de l'ADN par le système $\text{VOSO}_4\text{-KHSO}_5$ a été étudiée par Stemmler et Burrows.⁸⁰ Le mécanisme proposé implique l'oxydation de V(IV) en V(V) avec formation concomitante de radicaux sulfate (voie 1), puis la réduction de V(V) en V(IV) avec production de radicaux $\text{SO}_5^{\cdot-}$ à partir de HSO_5^- . Les résultats obtenus en RPE en solution gelée pour le sulfate de vanadyle en présence de KHSO_5 sont en accord avec cette hypothèse. En spin-trapping, on détecte un adduit DMPO-OH assez intense. Le fait qu'il ait été observé en présence de DMSO élimine l'hypothèse de l'implication de radicaux hydroxyle, et suggère plutôt la formation de radicaux superoxyde ou sulfate, car comme nous l'avons vu précédemment les adduits avec ces différents radicaux sont relativement instables et se décomposent rapidement en DMPO-OH. En ce qui concerne le ligand **1d**, qui, comme les autres ligands, a également révélé une activité nucléasique en présence de KHSO_5 , le même adduit DMPO-OH a pu être observé en spin-trapping, mais le signal est beaucoup moins intense.

Cependant, l'activité de coupure des complexes **2a-d** en présence de KHSO_5 est bien plus importante que celle des ligands ou de VOSO_4 alors que, en spin-trapping, aucune espèce radicalaire n'a pu être détectée lors de la réaction du complexe **2d** avec l'Oxone®. Ceci laisserait présager l'intervention d'un crypto-radical. D'autre part, en RPE, le complexe initial semble évoluer au cours de la réaction, pour fournir vraisemblablement du sulfate de vanadyle et donc libérer le ligand. Celui-ci doit donc certainement se trouver sous une forme modifiée, pour expliquer sa perte d'affinité

pour l'entité VO^{2+} . On peut par exemple supposer une transformation vers un système quinonique.

Sur la base de l'ensemble des résultats obtenus, un mécanisme plausible (Schéma 11) peut être proposé.¹³⁰ Comme indiqué par Stemmler et Burrows pour le sulfate de vanadyle,⁸⁰ il y aurait décomposition de HSO_5^- par le complexe V(IV). On aboutirait à un complexe V(V) et à la formation de radicaux sulfate, qui, avec le complexe V(IV) régénéré formerait un crypto-radical $[V(V)-OSO_3^-]$. Le complexe V(IV) aurait été régénéré par réaction avec HSO_5^- pour conduire à $SO_5^{\cdot-}$. Cependant, aucune preuve de la formation de $SO_5^{\cdot-}$ n'a pu être fournie. Un transfert électronique, du ligand vers le métal, expliquerait la perte du ligand, sous forme radicalaire, et la formation de $VOSO_4$. Le ligand libéré, ainsi que le sulfate de vanadyle, en présence d'Oxone®, engendreraient alors le clivage de l'ADN par oxydation au niveau des guanines.

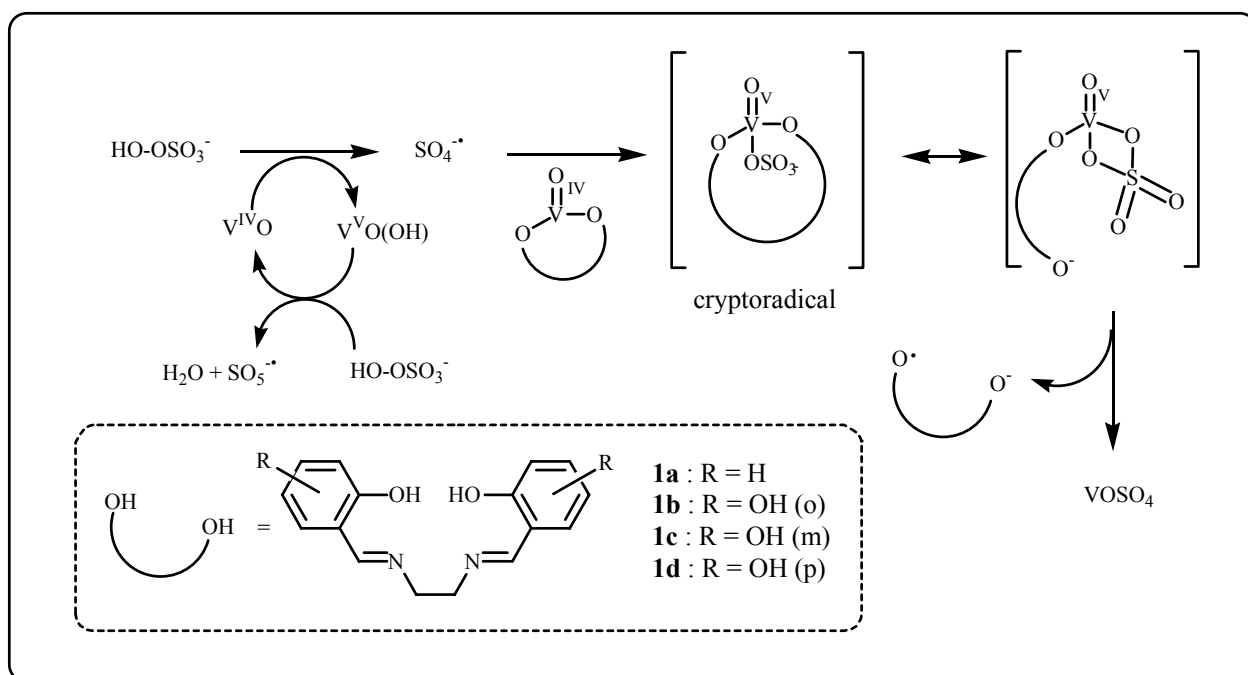


Schéma 11 : Mécanisme proposé pour la réaction des complexes **2a-d** avec $KHSO_5$

Par ailleurs, on pourrait aussi supposer, en présence d'ADN, une interaction entre le crypto-radical et l'ADN, semblable à celle proposée dans la littérature pour les macrocycles à nickel, qui eux aussi engendrent une oxydation des guanines de l'ADN en présence d'oxydants comme $KHSO_5$.²⁷ Ces composés oxydent préférentiellement les guanines les plus exposées et le mécanisme implique une coordination directe de l'ion métallique au niveau de l'azote N7 de la guanine. Il faut noter que, dans notre cas, l'activité de clivage a été observée sans nécessiter de traitement à la pipéridine, mais

elle pourrait provenir de la déglycosylation suivie de la β -élimination engendrées par les longues périodes d'incubation (~ 20 h).

CONCLUSION

Sur la base des états d'oxydation du vanadium dans les systèmes biologiques (V(III), V(IV) et V(V)), nous avons postulé que les complexes de vanadyle du salène **2a** et de ses dérivés hydroxylés **2b-d** seraient capables d'induire des coupures de l'ADN soit en présence d'un agent réducteur, soit en présence d'un agent oxydant. Les résultats décrits dans ce chapitre indiquent que ces composés, et notamment le complexe possédant un système hydroquinonique **2d**, constituent effectivement un nouvel exemple de nucléases capables de réagir sur l'ADN soit en condition réductrice (MPA) soit en condition oxydante (Oxone®). En revanche, ces complexes sont incapables d'induire de coupure de l'ADN en absence d'agent activateur extérieur. Ils ne constituent donc pas des nucléases auto-activées comme les mêmes ligands (systèmes hydroquinone et catéchol) complexés au cuivre ou au fer, testés précédemment au laboratoire.^{65,66} L'activité de coupure est nettement plus importante en présence d'Oxone® et, dans les deux cas, c'est le complexe **2d** possédant un système hydroquinonique qui s'est révélé le plus actif. Des expériences sur de l'ADN marqué ont révélé que les coupures se produisaient essentiellement au niveau des guanines, bases les plus facilement oxydables, sans nécessiter de traitement à la pipéridine.

Des études de RPE et de spin-trapping ont été entreprises afin d'élucider le mécanisme de coupure de l'ADN dans les différents systèmes. Peu d'informations ont été obtenues pour le système Complexe-MPA, il est vraisemblable que le mécanisme passe par la formation d'une espèce de vanadium (III) intermédiaire. Pour le système Complexe-Oxone®, en revanche, les résultats de RPE ont permis de proposer un mécanisme impliquant une décomplexation qui aboutirait à la libération de sulfate de vanadyle et du ligand modifié, type semi-quinone. Cependant, ce mécanisme sous-entendrait l'intervention de divers radicaux ($SO_4^{\cdot-}$, $SO_5^{\cdot-}$, radicaux semi-quinone...) qu'il n'a pas été possible de détecter en spin-trapping. Pour $SO_4^{\cdot-}$, l'hypothèse de la formation d'un crypto-radical, déjà décrit dans la littérature,⁸⁰ a été émise.

CHAPITRE III :
SALENES A CUIVRE
FONCTIONNALISES

La première partie de nos travaux visait à étudier la complexation du vanadium au salène et à ses dérivés hydroxylés, et à tester l'activité nucléasique des complexes ainsi formés. Nous avons montré que les complexes **2a-d** synthétisés peuvent exercer leur activité nucléasique en milieu réducteur ou en milieu oxydant, par contre aucun d'entre eux n'est capable de cliver l'ADN en absence d'agent activateur extérieur. Une étude effectuée précédemment au laboratoire, sur la même série de dérivés, complexés au cuivre ou au fer,^{65, 66} avait permis d'isoler des composés bien plus actifs, capables de cliver l'ADN sans nécessiter l'emploi d'un quelconque agent activateur. Dans cette série, le complexe possédant un système hydroquinonique (deux groupes hydroxyle en position *para*) constituait la plus efficace de ces nucléases auto-activées. L'intérêt de ce type de composés est évident dans le cadre d'applications biologiques *in vivo*, comparé aux composés nécessitant le recrutement d'un agent activateur extérieur.

Dans la deuxième partie de nos travaux, nous avons décidé de modifier le ligand salénique afin d'obtenir de nouveaux composés, possédant une meilleure affinité pour l'ADN. Cette modification consiste à introduire une chaîne latérale sur la fraction éthylènediamine du salène, selon un concept déjà développé précédemment au laboratoire.⁵⁸ Dans les travaux précédents, une chaîne aminobutane avait été greffée sur le salène, et les complexes de cuivre et de nickel avaient été étudiés. Ceux-ci nécessitaient l'emploi d'un agent activateur extérieur (MPA pour le complexe de cuivre et KHSO_5 pour le complexe de nickel) afin d'exercer leur activité nucléasique. La chaîne latérale, sous forme de sel d'ammonium, permettait d'améliorer l'affinité pour l'ADN, par interaction entre la charge cationique de l'ammonium et les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN. Par ailleurs, des molécules hybrides avaient été développées, par liaison de divers ligands de l'ADN (ligands du petit sillon ou agents intercalants) au groupement amino terminal du dérivé salénique, toujours dans le but d'améliorer la reconnaissance de l'ADN.^{61, 62}

Les nouvelles molécules développées ici (Figure 48) combinent les deux caractéristiques essentielles citées ci-dessus : d'une part, une fraction *N,N'*-bis(5-hydroxysalicylidène)éthylènediamine, complexée au cuivre, responsable de l'activité nucléasique auto-activée (système hydroquinonique), et, d'autre part, une chaîne latérale pour améliorer l'affinité avec les acides nucléiques. En effet, la chaîne latérale comporte une fonction amide, qui pourra éventuellement former des liaisons hydrogène avec l'ADN, un nombre de groupes méthylène variable ($n = 2, 4, 6$), afin d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne sur l'activité et l'affinité pour l'ADN, et une fonction amine

terminale. Cette fonction, sous forme de sel d'ammonium, peut servir à améliorer l'affinité pour l'ADN par interaction électrostatique avec les groupements phosphate. Sous forme neutre, la fonction amine permet le couplage à divers agents se liant à l'ADN, notamment à des oligonucléotides formant une triple hélice (TFO) ou à des ligands du petit sillon. Outre l'amélioration de l'affinité pour l'ADN, la synthèse de ces molécules hybrides a pour objectif l'obtention de nouvelles molécules capables de reconnaître et de cliver des séquences spécifiques de l'ADN. De telles molécules pourraient trouver une application potentielle en tant que régulateurs spécifiques de l'expression de gènes choisis pour cibles.

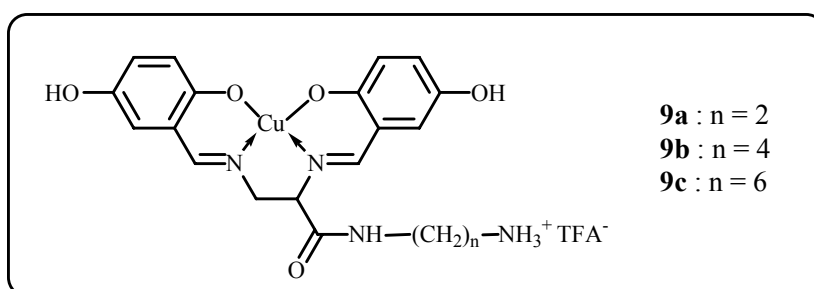


Figure 48 : Complexes de cuivre de dérivés fonctionnalisés de *N,N'*-bis(5-hydroxysalicylidène)éthylènediamine **9a-c**

Ce chapitre décrit donc la synthèse, la caractérisation physico-chimique, et l'activité biologique des complexes **9a-c**, ainsi que les essais de couplage de ces composés à des oligonucléotides et à des ligands du petit sillon.

A. SYNTHÈSE DES SALÈNES À CUIVRE FONCTIONNALISÉS

Les salènes à cuivre fonctionnalisés **9a-c** sont obtenus en sept étapes à partir de l'acide D,L-2,3-diaminopropanoïque, d'une diamine aliphatique à deux, quatre ou six atomes de carbone, ainsi que du 2,5-dihydroxybenzaldéhyde.

I. PROTECTION DES PRECURSEURS

Nous avons choisi l'acide D,L-2,3-diaminopropanoïque (mélange racémique) comme précurseur principal des salènes à cuivre fonctionnalisés **9a-c**. En effet, il sert de point d'ancrage aux deux entités essentielles de la molécule. Sa fonction β -diamine, d'une part, participe à la constitution de la fraction salénique, et sa fonction acide carboxylique, d'autre part, permet l'insertion de la chaîne latérale. Le précurseur de la chaîne latérale, quant à lui, est une diamine aliphatique de longueur variable, à deux, quatre ou six groupements méthyléniques : 1,2-éthylènediamine ($n = 2$), 1,4-butane-diamine ($n = 4$) ou 1,6-hexanediamine ($n = 6$). Afin de coupler les deux précurseurs, des protections orthogonales, *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) pour la fonction amine de la chaîne latérale et benzyloxycarbonyle (Z) pour la β -diamine sont utilisées. Elles permettent une déprotection sélective après le couplage entre les deux précurseurs.

La première étape correspond donc à la mono-protection des différentes diamines par le groupement *tert*-butyloxycarbonyle (Schéma 12, haut).¹³¹ La réaction entre la diamine et le di-*tert*-butyldicarbonate est effectuée dans le chloroforme. Afin de favoriser la mono-protection, la diamine est introduite en large excès (~ 10 équivalents). Les diamines mono-protégées **3a-c**, précurseurs de la chaîne latérale, sont obtenues avec des rendements respectifs de 71, 84 et 64 %.

Parallèlement, les deux fonctions amine de l'acide diaminopropanoïque sont protégées par le groupement benzyloxycarbonyle (Schéma 12, bas). Le monochlorhydrate de l'acide D,L-2,3-diaminopropanoïque réagit avec un excès de chloroformiate de benzyle dans un mélange eau/soude/tetrahydrofurane.¹³² L'acide 2,3-(dibenzyloxycarbonylamino)propanoïque **4** est obtenu avec un rendement de 83 %.

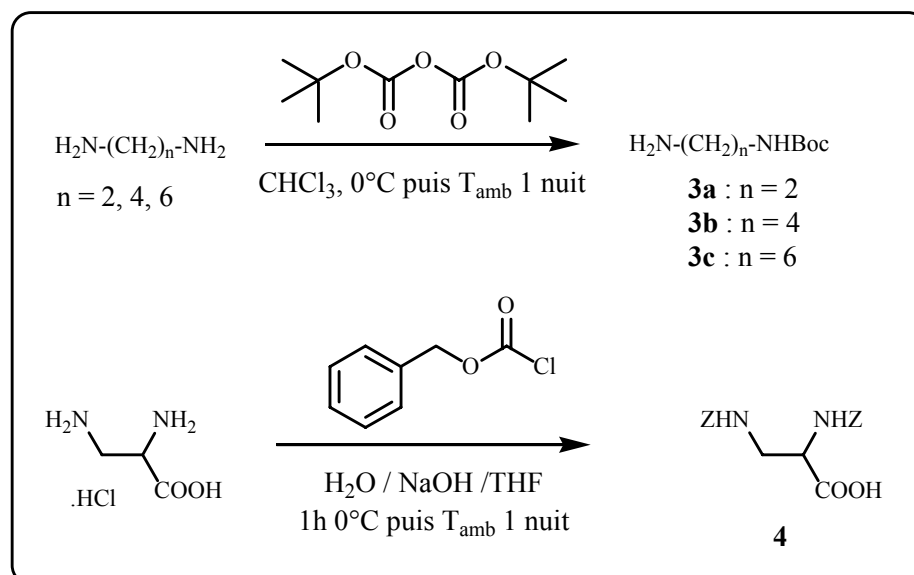


Schéma 12 : Protection des précurseurs

II. COUPLAGE PEPTIDIQUE ET SYNTHÈSE DES LIGANDS

Une fois les deux précurseurs protégés, ils réagissent entre eux pour former une liaison amide. Divers agents de couplage ont été testés pour activer la réaction (Figure 49) : les systèmes DCC/HOBt (Dicyclohexylcarbodiimide/Hydroxybenzotriazole), DCC/DMAP (Diméthylaminopyridine), HOBt/EDCI (chlorhydrate de 1-[3-(diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide). Cependant, le réactif de couplage qui s'est révélé le plus efficace est le réactif de Castro, le BOP (hexafluorophosphate de benzotriazolyloxytris(diméthylamino)phosphonium).¹³³

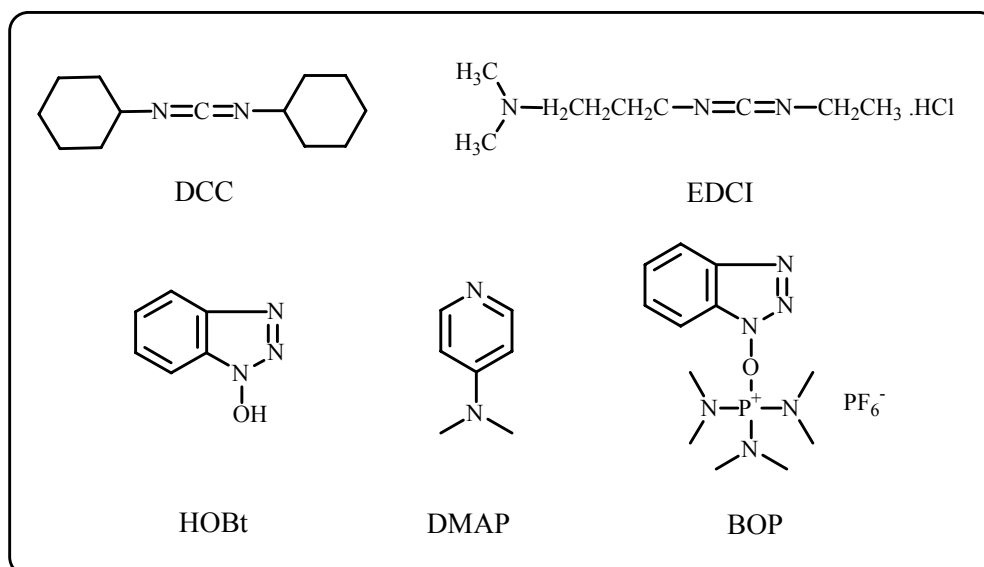


Figure 49 : Réactifs de couplage peptidique

La réaction de couplage entre l'acide et l'amine, activée par le BOP, est effectuée dans l'acétonitrile, en présence de triéthylamine (Schéma 13). On récupère les composés **5a-c** avec des rendements de 70, 76 et 68 % respectivement.

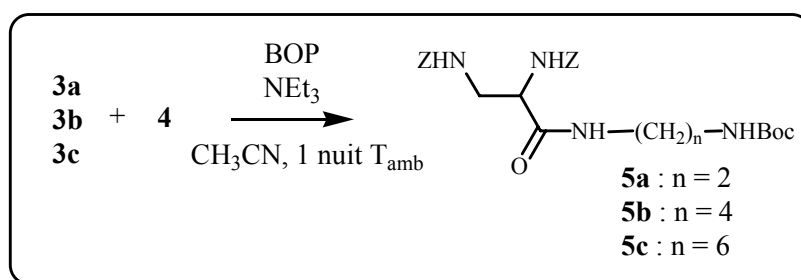


Schéma 13 : Couplage peptidique entre les deux précurseurs

L'étape suivante correspond au clivage des groupements benzyloxycarbone. Il s'agit d'une réaction d'hydrogénolyse, effectuée sous courant d'hydrogène en présence de palladium sur charbon dans le méthanol à reflux (Schéma 14). Les β -diamines libres **6a-c** ainsi obtenues, fonctionnalisées par une chaîne latérale, sont synthétisées avec de très bons rendements (90, 92 et 84 % respectivement).

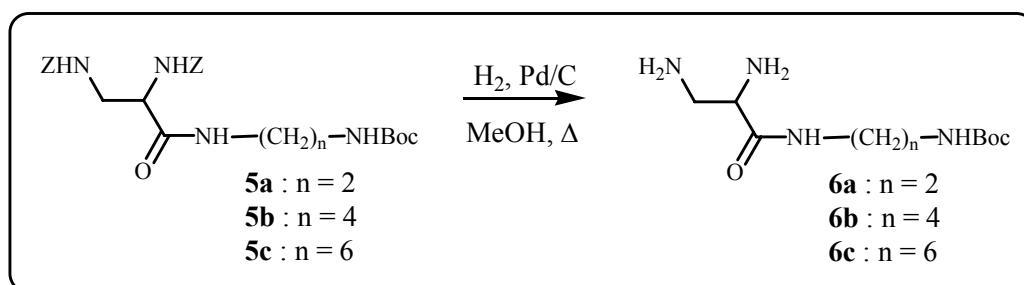


Schéma 14 : Déprotection de la fraction β -diamine

Les composés **6a-c** sont alors condensés à un excès de 2,5-dihydroxy-benzaldéhyde pour fournir les bases de Schiff **7a-c** (Schéma 15). Plusieurs modes opératoires ont été testés pour cette réaction. Les bases de Schiff sont notamment préparées dans l'éthanol, sous agitation vigoureuse et chauffage à reflux.⁵⁸ Cependant, la réaction de formation des imines étant une réaction réversible, nous avons cherché à favoriser la formation des bases de Schiff en déplaçant l'équilibre de la réaction. Pour cela, du tamis moléculaire (3Å) a été introduit dans le milieu réactionnel, afin de piéger l'eau formée.⁵⁸ Un autre procédé consiste à utiliser un montage de type Dean-Stark.⁶⁴ Les produits déprotégés **6a-c** et le dérivé de l'aldéhyde salicylique sont condensés dans le toluène, sous agitation vigoureuse et chauffage à reflux. Cependant, quelle que soit la méthode employée, nous avons rencontré des difficultés dans la purification de ces produits de condensation. L'étape de purification par chromatographie sur colonne pose

problème puisque les fonctions imine sont sensibles à l'acidité de la silice. Le produit attendu risque donc de se dégrader partiellement au cours de l'élution. Pour tenter de remédier à ce problème, on effectue une chromatographie "flash", sous courant d'argon, au lieu d'une chromatographie classique, afin de laisser le produit le moins longtemps possible en contact avec la silice. De la triéthylamine a également été introduite dans le solvant d'élution, afin de désactiver la silice et ainsi éviter la coupure des fonctions imine.

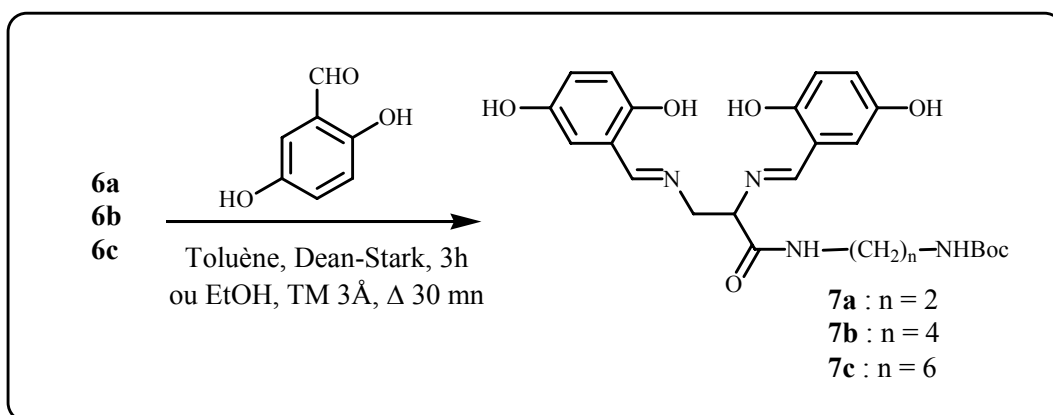


Schéma 15 : Synthèse des bases de Schiff

Toutes ces techniques de synthèse, comme de purification, n'ont malheureusement pas fourni les résultats attendus. Dans tous les cas, nous ne sommes pas parvenus à purifier le produit voulu de façon satisfaisante, l'analyse par RMN indique la présence d'impuretés et les rendements sont médiocres (moins de 20 à 40 % selon les cas). Il est toutefois impossible de déterminer si ces faibles rendements sont dûs à la réaction elle-même ou à la dégradation du produit lors de l'étape de purification par chromatographie.

Les bases de Schiff **7a-c** issues des essais de purification par chromatographie sur colonne sont engagées directement dans la complexation par le cuivre.

III. COMPLEXATION DES LIGANDS SALÉNIQUES ET DEPROTECTION

La complexation avec le métal doit s'effectuer avant la déprotection du groupement *tert*-butyloxycarbonyle porté par la chaîne latérale. En effet, les conditions acides de déprotection sont incompatibles avec la présence des fonctions imine instables dans un tel milieu. La complexation constitue donc une sorte de protection des fonctions imine.

La réaction entre les salènes **7a-c** et l'acétate de cuivre est menée dans un mélange éthanol/eau à reflux (Schéma 16).⁵⁸ Les complexes de cuivre **8a-c**, dont l'amine terminale de la chaîne latérale est encore protégée par le groupement Boc, précipitent dans le milieu. Ils sont obtenus avec des rendements respectifs de 43, 13 et 25 %.

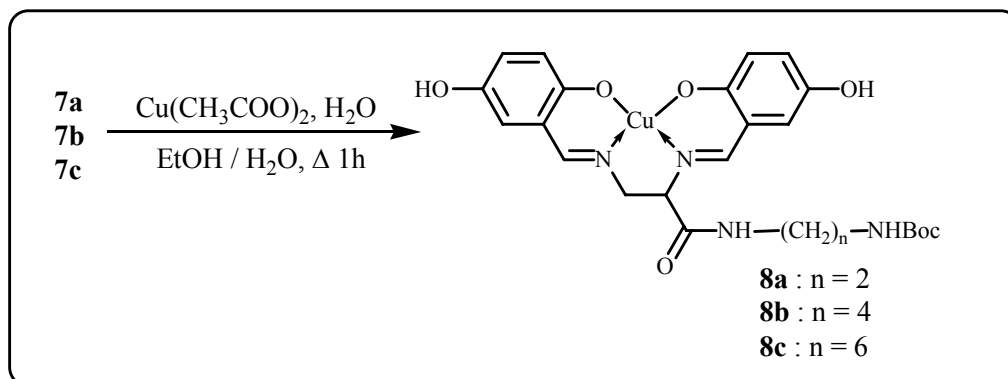


Schéma 16 : Complexation des ligands saléniques par le cuivre

Enfin, la dernière étape correspond à la déprotection du groupement amino terminal des composés **8a-c**. Le groupement *tert*-butyloxycarbonyle est éliminé par action de l'acide trifluoroacétique en présence d'anisole dans le dichlorométhane (Schéma 17).⁵⁸ Les rendements sont de l'ordre de 70 % pour **9a** et **9b** et seulement de 29 % pour **9c**. L'emploi d'anisole n'est pas systématique lors de la déprotection du groupe *tert*-butyloxycarbonyle. Il joue un rôle dans l'élimination des produits résultant de la coupure du groupement protecteur. Celle-ci entraîne en effet la formation d'isobutène, qui en présence d'acide fort (acide trifluoroacétique) génère une espèce carbocationique très réactive qui est piégée par l'anisole.

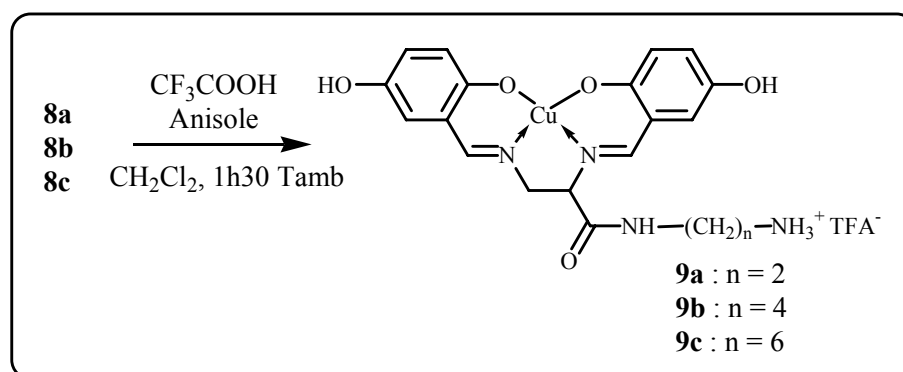


Schéma 17 : Déprotection du groupement amino terminal

B. ETUDE DES SALÈNES À CUIVRE FONCTIONNALISÉES PAR RPE

Comme les complexes de vanadyle étudiés dans le chapitre précédent, les complexes de cuivre (II) sont paramagnétiques. Le cuivre (II), de configuration $[\text{Ar}]3d^9$, possède en effet un électron célibataire. Il peut donc être étudié par RPE.

On admet généralement que les ligands entourant l'ion cuivrique sont disposés selon un arrangement octaédrique distordu, avec quatre ligands dans un plan incluant l'ion Cu^{2+} , et deux autres ligands sur un axe incluant Cu^{2+} et perpendiculaire à ce plan. Ces ligands perpendiculaires au plan sont généralement beaucoup moins fortement liés comparés aux ligands contenus dans le plan. Les complexes de cuivre (II) sont donc dans un environnement tétragonal distordu, et la RPE est alors de type axial, montrant une absorption importante à champ élevé, caractérisée par une valeur g_{\perp} et une absorption plus faible à champ plus faible, caractérisée par une valeur $g_{//}$.¹³⁴ Les isotopes ^{63}Cu et ^{65}Cu ont un spin nucléaire $I = 3/2$. Les spectres de RPE de Cu (II) montrent donc une structure hyperfine à 4 raies, caractérisée par une constante de couplage A_{\perp} à champ élevé et $A_{//}$ à champ plus faible. La constante de couplage A_{\perp} est généralement très petite, ce qui rend sa détermination expérimentale difficile. En revanche, $A_{//}$ est généralement plus importante, et les quatre raies à $g_{//}$ sont souvent bien résolues. Les ordres de grandeur de $g_{//}$ et $A_{//}$ dépendent notamment de la nature des ligands entourant l'ion cuivrique, et ces valeurs peuvent être utilisées afin de déterminer la structure des complexes étudiés.

Pour notre étude, des solutions des complexes **8a-c** (protégés par le groupement Boc) et **9a-c** (sels d'ammonium) à 5 mM dans le DMSO ont été préparées. Les spectres ont été enregistrés en solution gelée à 77 K sur un spectromètre Brüker ESC 106 fonctionnant en bande X (~ 9,5 GHz). La Figure 50 montre les spectres obtenus pour les différents complexes.

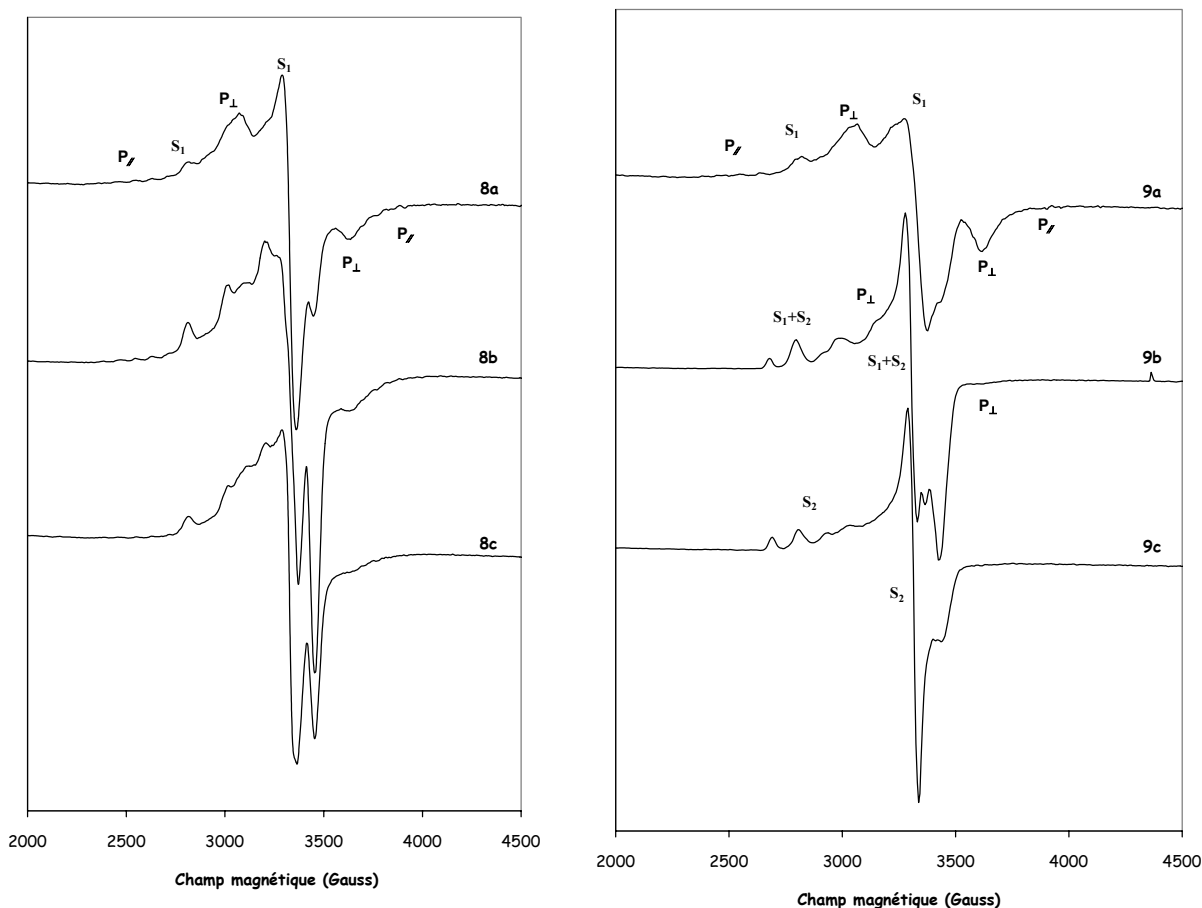


Figure 50 : Spectres de RPE, enregistrés à 77 K, des complexes **8a-c** et **9a-c** (5 mM dans DMSO)

Ces spectres, caractéristiques des ions de type d^9 ($g_{//} > g_{\perp} > g_e$), peuvent être attribués sans ambiguïté aux ions cuivriques. L'étude de ces spectres a révélé pour certains d'entre eux la présence d'ions cuivriques non seulement sous forme d'ions isolés mais aussi sous forme de paires d'ions.^{135, 136, 137, 138} En effet, le spectre de RPE d'une paire d'ion est radicalement différent de celui d'un ion isolé, car à une certaine distance entre les deux ions formant la paire, le couplage entre les deux électrons célibataires devient significatif et le système se divise en un état triplet ($S = 1$) et un état singulet ($S = 0$). Seul l'état triplet est paramagnétique, ce qui donne, en RPE, deux signaux correspondants aux transitions permises ($\Delta m_s = 1$) : $|1,-1\rangle \rightarrow |1,0\rangle$ et $|1,0\rangle \rightarrow |1,+1\rangle$, et un signal correspondant à une transition interdite ($\Delta m_s = 2$) : $|1,-1\rangle \rightarrow |1,+1\rangle$. La Figure 51 représente le diagramme énergétique pour deux électrons couplés et les transitions possibles. Généralement, la caractérisation la plus évidente en RPE de l'existence de paires d'ions Cu^{2+} est la présence d'un signal de faible intensité à champ moitié, produit par la transition interdite.^{139, 140}

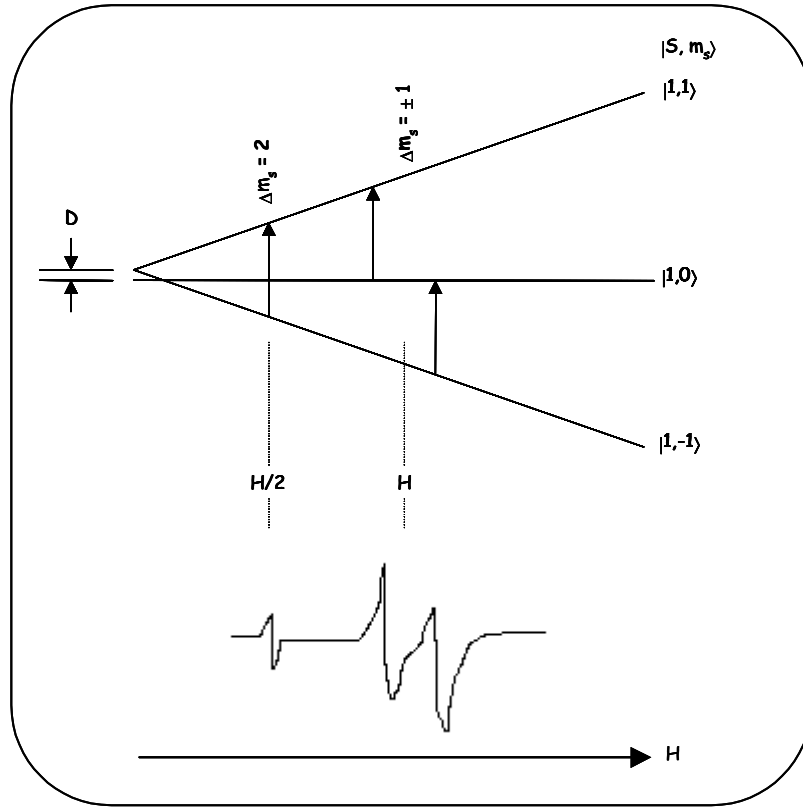


Figure 51 : Niveaux d'énergie pour deux électrons en interaction

Le système peut alors être décrit par l'hamiltonien de spin suivant, constitué de deux termes pour chaque électron indépendant 1 et 2 et d'un terme d'interaction entre ces deux électrons :^{120, 141, 142}

$$H = H_1 + H_2 + H_{int}$$

$$H_i = \sum (\beta g_j S_j H_j + A_j S_j I_j) \text{ avec } i = 1, 2 \text{ et } j = x, y, z$$

$$H_{int} = SDS + JS_1S_2$$

Le terme H_{int} tient compte des interactions d'échange isotrope (JS_1S_2) et anisotrope (SDS) entre les deux électrons. Le vecteur S est le spin électronique total, les vecteurs S_1 et S_2 sont les spins électroniques des deux ions 1 et 2. J est la constante d'interaction d'échange isotrope, elle correspond à la séparation énergétique entre l'état singulet et l'état triplet. D est la constante d'interaction d'échange anisotrope, correspondant à la séparation entre les composantes $m_s = 0$ et $m_s = \pm 1$ de l'état triplet à un champ magnétique nul (Figure 51). La constante D inclut un terme d'interaction pseudo-dipolaire et un autre purement dipolaire : $D = D_{ex} + D_{dip}$.

Dans le cas où la symétrie des tenseurs g , A et D est axiale, l'hamiltonien de spin s'écrit :

$$H = \beta g_{//} S_z H_z + \beta g_{\perp} (S_x H_x + S_y H_y) + A_{//} S_z I_z + A_{\perp} (S_x I_x + S_y I_y) + D [S_z^2 - 1/3 S(S+1)] + JS_1 S_2$$

La constante D peut être déterminée expérimentalement à partir de la séparation entre les deux composantes parallèles ou perpendiculaires $d_{//}$ ou d_{\perp} du signal correspondant à la paire (Figure 52) :

$$d_{//} = 2D/g_{//}\beta \text{ et } d_{\perp} = D/g_{\perp}\beta$$

Si on suppose que la valeur de D n'est due qu'aux interactions dipolaires, on a la relation suivante,^{135, 143} faisant intervenir la distance r entre les deux ions formant la paire :

$$D = [10^{20} \cdot (2g_{//}^2 + g_{\perp}^2) \beta^2] / [2r^3]$$

où D est en joule et r en nanomètre. Cette équation nous permet de calculer la distance r entre les ions. Quand la distance r augmente, D diminue tout comme les valeurs de $d_{//}$ et d_{\perp} . Par conséquent, la variation de la valeur de r dans les différents cas peut être déduite à partir des mesures des valeurs des paramètres $d_{//}$ et d_{\perp} sur les divers spectres.

La distance r entre les deux ions formant la paire peut aussi être calculée¹³⁵ à partir de l'intensité relative (I_{rel}) entre le signal observé à $\Delta m_s = 2$ (transition interdite) et celui obtenu à $\Delta m_s = 1$ (transition permise) : $I_{rel} = A \cdot (9,1)^2 / (r^6 \cdot \nu^2)$, où A est une constante (21 ± 2), r est la distance entre les deux ions en Å et ν est la fréquence micro-onde en gigahertz.

La Figure 52 illustre le spectre de RPE du complexe **8a**. Le spectre est apparemment constitué de la superposition de deux signaux. Le premier, noté S_1 , possédant une symétrie axiale et une structure hyperfine bien résolue ($g_{//}(S_1) = 2,200$; $g_{\perp}(S_1) = 2,038$; $A_{//}(S_1) = 198$ G), a été attribué à des ions Cu^{2+} isolés situés dans des sites à géométrie plan carrée.^{138, 144, 145, 146, 147} Le second, noté P, est constitué de deux pics séparés de 561 gauss de part et d'autre de la composante perpendiculaire du signal S_1 . De plus, en dessous du pic situé à bas champ, un groupe de cinq raies est observé, alors qu'un groupe de trois raies est repéré à proximité du pic à plus haut champ. Le signal P est comparable à ceux décrits dans la littérature dans différentes matrices contenant des paires d'ions Cu (II).^{135, 136, 137, 138}

En effet, les sept composantes du couplage hyperfin avec deux noyaux identiques de spin 3/2 (intensités relatives 1 : 2 : 3 : 4 : 3 : 2 : 1), en partie visibles pour $g_{//}$, et le signal de faible intensité observé à champ moitié (~ 1650 G) sont caractéristiques de l'existence de paires d'ions cuivre (II). Le signal de faible intensité correspond à la

transition interdite ($\Delta m_s = 2$) tandis que les signaux observés à champ normal (~ 3300 G) correspondent aux transitions permises ($\Delta m_s = 1$).

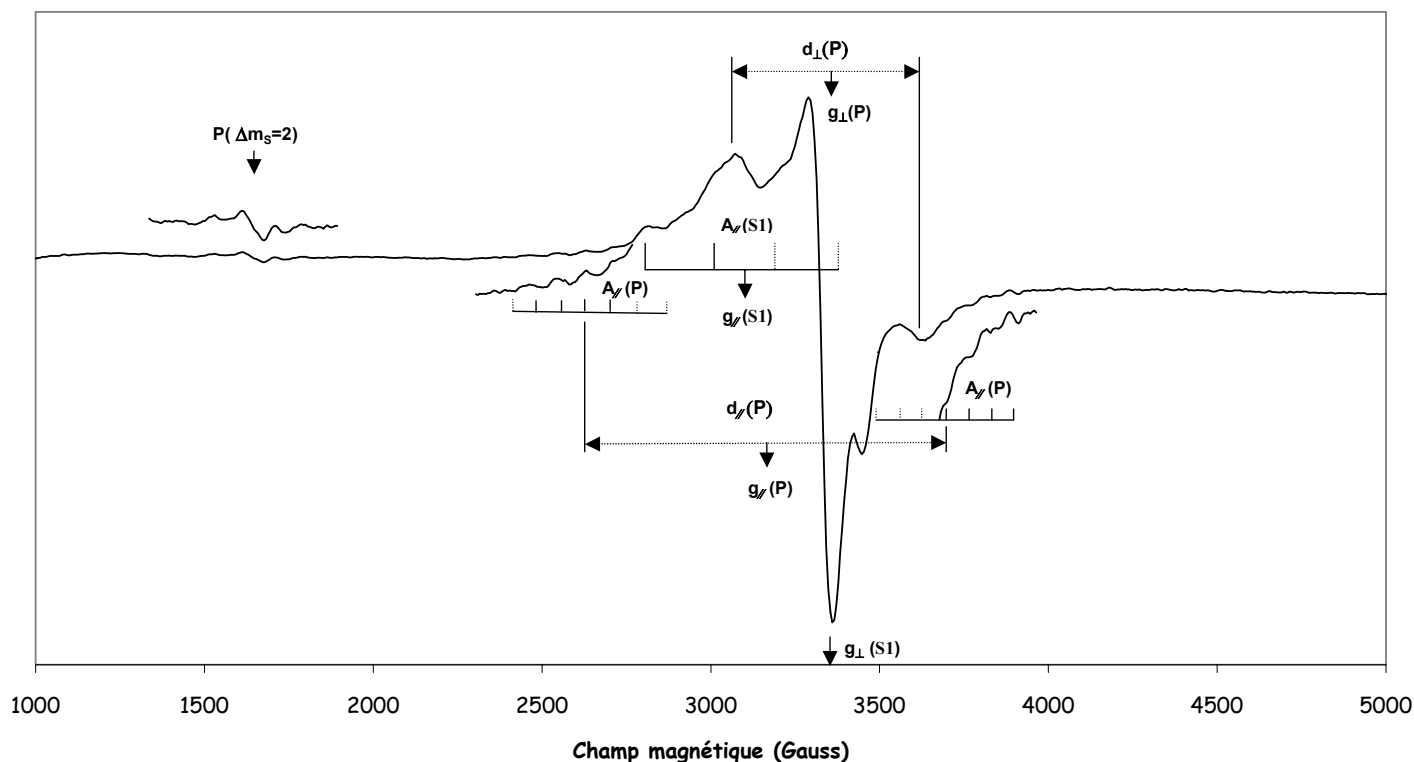


Figure 52 : Spectre du complexe **8a** (77 K, 5 mM dans DMSO)

La Figure 52 indique comment les valeurs de $g_{//}(P)$ et $g_{\perp}(P)$ peuvent être déterminées en mesurant le champ magnétique au centre des deux composantes parallèles et perpendiculaires respectivement.

Il a été montré¹⁴⁸ que, si les deux ions d'une paire sont équivalents et si l'axe de la paire est le même que l'axe principal de l'ion isolé, les spectres correspondant à ces espèces devraient avoir la même valeur de g et la valeur de la constante de couplage hyperfin correspondant à la paire devrait être deux fois plus faible que celle de l'ion isolé. Les résultats consignés dans le Tableau 10 ne sont pas en accord avec ces conditions. Ceci indique que les deux ions Cu^{2+} de la paire ont une géométrie complètement différente de celle des ions Cu^{2+} isolés. D'après les valeurs des paramètres de RPE,^{135, 136, 139} les ions Cu^{2+} des paires sont localisés dans des sites octaédriques.

Le Tableau 10 liste les valeurs des paramètres de RPE mesurées et calculées à partir des spectres obtenus pour tous les échantillons. Le signal S_1 a été observé pour tous les complexes protégés **8a-c**, quelle que soit la longueur de la chaîne. Au contraire,

dans la série des composés ioniques (sels d'ammonium **9a-c**), le signal est observé pour **9a** ($n = 2$). Pour **9b** ($n = 4$), l'intensité de ce signal diminue et pour **9c** ($n = 6$), le signal S_1 n'est pas observé du tout. De plus, le spectre correspondant à **9b** est la superposition de deux signaux : le signal S_1 décrit précédemment ainsi qu'un nouveau signal, noté S_2 , de symétrie axiale et caractérisé par : $g_{//} = 2,405$; $g_{\perp} = 2,064$ et $A_{//} = 118$ G. Ces paramètres de RPE peuvent être attribués à des ions Cu (II) isolés situés dans des sites à géométrie tétraédrique^{138, 146, 147, 149} ou pyramidale à base carrée.¹⁵⁰ Pour **9c**, seul ce nouveau signal S_2 est observé. Par ailleurs, on remarque que la valeur de d_{\perp} du signal correspondant aux paires d'ions P diminue quand la longueur de la chaîne latérale augmente, de **8a** à **8c** notamment, mais surtout de **9a** à **9b**, le signal P ayant d'ailleurs totalement disparu dans le spectre du complexe **9c**, dans lequel seul le nouveau signal S_2 a été observé. Cette diminution de la valeur de d_{\perp} peut s'expliquer par une augmentation de la distance r entre les deux ions formant la paire (Tableau 10).

Complexe	S_1			S_2			P				
	$g_{//}$	$A_{//}^*$	g_{\perp}	$g_{//}$	$A_{//}^*$	g_{\perp}	g_{\perp}	d_{\perp}	$g_{//}$	$A_{//}^*$	r^{**}
8a	2.200	198	2.038	-	-	-	2.04	561	2.13	74	3.77
9a	2.200	184	2.034	-	-	-	2.05	551	-	79	3.79
8b	2.200	198	2.036	-	-	-	2.06	535	-	88	3.83
9b	2.241	184	2.040	2.405	118	2.064	2.02	~ 466	-	-	4.01
8c	2.211	194	2.046	-	-	-	2.06	513	-	78	3.88
9c	-	-	-	2.408	118	2.065	-	-	-	-	-

* Les constantes de couplage de la structure hyperfine sont en Gauss.

** Les distances sont en Å.

Tableau 10 : Paramètres de RPE mesurés à partir des spectres des complexes **8a-c** et **9a-c** (77 K)

En conclusion, les résultats de RPE indiquent que certains ions cuivriques sont isolés et situés dans des sites à géométrie plan carrée alors que d'autres interagissent les uns avec les autres pour former des paires d'ions. Dans la série des produits protégés par le groupement Boc (composés **8a-c**), la géométrie des ions isolés reste plan carrée quel que soit le nombre de groupements méthyléniques de la chaîne latérale. Par contre, en ce qui concerne la série des sels d'ammonium (produits **9a-c**), la quantité de ces ions diminue quand la longueur de la chaîne augmente. Pour cette série, les ions cuivriques ont plutôt tendance à se situer dans un environnement tétraédrique ou pyramidal à base carrée plutôt que plan carré. En ce qui concerne les paires d'ions Cu (II), elles sont observées dans chacun des échantillons "non-ioniques" (série des produits protégés **8a-c**), mais la distance r entre les deux ions augmente avec

l'augmentation de la longueur de la chaîne. Au contraire, pour les échantillons "ioniques" (série des sels d'ammonium **9a-c**), les paires d'ions semblent relativement instables et disparaissent complètement quand le nombre de groupes méthylène est assez élevé (composé **9c**, $n = 6$).

C. ACTIVITE BIOLOGIQUE DES SALENES A CUIVRE FONCTIONNALISES

I. ETUDE DE LA LIAISON A L'ADN

L'interaction des composés **8a-c** et **9a-c** avec l'ADN a été étudiée par spectroscopie d'absorption UV-Visible. Les spectres des produits sont perturbés en présence d'ADN de thymus de veau. La Figure 53 montre l'exemple des deux complexes **8a** (protégé) et **9a** (déprotégé) possédant une chaîne latérale à deux groupements méthyléniques ($n = 2$). Les flèches indiquent les effets hypochromes (\downarrow) ou hyperchromes (\uparrow) observés.

Dans chaque série **8** et **9**, les spectres évoluent de la même façon en fonction du nombre d'atomes de carbone de la chaîne latérale. L'effet engendré par l'ajout d'ADN semble plus important pour $n = 2$ et 4 que pour $n = 6$. D'autre part, l'effet est plus marqué pour la série des produits déprotégés **9a-c** que pour la série des produits protégés **8a-c**. Ce phénomène peut s'expliquer par la possibilité d'interaction ionique entre les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN et les charges positives des sels d'ammonium **9a-c** obtenus après déprotection.

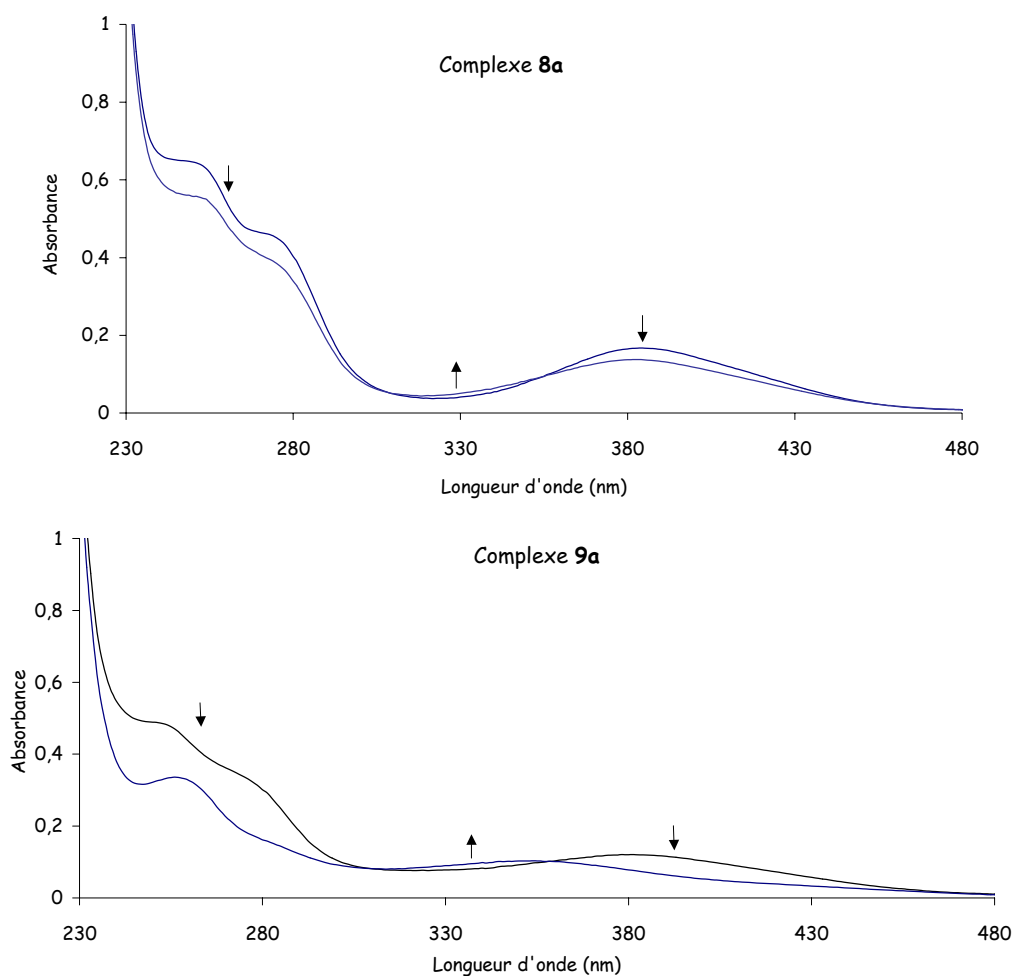


Figure 53 : Evolution des spectres UV-Visible de **8a** et **9a** en présence d'ADN

II. ETUDE DE COUPURE DE PLASMIDE

L'activité nucléasique des différents complexes **8** et **9** est étudiée en suivant la conversion d'un ADN de plasmide superenroulé (Sc) en ADN circulaire relâché (Nck) et en ADN linéaire (Lin). Les expériences sont menées en présence d'agent réducteur (MPA) mais aussi en absence de tout agent activateur. Un gel type, montrant l'activité de coupure après une nuit d'incubation à température ambiante est reporté Figure 54 (les lignes notées C et C⁺ correspondent au plasmide incubé sans produit à tester, respectivement en absence et en présence de MPA).

On constate tout d'abord que, en présence de l'agent activateur réducteur, les six composés testés **8a-c** et **9a-c** sont capables de promouvoir de façon significative des coupures au niveau de l'ADN de plasmide. En effet, dans chaque cas, la forme superenroulée (Sc) du plasmide est quasiment totalement convertie en forme circulaire relâchée (Nck). La forme linéaire (Lin) est également observée dans certains cas, notamment pour le complexe **9b**. A la concentration testée (25 μ M), il n'y a pas de

différence très nette entre la série des composés protégés **8a-c** et la série des sels d'ammonium **9a-c**. Les composés protégés semblent toutefois légèrement moins efficaces que leurs homologues déprotégés. Dans ces conditions, il est également difficile de tirer des conclusions quant à l'effet de la longueur de la chaîne latérale sur l'activité nucléasique : celle-ci reste en effet relativement constante quel que soit le nombre d'atomes de carbone de la chaîne latérale ($n = 2, 4, 6$). Le composé **9b** semble toutefois le plus actif, puisqu'on peut distinguer l'apparition de la forme linéaire du plasmide, par accumulation de coupures monobrins. Il faut également signaler que l'acétate de cuivre a aussi été testé comme témoin, en présence de MPA, et qu'il a révélé une excellente activité nucléasique, du même ordre de grandeur que celle des autres produits testés (résultat non présenté).

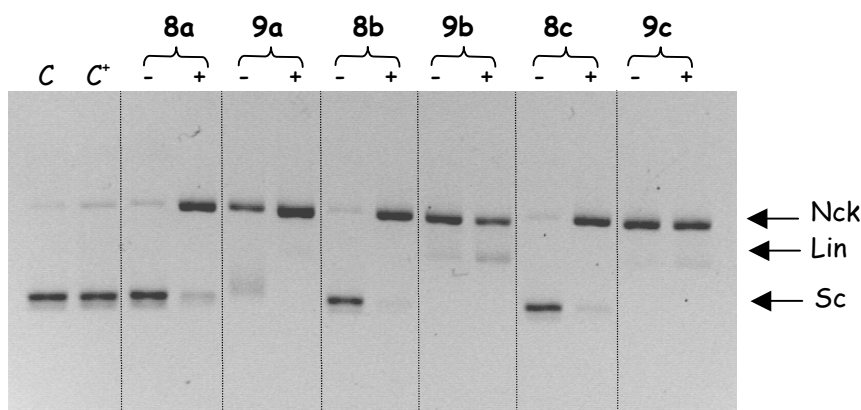


Figure 54 : Coupure de plasmide par les complexes **8a-c** et **9a-c** ($25 \mu\text{M}$) en absence d'agent activateur (-) ou en présence de MPA ($200 \mu\text{M}$) (+), incubation 1 nuit à T_{amb}

Cependant, l'objectif de ce travail est la conception de nucléases auto-activées, capables d'engendrer des coupures d'ADN en absence de tout agent activateur extérieur. Cette propriété a donc également été étudiée par les expériences de coupure de plasmide. Dans les conditions testées, en absence d'agent activateur, les composés protégés **8a-c** se sont révélés incapables de couper l'ADN de plasmide (Figure 54). Il en va de même pour l'acétate de cuivre testé comme témoin (résultat non présenté). En effet, la forme superenroulée n'est quasiment pas convertie en forme relâchée, les rapports des deux formes de l'ADN sont quasiment identiques à ceux des échantillons servant de contrôle (C, C⁺). En revanche, en ce qui concerne la série des sels d'ammonium **9a-c**, tous les produits ont révélé une excellente activité nucléasique, la forme superenroulée ayant, dans chaque cas, quasiment totalement disparu au profit de la forme circulaire relâchée. Les activités des complexes **9b** et **9c** sont comparables, le complexe **9a** semblant légèrement moins efficace.

Pour conclure, l'addition de l'agent activateur s'est révélée particulièrement importante pour la série des produits protégés : les complexes **8a-c**, inactifs dans les conditions testées en absence d'agent activateur, ont montré une bonne activité de coupure en présence de MPA. Pour la série des sels d'ammonium, en revanche, la différence entre les activités en absence et en présence d'agent activateur n'est pas si nette, puisque les complexes **9a-c** ne requièrent la présence d'aucun agent extérieur pour exercer une très bonne activité de coupure de plasmide.

D'autres expériences ont été réalisées en incubant les produits ($50 \mu\text{M}$) pendant une heure avec l'ADN de plasmide à 37°C . Dans ce cas, on obtient quasiment les mêmes activités de coupure pour les produits déprotégés **9a-c** (non présentés). L'activité de coupure des produits protégés **8a-c**, en revanche, reste faible dans ces conditions, même en présence de l'agent réducteur.

L'effet de la concentration a également été étudié pour les composés **8a-b** et **9a-b**, en absence d'agent activateur, après une nuit d'incubation à température ambiante (Figure 55). Les produits protégés **8a-b** sont relativement peu actifs, une importante quantité de forme superenroulée persiste, mais une amélioration de l'efficacité de clivage de l'ADN est observée avec l'augmentation de la concentration en complexe (10, 25, $40 \mu\text{M}$). Le composé **8b** ($n = 4$) se révèle plus actif que **8a** ($n = 2$). Concernant la série des sels d'ammonium, les deux composés **9a** et **9b** sont très actifs, et l'efficacité de la réaction avec l'ADN augmente là encore avec la concentration en complexe. Comme pour la série des produits protégés, **9b** reste plus actif que **9a**, ce qui laisse supposer une influence de la longueur de la chaîne sur l'activité nucléasique. Cependant, cette influence n'est plus vérifiée quand la longueur de la chaîne passe de $n = 4$ à $n = 6$. En effet, les activités des complexes **9b** ($n = 4$) et **9c** ($n = 6$) sont comparables, tout comme les activités de **8b** et **8c** (résultats non présentés). Il faut noter que le profil de coupure dans le cas du composé **9a** est un peu spécial : on observe, notamment à $40 \mu\text{M}$, une "traînée" sur le gel, sans doute due au fait que le clivage se poursuit dans le gel (digestion du plasmide résultant en une diffusion dans le gel).

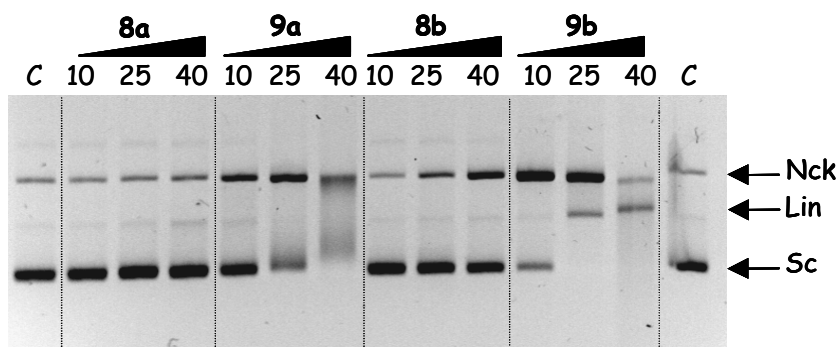


Figure 55 : Coupure de plasmide par les complexes **8a-b** et **9a-b** (10, 25 et 40 μM) en absence d'agent activateur, incubation 1 nuit à T_{amb}

La différence d'activité entre les produits protégés et déprotégés s'explique vraisemblablement par les interactions électrostatiques entre les groupements ammonium des composés déprotégés et les groupements phosphate de l'ADN, qui permettent de placer le complexe à proximité de l'ADN. Une meilleure interaction avec l'ADN avait d'ailleurs été observée précédemment en spectroscopie d'absorption UV-Visible pour la série des composés **9** par rapport aux composés **8**. Par contre, il semble moins évident de trouver une explication rationnelle permettant d'expliquer les différences d'activité en fonction de la longueur de la chaîne, d'autant plus que les études d'interaction avec l'ADN (UV-Visible) sont en contradiction avec les activités nucléasiques. Le complexe **9c** est celui qui a révélé une moins bonne capacité d'interaction avec l'ADN, et exerce pourtant, au même titre que **9b**, la meilleure activité nucléasique. Les différences d'interaction des composés **9a-c** avec l'ADN sont toutefois relativement peu importantes.

L'effet de la longueur de la chaîne a été étudié en RPE (B. page 109) et les résultats obtenus permettent de proposer une hypothèse expliquant les différences d'activités nucléasiques des divers produits. En effet, la RPE a permis de détecter la présence de paires d'ions Cu^{2+} , pour tous les composés protégés **8a-c**. Pour les composés déprotégés, les paires d'ions deviennent de plus en plus lâches au fur et à mesure que la longueur de la chaîne augmente et, pour **9c** ($n = 6$), aucun dimère d'ions cuivriques n'est d'ailleurs détecté. On peut alors supposer que la formation des paires d'ions constitue un point défavorable pour l'activité nucléasique des composés. Les activités nucléasiques de **9b** et **9c** sont néanmoins comparables, alors qu'un dimère est détecté pour **9b** mais pas pour **9c**. Dans le cas de **9b**, le dimère est toutefois relativement lâche, comparé aux autres ($r = 4,01 \text{ \AA}$, Tableau 10 page 114). L'activité de coupure pourrait aussi être

corrélée au changement de géométrie observé en RPE, pour les ions cuivriques isolés, en fonction de la longueur de la chaîne latérale. En effet, c'est seulement pour les deux composés présentant la meilleure activité nucléasique (**9b** et **9c**) que le signal S_2 a été détecté en RPE (page 114). Ce signal correspond à des ions Cu^{2+} situés dans des sites à géométrie tétraédrique ou pyramidale à base carrée.

III. ETUDE DE COUPURE D'ADN MARQUE

La technique de coupure de plasmide superenroulé est une technique très sensible pour tester l'activité nucléasique des dérivés saléniques **8a-c** et **9a-c**. En effet, il suffit seulement d'une coupure sur environ 5 000 nucléotides (longueur moyenne d'un plasmide) pour détecter l'activité sur le gel par la visualisation des différentes formes du plasmide. Cependant, cette faible activité n'est pas suffisante pour des études de footprint ou pour une dégradation rapide de l'ADN. L'utilisation du test de coupure sur un fragment d'ADN marqué, sur gel de séquence, permet non seulement d'étudier si la nucléase artificielle est suffisamment active pour être utilisée en tant qu'agent de footprinting mais aussi de déterminer une éventuelle spécificité de coupure de la nucléase synthétique envers la séquence d'ADN.

Deux fragments d'ADN ont été utilisés pour cette étude : un fragment de 117 paires de bases, marqué à son extrémité 3' (117-3'), ainsi qu'un fragment constitué de 62 nucléotides, sous forme d'une boucle avec deux brins complémentaires représentant un fragment de la séquence du provirus HIV, marqué à son extrémité 5' (HIV-Loop).

1. Coupure du fragment 117-3'

L'activité nucléasique des complexes **8a-c** et **9a-c** est testée dans un premier temps sur le fragment 117-3'. Les échantillons d'ADN marqués sont incubés pendant une nuit à température ambiante en présence de chaque composé à la concentration de 20 et 40 μM , en absence d'agent activateur. L'intégrité de l'ADN est ensuite analysée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide sous conditions dénaturantes (Figure 56).

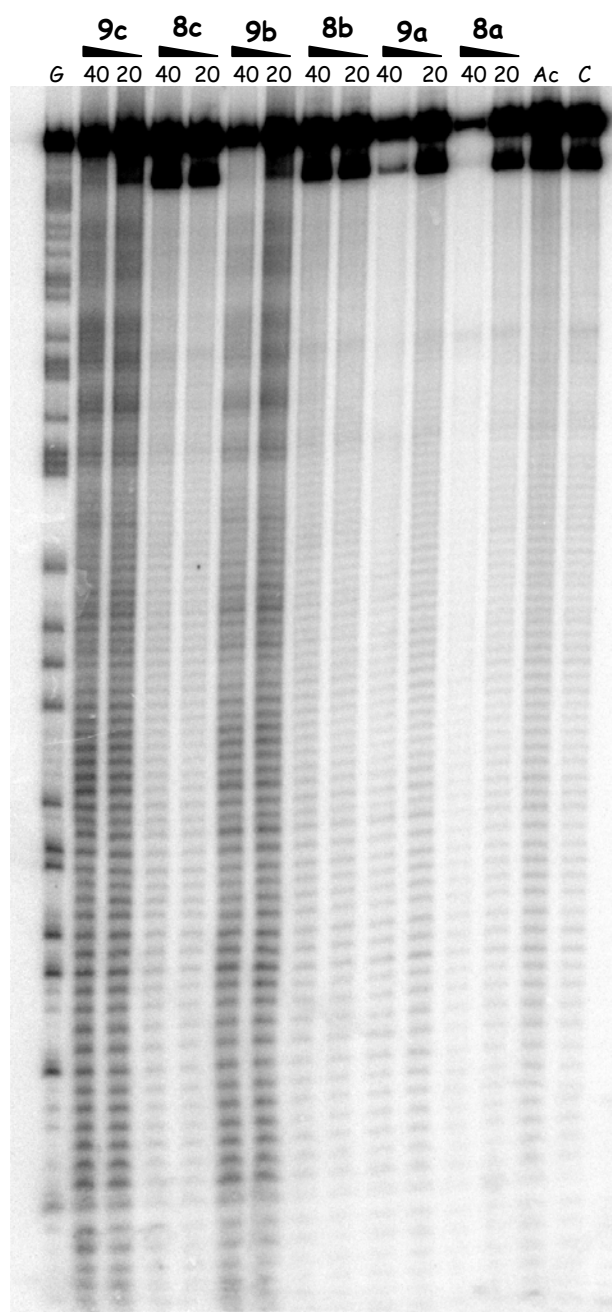


Figure 56 : Profil de coupure du fragment 117-3' par les complexes **8a-c** et **9a-c** (20 et 40 μM) en absence d'agent activateur, incubation 1 nuit à T_{amb}
(la figure se lit de droite à gauche)

Comme précédemment, on constate que les produits protégés **8a-c** présentent une très faible activité de coupure, comparable à celle de l'acétate de cuivre (Ac) testé comme témoin. Un problème de précipitation dans le puits de dépôt a été observé pour le complexe **8a** à la concentration de 40 μM , ce qui explique la faible quantité d'ADN détectée sur cette ligne (**8a**, 40 μM). Cependant, la meilleure efficacité a été observée pour la série des sels d'ammonium, et plus particulièrement les composés **9b** et **9c**, le complexe **9a** restant moins actif. La réaction de coupure n'est pas spécifique. L'ADN est

coupé de façon aléatoire, ce qui entraîne la formation d'une échelle de bandes de coupure uniforme. On observe ici encore une augmentation de l'activité nucléasique avec l'augmentation de la concentration des nucléases synthétiques. Pour ces composés, l'agent réducteur (MPA) n'est pas nécessaire. Au contraire, l'efficacité semble meilleure en absence d'agent réducteur plutôt qu'en sa présence (résultats non présentés).

2. Coupure du fragment HIV-Loop

Les études précédentes ont été effectuées à l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille. Les salènes à cuivre fonctionnalisés ont également fait l'objet d'une étude biologique au sein de l'équipe du professeur A. S. Boutorine, à l'Unité de Régulation et Dynamique des Génomes du Muséum National d'Histoire Naturelle.

Ce laboratoire, dédié à l'étude des acides nucléiques et des mécanismes d'expression génétique, s'intéresse au développement de molécules capables de moduler sélectivement l'expression de gènes choisis pour cibles. Mis à part les peptides biologiquement actifs, il existe deux classes de molécules de bas poids moléculaire, capables de reconnaître spécifiquement une séquence sur l'ADN double brin :

- les oligonucléotides formant des structures d'acides nucléiques en triple hélice (TFO, pour "Triplex-Forming Oligonucleotides") par fixation dans le grand sillon de l'ADN,
- les ligands du petit sillon de l'ADN constitués de sous-unités de type pyrrole et/ou imidazole (MGB, pour "Minor Groove Binders").

Le laboratoire s'attache à la conception et à l'étude de ces deux types de molécules. C'est d'ailleurs dans le cadre de cette étude que nos composés **9a-c** ont révélé un intérêt potentiel. En effet, afin d'étudier les interactions des différents TFO et MGB synthétisés avec l'ADN, l'équipe du professeur Boutorine s'est intéressée aux nucléases artificielles capables de jouer le rôle d'agents de footprinting. Il nous a alors paru intéressant de tester la capacité de nos produits **9a-c** à assurer ce rôle. Au préalable, l'activité nucléasique de ces différents composés a donc été étudiée sur le fragment HIV-Loop, choisi pour cible.

Les études menées au sein du laboratoire s'inscrivent en effet dans le cadre d'une approche anti-VIH. Le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus. Son matériel génétique est constitué d'ARN mais il s'intègre sous forme d'ADN proviral, le provirus, dans le génome de la cellule hôte, grâce aux actions successives de la transcriptase inverse et de l'intégrase, pour ensuite s'exprimer pendant toute la vie

active de la cellule. Ainsi, le modèle utilisé pour cible est un oligonucléotide constitué de 62 unités nucléotidiques, sous forme d'une boucle avec deux brins complémentaires représentant un fragment de la séquence du provirus du VIH (HIV-Loop, Figure 57). Il s'agit d'une séquence d'ADN double brin, fragment du provirus du VIH de 29 nucléotides, dont les deux brins sont liés de façon covalente par une boucle de quatre thymidine (T). Celle-ci permet de faciliter la formation d'un duplexe équimolaire et de permettre de visualiser tous les sites de coupure sur un seul gel, sans nécessiter la préparation de deux gels distincts avec chaque brin marqué. Cet oligonucléotide a été marqué par radioactivité au ^{32}P à son extrémité 5'.

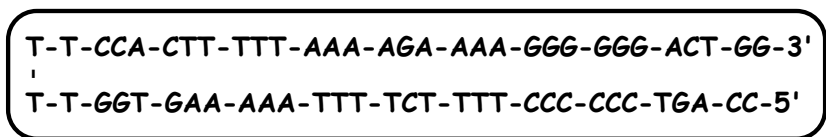


Figure 57 : Séquence du fragment HIV-Loop utilisé pour cible

Le fragment HIV-Loop marqué a donc été traité par les salènes à cuivre **9a-c**. Différentes expériences ont été menées en faisant varier divers paramètres : la concentration des différents composés, le tampon (pH 6 ou pH 7), le temps et la température d'incubation, la présence ou non d'agent réducteur (DTT). Les résultats ont ensuite été analysés après migration sur gel d'acrylamide dénaturant dans les conditions de séquençage, avec un contrôle coupé spécifiquement au niveau des adénines et des guanines (A+G) (Figure 58, incubation une nuit à température ambiante, tampon MES (pH 6) ou HEPES (pH 7), Sal-Fe correspond au complexe de fer de la *N,N'*-bis(5-hydroxysalicylidène)éthylènediamine, testé comme témoin). Ces expériences révèlent toutes l'activité de coupure non spécifique des complexes **9a-c**. En effet, les bandes correspondant à tous les fragments possibles de coupure de l'ADN marqué sont présentes. Les composés induisent donc des coupures aléatoires, ne dépendant pas de la séquence de l'ADN, comme observé précédemment sur le fragment d'ADN 117-3'.

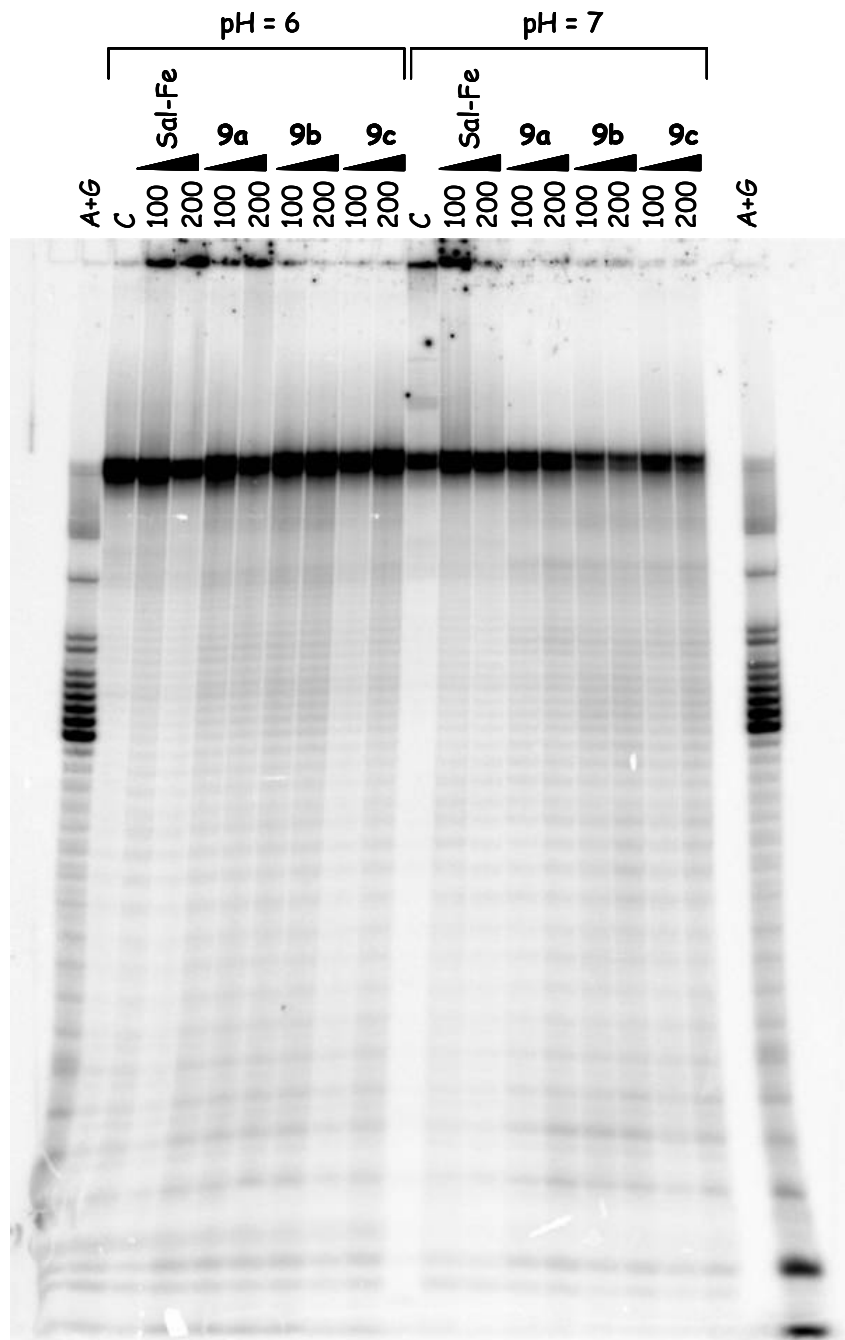


Figure 58 : Profil de coupure du fragment HIV-Loop par les complexes **9a-c** (100 et 200 μM) en absence d'agent activateur, incubation 1 nuit à T_{amb}

Cependant, on constate, quelles que soient les conditions testées, que les trois composés montrent une efficacité relativement peu importante en ce qui concerne la coupure du fragment d'ADN marqué, en comparaison aux résultats obtenus précédemment en linéarisation de plasmide. Cette observation s'explique par le fait que pour linéariser un plasmide, il suffit d'une coupure pour environ 5000 nucléotides (longueur moyenne d'un plasmide). En revanche, dans le cas du fragment HIV-Loop, une

coupure par molécule est requise, c'est-à-dire une coupure pour 62 nucléotides. Il faut donc une efficacité 80 fois plus élevée (dans une approximation linéaire, une concentration 80 fois plus importante ou un temps d'incubation 80 fois plus long). La variation des conditions opératoires a cependant peu d'influence sur l'activité des composés (l'emploi d'agent réducteur notamment n'a pas permis d'amélioration notable de l'efficacité de coupure).

Il faut également noter que l'activité de coupure sur le fragment 117-3' est beaucoup plus intense que sur le fragment HIV-Loop. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le fragment HIV-Loop est beaucoup plus court que le fragment 117-3', mais même une forte augmentation des concentrations des composés **9a-c** n'a pas permis de nette amélioration de l'activité.

IV. EXPERIENCES DE FOOTPRINTING

Les expériences de footprinting sont basées sur le principe que la présence d'une molécule capable de se lier à une séquence donnée d'un acide nucléique bloque l'accès de ce domaine de liaison à la nucléase qui ne peut donc pas induire de coupure à cet endroit. Ceci se visualise alors sur un gel de séquence obtenu après migration électrophorétique par une empreinte c'est-à-dire une zone d'absence de bandes de coupure. Pour être un bon agent de footprinting, la nucléase utilisée doit donc couper l'ADN de façon aléatoire, sans aucune spécificité. Comme nous l'avons vu précédemment, les composés testés **9a-c** sont capables d'induire des coupures non spécifiques d'un fragment d'ADN. Il paraît alors intéressant de tenter de les utiliser en tant qu'outils de footprinting potentiels.

Nous avons donc tenté d'utiliser les composés **9b** et **9c** en tant qu'agents de footprinting sur le fragment HIV-Loop. L'objectif est d'étudier la liaison à l'ADN-cible de deux types de composés, un oligonucléotide et un ligand du petit sillon, conçus pour interagir avec le fragment HIV-Loop au niveau de séquences spécifiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, deux types de molécules connues pour interagir spécifiquement avec l'ADN sont étudiées au Laboratoire de Biophysique : des oligonucléotides capables de former une triple hélice par association avec la double hélice d'ADN (TFO) d'une part, et des ligands du petit sillon de type oligocarboxamide (MGB) d'autre part. Le fragment HIV-Loop est en effet capable de former un triplex avec un oligonucléotide polypyrimidique 5'-TTT-TCT-TTT-CCC-CCC-T-3' (TFO). Celui-ci doit protéger la séquence, par formation d'une triple hélice, de la dégradation par le

dérivé du salène. La même séquence contient une région riche en adénines et thymines qui peut être reconnue par des ligands du petit sillon constitués de motifs de type *N*-méthylpyrrole (MGB).

1. Etude de l'interaction avec un TFO

Nous avons donc tenté d'étudier la protection du fragment modèle par un oligonucléotide LNA TFO (LNA pour "Locked Nucleic Acid"). Il s'agit d'un oligonucléotide comportant des riboses modifiés, les positions 2' et 4' de certains résidus ribose sont en effet reliées par un pont méthylénique (Figure 59). Cette modification permet de renforcer la stabilité du triplex formé avec le fragment d'ADN.

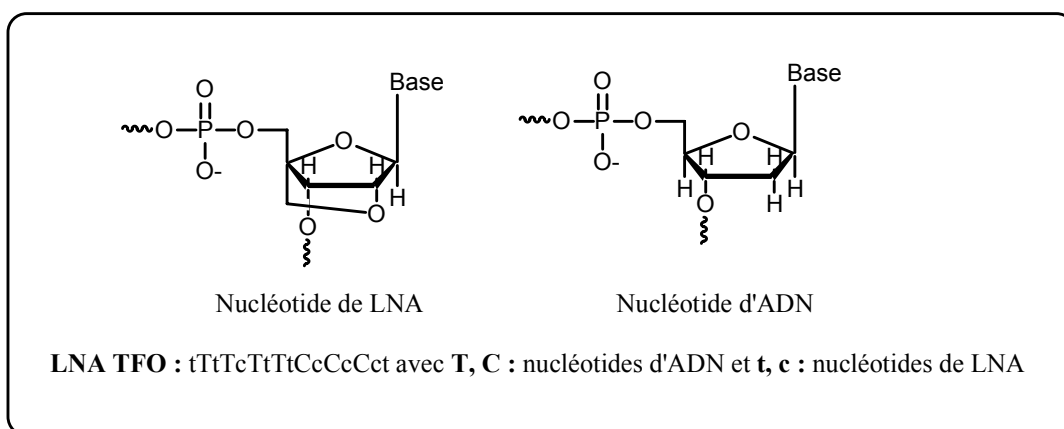


Figure 59 : Structure de l'oligonucléotide LNA TFO

Afin d'étudier cette interaction, le fragment modèle a donc été pré-incubé avec le TFO à tester avant d'être traité par les dérivés du salène. Plusieurs expériences ont été menées en faisant varier différents paramètres comme la concentration en LNA TFO, le pH (6 ou 7), l'emploi ou non d'un agent réducteur (DTT). Les résultats présentés Figure 60 correspondent à une concentration en TFO de 50 μM , et sont obtenus après 3 nuits d'incubation à température ambiante en présence des complexes **9b** ou **9c** (200 μM) et de DTT (400 μM), à pH 6 et à pH 7. La séquence du fragment HIV-Loop dénaturé est reportée à côté du gel, les adénines et les guanines sont indiquées en gras, et la cible double brin du TFO est soulignée (brins polypyrimidique et polypurique). Une protection par LNA TFO a bien été observée : on distingue en effet une zone d'absence de coupure, en présence de l'oligonucléotide modifié, noté (+) sur le gel, contrairement aux échantillons incubés sans LNA TFO, notés (-). Cette zone correspond bien à la

2. Etude de l'interaction avec un MGB

Les mêmes expériences ont été menées en remplaçant le TFO par un ligand du petit sillon "MGB (3+3)", hexa(*N*-méthylpyrrole)carboxamide (Figure 61). Selon les règles de reconnaissance découvertes par le groupe de Dervan (Chap. I.B.III.2.a page 29), ce ligand doit interagir avec la région riche en adénines et thymines de la cible et ainsi la protéger des coupures par les dérivés du salène. Là encore, différentes conditions opératoires ont été testées, par variation des concentrations, du pH ou encore du temps d'incubation. Cependant, quelles que soient les conditions employées, nous n'avons pu détecter de protection par le MGB testé. Il s'agit là encore vraisemblablement d'un problème d'équilibre dynamique entre les formes complexée et libre de l'ADN cible, le MGB ne se fixant pas très fortement et ne pouvant donc pas protéger efficacement l'ADN des coupures.

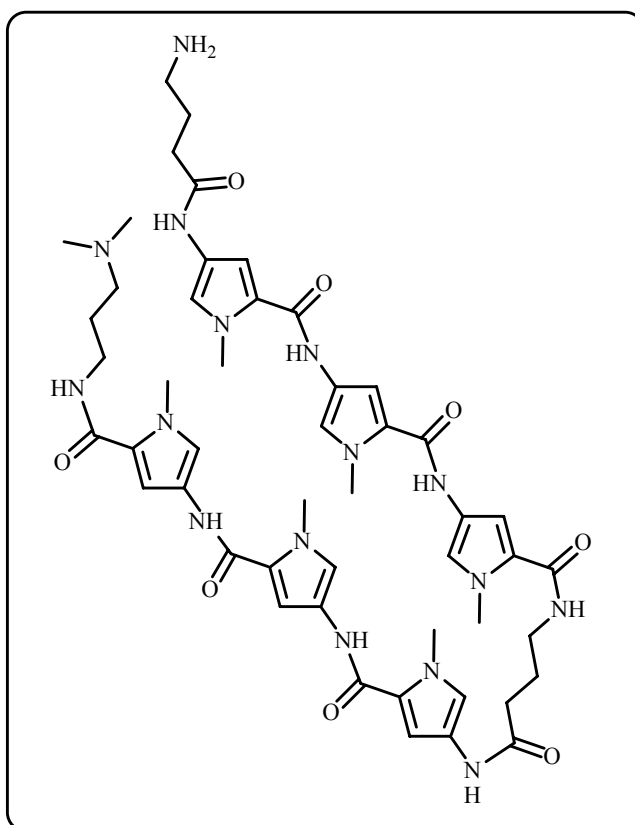


Figure 61 : Structure de MGB (3+3)

D. CONJUGAISON DES SALÈNES À CUIVRE À DES LIGANDS DE L'ADN

Outre leur utilisation en tant qu'agents de footprinting, les complexes **9a-c** ont également été conçus dans le but de pouvoir être greffés à des agents interagissant avec l'ADN. La chaîne latérale de chaque composé, par l'intermédiaire du groupement amino terminal, permet en effet l'association covalente à différents vecteurs. L'objectif de ce couplage est de cibler l'activité nucléasique au niveau de séquences particulières d'ADN. En effet, les composés ainsi obtenus possèdent à la fois une fraction affine pour l'ADN, capable de reconnaître des séquences spécifiques de cet ADN, ainsi qu'une fraction capable d'engendrer sa dégradation. De telles molécules hybrides s'inscrivent dans le cadre de la conception de nucléases artificielles présentant un degré de spécificité élevé, avec pour objectif la possibilité de contrôler l'expression de gènes choisis pour cibles. Le chapitre suivant décrit donc les tentatives de couplage des composés les plus actifs, **9b** et **9c**, à différents oligonucléotides capables de former une triple hélice avec le fragment HIV-Loop, ainsi qu'à des ligands du petit sillon reconnaissant les séquences riches en adénines et thymine de ce même fragment.

I. CONJUGAISON À UN OLIGONUCLEOTIDE FORMANT UNE TRIPLE HÉLICE

Les dérivés du salène ont été couplés à des oligonucléotides formant une triple hélice, dans le but de créer des agents de coupure spécifiques à la séquence, capables de couper l'ADN cible à la frontière entre les régions du duplexe et du triplex. La synthèse des conjugués a été limitée aux composés **9b** et **9c** (4 et 6 groupements méthyléniques dans la chaîne latérale), car ils se sont révélés les plus actifs dans les études de coupure d'ADN effectuées précédemment. Plusieurs TFO différents ont été greffés sur chaque composé : HIV-T (5'-TTT-TCT-TTT-CCC-CCC-T-3') et deux de ses dérivés comportant un bras espaceur (motifs éthylèneglycol) de longueur variable (Figure 62). Ainsi, la longueur du bras de liaison varie selon le complexe et l'oligonucléotide greffé. L'objectif d'une telle variation est d'obtenir la meilleure synergie possible entre les deux composantes de la molécule. En effet, si le bras de liaison est trop long par exemple, les deux entités risquent de perdre leur effet synergique et agir indépendamment l'une de l'autre.

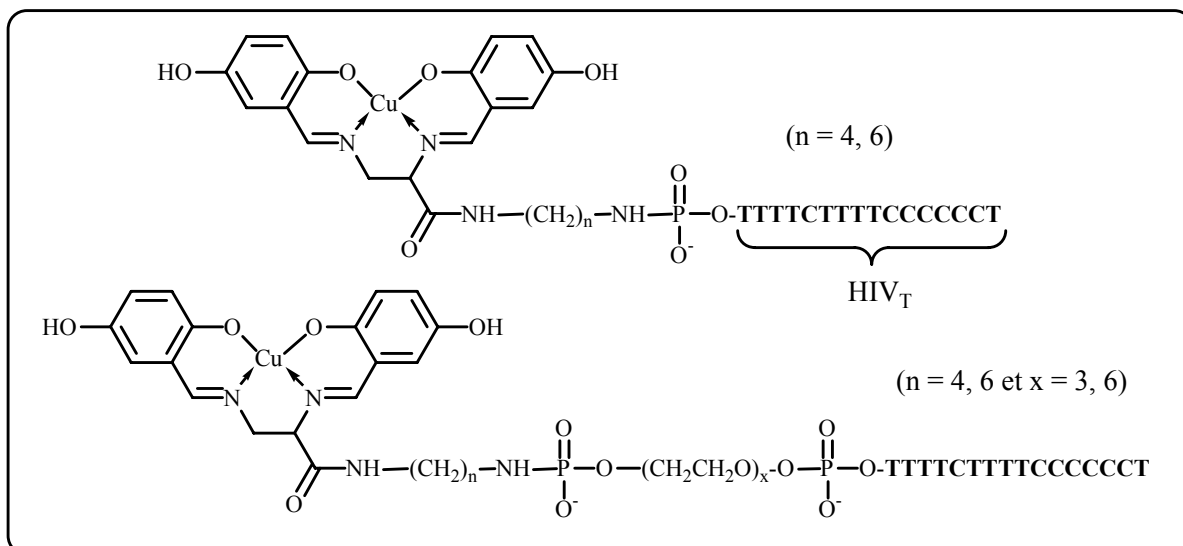


Figure 62 : Structures des conjugués des complexes **9b** et **9c** avec divers oligonucléotides

1. Méthode de couplage

L'oligonucléotide subit un traitement préalable qui permet de le rendre soluble dans les solvants organiques : il est précipité par une solution aqueuse de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB), jusqu'à neutralisation des charges. Il est en fait rendu hydrophobe par échange du contre-ion sodium de ses groupements phosphate par le tensioactif cationique CTA. Le couplage entre le groupement phosphate libre de l'oligonucléotide et la fonction amino terminale du dérivé du salène (Schéma 18) passe par l'activation du phosphate terminal par le disulfure de dipyridyle (PyS)₂ (aldriithiol™) et la triphénylphosphine (PPh₃) en présence de 4-(diméthylamino)pyridine (DMAP) dans le DMSO, suivie de l'interaction du phosphate activé avec le groupe amino du dérivé du salène en présence de triéthylamine (TEA). Les composés **9b** et **9c** étant sous forme de trifluoroacétate d'ammonium, l'ajout de triéthylamine permet de maintenir le milieu basique et de déprotoner les fonctions amine.

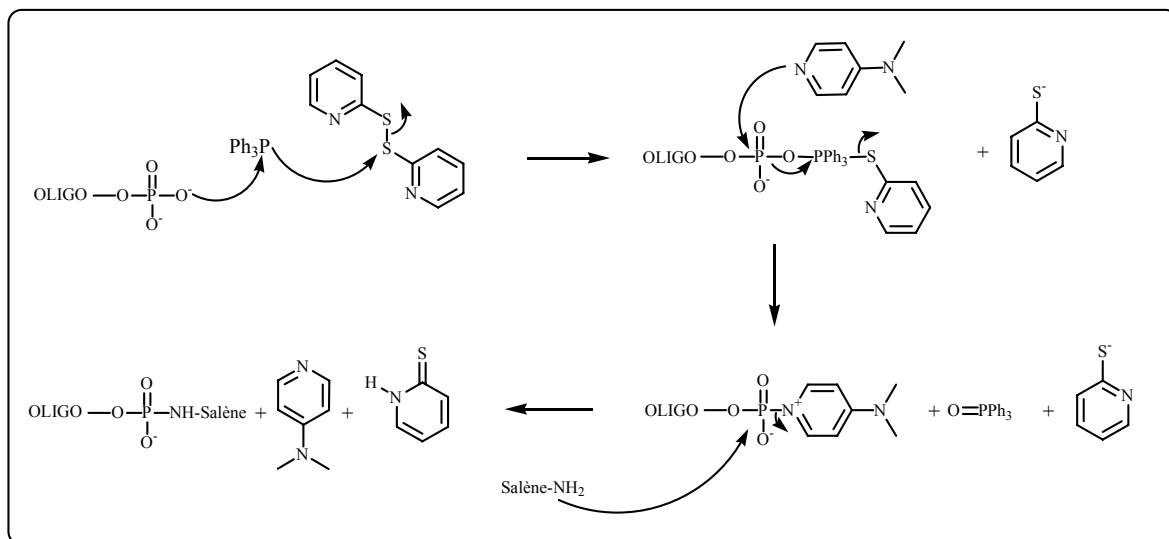


Schéma 18 : Mécanisme d'activation du phosphate terminal de l'oligonucléotide par le système $(\text{PyS})_2 / \text{PPh}_3 / \text{DMAP}$

La formation du conjugué est vérifiée par électrophorèse sur gel d'acrylamide et révélée par ombrage de fluorescence sous UV à 254 nm ("UV-shadow") : le conjugué migre moins loin sur le gel, en comparaison à l'oligonucléotide contrôle. La Figure 63 montre l'exemple du conjugué **9b**-HIV_TL3 ($x = 3$). On ne distingue pratiquement plus de trace de l'oligonucléotide de départ sur le gel. Les échantillons sont ensuite purifiés par HPLC. La concentration des conjugués dans l'eau est appréciée par spectrométrie d'absorption UV-Visible, à 260 nm ($\epsilon_{\text{conjugué}} = \epsilon_{\text{complexe}} + \epsilon_{\text{oligonucléotide}}$). Finalement, les différents conjugués sont récupérés avec des rendements moyens, de l'ordre de 50 %.



Figure 63 : Contrôle de la formation de (**9b**-HIV_TL3) sur gel d'acrylamide

Une fois les différents conjugués obtenus, nous avons voulu étudier les coupures produites par ces composés sur le fragment HIV-Loop.

2. Essai de coupure du fragment HIV-Loop par les conjugués

Le but de cette étude est de déterminer une éventuelle spécificité de coupure sur l'ADN cible double-brin (fragment HIV-Loop). Là encore, différentes conditions opératoires ont été testées : variations des concentrations, du pH, présence ou non d'agent réducteur (DTT), présence ou non d'acétate de cuivre. L'acétate de cuivre a été ajouté au cas où les dérivés saléniques se seraient décomplexés dans le milieu. Les résultats présentés ci-dessous (Figure 64 et Figure 65) correspondent à l'incubation de la boucle HIV-Loop à température ambiante pendant une nuit avec les différents complexes, conjugués ou non à un oligonucléotide (10 et 50 μM), en présence ou non de DTT (200 μM), à pH 6 (Figure 64) et à pH 7 (Figure 65).

Les gels obtenus montrent que les conjugués ne fournissent pas le résultat attendu, c'est-à-dire que l'on n'observe pas de coupure spécifique à proximité de la jonction entre le duplexe et le triplex, tout au moins dans les conditions testées. Au contraire, l'interaction entre le duplexe et le troisième brin, conjugué au complexe de cuivre du dérivé salénique, est assez inattendue. La présence du complexe semble induire une très forte agrégation avec le troisième brin qui n'a rien à voir avec le triplex attendu. Cette agrégation n'est même pas détruite dans le gel dénaturant qui contient pourtant de l'urée 7M, ce qui pose un problème de précipitation de l'ADN dans les puits de dépôt du gel d'acrylamide. Ce phénomène est plus marqué en présence des conjugués qu'en présence des complexes non conjugués, et il est également fortement accentué à pH 7 par rapport à pH 6, notamment en absence de DTT. Dans ce cas, on peut même déceler de nouvelles bandes qui apparaissent sur le gel, migrant moins loin que la boucle HIV-Loop elle-même, indiquant des phénomènes d'association entre différents brins d'ADN. La raison de ce comportement spécifique aux conjugués n'est pas claire et des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour comprendre la nature de cette agrégation.

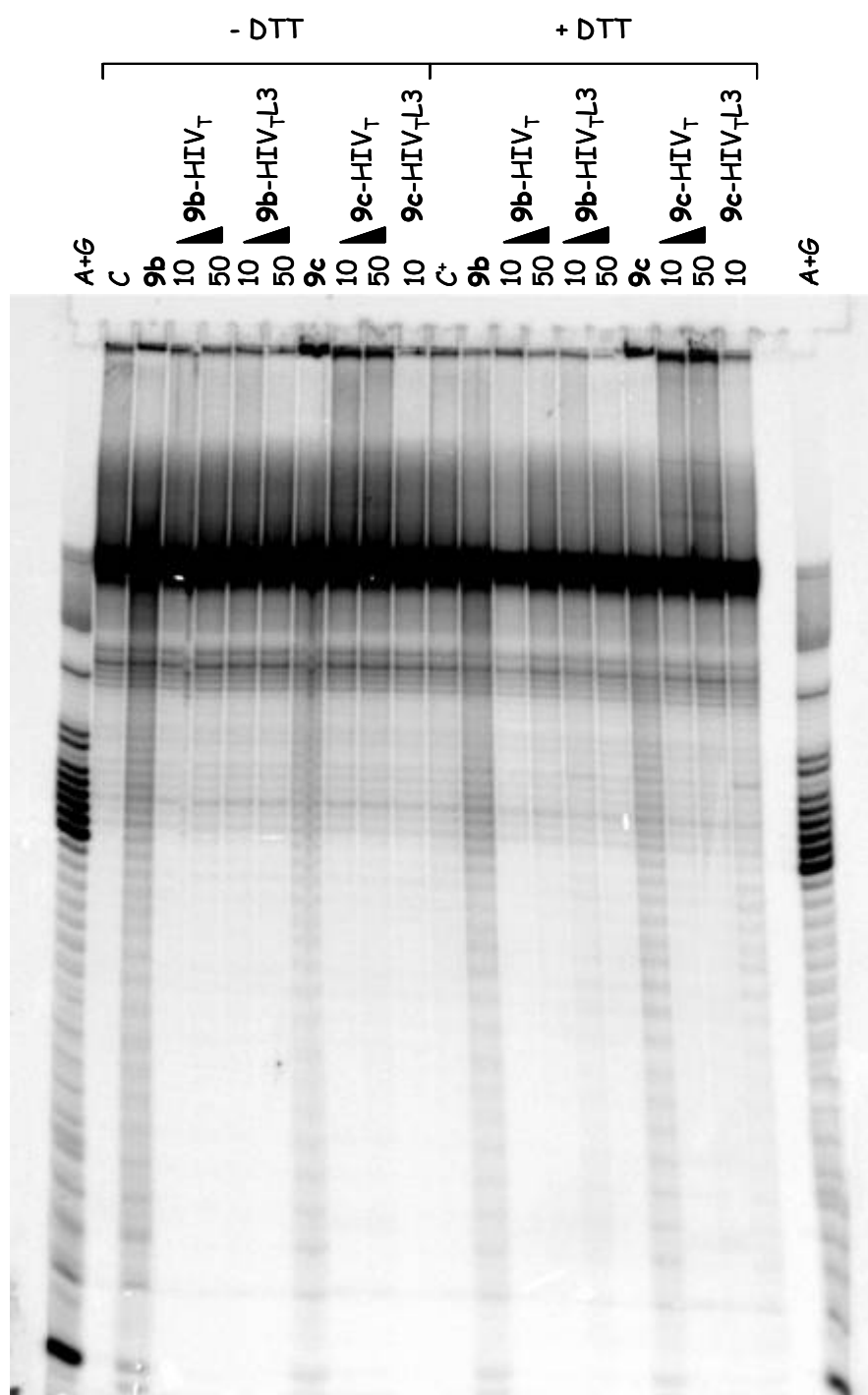


Figure 64 : Profil de coupure du fragment HIV-Loop par les complexes **9b-c** et leurs conjugués à différents oligonucléotides (après incubation à pH 6)

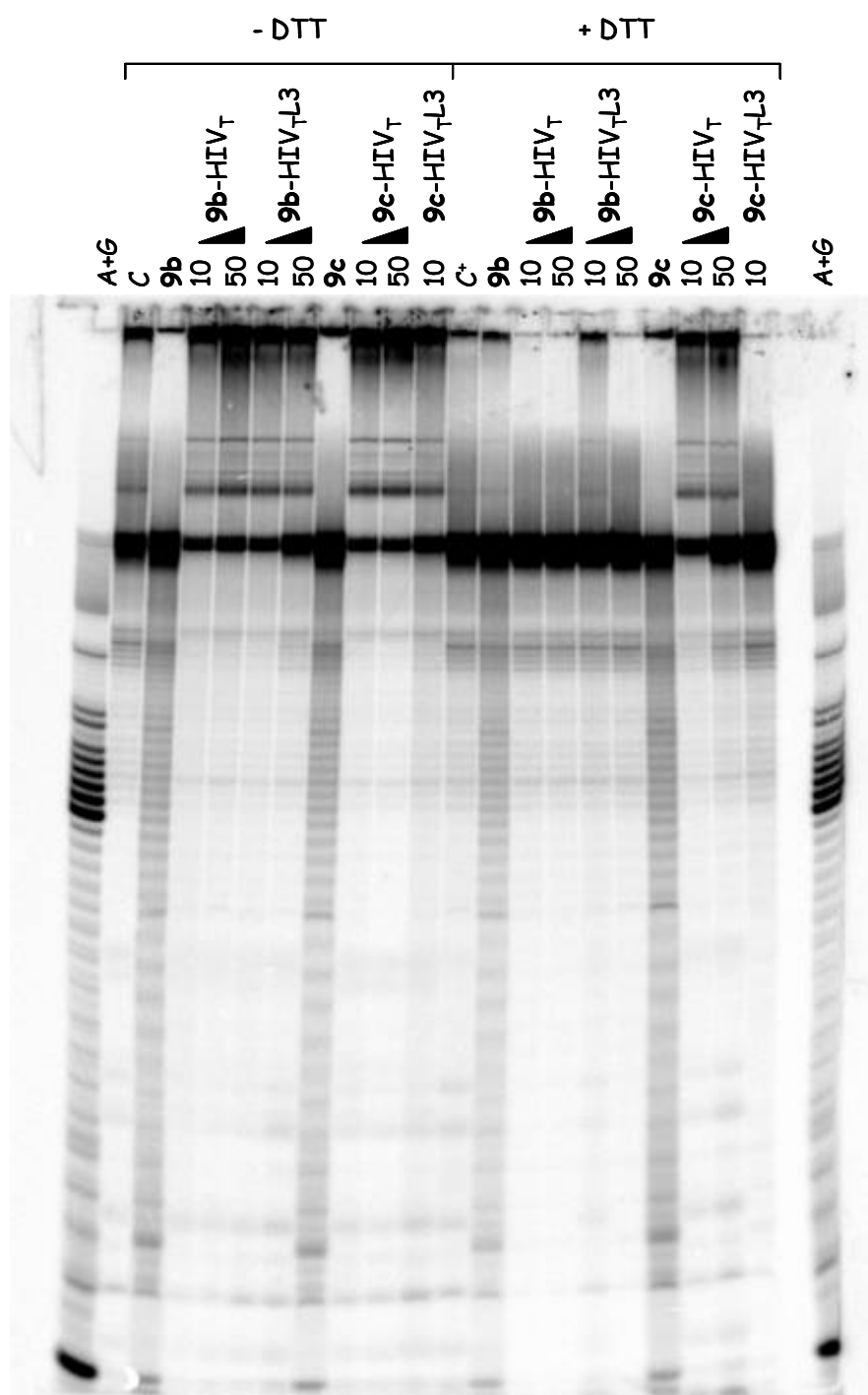


Figure 65 : Profil de coupure du fragment HIV-Loop par les complexes **9b-c** et leurs conjugués à différents oligonucléotides (après incubation à pH 7)

II. CONJUGAISON A UN LIGAND DU PETIT SILLON

Nous avons également tenté de coupler les dérivés du salène à des ligands du petit sillon de l'ADN, afin de synthétiser des agents spécifiques à la séquence, capables de couper l'ADN cible dans la région de la séquence riche en adénines et thymine. Les ligands du petit sillon employés sont de type oligocarboxamide et sont constitués de six ou huit unités *N*-méthylpyrrole ($\text{Boc}\gamma(\text{Py})_3\gamma(\text{Py})_3\text{COOH}$ ou $\text{Boc}\gamma(\text{Py})_4\gamma(\text{Py})_4\text{COOH}$), formant des structures en épingles à cheveux par l'intermédiaire de bras espaceur de type acide γ -aminobutyrique (γ). A titre d'exemple, la Figure 66 montre la structure de $\text{Boc}\gamma(\text{Py})_4\gamma(\text{Py})_4\text{COOH}$.

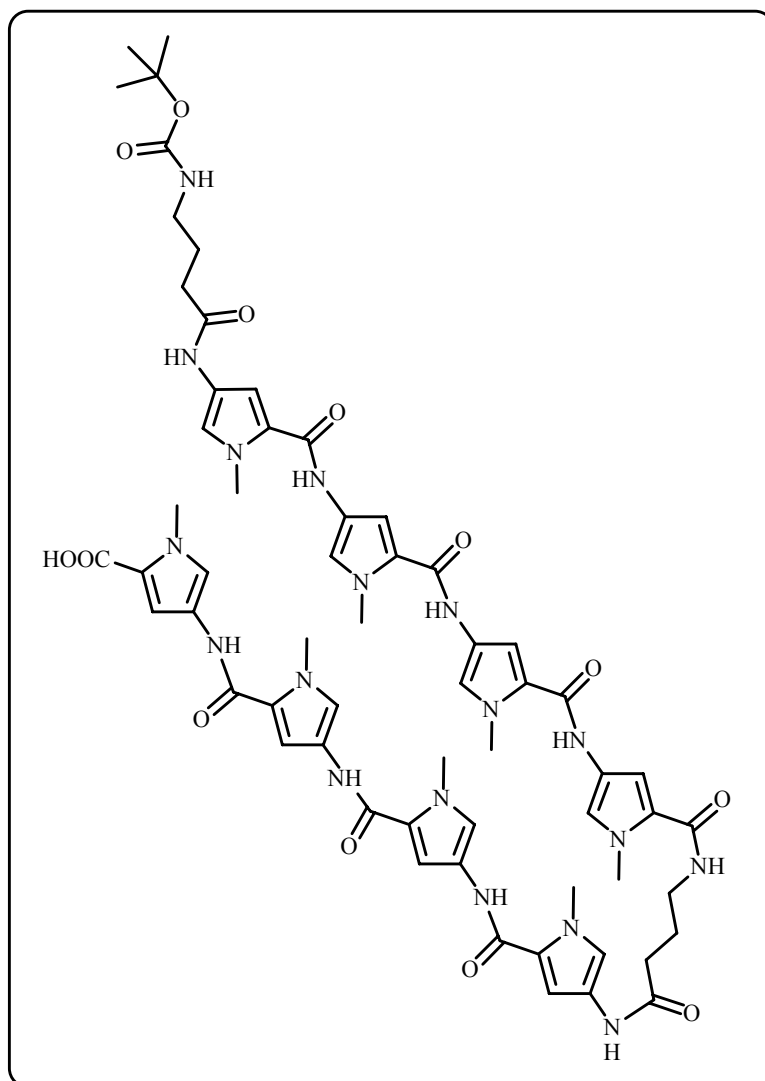


Figure 66 : Structure de $\text{Boc}\gamma(\text{Py})_4\gamma(\text{Py})_4\text{COOH}$

La fonction acide du ligand du petit sillon à greffer est activée par l'hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetra-méthyluronium (HATU, Schéma 19) dans le DMF et le couplage à nos dérivés saléniques s'effectue en présence de triéthylamine. D'autres conditions d'activation de l'acide ont également été testées, comme le système dicyclohexylcarbodiimide / hydroxybenzotriazole ou encore le réactif de Castro (BOP).

Chacune de ces méthodes a conduit à l'obtention de différents produits détectés sur CCM ainsi qu'en HPLC, mais finalement, l'analyse par spectrométrie de masse des différentes fractions collectées en HPLC n'a pas confirmé la présence des conjugués souhaités dans le mélange réactionnel. Cette question est actuellement en cours d'étude au laboratoire.

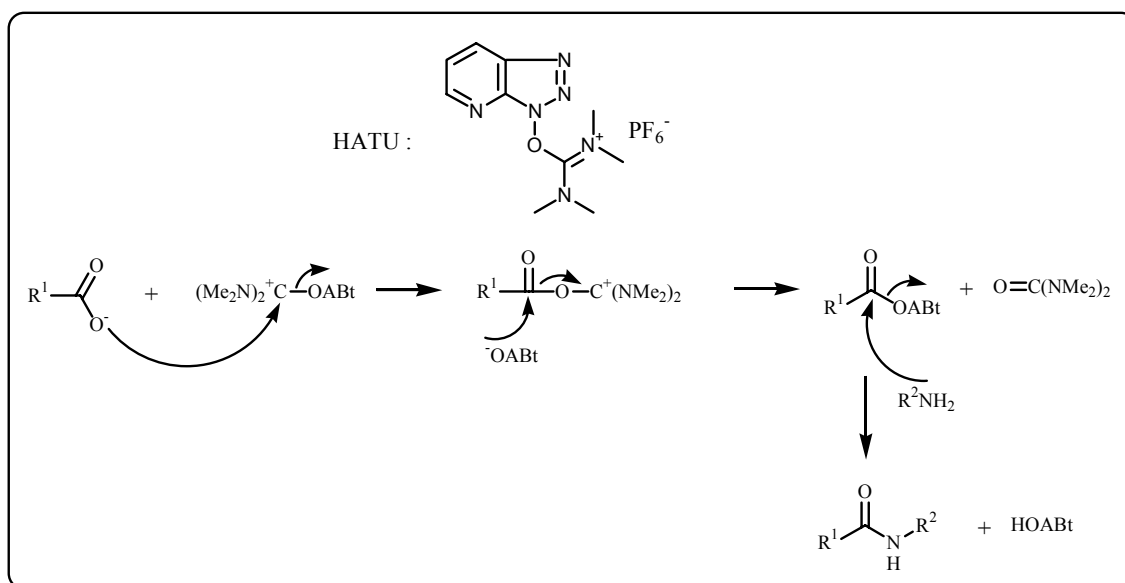


Schéma 19 : Formule et mécanisme d'action de l'agent de couplage peptidique HATU

CONCLUSION

Les salènes à cuivre fonctionnalisés **9a-c**, comportant une chaîne latérale de longueur variable ($n = 2, 4, 6$), sont obtenus sous forme de trifluoroacétate d'ammonium après une synthèse en 7 étapes. Ces composés, ainsi que les dérivés **8a-c** correspondants, dont la fonction amino terminale est protégée par un groupement Boc, ont été étudiés par RPE. Cette étude a permis de mettre en évidence la formation de structures dimériques, par association de deux ions cuivriques, au sein des différents composés. Ces structures sont observées pour tous les composés protégés **8a-c**, la distance entre les deux ions cuivriques augmentant avec le nombre d'atomes de carbone de la chaîne latérale. Pour les composés **9a-c**, le même phénomène est observé et l'interaction entre les deux ions Cu^{2+} devient de plus en plus lâche en fonction de l'augmentation de la longueur de la chaîne. L'effet pour cette série est plus marqué que pour la série des composés protégés. En effet, pour **9c** ($n = 6$), aucun dimère n'est détecté. Les structures des ions isolés diffèrent également selon les composés. Concernant les produits neutres **8a-c**, les ions cuivriques sont situés dans un environnement plan carré quelle que soit la longueur de la chaîne latérale. En revanche, pour la série des sels d'ammonium **9a-c**, une différence est observée en fonction du nombre de groupements méthyléniques de la chaîne latérale. Pour le composé **9a** ($n = 2$), la géométrie des ions cuivriques isolés reste plan carrée, comme pour les complexes **8a-c**. Pour **9b** ($n = 4$), le spectre de RPE apparaît comme la superposition de deux signaux, en plus du signal du dimère décrit précédemment. On retrouve, comme pour les autres composés, le signal caractéristique d'une géométrie plan carrée mais cette fois celui-ci coexiste avec un nouveau signal attribué à des ions se trouvant dans des sites à géométrie tétraédrique ou pyramidale à base carrée. Pour **9c** ($n = 6$), seul ce nouveau signal est observé. Ainsi, une chaîne latérale suffisamment longue, dotée d'une charge cationique à son extrémité, semble capable de modifier l'environnement de type plan carré généralement admis pour les complexes de cuivre des salènes.¹⁵¹

Les différents composés ont ensuite fait l'objet d'une étude biologique. Leur capacité d'interaction avec l'ADN a été étudiée par spectroscopie UV-Visible. Les composés **9a-c** ont révélé une meilleure capacité d'interaction par rapport aux composés **8a-c**. Cette observation s'explique vraisemblablement par la possibilité d'interaction électrostatique entre les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN et les charges cationiques des composés **9a-c**.

L'activité nucléasique des composés a également été étudiée par des expériences de coupure de plasmide. Dans ce modèle, en présence d'agent réducteur (MPA), tous les complexes **8a-c** et **9a-c** constituent d'excellentes nucléases chimiques. En revanche, en absence d'agent activateur, seuls les complexes **9a-c** se sont révélés véritablement efficaces. Les composés **9b** et **9c** notamment sont d'excellentes nucléases auto-activées. La différence d'activité entre les produits protégés et déprotégés est vraisemblablement due à une différence d'interaction avec l'ADN. En revanche, les différences d'activité observées en fonction de la longueur de la chaîne sont plus difficiles à expliquer mais peuvent cependant être reliées aux résultats obtenus en RPE. En effet, la formation de dimères d'ions Cu^{2+} semble avoir un effet défavorable sur l'activité nucléasique des composés. Ainsi, les composés **9b**, dont les ions cuivriques forment des paires relativement lâches, et **9c**, pour lequel aucune paire d'ions n'a été détectée, ont révélé la meilleure efficacité de coupure. La géométrie des ions cuivriques isolés peut également être mise en cause, puisque pour les composés les plus actifs, une géométrie de type tétraédrique ou pyramidale à base carrée a été décrite, contrairement à la géométrie plan carrée observée pour les composés **8a-c** et **9a**.

Quoiqu'il en soit, le modèle du plasmide superenroulé est un modèle très sensible pour déterminer l'activité nucléasique des composés. L'activité de coupure a donc également été testée sur des fragments d'ADN marqués au ^{32}P , sur gel de séquence. L'étude sur un fragment de 117-bp a permis de confirmer la bonne activité des complexes **9b** et **9c**, et de déterminer que la réaction de coupure s'effectue sans aucune spécificité : la distribution des coupures sur la molécule d'ADN est aléatoire, sans aucune préférence d'une séquence particulière. En revanche, sur un fragment plus court, HIV-Loop (boucle de 62 nucléotides), de moins bons résultats ont été obtenus. Dans ce modèle, l'efficacité des produits testés en tant que nucléases est beaucoup moins élevée. Nous avons néanmoins tenté de les utiliser comme agents de footprinting afin d'étudier une éventuelle protection de l'ADN cible des coupures par des molécules interagissant avec le grand ou le petit sillon de l'ADN : un oligonucléotide formant une triple hélice avec l'ADN cible (TFO) ou un ligand du petit sillon de type oligocarboxamide (MGB). Aucune protection n'a été observée par le ligand du petit sillon. Par contre, en ce qui concerne le grand sillon, la protection de la partie polypyrimidique du duplexe a été observée par un oligonucléotide LNA qui forme un triplex très stable avec l'ADN cible. Ainsi, on peut supposer que le dérivé du salène attaque l'ADN du côté du grand sillon, auquel cas le ligand du petit sillon n'est pas capable de le protéger. On peut également penser que le complexe entre l'ADN et ce ligand du petit sillon n'est pas assez stable, le

temps de résidence du ligand sur l'ADN est faible, ce qui ne lui permet pas d'empêcher le dérivé du salène de couper l'ADN.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la synthèse de conjugués entre les composés **9b**, **9c** et divers agents interagissant avec l'ADN. Nous avons notamment synthétisés des conjugués d'oligonucléotides. La formation de ces conjugués a été vérifiée sur gel d'acrylamide et ils ont été purifiés sur HPLC et obtenus avec des rendements satisfaisants. Les oligonucléotides utilisés dans la synthèse de ces conjugués forment des triplexes avec l'ADN cible polypurique. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à générer une coupure spécifique à la séquence sur l'ADN cible. L'interaction des conjugués avec le duplexe s'est traduite sur le gel d'acrylamide par une forte agrégation et la formation de produits dont la nature est inconnue, de poids moléculaire supérieur à celui du duplexe. Ces agrégats sont stables même dans les conditions de gel dénaturant (chauffage, urée 7 M). Dans aucun cas nous n'avons pu observer une coupure spécifique à proximité de la jonction entre le duplexe et le triplex. Il faut toutefois noter qu'il n'a pas été vérifié que les conjugués complexes de cuivre / oligonucléotides forment toujours des triplexes avec l'ADN cible. Seuls des tests sur les oligonucléotides non conjugués ont été effectués. Il paraît donc intéressant de s'assurer d'une bonne hybridation entre le duplexe et les différents conjugués, sur un gel retard par exemple, ou encore par des études de dénaturation thermique (dissociation du triplex puis du duplexe). En effet, un manque d'hybridation pourrait être à l'origine des résultats négatifs observés.

Nous avons également tenté de greffer des ligands du petit sillon de type oligocarboxamide au composé **9b**. Cette association passe par une réaction de couplage de type peptidique entre le groupement acide du ligand du petit sillon et le groupement amino terminal du composé **9b**. Plusieurs agents de couplage ont été testés pour activer cette réaction. Dans aucun des différents cas testés, l'analyse par spectrométrie de masse n'a confirmé la synthèse des conjugués attendus et les travaux seront continués.

CHAPITRE IV :
BIS-IMINES DERIVEES DU SALENE,
AGENTS POTENTIELS
DE LIAISON A L'ADN

Dans cette troisième et dernière partie de nos travaux, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au ligand salénique, nous avons cherché à le modifier afin d'obtenir de nouveaux composés capables d'interagir efficacement avec l'ADN. Tout en conservant la structure de base du salène, nous nous sommes éloignés du thème développé depuis quelques années au laboratoire, à savoir la conception de métallonucléases artificielles puisque les nouveaux composés ne comportent plus de métaux au sein de leur structure. Nous avons voulu nous orienter vers la conception de nouveaux agents de liaison à l'ADN et plus particulièrement vers des agents potentiellement capables de se loger dans le petit sillon.

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux ligands du petit sillon ont déjà été développés et certains d'entre eux ont révélé des propriétés anticancéreuses, antivirales, antibactériennes ou antiparasitaires intéressantes.⁸ Par exemple, certaines lexitropsines ont montré une activité contre le virus d'immunodéficience humaine de type 1 et 2. Le bérénil est utilisé en clinique comme antiparasitaire. Des analogues du bérénil ont révélé une activité contre les infections par *Pneumocystis carinii* et *Cryptosporidium parvuam in vivo*. Des conjugués Pt(II)-bérénil ont révélé une bonne activité contre les cellules leucémiques humaines HL60 et U-937. La pentamidine est utilisée contre la pneumonie induite par *P. carinii* chez les individus infectés par le VIH, sujets à haut risque pour cette infection. Le dérivé Pt-pentamidine a montré une importante activité antiproliférative contre les cellules de poumon et les lignées cancéreuses de mélanome. La néothramycine, un analogue de l'anthracycline, est utilisée en clinique dans le traitement du carcinome superficiel de la vessie.

La conception et la synthèse de ligands du petit sillon de l'ADN constitue donc un sujet de recherche qui s'étend rapidement et a conduit à la découverte de composés utilisés en clinique ou en essais cliniques.⁸ La découverte de nouvelles molécules, potentiellement capables d'être développées en tant que médicaments antiviraux ou antitumoraux, reste donc un challenge important à l'heure actuelle. Dans ce cadre, nous nous sommes donc intéressés à la synthèse de ligands potentiels du petit sillon dérivant du salène. Dans la littérature,⁶⁻⁹ les critères de base de la plupart des ligands du petit sillon regroupent :

- une structure en forme de croissant compatible avec le rayon de courbure du petit sillon de l'ADN,
- une structure constituée de cycles aromatiques pouvant contenir des hétéroatomes,

- des charges cationiques capables de former des interactions électrostatiques avec les groupements phosphate de l'ADN,
- des atomes donneurs et accepteurs de liaisons hydrogène.

La structure du salène a donc été modifiée (Figure 67) pour répondre à ces critères. Un cycle aromatique a été introduit au niveau de la fraction éthylènediamine. La position des substitutions au niveau de ce cycle varie, ce qui permet de moduler le rayon de courbure des différents composés afin de déterminer la courbure optimale pour une bonne affinité avec l'ADN. Les groupements hydroxyle du salène ont été remplacés par une chaîne alkoxy, dont la position varie également sur les deux cycles aromatiques latéraux, de façon symétrique, toujours dans le but de modifier le rayon de courbure de la molécule finale. Ces chaînes alkoxy comportent à leur extrémité une charge cationique, importante pour l'interaction avec les groupements phosphate de l'ADN.

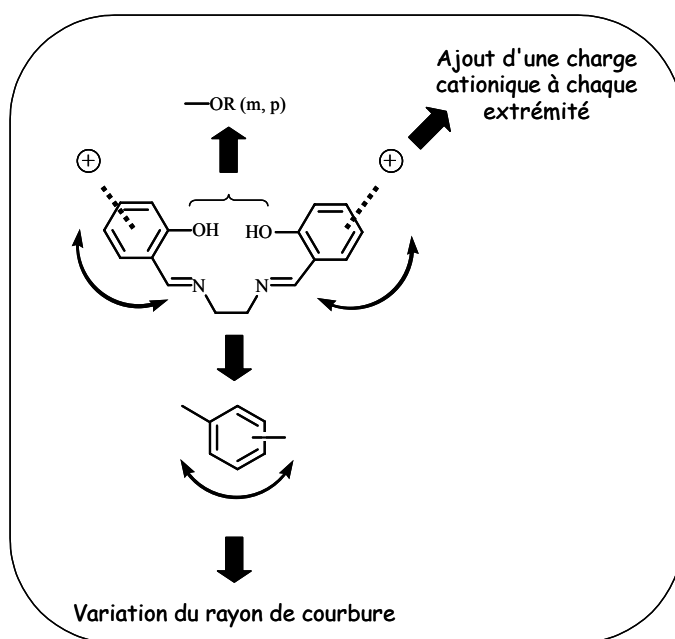


Figure 67 : Modifications de la structure du salène

Les produits synthétisés s'inspirent notamment de composés comportant un motif central de type téréphthalamide, isophthalamide ou stilbène, ainsi qu'un hétérocycle sous forme d'ammonium quaternaire à chacune de leurs extrémités (Figure 68).⁹

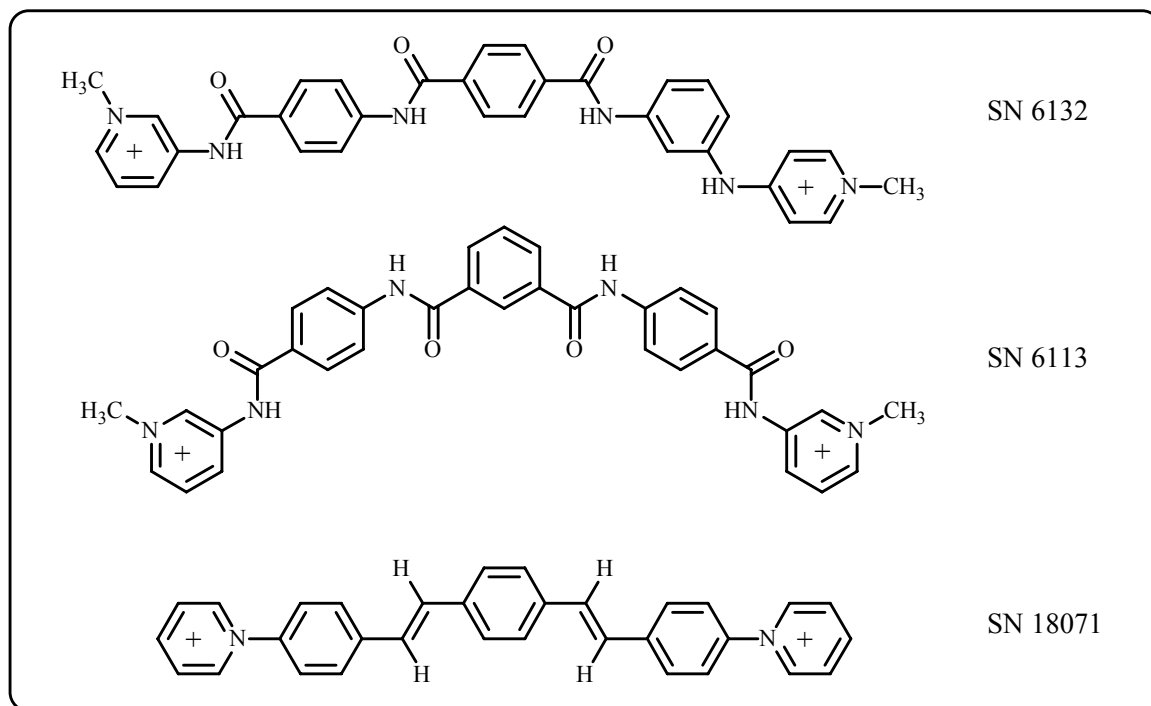


Figure 68 : Structures des composés SN 6132, SN 6113 et SN 18071

Les liaisons amide $-CONH-$ ou éthylénique $-CH=CH-$ sont remplacées, en ce qui concerne nos composés, par les liaisons imine $-CH=N-$, ce qui nous permettra d'apprécier l'importance de la présence des hétéroatomes pour la liaison à l'ADN. Les dérivés de type iodure de *N,N'*-bis[(2-triméthylammonium-éthoxy)benzylidène]benzènediamine **16-19** que nous avons synthétisés sont présentés Figure 69. L'étude de l'interaction avec l'ADN de chacun des différents isomères de position ainsi préparés permettra d'apprécier la courbure la plus favorable pour une interaction optimale.

Le chapitre qui suit décrit donc la synthèse des composés **16-19** ainsi que l'étude de leur interaction avec l'ADN.

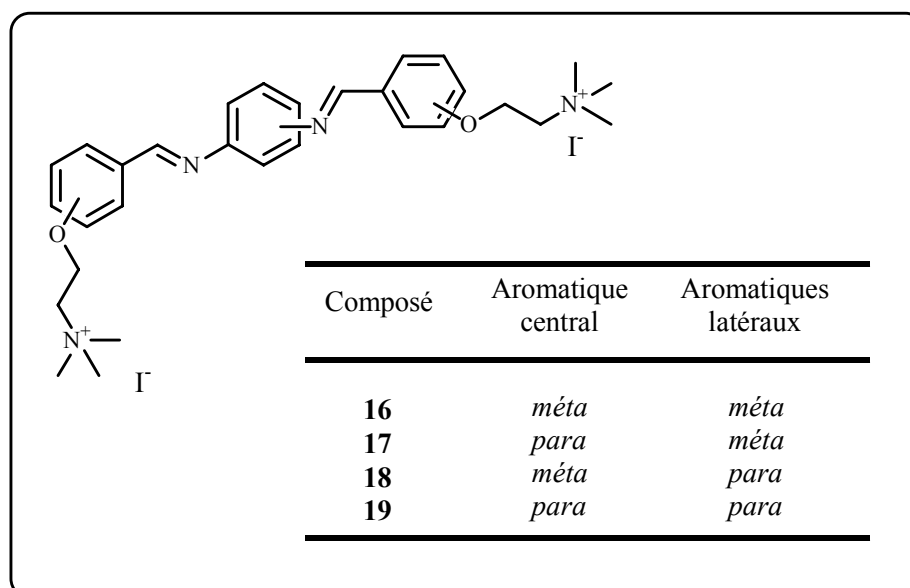


Figure 69 : Structure des composés 16-19

A. SYNTHÈSE DES IODURES DE *N,N'*-BIS[(2-TRIMETHYL-AMMONIUM-ETHOXY)BENZYLIDÈNE]BENZÈNEDIAMINE

Les composés **16-19** sont obtenus en trois étapes à partir du 3- (ou 4-) hydroxybenzaldéhyde et de la *méta*-(ou *para*-)phénylènediamine selon le Schéma 20.

Dans la première étape, le 3- (ou 4-)hydroxybenzaldéhyde est alkylé par le chlorure de 2-diméthylaminoéthyle. Généralement, les réactions d'alkylation s'effectuent dans l'acétone¹⁵² ou le DMF¹⁵³ en présence de carbonate de potassium. Cependant, en présence de K₂CO₃, on risque d'obtenir le produit de crotonisation entre le 3- (ou 4-)hydroxybenzaldéhyde et l'acétone. C'est pourquoi les manipulations ont été conduites dans le DMF. Le 3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzaldéhyde **10** et le 4-(2-diméthylaminoéthoxy)benzaldéhyde **11** sont obtenus avec des rendements respectifs de 43 et 57 %.

La deuxième étape correspond à la condensation entre les alkoxybenzaldéhydes obtenus précédemment et la 1,3- ou 1,4-phénylènediamine. La formation de bases de Schiff à partir de diamines aromatiques du type 1,3- ou 1,4-phénylènediamine est peu décrite dans la littérature.^{154, 155} Les condensations sont généralement décrites dans le benzène,^{156, 157} dans le méthanol¹⁵⁸ ou dans l'éthanol.¹⁵⁹ Un mode opératoire a également été décrit dans le THF.¹⁶⁰ Nous avons décidé d'effectuer la réaction soit dans l'éthanol absolu sous agitation à reflux pendant 1 h,¹⁵⁹ soit dans le toluène avec un montage de type Dean-Stark¹⁵⁷ pendant 2 h. Les *N,N'*-bis[(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]-benzènediamines **13** à **15** sont obtenues avec des rendements moyens (64, 54 et 41 % respectivement). Le composé **12** n'est obtenu qu'avec un rendement de 19 %.

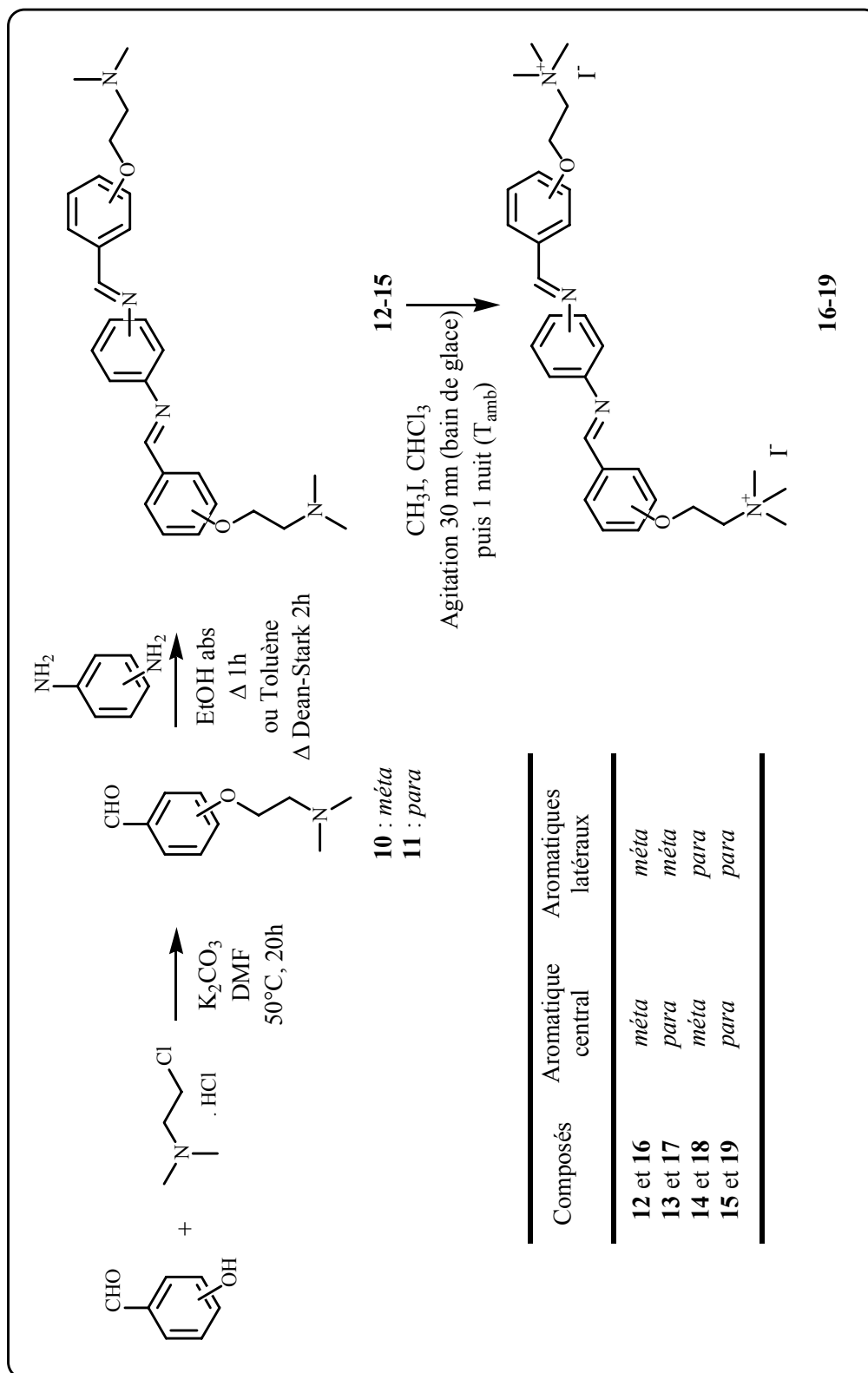


Schéma 20 : Synthèse des produits 16-19

Enfin, dans la dernière étape, les deux atomes d'azote terminaux des *N,N'*-bis[(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzènediamines **12-15** obtenues précédemment sont salifiés pour fournir une charge cationique à chaque extrémité des molécules. Cette réaction ne peut être effectuée par HCl, les liaisons imines étant fortement sensibles aux conditions acides, c'est pourquoi nous avons choisi l'iodure de méthyle. Les produits finaux **16-19** sont donc obtenus sous forme d'iodures d'ammonium (iodures de *N,N'*-bis[(2-triméthylammonium-éthoxy)benzylidène]benzènediamine). Dans la littérature, la synthèse de sels d'ammonium quaternaires obtenus par réaction d'une amine tertiaire avec CH₃I est décrite dans l'éthanol, le méthanol ou encore dans l'éther.^{161, 162, 163, 164, 165} Les composés **12-15** étant solubles à froid dans le chloroforme, nous avons appliqué à la synthèse de nos produits un des modes opératoires décrit dans la littérature,¹⁶¹ en remplaçant l'éthanol par le chloroforme. Les *N,N'*-bis[(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzènediamines sont donc solubilisées dans CHCl₃ et réagissent avec un excès d'iodure de méthyle. Les iodures d'ammonium **16, 17** et **19** sont obtenus avec des rendements corrects de 70, 51 et 84 %. En revanche, nous ne sommes pas parvenus à récupérer le composé **18** : un pic attribuable à une fonction aldéhyde α , en effet, été détecté en RMN indiquant une dégradation possible des liaisons imine.

B. ETUDE DES BIS-IMINES PAR RMN

Les composés **12-15** ont été étudiés par résonance magnétique nucléaire, afin de déterminer la stéréoisomérie *Z* ou *E* des liaisons imine. Les différents spectres ont été enregistrés sur un appareil Brüker DPX 300, au Service Commun de Physico-Chimie de l'Université de Lille 2. Le but de cette étude est de repérer les interactions dipolaires, c'est-à-dire les interactions dans l'espace entre les différents protons de la molécule, et plus particulièrement les protons qui sont en interaction dipolaire avec le proton de la liaison imine. Selon les protons en interaction dipolaire, il est possible de déterminer si les différents composés sont des stéréoisomères *Z* ou *E*. La Figure 70 montre deux structures possibles pour le composé **15** (liaisons imine *Z* ou *E*).

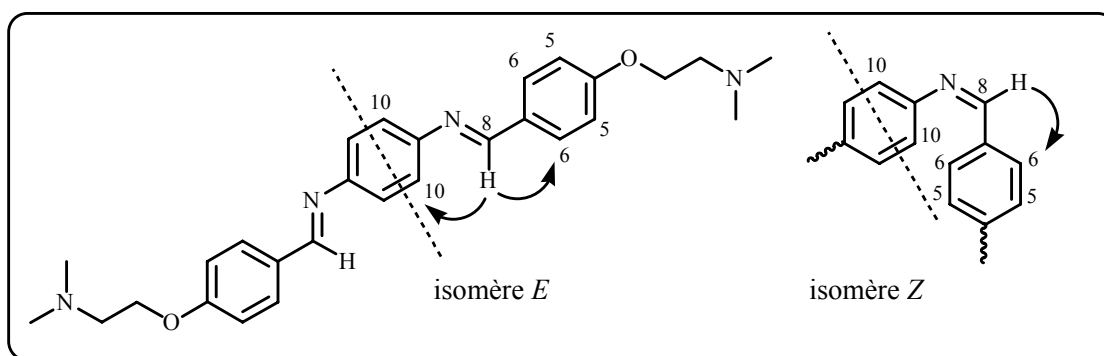


Figure 70 : Isomères *Z* et *E* du composé **15**

La description détaillée des spectres de RMN ^1H et ^{13}C des différents composés figure dans la partie expérimentale. Les numéros indiqués pour les protons qui nous intéressent correspondent à ceux utilisés dans la partie expérimentale pour l'attribution des différents pics. Ainsi, on devrait observer dans le cas de l'isomère *E* une interaction dipolaire entre le proton 8 (imine) et le proton 6, mais aussi entre le proton 8 et le proton 10. En revanche, en ce qui concerne l'isomère *Z*, seule l'interaction dipolaire avec le proton 6 doit être observée, l'interaction avec le proton 10 n'étant plus possible. De plus, dans ce cas, on devrait également observer des interactions dipolaires entre les différents protons des cycles aromatiques, contrairement à l'isomère *E*.

L'enregistrement du spectre de RMN du proton de chaque composé permet de repérer le pic correspondant aux protons des fonctions imine (vers 8,4 ppm). En irradiant de façon sélective ce signal (expérience de ROESY sélectif), on obtient un nouveau spectre, dans lequel ce signal apparaît en négatif et les signaux correspondant aux protons en interaction dipolaire avec le proton irradié apparaissent en positif. Les

autres signaux n'apparaissent plus, ou uniquement sous forme d'un petit signal résiduel en dispersion. La Figure 71 présente les spectres obtenus pour le composé **15**.

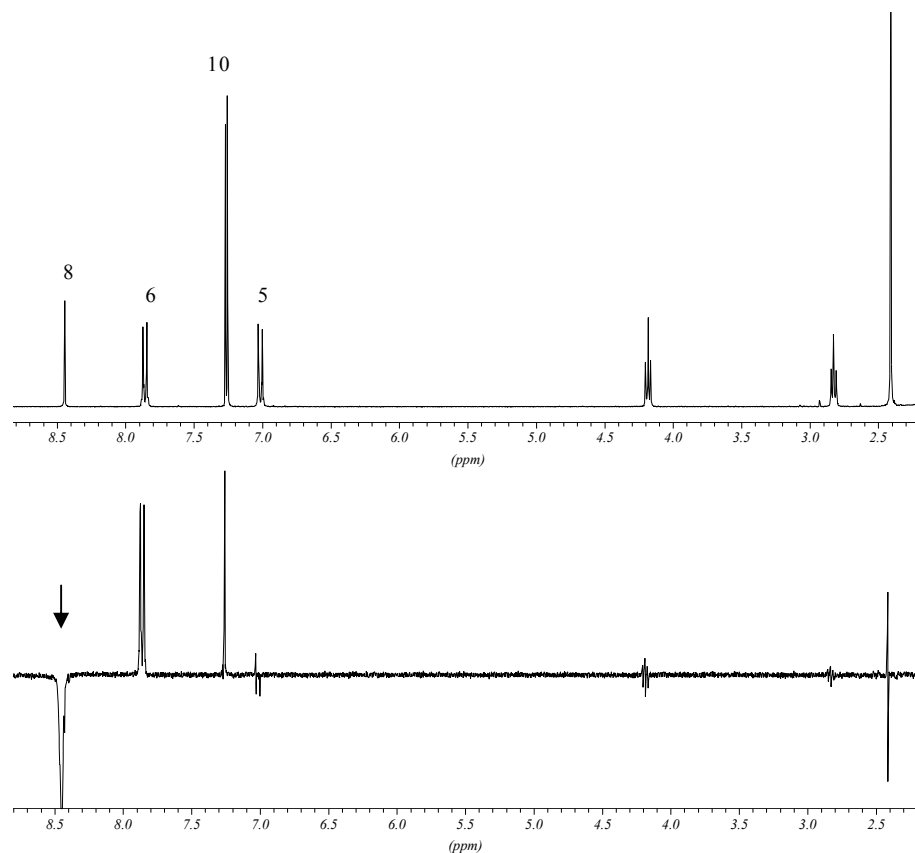


Figure 71 : Spectres RMN ^1H (haut) et ROESY sélectif (bas) du composé **15**

Ainsi, lorsque l'on irradie le signal correspondant au proton 8 de l'imine, on n'observe plus que les signaux correspondants aux protons 6 et 10. Cela signifie que le proton de la fonction imine est en interaction dipolaire à la fois avec le proton 6 et le proton 10. Ce résultat est donc en faveur d'une isomérisation *E*. De plus, il a été vérifié par des expériences de RMN à deux dimensions (ROESY 2D) qu'il n'y a pas d'interaction dipolaire entre les protons aromatiques (non présenté).

Les mêmes résultats ont été obtenus pour tous les composés : l'isomérisation *E* a pu être déterminée dans chaque cas. Le Tableau 11 liste les interactions dipolaires observées pour chaque composé.

	Composé	Interaction dipolaire
12		10-5 10-7 10-8 10-12 10-14
13		10-5 10-7 10-8 10-12
14		8-6 8-10 8-12
15		8-6 8-10

Tableau 11 : Interactions dipolaires avec le proton de la fonction imine

C. INTERACTION DES BIS-IMINES AVEC L'ADN

Nous avons testé la capacité des iodures d'ammonium ainsi que des composés neutres correspondants à interagir avec l'ADN. Pour cela, trois techniques ont été utilisées : la spectroscopie d'absorption UV-Visible, la dénaturation thermique et la technique de footprinting.

I. ETUDE PAR SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION UV-VISIBLE

L'interaction avec l'ADN a tout d'abord été étudiée par spectroscopie UV-Visible. Les spectres de chaque composé sont enregistrés dans une solution tampon BPE (20 μM), puis on enregistre à nouveau les spectres des composés en présence de quantités croissantes d'ADN de thymus de veau (jusqu'à une concentration finale de 200 μM). L'ADN est ajouté systématiquement dans la cuve contenant le produit à tester ainsi que dans la cuve de référence. Ces titrations nous permettent d'observer des variations de l'allure des spectres des différents composés en présence d'ADN. La Figure 72 présente les spectres obtenus pour les composés **15** et **19**, pour lesquels les effets observés sont les plus marqués. On constate que la présence de quantités croissantes d'ADN induit un effet hypochrome (diminution de l'absorbance) pour des longueurs d'onde supérieures à environ 300 nm ainsi qu'un effet hyperchrome (augmentation de l'absorbance) pour les longueurs d'onde inférieures. Ces effets sont significatifs d'une interaction des composés testés avec l'ADN. Les différents spectres d'absorption se croisent en un point isosbestique, indiquant une interaction homogène entre chaque composé et l'ADN.

Les effets observés pour le composé neutre **15** et celui sous forme de sel **19** sont sensiblement les mêmes, ainsi le composé neutre est tout aussi capable d'interagir avec l'ADN. Ceci s'explique par le fait que la valeur du pH du tampon BPE (7,1) est telle que les amines tertiaires se protonent dans le milieu ($\text{pK}_a[\text{R}_3\text{NH}^+/\text{R}_3\text{N}] \approx 10$). Les composés **12-15** peuvent donc aussi établir des liaisons ioniques avec les charges négatives de l'ADN.

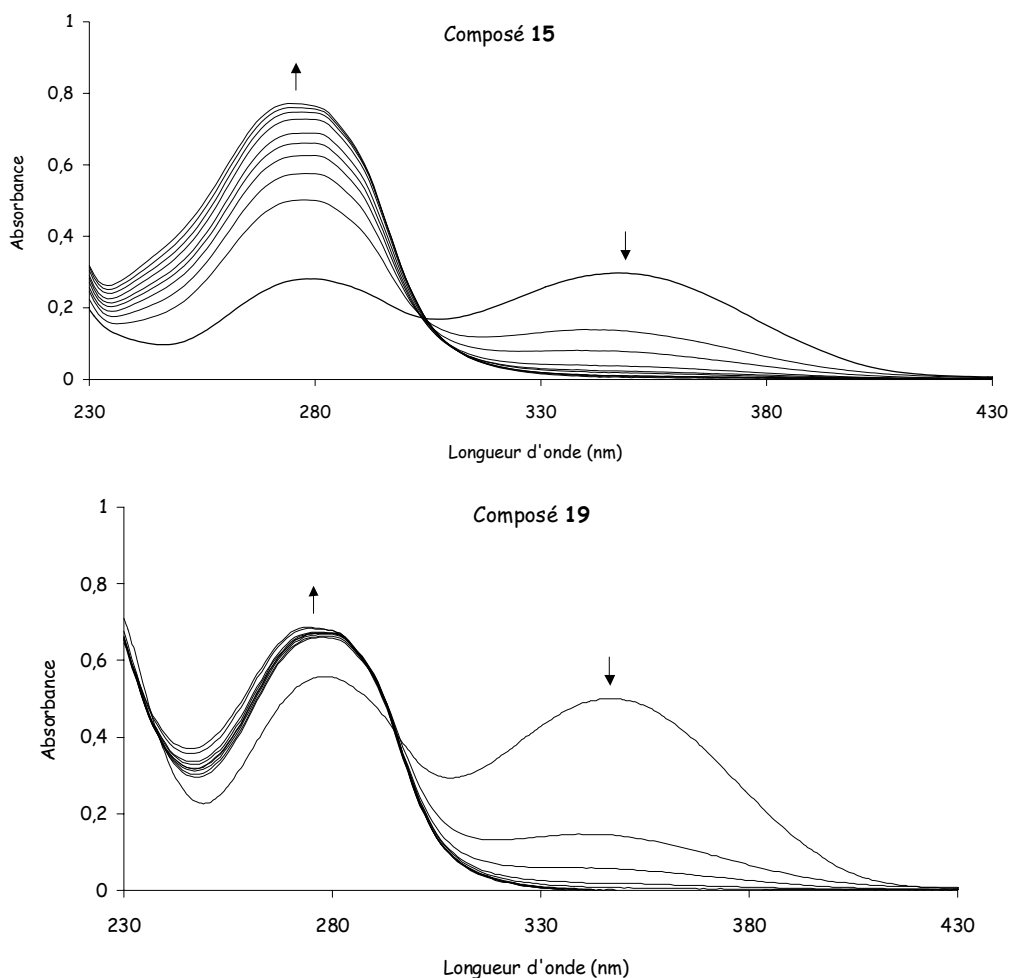


Figure 72 : Evolution des spectres des composés **15** et **19** en présence d'ADN

Le même type d'effet a été observé pour tous les composés testés. Le Tableau 12 regroupe les spectres observés en absence et en présence d'ADN (200 μ M) pour les quatre composés neutres **12-15** ainsi que pour les iodures d'ammonium obtenus **16, 17** et **19**. Dans ce tableau, les composés sont classés qualitativement selon leur capacité décroissante à interagir avec l'ADN : (**15** \approx **19**) > (**14** \approx **13** \approx **17**) > (**12** \approx **16**).

A la vue de ces résultats, il semblerait donc que les composés présentant la meilleure interaction avec l'ADN soient ceux dont toutes les substitutions sont positionnées en *para* (composés **15** et **19**). Les composés **12** et **16**, dont toutes les substitutions sont en *mé*ta, semblent en revanche moins efficaces.

Iodures d'ammonium

Composés neutres

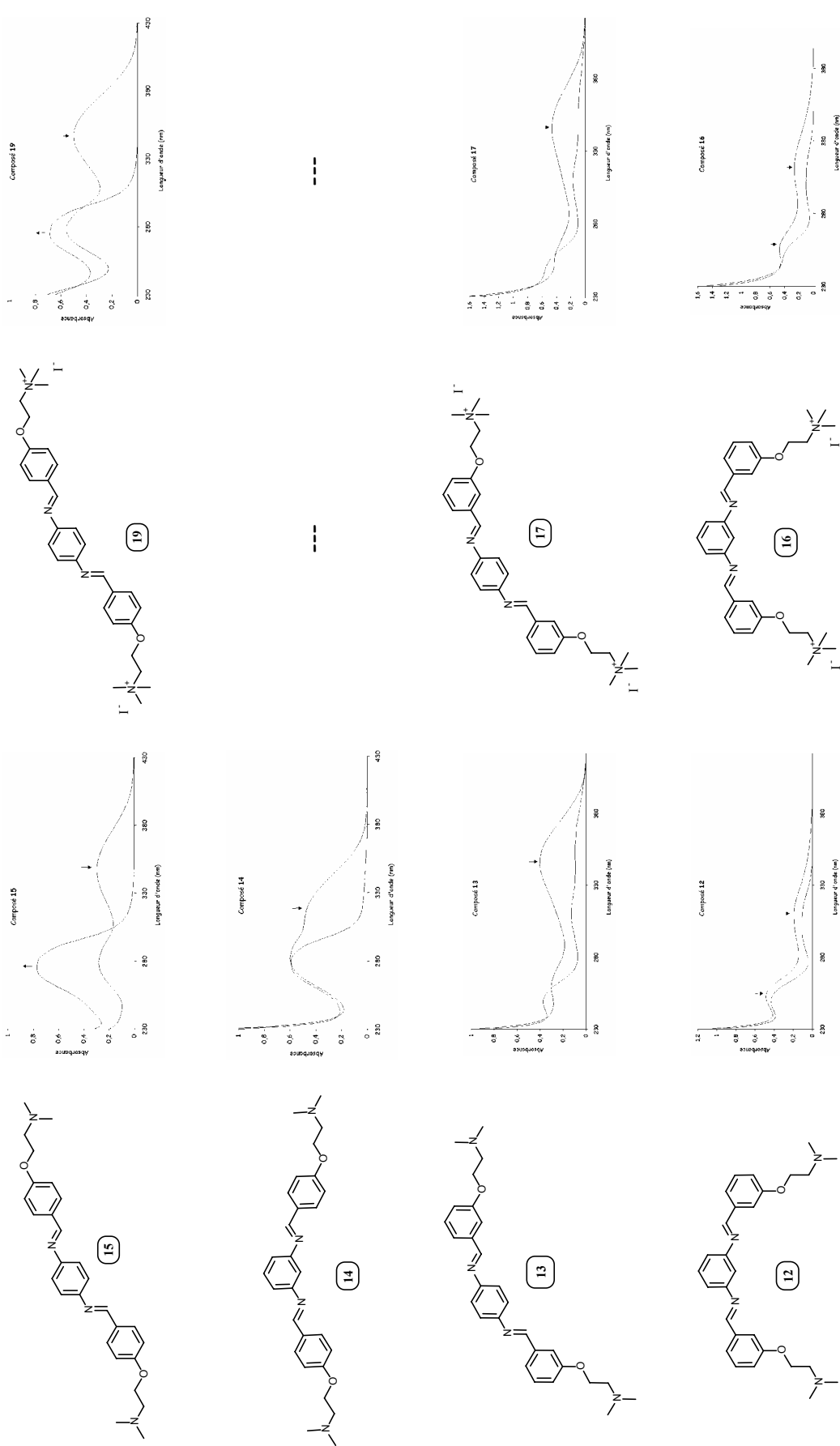


Tableau 12 : Spectres des différents composés en absence et en présence d'ADN

II. ETUDE PAR LA TECHNIQUE DE DENATURATION THERMIQUE

Nous avons voulu vérifier si les composés sont capables de stabiliser l'ADN vis-à-vis de la dénaturation thermique. Pour cela on détermine la température de fusion d'un ADN en absence et en présence des composés à tester, ce qui nous permet d'estimer la différence ΔT_m . Les tests ont été menés sur deux types d'ADN, de l'ADN de thymus de veau ($T_m \approx 64^\circ\text{C}$) d'une part et un polynucléotide poly(dA-dT) ($T_m \approx 44^\circ\text{C}$) d'autre part. Aucune valeur significative de ΔT_m n'a été obtenue pour les composés testés et ce quel que soit le type d'ADN étudié. Les températures de fusion des différents ADN sont en effet quasiment identiques en absence ou en présence des composés **12-15** ou **16, 17** et **19**. Ce résultat, *a priori* en contradiction avec les résultats obtenus en spectroscopie d'absorption UV-Visible, peut s'expliquer par le fait qu'un ligand peut interagir avec l'ADN sans pour autant le stabiliser de façon significative vis-à-vis de la dénaturation thermique, ce qui explique les valeurs de ΔT_m pratiquement nulles obtenues. Par ailleurs, nous avons voulu vérifier si les composés restent stables lorsque la température augmente. Les spectres UV-Visible des produits avant et après chauffage à 100°C , dans les mêmes conditions que dans les études de dénaturation thermique, sont complètement différents. Ce résultat laisse donc présager une dégradation des composés due à l'augmentation de température et permet également d'expliquer les résultats négatifs obtenus par cette technique.

III. ETUDE PAR LA TECHNIQUE DE FOOTPRINTING

Cette technique, également appelée technique d'empreinte à la DNase I, correspond à la digestion d'un ADN par une nucléase enzymatique, la DNase I, en présence de composés interagissant avec l'ADN. La DNase I est une nucléase non spécifique et coupe de façon aléatoire le fragment d'ADN. Les zones correspondant aux zones d'interaction d'un ligand éventuel avec l'ADN se traduisent sur un gel d'acrylamide par des zones d'empreintes c'est-à-dire des zones d'absence de coupure. En effet, l'ADN est protégé de la DNase I par le ligand, ainsi l'enzyme ne peut pas couper l'ADN au niveau de ces sites d'interaction avec le ligand. Cette technique permet donc de déterminer l'éventuelle spécificité d'interaction des composés pour certaines séquences particulières de l'ADN.

L'ADN utilisé pour ce test est un fragment d'ADN de 117 paires de bases marqué au ^{32}P à son extrémité -3' (fragment 117-3'). Les composés testés à des concentrations de 5, 10 et 20 μM sont d'abord mis à incuber 15 mn avec l'ADN, puis la digestion

enzymatique est initiée par ajout de la DNase I. Le résultat de la digestion est analysé par électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes. Le gel obtenu est représenté Figure 73. Aucune zone d'empreinte n'est détectée pour les composés testés. On ne note en effet aucune modification de l'activité DNasique en comparaison aux échantillons de contrôle, notés C sur le gel (ADN seul, sans composé à tester, en présence de DNase I). On peut alors supposer que l'affinité des divers composés pour l'ADN n'est pas suffisamment forte pour le protéger de la coupure par la DNase I et aucune spécificité de reconnaissance n'a pu être décelée.

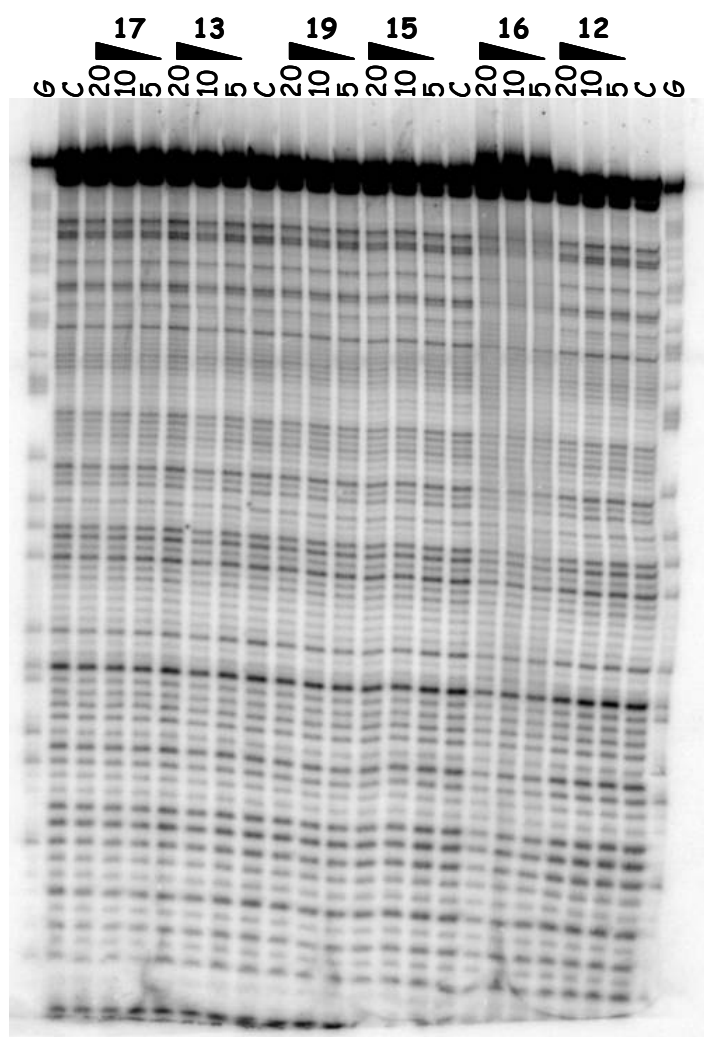


Figure 73 : Essai de footprint à la DNase I

CONCLUSION

Les modifications apportées à la structure du salène ont permis d'obtenir des composés capables d'interagir avec l'ADN, comme l'indique l'étude par spectroscopie UV-Visible. Cependant, les techniques auxquelles nous avons eu recours pour étudier cette interaction, dénaturation thermique et footprinting, n'ont fourni aucun indice en faveur d'une liaison au niveau du petit sillon de l'ADN. Le mode de liaison à l'ADN des différents composés semble donc plutôt relié à la possibilité d'interactions électrostatiques entre les charges cationiques portées par les composés à chacune de leurs extrémités et les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN. Peu de différences ont été observées entre les iodures d'ammonium et les composés neutres correspondants, les composés neutres étant capables de se protoner dans le milieu à pH 7,1. Toutefois, si l'interaction semble principalement due à l'établissement de liaisons ioniques entre les composés synthétisés et l'ADN, le rayon de courbure de la molécule semble également avoir son importance. En effet, la variation du rayon de courbure en fonction des produits synthétisés conduit à des différences notables d'interaction avec l'ADN. Une étude de modélisation moléculaire permettrait de déterminer la conformation la plus stable adoptée par chaque composé et ainsi d'apprécier le rayon de courbure de chaque molécule. Lors des études UV-Visible, les composés **15** et **19** se sont révélés les plus efficaces et les composés **12** et **16** présentent en revanche la moins bonne efficacité d'interaction. Des études complémentaires, en viscosimétrie ou en dichroïsme linéaire électrique par exemple, sont donc nécessaires afin de déterminer le mode de liaison à l'ADN des différents composés synthétisés. Selon ces résultats, des études sur des lignées cellulaires pourront être envisagées afin d'étudier l'éventuelle cytotoxicité des produits.

**CONCLUSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

Les recherches actuelles s'orientent vers la synthèse de nucléases artificielles toujours plus efficaces et sélectives. Pour améliorer l'efficacité de coupure, des modifications peuvent être effectuées au niveau du métal ou de son ligand, ce dernier permettant de moduler les propriétés redox du complexe.

Avec un ligand du type *N,N'*-bis(3- (ou 5-)hydroxysalicylidène)éthylènediamine, le remplacement du cuivre ou du fer par le vanadium (complexes **2a-d**) se traduit par la perte de la propriété d'auto-activation. L'activité de coupure nécessite la présence d'un agent activateur, soit réducteur (MPA) soit oxydant (Oxone®).

Les salènes à cuivre fonctionnalisés **9a-c**, quant à eux, sont bien plus efficaces. Des expériences de coupure de plasmide ont révélé leur excellente activité de coupure, en absence d'agent activateur. En revanche, dans les études de coupure de fragments d'ADN marqués, des différences notables ont été observées entre les fragments 117-3' et HIV-Loop. Une bonne activité de coupure a été observée sur le fragment 117-3', fragment d'ADN naturel, issu de la digestion d'un plasmide par des enzymes de restriction. De moins bons résultats ont été obtenus sur le fragment HIV-Loop, qui est un fragment synthétique. Il ne s'agit pas d'un véritable fragment d'ADN double brin, mais de deux séquences complémentaires appartenant à un seul et même brin, qui s'apparient en formant une boucle constituée de quatre thymidines. Les différences dans la structure des fragments d'ADN étudiés pourraient être à l'origine des différences observées pour l'activité nucléasique. Une perspective envisageable serait de répéter les expériences effectuées avec le fragment HIV-Loop sur un véritable ADN double brin présentant la même séquence. On peut également envisager le même type d'étude sur d'autres séquences d'ADN, présentant un intérêt thérapeutique dans le cadre du contrôle de l'expression de gènes cibles.

Concernant l'amélioration de l'affinité pour l'ADN et de la spécificité de coupure, le couplage à un oligonucléotide formant une triple hélice ou à un ligand du petit sillon en épingle à cheveux de type Dervan semble un des moyens les plus efficaces pour améliorer la sélectivité des nucléases chimiques. Ces composés sont en effet capables de reconnaître des séquences spécifiques de l'ADN. Des conjugués de ce type, décrits dans la littérature, ont été utilisés pour des expériences *in vitro*. En ce qui nous concerne, les résultats observés avec les complexes **9b** et **9c** n'ont pas été à la hauteur de nos espérances. Leur association à des oligonucléotides a bien été réalisée mais les études des coupures produites par ces conjugués ont fourni des résultats surprenants. Au lieu d'une coupure spécifique à proximité de la séquence ciblée par l'oligonucléotide, des phénomènes d'agrégation de l'ADN ont été observés sur gel d'acrylamide. Des

structures de nature inconnue et de poids moléculaire supérieur à celui du duplexe ont été détectées. En ce qui concerne l'association aux ligands du petit sillon, plusieurs essais de synthèse ont été effectués, avec différents agents de couplage peptidique, mais nous n'avons pas pu récupérer les produits de couplage. De nouvelles tentatives seront réalisées afin d'obtenir les produits attendus. Pour cela, on pourra notamment tester d'autres agents de couplage, optimiser les conditions de la réaction (temps, température, solvant...) ou encore essayer de mettre au point de meilleures techniques de séparation et purification (changement du gradient d'éluion en HPLC par exemple).

Toujours dans le souci d'améliorer la sélectivité, les futurs axes de recherche pourront également s'orienter vers la synthèse de nouveaux composés interagissant avec l'ADN. La nécessité de concevoir de nouveaux agents capables de se lier efficacement à l'ADN, et surtout de manière spécifique, reste en effet toujours d'actualité. Les composés **12-15** et **16**, **17** et **19**, dont la structure dérive de celle du salène, ont été synthétisés dans cette optique, mais l'interaction de ce type de composé avec l'ADN ne semble pas spécifique d'une séquence particulière. Des études complémentaires (viscosimétrie ou dichroïsme linéaire électrique par exemple) permettront de déterminer le mode de liaison de ces composés à l'ADN.

De manière plus générale, il a été constaté que la plupart des nucléases artificielles conjuguées à des ligands de l'ADN qui ont été étudiées jusqu'à présent ne sont pas adaptées à la régulation spécifique de l'expression de gènes dans les cellules ou *in vivo*. En effet, ces conjugués nécessitent souvent l'ajout d'agents activateurs qui, la plupart du temps, ne sont pas compatibles avec l'environnement intracellulaire. Pour remédier à ce problème, la synthèse de nucléases chimiques plus efficaces, et notamment ne nécessitant pas d'agent activateur, reste donc toujours d'actualité. Au laboratoire, par exemple, de nouveaux composés ont été conçus dans ce cadre. Pour ces composés, les groupements hydroxyle des cycles aromatiques ont été remplacés par des groupements amino et les fonctions imine ont été modifiées en fonctions amide (Figure 74). Les complexes de cuivre de ces ligands, portant sur les cycles aromatiques deux groupements amino en position *ortho* ou *para*, ont révélé, en coupure de plasmide comme en coupure d'ADN marqué (fragment 117-3'), une activité nucléasique nettement supérieure à celle des salènes à cuivre fonctionnalisés **9a-c**, et ce en absence d'agent activateur. Des tests sur le fragment HIV-Loop sont actuellement en cours. Ce résultat prometteur pourrait être mis à profit dans la synthèse de nouvelles molécules hybrides. L'insertion d'une chaîne latérale fonctionnalisée sur ce type de composés permettrait en

effet le couplage à un ligand de l'ADN, pour fournir un agent chimique particulièrement efficace et sélectif.

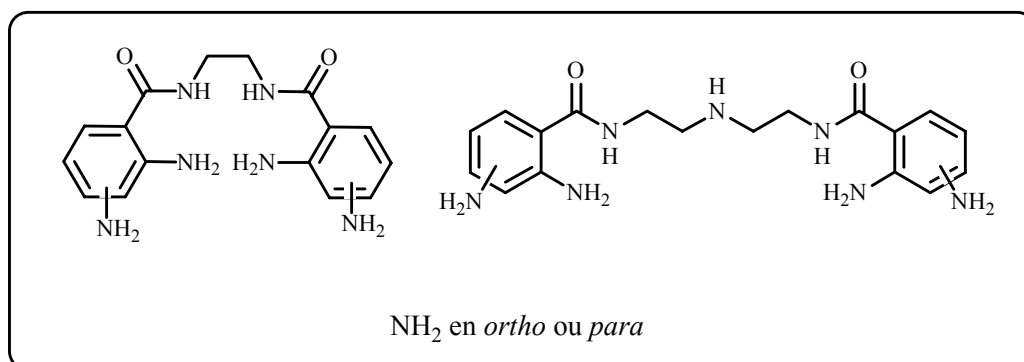


Figure 74 : Nouveaux ligands de nucléases auto-activées étudiées au laboratoire

Une autre alternative très prometteuse correspond à une approche non plus chimique mais biologique. Elle consiste à recruter directement des enzymes au sein de la cellule pour cliver l'ADN. Le cas de la topoisomérase a notamment été étudié. Dans ce cas, la nucléase artificielle couplée au ligand de l'ADN spécifique est remplacée par un inhibiteur de topoisomérase qui va bloquer la religation de l'ADN et ainsi générer des coupures uniquement au niveau de séquences spécifiques.

Enfin, après avoir rappelé le rôle essentiel joué par les deux entités d'un conjugué "nucléase-ligand de l'ADN", il ne faut pas négliger l'importance du bras espaceur connectant ces deux entités. Des modifications du bras espaceur peuvent en effet avoir un effet considérable sur l'efficacité et la spécificité des conjugués, les deux entités devant être positionnées de façon adéquate pour permettre un effet synergique optimum. L'optimisation du bras espaceur participe donc aussi activement à l'obtention de conjugués les plus efficaces et spécifiques possibles.

PARTIE EXPERIMENTALE

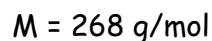
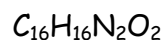
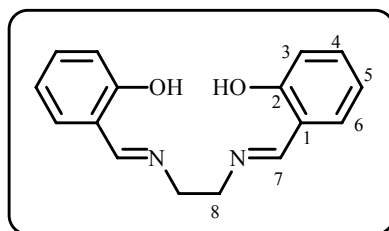
A - SYNTHÈSE ORGANIQUE

CONDITIONS GÉNÉRALES

- Les réactifs proviennent d'Aldrich ou Lancaster et ont été utilisés sans purification préalable, sauf indication contraire. La pyridine est distillée sur KOH et conservée sur tamis moléculaire 4 Å sous argon. La triéthylamine est distillée sous argon sur CaH₂. L'iodure de méthyle est également distillé avant utilisation.
- Les solvants utilisés sont des solvants de pureté commerciale. Ils ont été utilisés sans purification préalable, sauf indication contraire. Le méthanol est distillé sur magnésium et conservé sur tamis moléculaire 3 Å sous argon. Le tétrahydrofurane (THF) est distillé sur LiAlH₄.
- Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur plaques de silice 60F₂₅₄ d'épaisseur 0,2 mm, de référence 5735 Merck. Le solvant d'élution varie en fonction des composés et est indiqué pour chaque cas. Les tâches sont révélées sous lumière ultraviolette à 254 nm ou à la ninhydrine (solution à 0,1 % dans le méthanol), pour la détection des composés comportant une fonction amine.
- Les chromatographies sur colonne ont été effectuées en utilisant les silices Merck, Geduran Si 60 de granulométrie 0,063-0,200 mm et 0,040-0,063 mm respectivement pour les chromatographies à pression atmosphérique et sous pression d'argon (chromatographie "flash"). Les solvants d'élution sont indiqués pour chaque cas.
- Les points de fusion ont été déterminés à l'aide d'un microscope à platine chauffante Reichert Thermopan.
- Les spectres de masse en MALDI ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation") ont été enregistrés au moyen d'un spectromètre Finigan MAT Vision 2000 (Bremen). La matrice utilisée est un mélange eau/acide 2,5-dihydroxybenzoïque. Les spectres de masse en ESI (Electrospray Ionisation), mode positif, ont été enregistrés sur un spectromètre Quattro II waters (Manchester GB).
- Les spectres de RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés sur un appareil Brüker AM 300 WB (300 MHz pour la RMN ¹H et 75 MHz pour la RMN ¹³C). Les solvants deutérés utilisés sont indiqués pour chaque cas. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en partie par million (ppm). Les multiplicités sont exprimées par les abréviations : s

(singulet), sl (singulet large), d (doublet), dd (doublet de doublet), dt (doublet de triplet), Ddd (doublet de doublet dédoublé), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). Les spectres de RMN ^1H sont décrits selon δ (multiplicité, nombre de protons, attribution, constantes de couplage J (Hz)). Les spectres de RMN des produits **12-15** ont été enregistrés sur un appareil Brüker DPX 300. Les carbones ont pu être attribués grâce à des expériences de RMN à deux dimensions H, C (COSY).

- Les spectres d'absorption dans l'IR ont été obtenus au moyen d'un appareil Impact 400 D Nicolet. Les pastilles ont été préparées en utilisant KBr comme support inerte. Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1} . Seuls les pics principaux sont indiqués.

***N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine (1a)****1^{ère} méthode :**

Dans un ballon monocol de 250 mL, équipé d'un barreau aimanté, d'un appareil de Dean-Stark et d'un réfrigérant, on prépare le ligand **1a** dans 150 mL de toluène à partir de 2,18 mL de salicyaldéhyde (2,50 g ; 20,5 mmol) et de 0,67 mL d'éthylènediamine (0,60 g ; 10,0 mmol). Le mélange se colore instantanément en jaune. Il est agité vigoureusement et chauffé à reflux dans un bain d'huile pendant 3 heures. Après retour à température ambiante, le toluène est éliminé sous pression réduite. Le résidu solide ainsi obtenu est recristallisé dans l'éthanol, filtré sur verre fritté, lavé à l'éthanol et à l'éther puis séché sous pression réduite sur P₂O₅. On récupère le ligand **1a** sous forme de cristaux jaunes (2,14 g ; 8,0 mmol ; 80 %).

2^{ème} méthode :

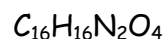
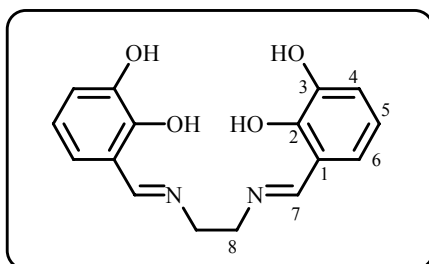
A une solution de 0,67 mL d'éthylènediamine (0,60 g ; 10,0 mmol) dans 10 mL d'éthanol, 2,18 mL de salicyaldéhyde (2,50 g ; 20,5 mmol) dans 10 mL d'éthanol sont ajoutés goutte à goutte sous agitation vigoureuse. Le produit précipite immédiatement. Le mélange est chauffé à reflux pendant une demi-heure, puis refroidi à température ambiante et filtré sur verre fritté. Le produit est alors recristallisé dans l'éthanol, filtré sur verre fritté, lavé à l'éthanol et à l'éther puis placé au dessiccateur sous pression réduite sur P₂O₅. On obtient le ligand **1a** sous forme de cristaux jaunes (2,00 g ; 7,5 mmol ; 75 %).

- **CCM** : R_f = 0,90 (éluant : CH₂Cl₂/MeOH 90/10)
- **Pf** : 127-128°C (Litt : 125-126°C)¹⁶⁶
- **MS (MALDI)** : (M + Na)⁺ = 290,9
- **¹H RMN (DMSO-d₆)** : 3,91 (s, 4H, H₈) ; 6,84-6,92 (m, 4H, H_{Ar}) ; 7,27-7,44 (m, 4H, H_{Ar}) ; 8,57 (s, 2H, H₇)
- **¹³C RMN (DMSO-d₆)** : 58,8 (C₈) ; 116,4 (C_{Ar}) ; 118,5 (C_{Ar}) ; 118,6 (C_{Ar}) ; 131,6 (C_{Ar}) ; 132,3 (C_{Ar}) ; 160,4 (C₂) ; 166,8 (C₇)

Les données de RMN ¹H et ¹³C sont conformes à la littérature.¹¹⁴

- **IR (KBr)** : 3440 (OH) ; 1630 (imine) ; 1570 ; 1490 ; 1280 ; 860 ; 750.

N,N'-bis(3-hydroxysalicylidène)éthylènediamine (**1b**)



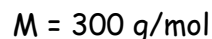
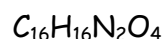
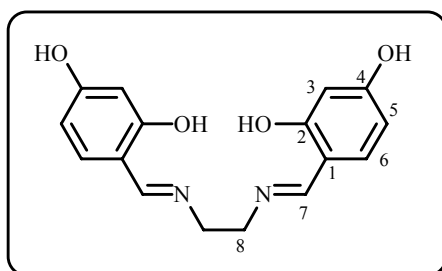
1^{ère} méthode :

Dans un ballon monocol de 250 mL, équipé d'un barreau aimanté, d'un appareil de Dean-Stark et d'un réfrigérant, on prépare le ligand **1b** dans 150 mL de toluène à partir de 2,82 g de 2,3-dihydroxybenzaldéhyde (20,4 mmol) et de 0,67 mL d'éthylènediamine (0,60 g ; 10,0 mmol). Le mélange se colore instantanément en orange foncé. Il est agité vigoureusement et chauffé à reflux dans un bain d'huile pendant 3 heures. Après retour à température ambiante, la suspension est filtrée sur verre fritté, et le précipité obtenu est lavé à l'éthanol et à l'éther puis séché sous pression réduite sur P_2O_5 . On récupère le ligand **1b** sous forme de poudre orange (2,69 g ; 9,0 mmol ; 90 %).

2^{ème} méthode :

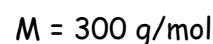
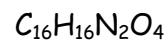
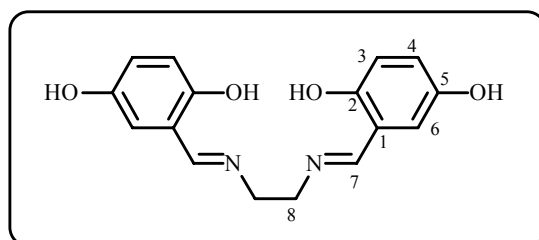
A une solution de 0,67 mL d'éthylènediamine (0,60 g ; 10,0 mmol) dans 10 mL d'éthanol, 2,76 g de 2,3-dihydroxybenzaldéhyde (20,0 mmol) dans 10 mL d'éthanol sont ajoutés goutte à goutte sous agitation vigoureuse. Le produit précipite immédiatement. Le mélange est chauffé à reflux pendant une demi-heure, refroidi à température ambiante et filtré sur verre fritté. Le précipité obtenu est lavé à l'éthanol et à l'éther puis placé au dessiccateur sous pression réduite sur P_2O_5 . On obtient le ligand **1b** sous forme de poudre orange (2,93 g ; 9,8 mmol ; 98 %).

- **CCM** : $R_f = 0,60$ (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$ 90/10)
- **Pf** : $> 260^\circ C$
- **MS (MALDI)** : $(M + H)^+ = 301,4$; $(M + Na)^+ = 323,4$; $(M + K)^+ = 339,3$
- **1H RMN (DMSO- d_6)** : 3,92 (s, 4H, H_8) ; 6,64 (t, 2H, H_5 , $J_{H_5H_4} = J_{H_5H_6} = 7,7$ Hz) ; 6,80-6,87 (m, 4H, H_4 et H_6) ; 8,53 (s, 2H, H_7)
- **^{13}C RMN (DMSO- d_6)** : 58,0 (C_8) ; 117,6 (C_{Ar}) ; 117,7 (C_{Ar}) ; 118,1 (C_{Ar}) ; 121,9 (C_{Ar}) ; 145,7 (C_{Ar}) ; 150,9 (C_{Ar}) ; 167,1 (C_7)
- **IR (KBr)** : 3390 (OH) ; 1630 (imine) ; 1470 ; 1240 ; 1190 ; 1020 ; 730.

***N,N'*-bis(4-hydroxysalicylidène)éthylènediamine (1c)**

Selon le même mode opératoire que celui décrit précédemment pour **1b** (1^{ère} méthode), on prépare le ligand **1c** dans 150 mL de toluène à partir de 2,82 g de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde (20,4 mmol) et de 0,67 mL d'éthylènediamine (0,60 g ; 10,0 mmol). On le récupère sous forme de poudre orange (2,81 g ; 9,4 mmol ; 94 %).

- **CCM** : $R_f = 0,58$ (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$ 80/20)
- **Pf** : $> 260^\circ C$
- **MS (MALDI)** : $(M + H)^+ = 301,6$; $(M + Na)^+ = 323,5$; $(M + K)^+ = 339,5$
- **1H RMN (DMSO- d_6)** : 3,77 (s, 4H, H_8) ; 6,15 (d, 2H, H_3 , $J_{H_3H_5} = 2,4$ Hz) ; 6,26 (dd, 2H, H_5 , $J_{H_5H_3} = 2,4$ Hz, $J_{H_5H_6} = 8,6$ Hz) ; 7,16 (d, 2H, H_6 , $J_{H_6H_5} = 8,6$ Hz) ; 8,35 (s, 2H, H_7)
- **^{13}C RMN (DMSO- d_6)** : 57,8 (C_8) ; 102,5 (C_{Ar}) ; 106,9 (C_{Ar}) ; 111,2 (C_{Ar}) ; 133,4 (C_{Ar}) ; 161,7 (C_{Ar}) ; 164,3 (C_{Ar}) ; 165,7 (C_7)
- **IR (KBr)** : 3410 (OH) ; 2560 ; 1640 (imine) ; 1580 ; 1470 ; 1230 ; 1160 ; 790.

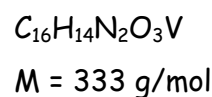
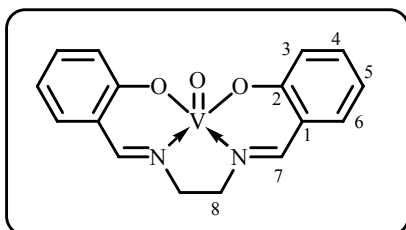
***N,N'*-bis(5-hydroxysalicylidène)éthylènediamine (1d)**

De la même façon, on prépare le ligand **1d** dans 150 mL de toluène à partir de 2,82 g de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde (20,5 mmol) et de 0,67 mL d'éthylènediamine (0,60 g ; 10,0 mmol). Celui-ci est obtenu sous forme de poudre ocre (2,81 g ; 9,4 mmol ; 94 %).

- **CCM** : $R_f = 0,84$ (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$ 80/20)
- **Pf** : $> 260^\circ C$

- **MS (MALDI)** : $(M + H)^+ = 301,9$; $(M + Na)^+ = 323,5$
- **1H RMN (DMSO- d_6)** : 3,87 (s, 4H, H_8) ; 6,66-6,79 (m, 6H, H_3, H_4, H_6) ; 8,46 (s, 2H, H_7)
- **^{13}C RMN (DMSO- d_6)** : 59,1 (C_8) ; 116,5 (C_{Ar}) ; 116,8 (C_{Ar}) ; 118,5 (C_{Ar}) ; 119,8 (C_{Ar}) ; 149,2 (C_{Ar}) ; 152,8 (C_{Ar}) ; 166,5 (C_7)
- **IR (KBr)** : 3300 (OH) ; 1640 (imine) ; 1590 ; 1450 ; 1410 ; 1300 ; 1260 ; 1210 ; 1150 ; 1030 ; 840 ; 780.

Complexe de vanadyle de la *N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine (2a)



1^{ère} méthode :

Dans un ballon tricol de 250 mL, équipé d'un barreau aimanté, d'un réfrigérant et d'un thermomètre, on prépare une solution de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ (664 mg ; 3,1 mmol) dans 100 mL de méthanol. La suspension est chauffée à 60°C. Après solubilisation, on ajoute 829 mg de *N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine **1a** (3,1 mmol). Puis, à la suspension noire obtenue, on ajoute 6 mL de pyridine (5,9 g ; 70,0 mmol). Le mélange réactionnel se colore alors en vert foncé. Il est agité pendant 1 heure à 60°C. Après retour à température ambiante, la suspension est filtrée sur verre fritté, et le précipité obtenu est lavé abondamment à l'eau puis au méthanol et à l'éther et enfin séché sous pression réduite sur P_2O_5 . On récupère le complexe **2a** sous forme de poudre verte (637 mg ; 1,9 mmol ; 63 %).

2^{ème} méthode :

On suit le même mode opératoire que celui de la 1^{ère} méthode mais sans ajouter de pyridine. En partant de 634 mg de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ (2,9 mmol) et de 787 mg de *N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine **1a** (2,9 mmol), ceci nous conduit à 606 mg de complexe **2a** sous forme de poudre verte (1,8 mmol ; 62 %).

3^{ème} méthode :

On reprend le mode opératoire décrit à la 1^{ère} méthode mais, cette fois, la manipulation est effectuée sous atmosphère inerte d'argon. On part de 1,08 g de $\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5,0 mmol) et de 1,34 g de *N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine **1a** (5,0 mmol). On ajoute 10 mL de pyridine (9,8 g ; 120,0 mmol). On obtient le complexe **2a** sous forme de poudre verte (1,30 g ; 3,9 mmol ; 79 %).

4^{ème} méthode :

On suit la 3^{ème} méthode mais sans ajouter de pyridine. 465 mg de $\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2,1 mmol) et 584 mg de *N,N'*-bis(salicylidène)éthylènediamine **1a** (2,2 mmol) nous conduisent à 528 mg de complexe **2a** sous forme de poudre verte (1,6 mmol ; 74 %).

5^{ème} méthode :

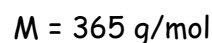
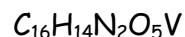
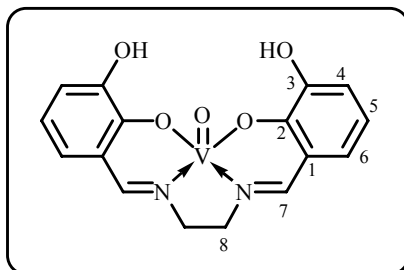
Cette fois, on reprend la 1^{ère} méthode en travaillant sous atmosphère inerte d'argon et en utilisant du méthanol distillé et dégazé ainsi que de la pyridine distillée et dégazée. Avec 511 mg de $\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2,4 mmol), 635 mg de *N,N'*-bis(salicylidène)-éthylènediamine **1a** (2,4 mmol) et 4,7 mL de pyridine (4,6 g ; 60,0 mmol), on obtient 599 mg de complexe **2a** sous forme de poudre verte (1,8 mmol ; 77 %).

6^{ème} méthode :

Cette méthode est identique à la 5^{ème} méthode mais sans ajout de pyridine. En partant de 507 mg de $\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2,3 mmol) et de 630 mg de *N,N'*-bis(salicylidène)-éthylènediamine **1a** (2,4 mmol), on récupère 615 mg de complexe **2a** sous forme de poudre verte (1,9 mmol ; 79 %).

- **CCM** : $R_f = 0,70$ (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10)
- **Pf** : $> 260^\circ\text{C}$
- **MS (MALDI)** : $(M)^+ = 332,9$; $(M + \text{Na})^+ = 355,9$; $(M + \text{K})^+ = 371,9$
- **RMN** : Il n'a pas été effectué d'analyse RMN du fait du paramagnétisme des complexes de vanadyle qui rend la caractérisation impossible.
- **IR (KBr)** : 1620 (imine) ; 1540 ; 1480 ; 1450 ; 1390 ; 1300 ; 990 ; 630.

Complexe de vanadyle de la *N,N'*-bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine (**2b**)



1^{ère} méthode :

Dans un ballon tricol de 250 mL, équipé d'un barreau aimanté, d'un réfrigérant et d'un thermomètre, on prépare une solution de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ (646 mg ; 3,0 mmol) dans 100 mL de méthanol. La suspension est chauffée à 60°C. Après solubilisation, on ajoute 897 mg de *N,N'*-bis(3-hydroxysalicylidène)éthylènediamine **1b** (3,0 mmol). Puis, à la suspension noire obtenue, on ajoute 6 mL de pyridine (5,9 g ; 70,0 mmol). Le mélange réactionnel se colore alors en vert foncé. Il est agité pendant 1 heure à 60°C. Après retour à température ambiante, la suspension est filtrée sur verre fritté, et le précipité obtenu est lavé abondamment à l'eau puis au méthanol et à l'éther et enfin séché sous pression réduite sur P_2O_5 . On récupère le complexe **2b** sous forme de poudre verte (705 mg ; 1,9 mmol ; 65 %).

2^{ème} méthode :

On suit le même mode opératoire que celui de la 1^{ère} méthode mais sans ajouter de pyridine. En partant de 645 mg de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ (3,0 mmol) et de 895 mg de *N,N'*-bis(3-hydroxysalicylidène)éthylènediamine **1b** (3,0 mmol), ceci nous conduit à 634 mg de complexe **2b** sous forme de poudre noire (1,7 mmol ; 58 %).

3^{ème} méthode :

On reprend le mode opératoire décrit à la 1^{ère} méthode mais, cette fois, la manipulation est effectuée sous atmosphère inerte d'argon. On part de 672 mg de sulfate de vanadyle (3,1 mmol) et de 931 mg de *N,N'*-bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine **1b** (3,1 mmol). On ajoute 6 mL de pyridine (5,9 g ; 70,0 mmol). On obtient le complexe **2b** sous forme de poudre verte (778 mg ; 2,1 mmol ; 69 %).

4^{ème} méthode :

On suit la 3^{ème} méthode mais sans ajouter de pyridine. 1,10 g de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ (5,1 mmol) et 1,53 g de *N,N'*-bis(3-hydroxysalicylidène)éthylènediamine **1b** (5,1 mmol) nous conduisent à 1,37 g de complexe **2b** sous forme de poudre noire (3,8 mmol ; 74 %).

5^{ème} méthode :

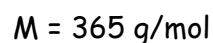
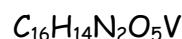
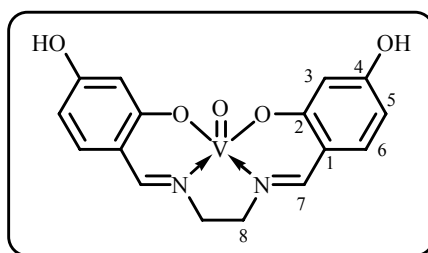
Cette fois, on reprend la 1^{ère} méthode en travaillant sous atmosphère inerte d'argon et en utilisant du méthanol distillé et dégazé ainsi que de la pyridine distillée et dégazée. Avec 507 mg de $\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2,3 mmol), 703 mg de *N,N'*-bis(3-hydroxysalicylidène)éthylènediamine **1b** (2,3 mmol) et 4,7 mL de pyridine (4,6 g ; 60,0 mmol), on obtient 652 mg de complexe **2b** sous forme de poudre verte (1,8 mmol ; 76 %).

6^{ème} méthode :

Cette méthode est identique à la 5^{ème} méthode mais sans ajout de pyridine. En partant de 623 mg de $\text{VO}_2\text{SO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (2,9 mmol) et de 863 mg de *N,N'*-bis(3-hydroxysalicylidène)éthylènediamine **1b** (2,9 mmol), on récupère 817 mg de complexe **2b** sous forme de poudre noire (2,2 mmol ; 78 %).

- **CCM** : $R_f = 0,60$ (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10)
- **Pf** : $> 260^\circ\text{C}$
- **MS (MALDI⁺)** : $(M)^+ = 365,0$; $(M + H)^+ = 366,0$; $(M + \text{Na})^+ = 388,0$; $(M + \text{K})^+ = 404,0$
- **IR (KBr)** : 3380 (OH) ; 1620 (imine) ; 1550 ; 1450 ; 1310 ; 1260 ; 1220 ; 970 ; 742.

Complexe de vanadyle de la *N,N'*-bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine (**2c**)

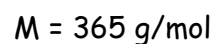
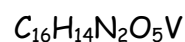
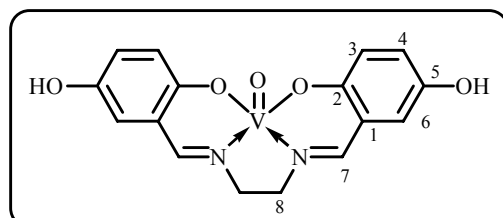


On suit la méthode décrite précédemment (1^{ère} méthode). A partir de 1,07 g de sulfate de vanadyle (4,9 mmol), 1,48 g de *N,N'*-bis(4-hydroxysalicylidène)éthylènediamine **1c** (4,9 mmol) et 10 mL de pyridine (9,8 g ; 120,0 mmol), dans 100 mL de méthanol, on forme le complexe **2c** qui est récupéré sous forme de poudre marron (277 mg ; 0,8 mmol ; 15 %).

- **CCM** : $R_f = 0,60$ (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10)
- **Pf** : $> 260^\circ\text{C}$
- **MS (MALDI)** : $(M)^+ = 364,9$

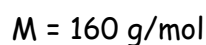
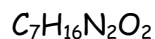
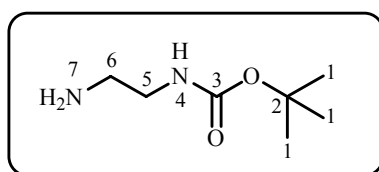
- **IR (KBr)** : 3410 ; 3020 (OH) ; 1610 (imine) ; 1530 ; 1500 ; 1450 ; 1230 ; 1120 ; 970 ; 620.

Complexe de vanadyle de la *N,N'*-bis(5-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine (2d)



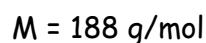
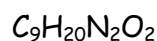
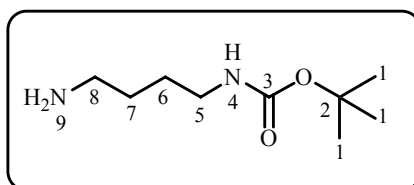
De la même façon, 1,07 g de $VOSO_4 \cdot 3H_2O$ (4,9 mmol), 1,48 g de *N,N'*-bis(5-hydroxysalicylidène)éthylènediamine **1d** (4,9 mmol) et 10 mL de pyridine (9,8 g ; 120,0 mmol) dans 100 mL de méthanol nous conduisent au complexe **2d**, obtenu sous forme de poudre verte (1,38 g ; 3,8 mmol ; 77 %).

- **CCM** : $R_f = 0,39$ (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$ 90/10)
- **Pf** : $> 260^\circ C$
- **MS (MALDI⁺)** : $(M)^+ = 365,0$; $(M + H)^+ = 366,0$; $(M + Na)^+ = 388,0$
- **IR (KBr)** : 3370 (OH) ; 1620 (imine) ; 1530 ; 1470 ; 1440 ; 1290 ; 1170 ; 960 ; 810.

***N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)éthylènediamine (3a)**

Une solution de di-*tert*-butyldicarbonate (10,99 g ; 50,3 mmol) dans 250 mL de chloroforme est ajoutée goutte à goutte à une solution d'éthylènediamine (34 mL ; 30,57 g ; 509 mmol) dans 500 mL de chloroforme sur une période de 5h30, sous agitation et à 0°C (refroidissement dans un bain de glace et de sel). Le milieu réactionnel prend progressivement une coloration blanche : un précipité blanc se forme. Le mélange est agité pendant 16h30 supplémentaires à température ambiante. Après arrêt de l'agitation, le précipité blanc est filtré sur verre fritté et le filtrat est lavé abondamment à l'eau. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$, et, après filtration, évaporée sous pression réduite pour conduire à la diamine mono-protégée **3a** sous forme d'une huile jaune (5,74 g ; 35,9 mmol ; 71 %).

- **CCM** : $R_f = 0,45$ (éluant : MeOH/NH₄OH 99/1)
- **Pf** : huile
- **¹H RMN (CDCl₃)** : 1,20 (s, 2H, H₇) ; 1,25 (s, 9H, H₁) ; 2,59 (t, 2H, H₆, $J_{H_6H_5} = 6,0 \text{ Hz}$) ; 2,97 (q, 2H, H₅, $J_{H_5H_6} = J_{H_5H_4} = 6,0 \text{ Hz}$) ; 5,44 (sl, 1H, H₄)
- **¹³C RMN (CDCl₃)** : 28,0 (C₁) ; 41,5 (CH₂) ; 43,1 (CH₂) ; 78,5 (C₂) ; 156,0 (C₃).

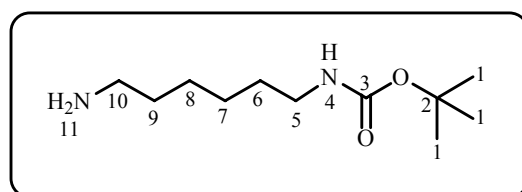
***N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1,4-butanediamine (3b)**

De la même façon, une solution de di-*tert*-butyldicarbonate (2,02 g ; 9,2 mmol) dans 50 mL de chloroforme est ajoutée goutte à goutte à une solution de putrescine (1,4-butanediamine) (9,15 mL ; 8,03 g ; 91 mmol) dans 100 mL de chloroforme sur une période de 3h30, sous agitation et à 0°C. Le mélange est agité pendant 18h30 supplémentaires à température ambiante. Le même traitement que celui effectué pour

3a nous fournit la diamine mono-protégée **3b** sous forme d'une huile jaunâtre (1,46 g ; 7,8 mmol ; 84 %).

- **CCM** : $R_f = 0,49$ (éluant : MeOH/NH₄OH 90/10)
- **Pf** : huile
- **¹H RMN (CDCl₃)** : 0,94 (s, 2H, H₉) ; 1,15 (s, 9H, H₁) ; 1,19-1,30 (m, 4H, H₆ et H₇) ; 2,41 (t, 2H, H₈, $J_{H_8H_7} = 6,2$ Hz) ; 2,82 (q, 2H, H₅, $J_{H_5H_6} = J_{H_5H_4} = 6,2$ Hz) ; 5,28 (sl, 1H, H₄)
- **¹³C RMN (CDCl₃)** : 27,7 (CH₂) ; 28,6 (C₁) ; 31,0 (CH₂) ; 40,6 (CH₂) ; 42,0 (CH₂) ; 79,2 (C₂) ; 156,2 (C₃).

N-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1,6-hexanediamine (**3c**)

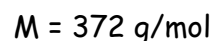
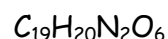
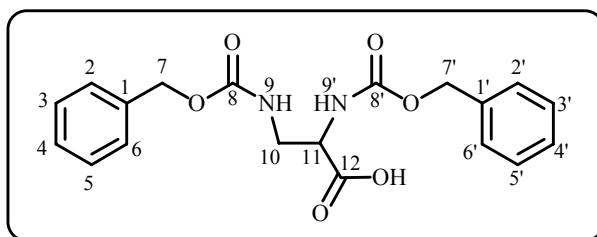


$C_{11}H_{24}N_2O_2$
 $M = 216$ g/mol

On suit toujours le même mode opératoire. Une solution de di-*tert*-butyldicarbonate (4,53 g ; 20,8 mmol) dans 100 mL de chloroforme est ajoutée goutte à goutte à une solution de 1,6-diaminohexane (22,79 g ; 196 mmol) dans 200 mL de chloroforme sur une période de 2h20, sous agitation et à 0°C. Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. Le traitement est le même que celui décrit précédemment. Cependant, dans ce cas, l'huile incolore (3,58 g) récupérée après évaporation de la phase organique est chromatographiée sur colonne de silice (gradient d'éluant : CH₂Cl₂/MeOH 70/30 jusqu'à MeOH 100 %) pour conduire à l'obtention du produit **3c** sous forme d'une huile jaune (2,88 g ; 13,3 mmol ; 64 %).

- **CCM** : $R_f = 0,48$ (éluant : MeOH/NH₄OH 90/10)
- **Pf** : huile
- **¹H RMN (CDCl₃)** : 1,20-1,50 (m, 8H, H₆, H₇, H₈, H₉) ; 1,40 (s, 9H, H₁) ; 1,48 (s, 2H, H₁₁) ; 2,64 (t, 2H, H₁₀, $J_{H_{10}H_9} = 6,1$ Hz) ; 3,06 (q, 2H, H₅, $J_{H_5H_6} = J_{H_5H_4} = 6,1$ Hz) ; 4,61 (sl, 1H, H₄)
- **¹³C RMN (CDCl₃)** : 26,5 (CH₂) ; 26,6 (CH₂) ; 28,4 (C₁) ; 30,1 (CH₂) ; 33,7 (CH₂) ; 40,5 (CH₂) ; 42,1 (CH₂) ; 79,0 (C₂) ; 156,0 (C₃).

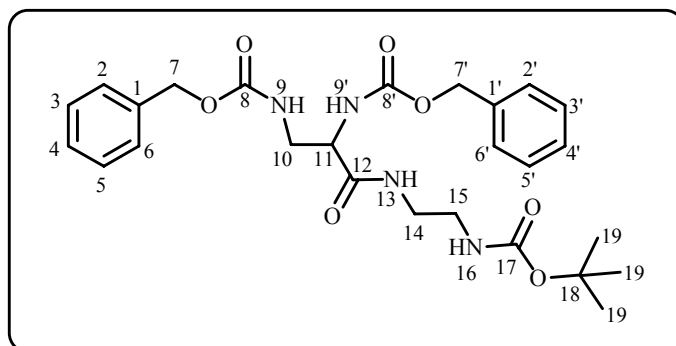
Acide D,L-2,3-di(benzyloxycarbonylamino)propanoïque (4)



Le monochlorhydrate de l'acide D,L-2,3-diaminopropanoïque (2,92 g ; 20,8 mmol) est dissous dans 50 mL d'eau, neutralisé par NaOH 1M (42 mL ; 42 mmol ; 2 équ.) puis refroidi dans un bain d'EtOH sur une plaque refroidissante à 0°C. Une solution de chloroformiate de benzyloxy (8 mL ; 9,56 g ; 56,0 mmol, 2,7 équ.) dans 50 mL de THF ainsi qu'une solution de NaOH 1M (50 mL) sont alors ajoutées lentement et simultanément grâce à deux ampoules à addition. Le milieu réactionnel est agité pendant 1h à 0°C puis une nuit à température ambiante, le pH étant maintenu vers 9-10 par ajout de soude (10 mL). Le THF est ensuite évaporé sous pression réduite et la phase aqueuse est lavée à l'éther (3 × 50 mL). Puis elle est acidifiée par une solution d'HCl 2M et le produit est alors extrait à l'acétate d'éthyle. La phase AcOEt est séchée sur MgSO₄ puis évaporée sous pression réduite pour fournir un résidu huileux incolore qui est recristallisé dans un mélange AcOEt/hexane. Après filtration, lavage à l'hexane et séchage au dessiccateur sous pression réduite sur P₂O₅, on récupère le produit **4** sous forme de poudre blanche (6,44 g ; 17,3 mmol ; 83 %).

- **CCM** : R_f = 0,39 (éluant : CH₂Cl₂/MeOH 90/10)
- **Pf** : 124°C (Litt : 126°C)¹⁶⁷
- **¹H RMN (DMSO-d₆)** : 3,28-3,42 (m, 2H, H₁₀) ; 4,07-4,16 (m, 1H, H₁₁) ; 5,01 et 5,03 (2 s, 4H, H₇, H_{7'}) ; 7,26-7,40 (m, 10H, H_{Ar}) ; 7,45 et 7,48 (2sl, 2H, H₉, H_{9'})
- **¹³C RMN (DMSO-d₆)** : 41,6 (C₁₀) ; 54,0 (C₁₁) ; 65,4 et 65,6 (C₇, C_{7'}) ; 127,6 / 127,7 / 127,8 / 128,3 (C_{Ar}) ; 136,9 et 137,0 (C₁, C_{1'}) ; 156,0 et 156,3 (C₈, C_{8'}) ; 172,0 (C₁₂).

2,3-di(benzyloxycarbonylamino)-*N*-(2-*tert*-butyloxycarbonylaminoéthyl)propionamide (5a)



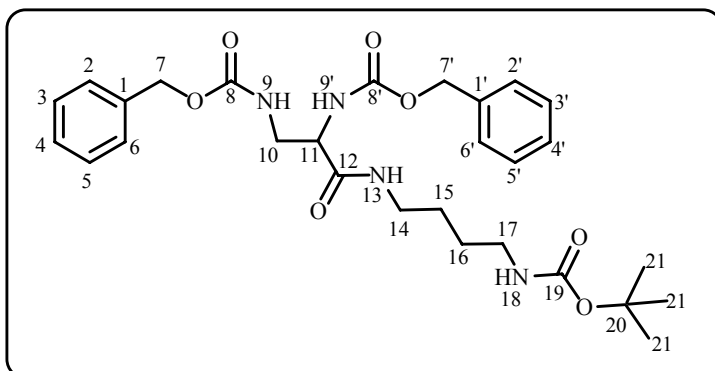
$$C_{26}H_{34}N_4O_7$$

$$M = 514 \text{ g/mol}$$

A une solution de *N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)éthylènediamine **3a** (1,61 g ; 10,1 mmol), d'acide 2,3-di(benzyloxycarbonylamino)propanoïque **4** (3,74 g ; 10,1 mmol) et du réactif de Castro (4,51 g ; 10,2 mmol) dans 120 mL d'acétonitrile est ajoutée de la triéthylamine (1,40 mL ; 1,01 g ; 10,0 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Une solution saturée de NaCl (250 mL) est alors ajoutée et le produit est extrait à l'acétate d'éthyle (3 × 200 mL). La phase organique est lavée successivement par 150 mL de solution d'HCl 2N, 150 mL d'eau, 150 mL de solution de NaHCO₃ à 5 % puis de nouveau 150 mL d'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄ puis, après filtration, évaporée sous pression réduite pour conduire à un résidu solide blanc qui est recristallisé dans le méthanol. On récupère finalement, après filtration et séchage sous pression réduite sur P₂O₅, le produit **5a** sous forme de poudre blanche (3,65 g ; 7,1 mmol ; 70 %).

- **CCM** : R_f = 0,48 (éluant : Acétone/Ether de Pétrole 50/50)
- **Pf** : 158°C
- **¹H RMN (DMSO-d₆)** : 1,37 (s, 9H, H₁₉) ; 2,98 (m, 2H, CH₂) ; 3,06 (m, 2H, CH₂) ; 3,27 (m, 2H, CH₂) ; 4,07 (m, 1H, H₁₁) ; 5,01 et 5,02 (2s, 4H, H₇ et H_{7'}) ; 6,77 (sl, 1H, NH) ; 7,21 (sl, 1H, NH) ; 7,23 (sl, 1H, NH) ; 7,29-7,36 (m, 10H, H_{Ar}) ; 8,01 (sl, 1H, H₁₃)
- **¹³C RMN (DMSO-d₆)** : 28,2 (C₁₉) ; 36,4 (CH₂) ; 36,5 (CH₂) ; 42,3 (C₁₀) ; 55,0 (C₁₁) ; 65,4 et 65,6 (C₇, C_{7'}) ; 77,7 (C₁₈) ; 127,6 / 127,7 / 127,8 / 127,9 (C_{Ar}) ; 136,8 et 137,0 (C₁, C_{1'}) ; 155,6 / 155,7 / 156,3 (C₈, C_{8'} et C₁₇) ; 169,0 (C₁₂).

2,3-di(benzyloxycarbonylamino)-*N*-(4-*tert*-butyloxycarbonylaminobutyl)propionamide (5b)



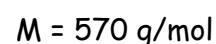
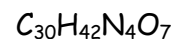
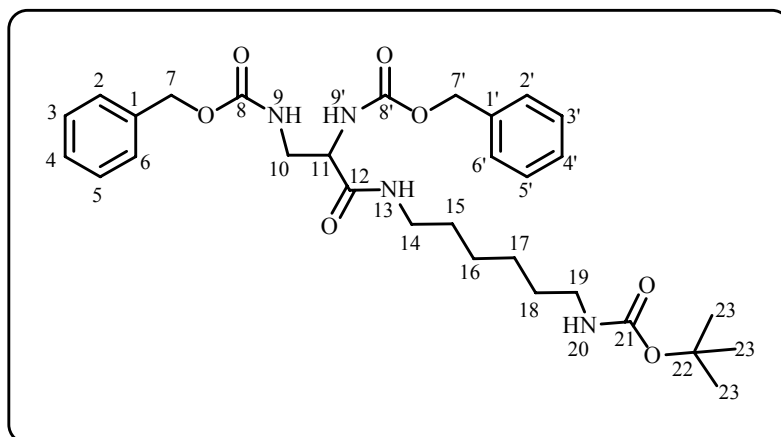
$$C_{28}H_{38}N_4O_7$$

$$M = 542 \text{ g/mol}$$

Selon le même mode opératoire, la *N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1,4-butanediamine **3b** (0,94 g ; 5,0 mmol) réagit avec l'acide 2,3-di(benzyloxycarbonylamino)propanoïque **4** (1,89 g ; 5,1 mmol) en présence du réactif de Castro (2,29 g ; 5,2 mmol) et de triéthylamine (0,70 mL ; 0,51 g ; 5,0 mmol) dans 60 mL d'acétonitrile. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Une solution saturée de NaCl (100 mL) est alors ajoutée et le produit est extrait à l'acétate d'éthyle (3 × 100 mL). La phase organique est lavée successivement par 100 mL de solution d'HCl 2N, 100 mL d'eau, 100 mL de solution de NaHCO₃ à 5 % puis de nouveau 100 mL d'eau. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄ puis, après filtration, évaporée sous pression réduite pour conduire à un résidu solide blanc qui est recristallisé dans le méthanol. On récupère finalement, après filtration et séchage sous pression réduite sur P₂O₅, le produit **5b** sous forme de poudre blanche (2,05 g ; 3,8 mmol ; 76 %).

- **CCM** : R_f = 0,55 (éluant : Acétone/Ether de Pétrole 50/50)
- **Pf** : 146°C
- **¹H RMN (DMSO-d₆)** : 1,36 (s, 9H, H₂₁) ; 1,20-1,50 (m, 4H, 2CH₂) ; 2,89-3,01 (m, 4H, 2CH₂) ; 3,28-3,35 (m, 2H, CH₂) ; 4,07-4,09 (m, 1H, H₁₁) ; 5,00 et 5,01 (2s, 4H, H₇, H₇) ; 6,75 (sl, 1H, NH) ; 7,24 (sl, 2H, 2NH) ; 7,32-7,40 (m, 10H, H_{Ar}) ; 7,91 (sl, 1H, H₁₃)
- **¹³C RMN (DMSO-d₆)** : 26,3 (CH₂) ; 26,8 (CH₂) ; 28,3 (C₂₁) ; 38,4 (CH₂) ; 38,5 (CH₂) ; 42,4 (C₁₀) ; 55,0 (C₁₁) ; 65,4 et 65,5 (C₇, C₇) ; 77,3 (C₂₀) ; 127,6 / 127,7 / 127,8 (C_{Ar}) ; 136,9 et 137,0 (C₁, C₁) ; 155,6 / 155,7 / 156,3 (C₈, C₈, C₁₉) ; 169,5 (C₁₂).

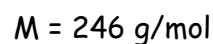
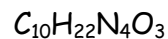
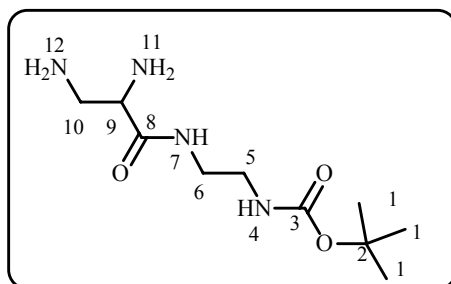
2,3-di(benzyloxycarbonylamino)-*N*-(6-*tert*-butyloxycarbonylamino)hexyl)propionamide (5c)



De la même façon, on prépare le produit **5c** à partir de 1,10 g de *N*-(*tert*-butyloxycarbonyl)-1,6-hexanediamine **3c** (5,1 mmol), 1,90 g d'acide **4** (5,1 mmol), 2,31 g de réactif de Castro (5,2 mmol) et 0,77 mL de triéthylamine (5,5 mmol) dans 60 mL d'acétonitrile. On récupère le produit **5c** après recristallisation dans le méthanol sous forme de poudre blanche (1,99 g ; 3,5 mmol ; 68 %).

- **CCM** : $R_f = 0,60$ (éluant : Acétone/Ether de Pétrole 50/50)
- **Pf** : 138°C
- **1H RMN (DMSO- d_6)** : 1,10-1,40 (m, 8H, CH_2) ; 1,36 (s, 9H, H_{23}) ; 2,80 (m, 2H, CH_2) ; 3,00 (m, 2H, CH_2) ; 3,35 (m, 2H, CH_2) ; 4,06 (m, 1H, H_{11}) ; 5,01 et 5,02 (2s, 4H, H_7 , H_7) ; 6,78 (sl, 1H, NH) ; 7,21 (sl, 1H, NH) ; 7,25 (sl, 1H, NH) ; 7,33-7,35 (m, 10H, H_{Ar}) ; 7,89 (sl, 1H, H_{13})
- **^{13}C RMN (DMSO- d_6)** : 25,9 ($2CH_2$) ; 28,3 (C_{23}) ; 28,9 (CH_2) ; 29,5 (CH_2) ; 36,4 (CH_2) ; 36,5 (CH_2) ; 42,4 (C_{10}) ; 54,9 (C_{11}) ; 65,4 et 65,5 (C_7 , C_7) ; 77,3 (C_{22}) ; 127,6 / 127,7 / 127,8 / 127,9 / 128,0 / 128,3 (C_{Ar}) ; 136,8 et 137,0 (C_1 , C_1') ; 155,6 / 155,7 / 156,2 (C_8 , $C_{8'}$, C_{21}) ; 169,5 (C_{12}).

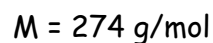
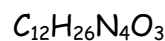
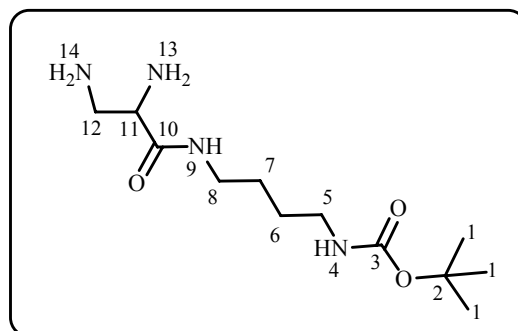
2,3-diamino-*N*-(2-*tert*-butyloxycarbonylaminoéthyl)propionamide
(6a)



Le produit **5a** (2,71 g ; 5,3 mmol) est solubilisé à chaud dans le méthanol (70 mL) puis soumis à un courant d'hydrogène. La réaction d'hydrogénolyse est catalysée par ajout d'une pointe de spatule de palladium sur charbon (Pd/C). Le mélange réactionnel est agité et chauffé à reflux dans un bain d'huile pendant 5 heures (l'évolution de la réaction est suivie par CCM). Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré sur célite afin d'ôter le catalyseur. Le méthanol est évaporé sous pression réduite. Le produit **6a** est obtenu sous forme d'une huile jaune (1,17 g ; 4,8 mmol ; 90 %).

- **CCM** : $R_f = 0,18$ (éluant : MeOH/NH₄OH 90/10)
- **Pf** : huile
- **¹H RMN (DMSO-d₆)** : 1,36 (s, 9H, H₁) ; 2,53 (m, 2H, CH₂) ; 2,64 (m, 1H, H₉) ; 2,70 (m, 2H, CH₂) ; 2,90 (m, 2H, CH₂) ; 6,85 (sl, 1H, H₄) ; 7,91 (sl, 1H, H₇)
- **¹³C RMN (DMSO-d₆)** : 28,2 (C₁) ; 46,4 (2CH₂) ; 48,6 (C₁₀) ; 57,4 (C₉) ; 77,6 (C₂) ; 155,6 (C₃) ; 174,4 (C₈).

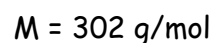
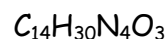
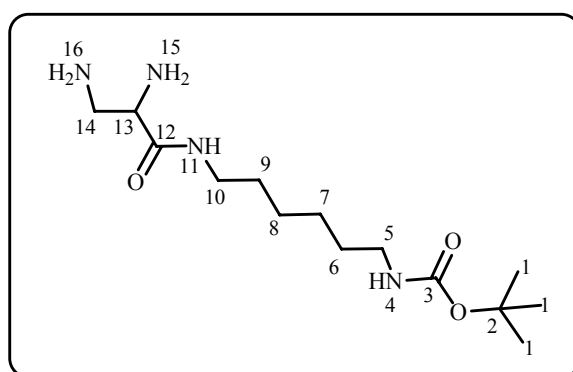
**2,3-diamino-*N*-(4-*tert*-butyloxycarbonylaminobutyl)propionamide
(6b)**



Le produit **6b** est obtenu de la même façon. A partir de 1,00 g de produit protégé **5b** (1,8 mmol), on récupère le produit déprotégé **6b** sous forme d'une huile jaune (454 mg ; 1,7 mmol ; 92 %).

- **CCM** : $R_f = 0,25$ (éluant : MeOH/NH₄OH 90/10)
- **Pf** : huile
- **¹H RMN (DMSO-*d*₆)** : 1,14-1,40 (m, 4H, H₆, H₇) ; 1,36 (s, 9H, H₁) ; 2,54 (m, 2H, CH₂) ; 2,63 (m, 1H, H₁₁) ; 2,72 (m, 2H, CH₂) ; 2,87 (m, 2H, CH₂) ; 6,79 (sl, 1H, H₄) ; 7,86 (sl, 1H, H₉)
- **¹³C RMN (DMSO-*d*₆)** : 26,6 (CH₂) ; 26,9 (CH₂) ; 28,3 (C₁) ; 46,4 (2CH₂) ; 48,6 (C₁₂) ; 57,2 (C₁₁) ; 77,3 (C₂) ; 155,6 (C₃) ; 173,8 (C₁₀).

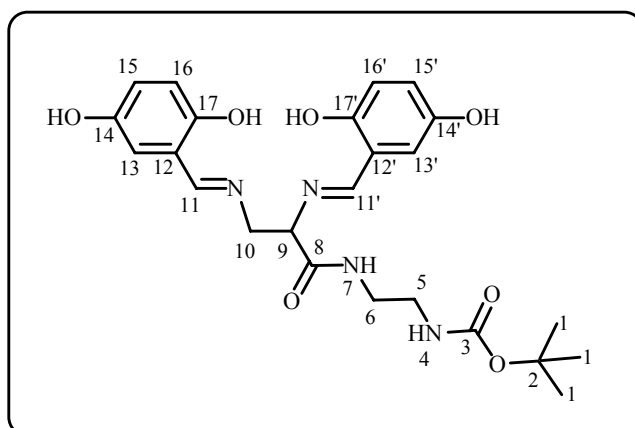
**2,3-diamino-*N*-(6-*tert*-butyloxycarbonylaminohexyl)propionamide
(6c)**



Toujours selon le même mode opératoire, 1,96 g de produit protégé **5c** (3,4 mmol) nous conduisent au produit déprotégé **6c** sous forme d'une huile jaune (0,86 g ; 2,8 mmol ; 84 %).

- **CCM** : $R_f = 0,30$ (éluant : MeOH/NH₄OH 90/10)
- **Pf** : huile
- **¹H RMN (DMSO-d₆)** : 1,21-1,40 (m, 8H, H₆, H₇, H₈, H₉) ; 1,36 (s, 9H, H₁) ; 2,53 (m, 2H, CH₂) ; 2,62 (m, 1H, H₁₃) ; 2,70 (m, 2H, CH₂) ; 2,89 (m, 2H, CH₂) ; 6,77 (sl, 1H, H₄) ; 7,88 (sl, 1H, H₁₁)
- **¹³C RMN (DMSO-d₆)** : 26,5 (CH₂) ; 26,6 (CH₂) ; 26,9 (CH₂) ; 28,2 (C₁) ; 46,4 (CH₂) ; 48,6 (CH₂) ; 50,3 (CH₂) ; 57,3 (C₁₃) ; 60,9 (CH₂) ; 77,3 (C₂) ; 155,6 (C₃) ; 173,6 (C₁₂).

2,3-Bis-[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]-N-(2-tert-butylloxycarbonylaminoéthyl)propionamide (**7a**)



$C_{24}H_{30}N_4O_7$

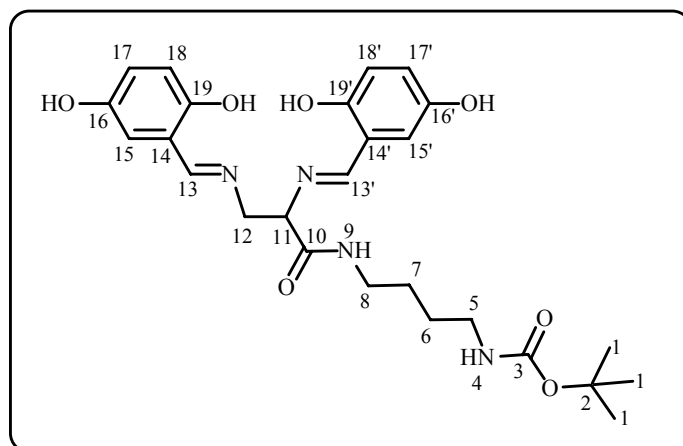
$M = 486 \text{ g/mol}$

Dans un ballon tricol de 100 mL, équipé d'un barreau aimanté et surmonté d'un réfrigérant et d'un appareil de Dean-Stark, on synthétise le ligand **7a** dans 50 mL de toluène à partir du produit **6a** (626 mg ; 2,5 mmol) et de 800 mg de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde (5,8 mmol ; 2,3 éq.). Le mélange réactionnel se colore en marron. Il est agité vigoureusement et chauffé à reflux dans un bain d'huile pendant 3 heures. Après retour à température ambiante, le toluène est évaporé sous pression réduite. Le résidu est trituré dans l'éther afin d'éliminer le plus possible de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde. On récupère alors après filtration et lavage à l'éther une poudre marron (1,14 g). Celle-ci est chromatographiée sur colonne "flash" (éluant : CH₂Cl₂/MeOH/NEt₃ 92/8/1) pour conduire à 408 mg de poudre jaune. L'analyse RMN de

cette poudre indique que le produit **7a** n'est pas correctement purifié et il est engagé tel quel dans l'étape suivante.

➤ **CCM** : $R_f = 0,45$ (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10).

2,3-Bis-[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]-N-(4-tert-butylloxycarbonylaminobutyl)propionamide (**7b**)



$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_7$

$M = 514 \text{ g/mol}$

1^{ère} méthode :

C'est la méthode développée précédemment pour **7a**. Le produit **7b** est préparé par condensation de la diamine **6b** (0,72 g ; 2,6 mmol) et du 2,5-dihydroxybenzaldéhyde (1,45 g ; 10,5 mmol ; 4 éq.) dans 70 mL de toluène, dans un montage de type Dean-Stark. La poudre marron (1,70 g) récupérée après évaporation du toluène et trituration du résidu dans l'éther diéthylique est chromatographiée sur colonne "flash" (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10) pour conduire à 411 mg de poudre jaune.

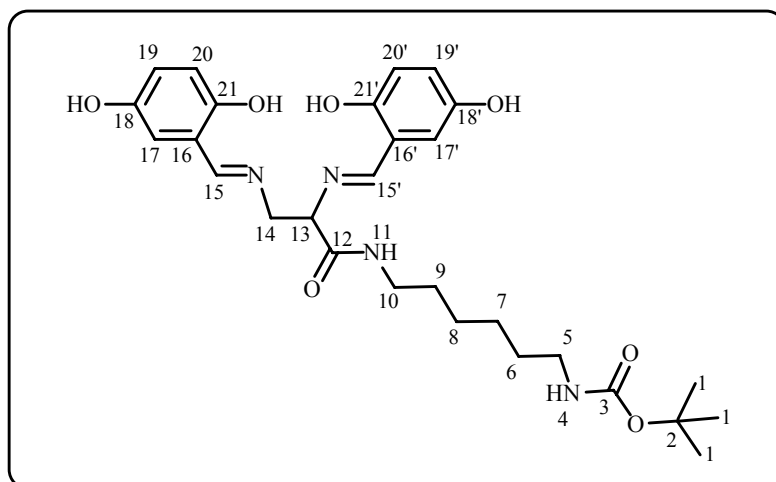
2^{ème} méthode :

A une solution de 943 mg du produit **6b** (3,4 mmol) dans 25 mL d'éthanol, une solution de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde (1,12 g ; 8,1 mmol ; 2,4 éq.) dans 45 mL d'éthanol est ajoutée goutte à goutte sous agitation vigoureuse en présence de tamis moléculaire 3 Å. Le mélange est chauffé à reflux pendant une demi-heure et, après retour à température ambiante, le tamis moléculaire est filtré sur célite. Le filtrat est évaporé sous pression réduite et le résidu est trituré dans l'éther afin d'éliminer le plus possible de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde. On récupère alors après filtration et lavage à l'éther une poudre marron (1,98 g). Celle-ci est chromatographiée sur colonne "flash" (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NEt}_3$ 92/8/1) pour conduire à 705 mg de poudre jaune.

Ici encore, quelque soit la méthode employée, l'analyse RMN révèle que le produit **7b** n'est pas correctement purifié et il est engagé tel quel dans l'étape suivante.

➤ **CCM** : $R_f = 0,58$ (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10).

2,3-Bis-[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]-N-(6-tert-butylloxycarbonylaminohexyl)propionamide (**7c**)



$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_7$

$M = 542 \text{ g/mol}$

1^{ère} méthode :

Les réactifs sont condensés dans le toluène, dans un montage de Dean-Stark. On synthétise le ligand **7c** dans 30 mL de toluène à partir de la diamine **6c** (0,72 g ; 2,3 mmol) et de 1,27 g de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde (9,2 mmol ; 4 éq.). On récupère après évaporation du toluène et trituration du résidu dans l'éther une poudre marron (1,49 g), qui est chromatographiée sur colonne "flash" (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10) pour conduire à 172 mg de poudre jaune.

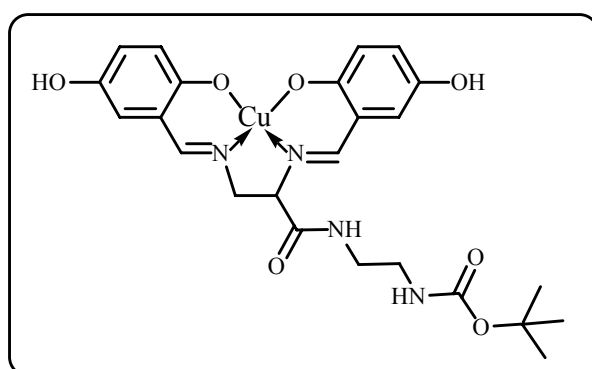
2^{ème} méthode :

La réaction de condensation s'effectue cette fois dans l'éthanol, en présence de tamis moléculaire 3 Å. A une solution de 1,35 g du produit **6c** (4,4 mmol) dans 25 mL d'éthanol, 2,47 g de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde (17,8 mmol ; 4 éq.) dans 25 mL d'éthanol sont ajoutés goutte à goutte sous agitation vigoureuse. On récupère alors après filtration du tamis, évaporation du solvant et trituration du résidu dans l'éther une poudre marron (3,84 g). Celle-ci est chromatographiée sur colonne "flash" (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10) pour conduire à 740 mg de poudre jaune.

Comme précédemment, quelque soit la méthode employée, l'analyse RMN montre que le produit **7c** n'est pas correctement purifié et il est engagé tel quel dans l'étape suivante.

➤ **CCM** : $R_f = 0,62$ (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10).

Complexe de cuivre (II) du 2,3-Bis-[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]-*N*-(2-*tert*-butyloxycarbonylaminoéthyl)propionamide (8a**)**



$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_7\text{Cu}$

$M = 547 \text{ g/mol}$

Dans un ballon monocol de 50 mL, 153 mg de produit **7a** (0,3 mmol) sont solubilisés dans 5 mL d'E+OH. Une solution d'acétate de cuivre (50 mg ; 0,25 mmol) dans 5 mL d'eau est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel qui est chauffé à reflux et agité vigoureusement pendant 1 heure. Un précipité kaki se forme et celui-ci est récupéré par filtration sur verre fritté, lavé à l'éthanol puis séché sous pression réduite sur P_2O_5 . Le produit **8a** est ainsi obtenu (70 mg ; 0,13 mmol ; 43 %).

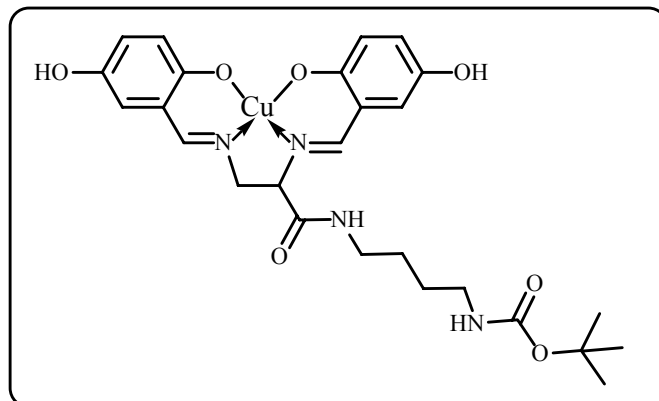
➤ **CCM** : $R_f = 0,25$ (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10)

➤ **Pf** : $> 260^\circ\text{C}$

➤ **MS (ESI)** : $(M_{63\text{Cu}} + \text{H})^+ = 548,0$; $(M_{65\text{Cu}} + \text{H})^+ = 549,9$

➤ **RMN** : Il n'a pas été effectué de RMN du fait du paramagnétisme des complexes de cuivre qui rend la caractérisation impossible.

Complexe de cuivre (II) du 2,3-Bis-[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]-*N*-(4-*tert*-butyloxycarbonylamino-butyl)propionamide (8b)



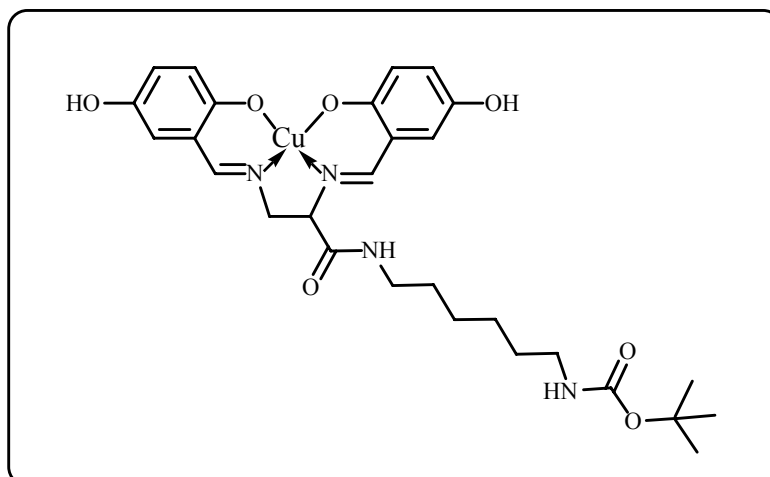
$$C_{26}H_{32}N_4O_7Cu$$

$$M = 575 \text{ g/mol}$$

De la même façon, par réaction de 280 mg de produit **7b** (0,54 mmol) et 104 mg d'acétate de cuivre (0,52 mmol), on récupère le produit **8b** sous forme de précipité kaki (40 mg ; 0,07 mmol ; 13 %).

- **CCM** : $R_f = 0,53$ (éluant : $CH_2Cl_2/MeOH$ 90/10)
- **Pf** : $> 260^\circ C$
- **MS (ESI)** : $(M_{63Cu} + H)^+ = 576,0$; $(M_{65Cu} + H)^+ = 578,0$.

Complexe de cuivre (II) du 2,3-Bis-[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]-*N*-(6-*tert*-butyloxycarbonylamino-hexyl)propionamide (8c)



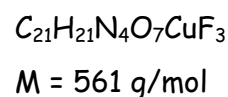
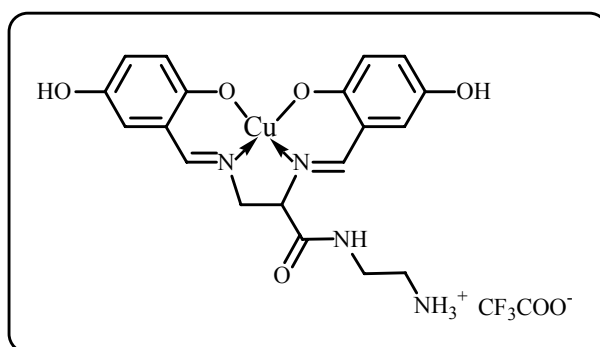
$$C_{28}H_{36}N_4O_7Cu$$

$$M = 603 \text{ g/mol}$$

Le produit **7c** (138 mg ; 0,25 mmol), par réaction avec l'acétate de cuivre (50 mg ; 0,25 mmol), fournit le complexe **8c** sous forme de précipité kaki (36 mg ; 0,06 mmol ; 25 %).

- **CCM** : $R_f = 0,62$ (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90/10)
- **Pf** : $> 260^\circ\text{C}$
- **MS (ESI)** : $(M_{63\text{Cu}} + \text{H})^+ = 604,2$; $(M_{65\text{Cu}} + \text{H})^+ = 606,2$.

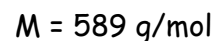
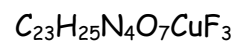
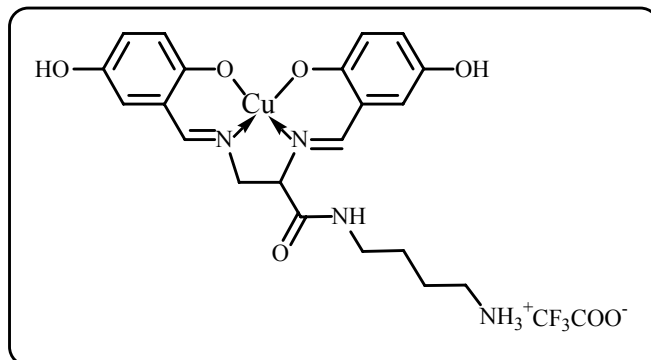
**Sel trifluoroacétique du complexe de cuivre (II) du 2,3-Bis-
[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]-N-(2-aminoéthyl)propionamide
(9a)**



Dans un ballon monocol de 25 mL, le produit **8a** (45 mg ; 0,08 mmol) est mis en suspension dans 7 mL de dichlorométhane, en présence de 9 μL d'anisole (0,08 mmol ; 1 éq.). Un excès d'acide trifluoroacétique (0,4 mL ; 5 mmol ; 65 éq.) est ajouté et la suspension devient alors une solution limpide. Le mélange réactionnel est agité 1h30 à température ambiante, puis le dichlorométhane et le TFA sont évaporés. Plusieurs co-évaporations au méthanol sont effectuées afin d'éliminer les traces de TFA. Le résidu ainsi obtenu est ensuite trituré dans l'éther. On obtient le produit **9a** sous forme de poudre marron-kaki, après filtration, lavage à l'éther et séchage sous pression réduite sur P_2O_5 (31 mg ; 0,06 mmol ; 69 %).

- **CCM**: $R_f = 0$ (éluant : MeOH 100 %)
- **Pf** : $> 260^\circ\text{C}$
- **MS (ESI)** : $(M_{63\text{Cu}})^+ = 448,0$; $(M_{65\text{Cu}})^+ = 450,0$.

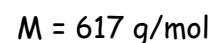
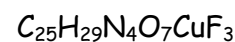
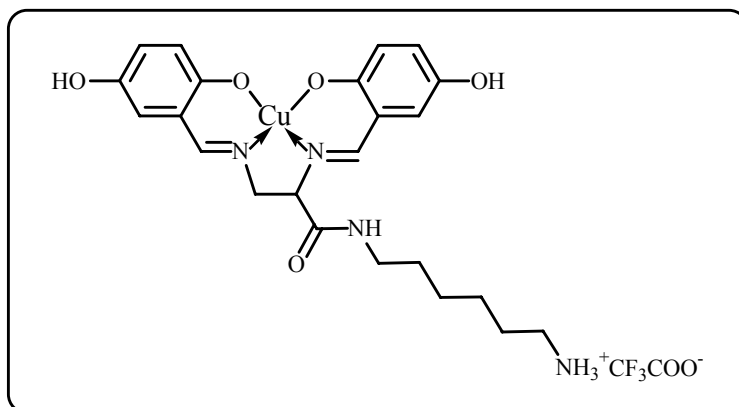
**Sel trifluoroacétique du complexe de cuivre (II) du 2,3-Bis-
[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]-N-(4-aminobutyl)propionamide
(9b)**



Selon le même mode opératoire, la déprotection du produit **8b** (40 mg ; 0,07 mmol) par un excès d'acide trifluoroacétique (0,35 mL ; 4,5 mmol ; 65 éq.) en présence de 7,6 μL d'anisole (0,07 mmol ; 1 éq.) fournit le produit **9b** sous forme de poudre marron-kaki (30 mg ; 0,05 mmol ; 72 %).

- **CCM**: $R_f = 0$ (éluant : MeOH 100 %)
- **Pf** : $> 260^\circ\text{C}$
- **MS (ESI)** : $(M_{63Cu})^+ = 475,9$; $(M_{65Cu})^+ = 477,9$.

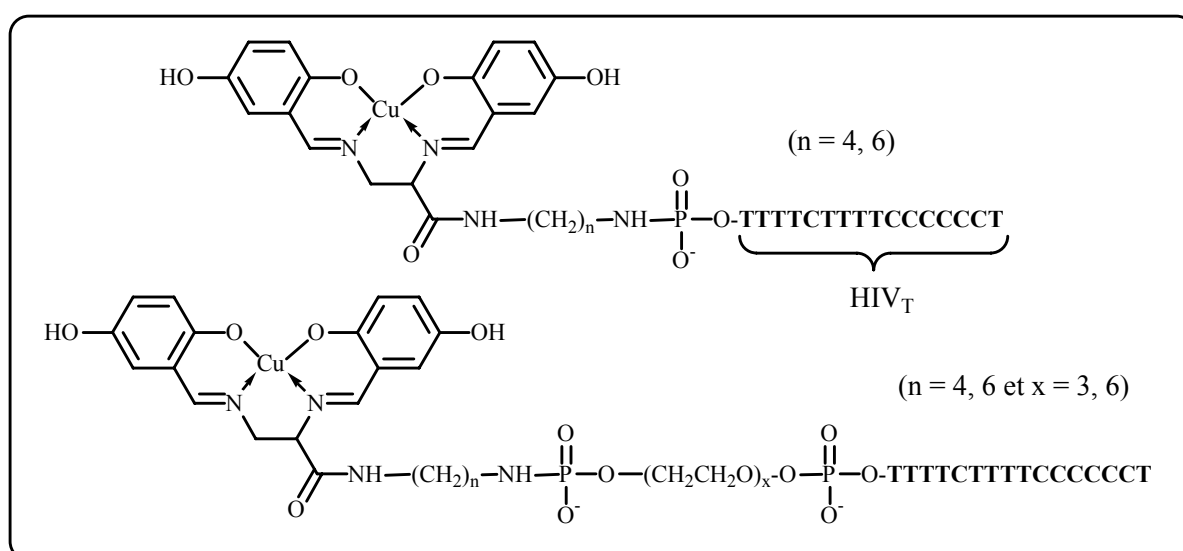
**Sel trifluoroacétique du complexe de cuivre (II) du 2,3-Bis-
[(2,5-dihydroxybenzylidène)amino]-N-(6-aminohexyl)propionamide
(9c)**



Le produit protégé **8c** (30 mg ; 0,05 mmol) réagit avec 0,25 mL d'acide trifluoroacétique (3,2 mmol ; 65 éq.) en présence de 5,4 μL d'anisole (0,05 mmol ; 1 éq.) pour aboutir à la formation du sel d'ammonium **9c** sous forme de poudre marron-kaki (9 mg ; 0,01 mmol ; 29 %).

- **CCM**: $R_f = 0$ (éluant : MeOH 100 %)
- **Pf** : $> 260^\circ\text{C}$
- **MS (ESI)** : $(M_{63\text{Cu}})^+ = 504,3$; $(M_{65\text{Cu}})^+ = 506,3$.

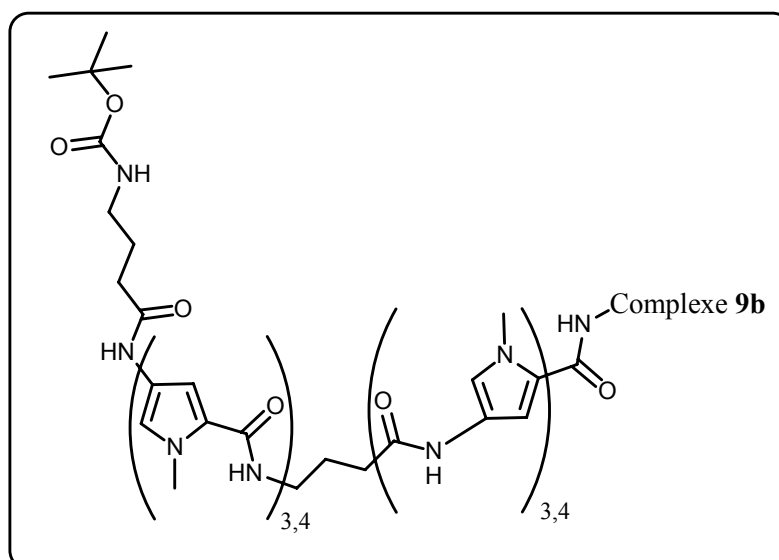
Conjugués des complexes **9b** et **9c** avec différents oligonucléotides (**HIV_T**, **HIV_TL3**, **HIV_TL6**)



L'oligonucléotide ($\approx 300 \mu\text{g}$) est précipité par EtOH/acétate de sodium, lavé par EtOH et séché à 60°C . Il est ensuite repris dans 30 μL d'eau et traité par le minimum de solution de CTAB à 8 %, μL par μL , jusqu'à ce que le précipité blanc formé n'évolue plus (un excès de CTAB conduirait à une resolubilisation du précipité). Il est récupéré par centrifugation et élimination du surnageant. 200-300 μL d'éthanol sont alors ajoutés au précipité pour le solubiliser et l'échantillon est lyophilisé pendant 30-40 mn pour le sécher. Au sel de CTA ainsi obtenu, soluble dans les solvants organiques, sont ajoutés 5 mg (41 μmol) de DMAP dans 50 μL de DMSO, 6,6 mg (30 μmol) de $(\text{PyS})_2$ dans 25 μL de DMSO et 7,9 mg (30 μmol) de PPh_3 dans 25 μL de DMSO. Après agitation, l'échantillon est laissé à température ambiante pendant 15 mn afin d'activer le phosphate terminal de l'oligonucléotide, avant d'être couplé au groupe amino terminal des complexes **9b** ou **9c**. Pour cela, 0,5 mg de dérivé du salène (**9b** ou **9c**, 0,85 et 0,81 μmol respectivement) dans

50 μL de DMSO ainsi que 5 μL (36 μmol) de TEA sont ajoutés au milieu réactionnel. Les complexes se trouvant sous forme de sels d'ammonium (trifluoroacétates), l'ajout de TEA permet de maintenir le milieu basique et de déprotoner les fonctions amines. Après réaction une nuit à température ambiante, le conjugué est précipité par ajout d'une solution de LiClO_4 à 3 % dans l'acétone, puis lavé à l'acétone et resolubilisé dans 30 μL d'eau. La formation du conjugué est vérifiée par électrophorèse sur gel d'acrylamide (20 %) et révélée par ombrage de fluorescence sous UV à 254 nm (UV-shadow). L'échantillon est ensuite purifié par HPLC (colonne XTerra C18 (7,8 \times 300 mm) de Waters, détection UV-Visible à 260, 310, 360 nm, gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 40 % en solution aqueuse, acétate d'ammonium 0.02 M, débit 2 mL/mn). Après lyophilisation, les échantillons correspondant au pic du conjugué sont précipités par EtOH/acétate d'ammonium, lavés à EtOH, lyophilisés, repris dans 30 μL d'eau. La concentration des conjugués dans l'eau est appréciée par spectrométrie UV-Visible. Les rendements sont de l'ordre de 50 %.

Conjugués du complexe 9b avec différents MGB



1^{ère} méthode : Activation par HATU :

A 3,0 mg d'acide MGB $\text{Boc}\gamma\text{Py}_4\gamma\text{Py}_4\text{COOH}$ (2,3 μmol) dans 200 μL de DMF sont ajoutés 1,4 mg de HATU (3,8 μmol ; 1,6 éq.), 5,0 mg de complexe **9b** (8,5 μmol ; 3,7 éq.) et 1,7 μL de TEA (11,8 μmol ; 5,1 éq.). L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Après 6h de réaction à température ambiante, le mélange est précipité par Et_2O , le culot est lavé à Et_2O et repris dans 120 μL de CH_2Cl_2 et 60 μL de TFA, afin d'ôter le groupement

protecteur *tert*-butyloxycarbonyle (déprotection Boc). Le milieu réactionnel est laissé 30 mn à température ambiante puis précipité par Et₂O, lavé à Et₂O et le culot est solubilisé dans 300 µL d'eau et 2 µL de TFA. L'étape de purification s'effectue par HPLC (colonne XTerra C18 (7,8×300 mm), détection UV-Visible à 260, 310, 350, 370 nm, gradient linéaire 20-80 % CH₃CN en solution aqueuse, acétate d'ammonium 0.02 M). Les fractions récupérées ont été analysées en spectrométrie de masse mais aucune d'entre elles ne correspond au produit attendu.

2^{ème} méthode : Activation par DCC/HOBt :

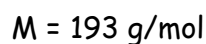
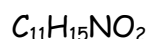
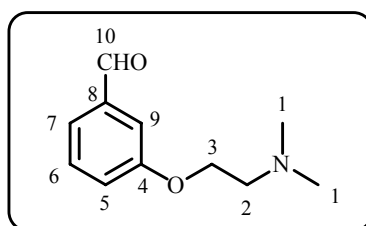
1,5 mg d'acide MGB BocγPy₃γPy₃COOH (1,5 µmol) sont solubilisés dans 50 µL de DMF, et 0,24 mg (1,8 µmol ; 1,2 éq.) de HOBt dans 50 µL de DMF ainsi que 0,36 mg (1,8 µmol ; 1,2 éq.) de DCC dans 50 µL de DMF sont ajoutés. L'activation de l'acide est continuée pendant 15h30. Puis 1,04 mg (1,8 µmol ; 1,2 éq.) de complexe **9b** dans 20 µL de DMF ainsi que 4 µL (28 µmol ; 19 éq.) de TEA sont ajoutés au milieu réactionnel, et la réaction évolue pendant 17h. Après précipitation et lavage par Et₂O et lyophilisation, le produit est purifié par HPLC. Cependant, aucune des différentes fractions récupérées, analysées par spectrométrie de masse, ne correspond au produit attendu.

3^{ème} méthode : Activation par BOP :

2,0 mg d'acide MGB BocγPy₃γPy₃COOH (2,0 µmol) sont solubilisés dans 50 µL de DMF, et 0,87 mg (2,0 µmol ; 1 éq.) de BOP dans 50 µL de DMF, 1,15 mg (2,0 µmol ; 1 éq.) de complexe **9b** dans 20 µL de DMF ainsi que 4 µL (28 µmol ; 14 éq.) de TEA sont ajoutés. L'évolution de la réaction, à température ambiante, est suivie par CCM. Après deux jours de réaction, le milieu est précipité par Et₂O et le culot lavé à Et₂O et lyophilisé. Une purification par HPLC est effectuée mais là encore, aucune des fractions analysées en spectrométrie de masse ne donne le résultat attendu.

La même manipulation est également recommencée avec déprotection du groupement Boc avant la purification par HPLC (CH₂Cl₂/TFA, voir 1^{ère} méthode). Dans ce cas, comme dans les autres, l'analyse par spectrométrie de masse n'a pas permis de confirmer la présence du conjugué souhaité dans le mélange réactionnel.

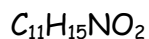
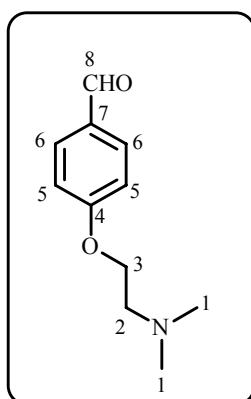
3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzaldéhyde (10)



Dans un ballon tricol de 100 ml, équipé d'un barreau aimanté et d'un thermomètre, et surmonté d'un réfrigérant, on prépare le produit **10** dans 45 mL de DMF à partir de 1,43 g de 3-hydroxybenzaldéhyde (11,7 mmol), 2,25 g de chlorure de 2-(diméthylamino)éthyle sous forme de chlorhydrate (15,6 mmol ; 1,3 éq.) et 4,83 g de carbonate de potassium (34,9 mmol ; 3,0 éq.). La suspension est chauffée à 50°C pendant 20 heures. Après retour à température ambiante et filtration, le DMF est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux obtenu est repris dans 100 mL d'éther diéthylique et 100 mL d'eau distillée. La phase étherée est récupérée et séchée sur sulfate de magnésium. Après filtration, elle est évaporée sous pression réduite pour conduire à une huile jaune (1,17 g) qui est chromatographiée sur colonne "flash" (éluant : Acétone/MeOH 80/20). Le produit **10** est récupéré sous forme d'une huile jaune (960 mg ; 5,0 mmol ; 43 %).

- **CCM** : $R_f = 0,28$ (éluant : Acétone/MeOH 80/20)
- **Pf** : huile
- **^1H RMN (CDCl_3)** : 2,32 (s, 6H, H_1) ; 2,74 (t, 2H, H_2 , $J_{H_2H_3} = 5,4$ Hz) ; 4,10 (t, 2H, H_3 , $J_{H_3H_2} = 5,4$ Hz) ; 7,14-7,23 (m, 1H, H_{Ar}) ; 7,34-7,48 (m, 3H, H_{Ar}) ; 9,94 (s, 1H, H_{10})
- **^{13}C RMN (CDCl_3)** : 46,0 (C_1) ; 58,3 (C_2) ; 66,4 (C_3) ; 112,9 (C_{Ar}) ; 122,3 (C_{Ar}) ; 123,8 (C_{Ar}) ; 130,2 (C_{Ar}) ; 137,9 (C_8) ; 159,6 (C_4) ; 192,3 (C_{10}).

4-(2-diméthylaminoéthoxy)benzaldéhyde (11)

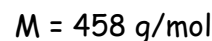
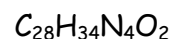
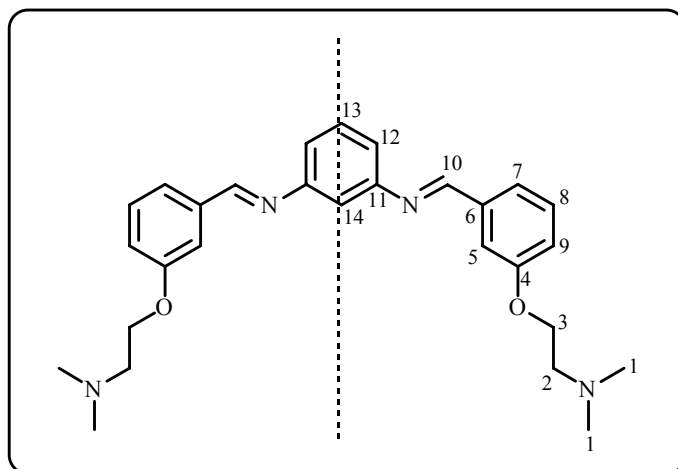


$$M = 193 \text{ g/mol}$$

On prépare de la même façon le produit **11** dans 45 mL de DMF à partir de 1,24 g de 4-hydroxybenzaldéhyde (10,1 mmol), 1,85 g de chlorure de 2-(diméthylamino)éthyle sous forme de chlorhydrate (12,8 mmol ; 1,3 éq.) et 3,82 g de carbonate de potassium (27,7 mmol ; 2,7 éq.). L'huile jaune (1,27 g) obtenue après le traitement indiqué précédemment est chromatographiée sur colonne "flash" (éluant : Acétone/MeOH 80/20). Le produit **11** est récupéré sous forme d'une huile jaune (1,11 g ; 5,8 mmol ; 57 %).

- **CCM** : $R_f = 0,27$ (éluant : Acétone/MeOH 80/20)
- **Pf** : huile
- **1H RMN ($CDCl_3$)** : 2,32 (s, 6H, H_1) ; 2,73 (t, 2H, H_2 , $J_{H_2H_3} = 5,7$ Hz) ; 4,12 (t, 2H, H_3 , $J_{H_2H_3} = 5,7$ Hz) ; 6,99 (d, 2H, H_5 , $J_{H_5H_6} = 8,6$ Hz) ; 7,80 (d, 2H, H_6 , $J_{H_6H_5} = 8,6$ Hz) ; 9,85 (s, 1H, H_8)
- **^{13}C RMN ($CDCl_3$)** : 46,0 (C_1) ; 58,2 (C_2) ; 66,6 (C_3) ; 115,0 (C_{Ar}) ; 130,1 (C_7) ; 132,1 (C_{Ar}) ; 164,0 (C_4) ; 190,9 (C_8).

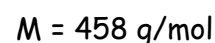
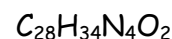
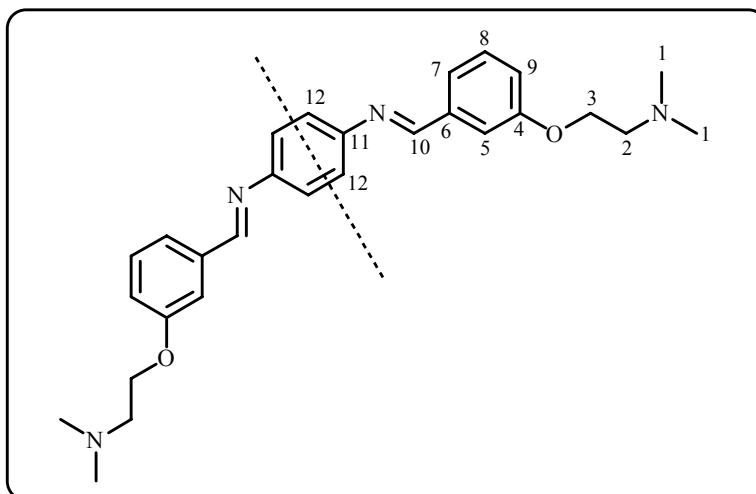
***N,N'*-bis[3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,3-diamine (12)**



A une solution de 3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzaldéhyde **10** (710 mg ; 3,7 mmol) dans 5 mL d'éthanol absolu est ajoutée goutte à goutte sous agitation vigoureuse une solution de 1,3-phénylènediamine (184 mg ; 1,7 mmol ; 0,46 éq.) dans 5 mL d'éthanol. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 1 heure, puis, après retour à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux marron ainsi obtenu est trituré dans l'éther diéthylique et un précipité jaune apparaît. Après filtration, lavage à l'éther et séchage sous pression réduite sur P_2O_5 , le produit **12** est récupéré sous forme de poudre beige (147 mg ; 0,3 mmol ; 19 %).

- **CCM** : $R_f = 0,24$ (éluant : MeOH/NH₄OH 90/10)
- **Pf** : 88°C
- **MS (MALDI)** : $(M + H)^+ = 459,2$
- **¹H RMN (CDCl₃)** : 2,41 (s, 12H, H₁) ; 2,84 (t, 4H, H₂, $J_{H_2H_3} = 5,7$ Hz) ; 4,21 (t, 4H, H₃, $J_{H_3H_2} = 5,7$ Hz) ; 7,05 (t, 1H, H₁₄) ; 7,08 (Ddd, 2H, H₉, $J_{H_9H_8} = 7,5$ Hz, $J_{H_9H_5} = 2,5$ Hz, $J_{H_9H_7} = 1,5$ Hz) ; 7,10 (dd, 2H, H₁₂, $J_{H_{12}H_{13}} = 7,8$ Hz, $J_{H_{12}H_{14}} = 2,0$ Hz) ; 7,38 (t, 2H, H₈, $J_{H_8H_7} = J_{H_8H_9} = 7,5$ Hz) ; 7,41 (t, 1H, H₁₃, $J_{H_{13}H_{12}} = 7,8$ Hz) ; 7,43 (dt, 2H, H₇, $J_{H_7H_8} = 7,5$ Hz, $J_{H_7H_9} = J_{H_7H_5} = 1,5$ Hz) ; 7,55 (dd, 2H, H₅, $J_{H_5H_9} = 2,5$ Hz, $J_{H_5H_7} = 1,5$ Hz) ; 8,48 (s, 2H, H₁₀)
- **¹³C RMN (CDCl₃)** : 45,7 (C₁) ; 58,1 (C₂) ; 65,8 (C₃) ; 112,6 (C₅) ; 113,0 (C₁₄) ; 118,7 (C₁₂ ou 9) ; 119,0 (C₉ ou 12) ; 122,6 (C₇) ; 129,8 (C₈ et 13) ; 137,5 (C₆) ; 153,0 (C₁₁) ; 159,1 (C₄) ; 160,5 (C₁₀).

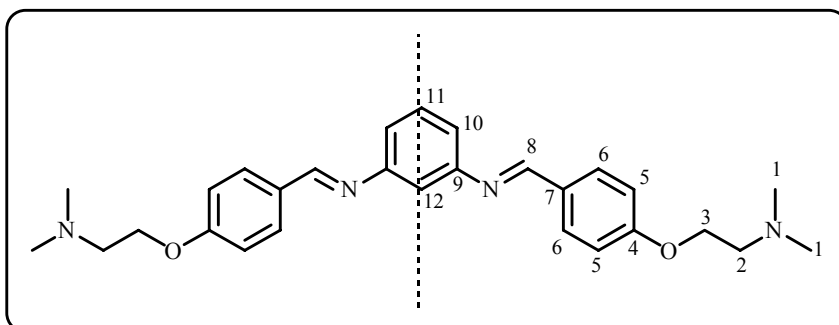
***N,N'*-bis[3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,4-diamine (13)**



A une solution de 3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzaldéhyde **10** (530 mg ; 2,7 mmol) dans 10 mL d'éthanol absolu est ajoutée goutte à goutte sous agitation vigoureuse une solution de 1,4-phénylènediamine (137 mg ; 1,3 mmol ; 0,48 éq.) dans 10 mL d'éthanol. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 1h30, puis, après retour à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu huileux jaune (633 mg) ainsi obtenu est recristallisé dans l'éthanol absolu, et le produit **13** est récupéré après filtration, lavage à l'éthanol et séchage sous pression réduite sur P_2O_5 sous forme de cristaux jaunes (372 mg ; 0,8 mmol ; 64 %).

- **CCM** : $R_f = 0,23$ (éluant : MeOH/NH₄OH 90/10)
- **Pf** : 97°C
- **MS (MALDI)** : $(M + H)^+ = 459,1$; $(M + Na)^+ = 481,1$
- **¹H RMN (CDCl₃)** : 2,37 (s, 12H, H₁) ; 2,78 (t, 4H, H₂, $J_{H_2H_3} = 5,7$ Hz) ; 4,17 (t, 4H, H₃, $J_{H_3H_2} = 5,7$ Hz) ; 7,08 (Ddd, 2H, H₉, $J_{H_9H_8} = 7,7$ Hz, $J_{H_9H_5} = 2,5$ Hz, $J_{H_9H_7} = 1,4$ Hz) ; 7,28 (s, 4H, H₁₂) ; 7,37 (t, 2H, H₈, $J_{H_8H_7} = J_{H_8H_9} = 7,7$ Hz) ; 7,43 (dt, 2H, H₇, $J_{H_7H_8} = 7,7$ Hz, $J_{H_7H_9} = J_{H_7H_5} = 1,4$ Hz) ; 7,55 (dd, 2H, H₅, $J_{H_5H_9} = 2,5$ Hz, $J_{H_5H_7} = 1,4$ Hz) ; 8,47 (s, 2H, H₁₀)
- **¹³C RMN (CDCl₃)** : 45,9 (C₁) ; 58,3 (C₂) ; 66,1 (C₃) ; 112,5 (C₅) ; 118,9 (C₉) ; 121,8 (C₁₂) ; 122,4 (C₇) ; 129,7 (C₈) ; 137,6 (C₆) ; 149,9 (C₁₁) ; 159,2 (C₄) ; 159,6 (C₁₀)

***N,N'*-bis[4-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,3-diamine (14)**

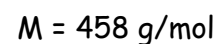
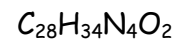
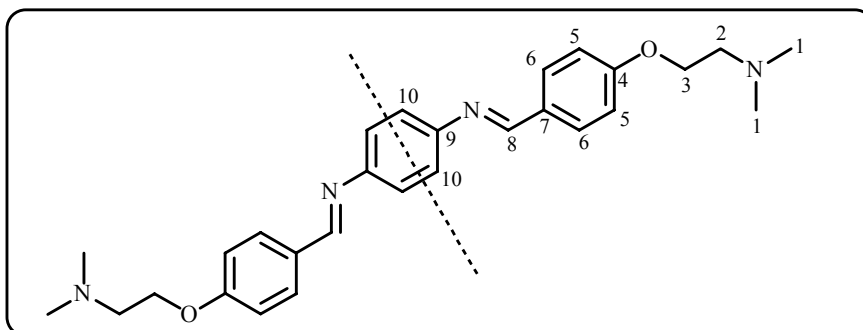


$C_{28}H_{34}N_4O_2$
 $M = 458 \text{ g/mol}$

A une solution de 4-(2-diméthylaminoéthoxy)benzaldéhyde **11** (342 mg ; 1,8 mmol) dans 15 mL de toluène est ajoutée 90 mg de 1,3-phénylènediamine (0,8 mmol ; 0,44 éq.). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant deux heures, dans un montage de Dean-Stark. Après retour à température ambiante, le solvant est évaporé sous pression réduite, et le résidu huileux marron ainsi obtenu est trituré dans l'éther diéthylique. Il se forme alors un précipité jaune, qui est recristallisé dans l'éthanol absolu. Après filtration, lavage à l'éthanol et séchage sous pression réduite sur P_2O_5 , le produit **14** est obtenu sous forme de cristaux blancs (64 mg ; 0,14 mmol ; 54 %)

- **CCM** : $R_f = 0,23$ (éluant : MeOH/ NH_4OH 90/10)
- **Pf** : $103^\circ C$
- **MS (MALDI)** : $(M + H)^+ = 459,1$
- **1H RMN ($CDCl_3$)** : 2,38 (s, 12H, H_1) ; 2,79 (t, 4H, H_2 , $J_{H_2H_3} = 5,7 \text{ Hz}$) ; 4,15 (t, 4H, H_3 , $J_{H_3H_2} = 5,7 \text{ Hz}$) ; 7,00 (d, 4H, H_5 , $J_{H_5H_6} = 8,8 \text{ Hz}$) ; 7,02 (t, 1H, H_{12} , $J_{H_{12}H_{10}} = 2,2 \text{ Hz}$) ; 7,05 (dd, 2H, H_{10} , $J_{H_{10}H_{11}} = 7,8 \text{ Hz}$, $J_{H_{10}H_{12}} = 2,2 \text{ Hz}$) ; 7,38 (t, 1H, H_{11} , $J_{H_{11}H_{10}} = 7,8 \text{ Hz}$) ; 7,85 (d, 4H, H_6 , $J_{H_6H_5} = 8,8 \text{ Hz}$) ; 8,44 (s, 2H, H_8)
- **^{13}C RMN ($CDCl_3$)** : 45,9 (C_1) ; 58,1 (C_2) ; 66,1 (C_3) ; 112,9 (C_{12}) ; 114,8 (C_5) ; 118,3 (C_{10}) ; 129,3 (C_7) ; 129,7 (C_{11}) ; 130,5 (C_6) ; 153,3 (C_9) ; 159,9 (C_8) ; 161,5 (C_4).

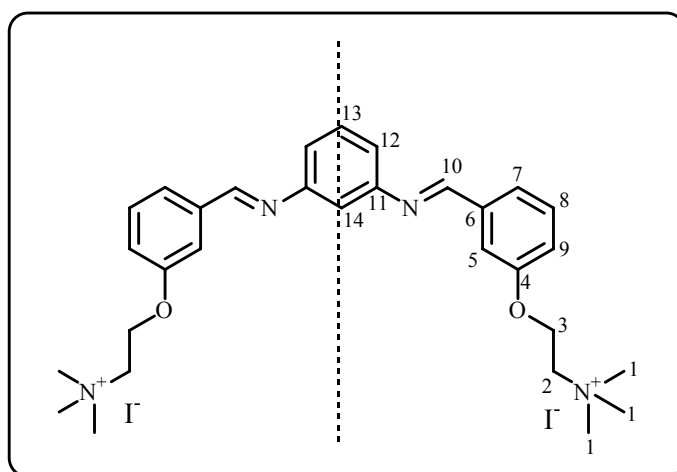
***N,N'*-bis[4-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,4-diamine (15)**



A une solution de 4-(2-diméthylamino-éthoxy)benzaldéhyde **11** (879 mg ; 4,6 mmol) dans 5 mL d'éthanol absolu est ajoutée goutte à goutte sous agitation vigoureuse une solution de 1,4-phénylènediamine (235 mg ; 2,2 mmol ; < 0,5 éq.) dans 5 mL d'éthanol. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant une heure. Lors du retour à température ambiante, des cristaux jaunes se forment. Ceux-ci sont filtrés, lavés à l'éthanol et recristallisés dans un minimum d'éthanol. Le produit **15** est récupéré après filtration, lavage à l'éthanol et séchage sous pression réduite sur P_2O_5 sous forme de cristaux jaunes (414 mg ; 0,9 mmol ; 41 %).

- **CCM** : $R_f = 0,23$ (éluant : MeOH/NH₄OH 90/10)
- **Pf** : 170°C
- **MS (MALDI)** : $(M + H)^+ = 459,2$
- **¹H RMN (CDCl₃)** : 2,38 (s, 12H, H₁) ; 2,79 (t, 4H, H₂, $J_{H_2H_3} = 5,7$ Hz) ; 4,15 (t, 4H, H₃, $J_{H_3H_2} = 5,7$ Hz) ; 7,00 (d, 4H, H₅, $J_{H_5H_6} = 8,8$ Hz) ; 7,23 (s, 4H, H₁₀) ; 7,83 (d, 4H, H₆, $J_{H_6H_5} = 8,8$ Hz) ; 8,42 (s, 2H, H₈)
- **¹³C RMN (CDCl₃)** : 46,1 (C₁) ; 58,4 (C₂) ; 66,4 (C₃) ; 115,0 (C₅) ; 121,9 (C₁₀) ; 129,6 (C₇) ; 130,6 (C₆) ; 150,1 (C₉) ; 159,1 (C₄) ; 161,7 (C₈).

Iodure de *N,N'*-bis[3-(2-triméthylammoniuméthoxy)benzylidène]-benzène-1,3-diamine (16)

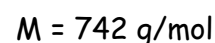
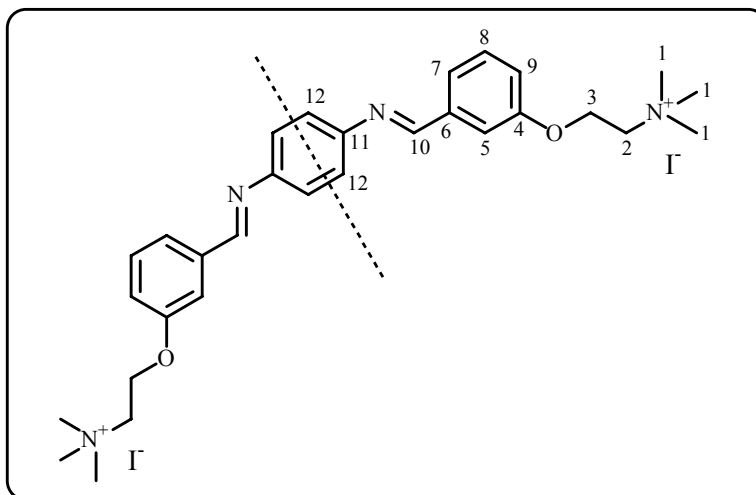


$$M = 742 \text{ g/mol}$$

A une solution de *N,N'*-bis[3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,3-diamine **12** (52 mg ; 0,11 mmol) dans 5 mL de chloroforme, préalablement refroidie dans un bain de glace, sont ajoutés 100 μ L de CH_3I (228 mg ; 1,6 mmol ; 14 eq.). Le milieu réactionnel est agité 30 mn dans le bain de glace puis une nuit à température ambiante. Un précipité apparaît progressivement. 25 mL d'éther diéthylique sont alors ajoutés au milieu réactionnel. Après agitation, le précipité jaune formé est filtré sur verre fritté, lavé à Et_2O et séché sous pression réduite sur P_2O_5 . Le produit **16** est obtenu sous forme de poudre beige (57 mg ; 77 μ mol ; 70 %).

- **CCM** : $R_f = 0$ (éluant : Acétone/MeOH 80/20)
- **Pf** : $> 260^\circ C$
- **MS (ESI)** : $(M/2) = 244,2$
- 1H RMN ($DMSO-d_6$) : 3,22 (s, 18H, H_1) ; 3,84 (s, 4H, H_2) ; 4,56 (s, 4H, H_3) ; 7,00 - 7,32 (m, 5H, H_{Ar}) ; 7,40-7,80 (m, 7H, H_{Ar}) ; 8,72 (s, 2H, H_{10})
- ^{13}C RMN ($DMSO-d_6$) : 53,2 (C_1) ; 61,8 (CH_2) ; 64,2 (CH_2) ; 112,8 (C_{Ar}) ; 113,2 (C_{Ar}) ; 118,4 (C_{Ar}) ; 119,1 (C_{Ar}) ; 122,8 (C_{Ar}) ; 130,0 (C_{Ar}) ; 130,1 (C_{Ar}) ; 137,4 (C_6) ; 152,2 (C_{11}) ; 157,7 (C_4) ; 160,8 (C_{10}).

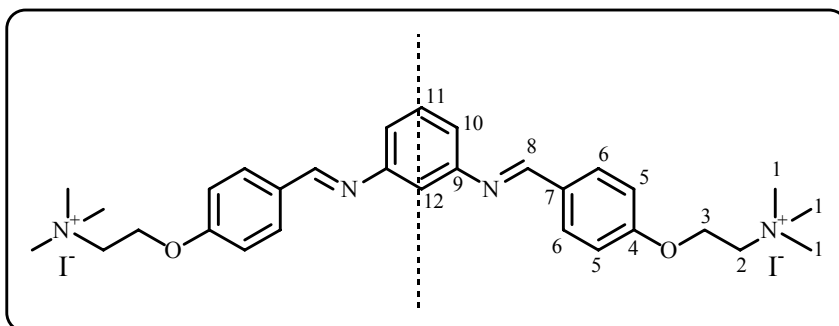
Iodure de *N,N'*-bis[3-(2-triméthylammoniuméthoxy)benzylidène]- benzène-1,4-diamine (17)



A une solution de *N,N'*-bis[3-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,4-diamine **13** (139 mg ; 0,30 mmol) dans 5 mL de chloroforme, préalablement refroidie dans un bain de glace, sont ajoutés 100 μ L de CH_3I (228 mg ; 1,6 mmol ; 5 eq.). Le milieu réactionnel est agité 30 mn dans le bain de glace puis une nuit à température ambiante. Un précipité apparaît progressivement. 25 mL d'éther diéthylique sont alors ajoutés au milieu réactionnel. Après agitation, le précipité jaune formé est filtré sur verre fritté, lavé à Et_2O et recristallisé dans un mélange $EtOH / H_2O$. Après filtration, lavage à l'éthanol puis à l'éther, et séchage sous pression réduite sur P_2O_5 , le produit **17** est obtenu sous forme de poudre jaune (114 mg ; 0,15 mmol ; 51 %).

- **CCM** : $R_f = 0$ (éluant : Acétone/MeOH 80/20)
- **Pf** : $> 260^\circ C$
- **MS (ESI)** : $(M/2) = 244,2$
- **1H RMN (DMSO- d_6)** : 3,22 (s, 18H, H_1) ; 3,84 (s, 4H, H_2) ; 4,56 (s, 4H, H_3) ; 7,15-7,25 (m, 2H, H_9) ; 7,37 (s, 4H, H_{12}) ; 7,44-7,68 (m, 6H, H_5, H_7, H_8) ; 8,70 (s, 2H, H_{10})
- **^{13}C RMN (DMSO- d_6)** : 53,2 (C_1) ; 61,8 (CH_2) ; 64,1 (CH_2) ; 113,1 (C_{Ar}) ; 118,3 (C_{Ar}) ; 122,1 (C_{Ar}) ; 122,7 (C_{Ar}) ; 130,0 (C_{Ar}) ; 137,6 (C_6) ; 149,1 (C_{11}) ; 157,7 (C_4) ; 159,8 (C_{10}).

Iodure de *N,N'*-bis[4-(2-triméthylammoniuméthoxy)benzylidène]-benzène-1,3-diamine (18)

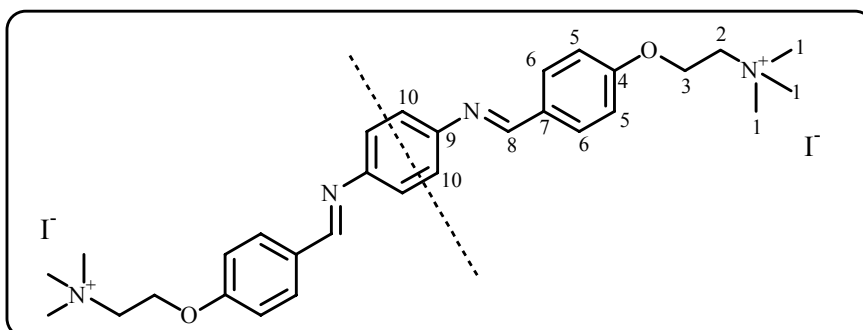


$$C_{30}H_{40}N_4O_2I_2$$

$$M = 742 \text{ g/mol}$$

A une solution de *N,N'*-bis[4-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,3-diamine **14** (101 mg ; 0,22 mmol) dans 5 mL de chloroforme, préalablement refroidie dans un bain de glace, sont ajoutés 100 μ L de CH_3I (228 mg ; 1,6 mmol ; 7 eq.). Le milieu réactionnel est agité 30 mn dans le bain de glace puis une nuit à température ambiante. Un précipité apparaît progressivement. 25 mL d'éther diéthylique sont alors ajoutés au milieu réactionnel. Après agitation, le précipité formé est filtré sur verre fritté, lavé à l'éther et séché sous pression réduite sur P_2O_5 . On récupère une poudre beige, mais l'analyse RMN de cette poudre indique que le produit s'est dégradé : on retrouve en effet sur le spectre, outre les pics correspondants au produit **18**, un pic attribuable à une fonction aldéhyde.

Iodure de *N,N'*-bis[4-(2-triméthylammoniuméthoxy)benzylidène]-benzène-1,4-diamine (19)



$$C_{30}H_{40}N_4O_2I_2$$

$$M = 742 \text{ g/mol}$$

Le même mode opératoire appliqué à une solution de *N,N*-bis[4-(2-diméthylaminoéthoxy)benzylidène]benzène-1,4-diamine **15** (46 mg ; 0,10 mmol) dans 5 mL de chloroforme, à laquelle on ajoute 100 μ L de CH_3I (228 mg ; 1,6 mmol ; 16 μ q.), fournit le produit **19** sous forme de poudre jaune (62 mg ; 84 μ mol ; 84 %).

- **CCM** : $R_f = 0$ (éluant : Acétone/MeOH 80/20)
- **Pf** : $> 260^\circ\text{C}$
- **MS (ESI)** : $(M/2) = 244,3$
- **^1H RMN (DMSO- d_6)** : 3,21 (s, 18H, H_1) ; 3,84 (s, 4H, H_2) ; 4,57 (s, 4H, H_3) ; 7,16 (d, 4H, H_5 , $J_{H_5H_6} = 7,2$ Hz) ; 7,33 (s, 4H, H_{10}) ; 7,94 (d, 4H, H_6 , $J_{H_6H_5} = 7,2$ Hz) ; 8,64 (s, 2H, H_8)
- **^{13}C RMN (DMSO- d_6)** : 53,1 (C_1) ; 61,8 (CH_2) ; 64,0 (CH_2) ; 115,0 (C_{Ar}) ; 121,9 (C_{Ar}) ; 129,7 (C_7) ; 130,4 (C_{Ar}) ; 149,1 (C_9) ; 158,9 (C_4) ; 159,9 (C_8).

B - ACTIVITE BIOLOGIQUE : PROTOCOLES

L'étude biochimique des différents produits nécessite l'emploi de solutions de très faibles concentrations, de l'ordre de quelques micromoles par litre. Ces solutions sont préparées régulièrement lors de chaque nouvelle expérience, par dilution d'une solution stock. Les solutions stocks sont des solutions des composés dans le DMSO, à la concentration de 5 mM. Ces solutions sont conservées au congélateur et un échantillon de chacune est décongelé pour utilisation lors de chaque expérience. L'eau utilisée pour les dilutions est de l'eau desionisée, filtrée au travers d'un filtre de diamètre de pores 22 μm et stérilisée.

I. SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION UV-VISIBLE

Les spectres ont été enregistrés entre 230 et 550 nm au moyen d'un spectrophotomètre UV-Visible KONTRON INSTRUMENTS UVIKON 943. Les mesures ont été effectuées dans des cuves en quartz de 10 mm de trajet optique, dans 1 mL de tampon Bis Phosphate EDTA (BPE : 6 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH = 7,1).

Dans un premier temps, on enregistre le spectre du produit seul, à la concentration de 75 μM (complexes **2a-d**) ou 20 μM (complexes **8a-c** et **9a-c** et produits **12-19**). Puis, on enregistre à nouveau le spectre du composé en présence d'ADN de thymus de veau (200 μM , maximum d'absorption à 260 nm).

Pour évaluer plus précisément l'interaction des produits avec l'ADN, on peut aussi mesurer les variations de l'absorbance du composé dans la solution tampon en présence de concentrations croissantes d'ADN, l'ADN étant ajouté progressivement à la fois dans la cuve de référence et dans la cuve contenant le produit à tester (titrations).

II. DENATURATION THERMIQUE DE L'ADN

Les mesures sont effectuées dans le même tampon (BPE). Un rapport de concentrations [(composé testé) / ADN] de 0,5 ou 1 est utilisé. Les cuves en quartz du spectrophotomètre contiennent 1 mL de tampon BPE. Un volume approprié d'ADN est ajouté dans chaque cuve afin d'obtenir une absorbance à 260 nm de 0,12 ($\pm 0,01$), ce qui correspond à une concentration de 20 μM (selon l'application de la loi de BEER-LAMBERT : $A^{260} = \varepsilon \times l \times C$, avec $\varepsilon = 6\,600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour une concentration en ADN exprimée en

terme de nucléotide). Puis le produit est introduit à la concentration voulue. On conserve également une cuve de référence, ADN seul.

Le couplage du spectrophotomètre UVIKON 943 à un bain thermostaté (NESLAB RTE 111) permet la programmation d'une élévation progressive de la température des échantillons à raison de 1°C / minute. L'absorbance de la solution à 260 nm est relevée toutes les minutes, ce qui permet d'accéder à la courbe Absorbance = f(Température). Le calcul de la dérivée première de cette courbe nous fournit la valeur de son maximum, T_m .

III. COUPURE DE PLASMIDE

Chaque échantillon de 20 μL contient 2 μL de solution de plasmide (0,13 μg), 2 μL de tampon TN (Tris-NaCl : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) 10 mM, NaCl 10 mM, pH = 7), 6 μL d'eau et 10 μL de solution du produit à tester à la concentration voulue. On prépare également des échantillons "contrôles", qui servent de référence, dans lesquels les 10 μL de solution de produit sont remplacés par 10 μL d'une solution de DMSO dans l'eau, afin d'avoir une quantité de DMSO équivalente pour tous les échantillons, les solutions stocks des complexes étant effectuées dans le DMSO.

Dans certains cas, les manipulations sont menées en présence d'agent activateur. Au lieu des 6 μL d'eau, on introduit donc 2 μL de solution d'agent activateur à la concentration désirée et on complète avec 4 μL d'eau. Des témoins "ADN + agent activateur" doivent alors être préparés, de la même façon que pour les témoins "ADN seul".

Une fois préparés, les échantillons sont mis à incuber (les temps et températures d'incubation sont indiqués pour chaque cas). Après incubation, 5 μL de bleu non dénaturant (0,25 % de bleu de bromophénol, 0,25 % de xylène cyanol, 30 % de glycérol dans l'eau) sont ajoutés dans chaque tube. Les échantillons sont alors déposés sur un gel d'agarose (1 % dans un tampon TBE : Tris Borate EDTA : tris(hydroxyméthyl)-aminométhane 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3), plongé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TBE. Le bleu non dénaturant permet de mieux visualiser les dépôts ainsi que l'avancement de la migration. L'électrophorèse est arrêtée après deux heures de migration à 120 V.

Le gel est ensuite plongé dans un bain à 10 μg / mL de bromure d'éthidium (BET, Figure 75) pendant 20 minutes. Il s'agit d'un révélateur d'électrophorèse de l'ADN très sensible. Non fluorescent à l'état libre, il le devient en s'intercalant à l'ADN.

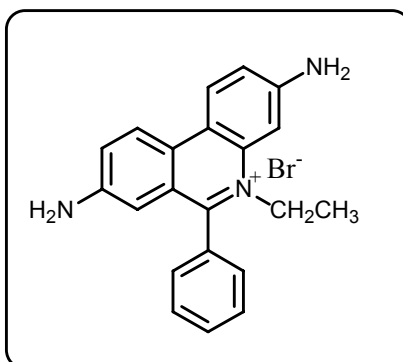


Figure 75 : Bromure d'éthidium, BET

Après fixation du BET à l'ADN, le gel est lavé à l'eau puis photographié sous lumière ultraviolette.

IV. COUPURE D'ADN MARQUE

1. Coupure d'un fragment d'ADN de 117-bp

a. Préparation du fragment marqué

Le fragment d'ADN de 117 paires de bases est obtenu par digestion du plasmide pBS (Stratagene) par les enzymes de restriction *EcoRI* et *PvuII*. Il est radiomarké à son extrémité-3' en y incorporant la α -[^{32}P]-dATP (Amersham, 3000 Ci/mmol) grâce à l'AMV Reverse Transcriptase (Avian Myeloblastosis Virus RT, Roche). Les produits de digestion marqués sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (6 %) sous conditions non dénaturantes dans le tampon TBE. L'autoradiographie de ce gel permet d'identifier les fragments radiomarkés. La bande d'acrylamide correspondant au fragment d'intérêt est alors excisée, écrasée et éluée une nuit à 4°C dans un tampon Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). La suspension est passée au travers d'un filtre Millipore 0,45 μm et l'ADN est précipité par de l'éthanol absolu froid. Après lavage à l'éthanol à 70 % et séchage, le culot d'ADN est remis en suspension dans de l'eau désionisée, et dilué de façon à obtenir une solution à 100 cps/ μL .

b. Coupure du fragment marqué

Chaque échantillon, de 20 μL au total, contient 2 μL de solution d'ADN 117-3' marqué au ^{32}P , 2 μL de tampon TN 10 mM, 6 μL d'eau et 10 μL de produit à tester à la concentration voulue. Les 6 μL d'eau sont éventuellement remplacés par 4 μL d'eau et 2 μL de solution d'agent activateur à la concentration voulue. Après incubation, les fragments d'ADN de chaque échantillon sont précipités par 100 μL d'éthanol absolu, puis, après agitation au vortex, les tubes sont centrifugés pendant 20 mn à 4°C. Le

surnageant est alors éliminé et le culot est séché à l'air libre pendant environ une heure. Il est ensuite resuspendu dans 5 μL de bleu dénaturant (tampon TBE contenant 80 % de formamide et 0,1 % de colorant) puis les échantillons sont chauffés à 90°C pendant 4 mn, et immédiatement plongés dans la glace. Ils sont alors déposés sur gel de polyacrylamide dénaturant (8 %, urée 7 M) et soumis à électrophorèse. Un témoin "G" est également déposé sur le gel. Il permet de repérer les guanines sur le fragment d'ADN étudié (cf c.). Après migration, le gel est autoradiographié et un comptage par accumulation d'image du phosphore est réalisé.

Certains échantillons ont subi un traitement à la pipéridine avant d'être déposés sur le gel. Pour cela, 30 μL de pipéridine 0,5 M sont ajoutés au précipité, l'ensemble est chauffé pendant 10 mn à 90°C puis chaque échantillon est lyophilisé avant l'ajout de bleu dénaturant. Puis les échantillons sont traités comme précédemment.

c. Témoin G-track

La piste contrôle (G-track) montre la localisation des guanines dans le brin d'ADN testé. Les guanines sont révélées par digestion chimique à la pipéridine. La sonde (50 000 cpm) est incubée 3 mn sur la glace dans 200 μL de tampon (cacodylate de sodium 50 mM, EDTA 1 mM) avec 1 μL de diméthylsulfate (DMS). Le DMS transfère un groupement méthyle sur les guanines de la sonde. La réaction est stoppée par 50 μL de solution G-stop (acétate de sodium 1,5 M, β -mercaptoéthanol 1 M, t-RNA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). L'ADN méthylé est précipité à l'éthanol, lavé et séché sous vide. Le culot est repris dans 100 μL de pipéridine 10 % permettant la digestion au niveau des guanines méthylées par incubation 30 mn à 90°C. Le mélange est séché sous vide et repris dans le tampon de dépôt dénaturant pour être déposé sur gel.

2. Coupure du fragment HIV Loop

a. Préparation du fragment marqué

Le fragment HIV-Loop est marqué à son extrémité-5' par ^{32}P . Dans un tube Eppendorf contenant 1 μL de boucle (HIV-Loop) en solution (40 pmol), sont ajoutés 2 μL de tampon kinase (10x) et 13 μL d'eau bidistillée. Avec toutes les précautions de rigueur sont ajoutés au mélange 3 μL de γ - ^{32}P -ATP (30 μCi) puis 1 μL de polynucléotidokinase T4. Le milieu réactionnel est incubé 30 mn à 37°C. L'excès de γ - ^{32}P -ATP est éliminé par gel-filtration sur une colonne BioSpin 6 (BioRad). La pureté de la boucle marquée ainsi obtenue est vérifiée sur gel de polyacrylamide dénaturant à 20 % (vérification de la présence d'une seule bande). Elle est stockée à -18°C.

b. Coupure du fragment HIV-Loop marqué

Chaque échantillon, de 20 μL au total, contient 1 μL de boucle non marquée (HIV-Loop, 1.2 pmol, 60 nM), 0,2 μL de boucle marquée (^{32}P HIV-Loop), 2 μL de tampon 10x (tampon MES : 50 mM MES (acide 2-(*N*-morpholino)éthanesulfonique), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , pH = 6,0 ou tampon HEPES (acide *N*-2-hydroxyéthylpipérazine-*N'*-2-éthanesulfonique) : 50 mM HEPES au lieu de MES, pH = 7,2 ou tampon TN : pH = 7,0), 6,8 μL d'eau bidistillée et 10 μL de produit à tester à la concentration voulue. Dans certains cas, 2 μL d'eau bidistillée sont remplacés par 2 μL de solution d'agent réducteur (DTT). Après incubation, 0,5 μL d'ADN porteur sont ajoutés dans chaque tube (ADN non radioactif, ajouté dans le but de favoriser la coagulation et la précipitation de l'ADN marqué après le traitement) et les fragments d'ADN de chaque échantillon sont précipités par LiClO_4 /acétone. Après centrifugation, les surnageants sont éliminés et les culots lavés à l'acétone. Après une deuxième précipitation, centrifugation et élimination des surnageants, les échantillons sont lyophilisés. Ils sont ensuite resuspendus dans 20 μL de tampon de charge (urée 7 M, bleu de bromophénol et xylène cyanol 0,0025 % dans le tampon TBE) puis les échantillons sont chauffés à 90°C pendant 3 mn et immédiatement plongés dans la glace. Une fraction de 7 μL est alors déposée sur gel de polyacrylamide dénaturant (15 %, tampon TBE 1x, urée 7 M) et soumise à électrophorèse (environ 2 h à 60 W). Un témoin "A+G" est également déposé sur le gel (cf c.). Il permet de repérer les adénines et les guanines sur le fragment d'ADN étudié. Après migration, la radioactivité est révélée dans une cassette d'exposition pendant une nuit puis le résultat est analysé par un instrument Molecular Dynamics Phosphorimager (scanner) équipé du logiciel ImageQuant.

c. Témoin (A+G), méthode de Maxam-Gilbert simplifiée

A 3 μL de boucle marquée (^{32}P HIV-Loop) sont ajoutés 4 μL d'ADN porteur. L'échantillon est chauffé pendant 3 mn à 90°C puis plongé dans la glace, afin de dénaturer la boucle puis de la figer dans cette configuration dénaturée, plus accessible. Il est ensuite incubé dans 60 μL d'une solution d'acide formique à 66 % à 37°C. Des aliquotes de 17 μL sont prélevés après 5, 10, 15 et 20 mn d'incubation respectivement. Ils sont alors précipités par LiClO_4 /acétone, lavés à l'acétone, réunis dans un seul tube, lyophilisés pendant 20 mn puis traités à la pipéridine 1M pendant 30 mn à 90°C, 3 μL d'ADN porteur sont ajoutés, et l'ADN est précipité par LiClO_4 /acétone, lavé à l'acétone et lyophilisé. 20 μL de solution de charge sont ajoutés et l'échantillon est conservé au congélateur.

3. Remarque : gel d'acrylamide dénaturant pour électrophorèse

L'activité des différents produits est analysée sur gel de polyacrylamide dénaturant à 8 % pour le fragment 117-3' et à 15 % pour le fragment HIV-Loop. Pour préparer le gel à 8 %, 600 μL de persulfate d'ammonium (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) à 10 % et 60 μL de TEMED (TétraMéthylEthylèneDiamine) sont ajoutés à 60 mL de solution d'acrylamide (8 %, tampon TBE 1x, urée 7 M). Pour préparer le gel à 15 %, 400 μL d'APS et 40 μL de TEMED sont ajoutés au 60 mL de solution d'acrylamide (15 %, tampon TBE 1x, urée 7 M). On laisse polymériser le gel pendant environ 20-30 mn, avant de l'installer dans la cuve d'électrophorèse, dans une solution tampon de TBE. On applique une puissance de 60 W pendant 40 mn (préélectrophorèse) avant de déposer les échantillons dans les puits.

V. EXPERIENCES DE FOOTPRINT

1. Expériences de footprint sur le fragment HIV-Loop

a. Footprint en présence de LNA TFO

Chaque échantillon, de 10 μL au total, contient 1 μL de boucle non marquée (HIV-Loop, 1.2 pmol, 60 nM), 0.2 μL de boucle marquée (^{32}P HIV-Loop), 1 μL de tampon 10 \times (MES ou HEPES), 5,8 μL d'eau bidistillée et 2 μL de solution de LNA TFO à 500 μM (remplacés par 2 μL d'eau dans le cas des contrôles). Les échantillons sont incubés pendant 3h au réfrigérateur (formation du triplexe). Puis le composé à activité nucléasique (**9b**, **9c**) est ajouté en présence d'agent réducteur (aux 10 μL précédents sont ajoutés 0.8 μL de solution de complexe à 5 mM, 1 μL de tampon 10 \times , 2 μL de solution de DTT à 4 mM et 6.2 μL d'eau). Pour les contrôles sans DTT (C), les 10 μL ajoutés correspondent à 1 μL de tampon 10 \times et 9 μL d'eau, et pour les contrôles en présence de DTT (C*), il s'agit de 1 μL de tampon 10 \times , 2 μL de solution de DTT à 4 mM et 7 μL d'eau. Après incubation 64h30 à température ambiante, les échantillons sont traités comme indiqué précédemment.

b. Footprint en présence de MGB

On suit le même protocole que celui suivi en présence de LNA TFO, ce dernier étant remplacé par une solution de MGB à la concentration voulue.

2. Footprint à la DNase I sur le fragment 117-3'

La nucléase utilisée ici n'est plus une nucléase chimique comme précédemment mais une nucléase enzymatique, la DNase I. Cette technique a été employée afin

d'étudier l'interaction des composés **12-19** avec l'ADN, et de déceler une éventuelle spécificité de séquence pour cette interaction.

Les expériences sont effectuées sur un volume total de 10 μL . L'ADN marqué (117-3', 2 μL) est incubé avec 2 μL de solution tampon TN 10 mM et 4 μL de solution de produit à tester à la concentration voulue, soit 5, 10 et 20 μM (concentrations finales), pendant 15 mn à température ambiante. Puis la digestion enzymatique est initiée par ajout de 2 μL d'une solution de DNase I (solution concentrée diluée au 1/5000 dans un tampon DNase I). Chaque échantillon est alors mis à incuber pendant 3 mn avant d'être plongé dans la carboglace afin de stopper la digestion. Après lyophilisation, les échantillons sont repris dans 5 μL de bleu dénaturant, chauffés pendant 4 mn à 90°C, plongés dans la glace, et déposés sur gel de polyacrylamide dénaturant (8 %, urée 7 M) puis soumis à électrophorèse.

C - RPE ET SPIN-TRAPPING

Les spectres de RPE ont été enregistrés au Laboratoire de Catalyse et Environnement - E.A. 2598, Université du Littoral - Côte d'Opale, à Dunkerque, sur un appareil Brüker ESC 106 fonctionnant en bande X.

Les spectres de Spin-Trapping ont été enregistrés au Centre Commun de Mesures RMN - RPE, à l'USTL, sur un appareil Brüker ESP 300 fonctionnant en bande X.

Ce chapitre rassemble les conditions expérimentales des différentes manipulations menées au Chapitre II (Salènes à Vanadium), afin d'étudier la réaction du complexe **2d**, du complexe **2a** et du sulfate de vanadyle avec l'Oxone®, l'eau oxygénée ou le MPA (cf Chap. II - D. Elucidation des mécanismes de coupure).

I. RPE

1. RPE en présence d'Oxone®

a. Spectres à température ambiante

- Complexe **2d** seul :
 - 200 µL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (1 mM)
 - 800 µL d'eau
- Complexe + Oxone® :
 - 200 µL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (1 mM)
 - 100 µL de solution d'Oxone® à 40 mM dans l'eau (4 mM)
 - 700 µL d'eau

b. Spectres en solution gelée (77 K)

- Complexe **2a** ou **2d** seul :
 - 200 µL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (1 mM)
 - 100 µL d'eau
 - 700 µL de DMSO
- Complexe + Oxone® :
 - 200 µL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (1 mM)
 - 100 µL de solution d'Oxone® à 40 mM dans l'eau (4 mM)
 - 700 µL de DMSO
- Test en présence de tampon TN :

- 200 μL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (1 mM)
- 100 μL de solution d'Oxone® à 40 mM dans l'eau (4 mM)
- 100 μL de tampon TN (1 mM)
- 600 μL de DMSO

Nous avons vérifié que la présence du tampon Tris-NaCl (1 mM) ne modifiait en rien les phénomènes observés.

- VOSO_4 seul :
 - 200 μL de VOSO_4 à 5 mM dans DMSO/ H_2O 50/50 (1 mM)
 - 100 μL d'eau
 - 700 μL de DMSO
- VOSO_4 + Oxone® :
 - 200 μL de VOSO_4 à 5 mM dans DMSO/ H_2O 50/50 (1 mM)
 - 100 μL de solution d'Oxone® à 40 mM dans l'eau (4 mM)
 - 700 μL de DMSO

2. RPE en présence d'eau oxygénée

- $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Complexe} = 4$:
 - 200 μL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (1 mM)
 - 100 μL de solution d' H_2O_2 à 40 mM dans l'eau (4 mM)
 - 700 μL de DMSO
- $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Complexe} = 44$:
 - 200 μL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (1 mM)
 - 5 μL de solution d' H_2O_2 à 30 % dans l'eau (44 mM)
 - 95 μL d'eau
 - 700 μL de DMSO
- $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Complexe} = 882$:
 - 200 μL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (1 mM)
 - 100 μL de solution d' H_2O_2 à 30 % dans l'eau (882 mM)
 - 700 μL de DMSO

3. RPE en présence de MPA

- 200 μL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (1 mM)
- 100 μL de solution de MPA à 40 mM dans l'eau (4 mM)
- 100 μL de tampon TN (1 mM)
- 600 μL de DMSO

II. SPIN-TRAPPING

1. Réaction de Fenton

Cette réaction sert à vérifier la qualité du DMPO utilisé.

- 50 μL de DMPO (9,6 mM)
- 400 μL de tampon TN (8,5 mM)
- 10 μL de solution de FeSO_4 dans l'eau (0,4 mM)
- 10 μL de solution d' H_2O_2 dans l'eau (4 mM)

2. Spin-trapping en présence d'Oxone®

a. Complexe 2d

- 50 μL de DMPO (9 mM)
- 50 μL de tampon TN (1 mM)
- 10 μL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (100 μM)
- 5 μL de solution d'Oxone® à 40 mM dans l'eau (400 μM)
- 385 μL d'eau

b. VO_2SO_4

- 50 μL de DMPO (9 mM)
- 50 μL de tampon TN (1 mM)
- 10 μL de solution de VO_2SO_4 à 5 mM dans l'eau (100 μM)
- 10 μL de DMSO
- 5 μL de solution d'Oxone® à 40 mM dans l'eau (400 μM)
- 375 μL d'eau

c. Ligand 1d

- 50 μL de DMPO (9 mM)
- 50 μL de tampon TN (1 mM)
- 10 μL de solution de ligand à 5 mM dans le DMSO (100 μM)
- 5 μL de solution d'Oxone® à 40 mM dans l'eau (400 μM)
- 385 μL d'eau

3. Spin-trapping en présence d'eau oxygénée

a. Complexe 2d

- Complexe à 100 μM :
 - 50 μL de DMPO (9 mM)
 - 50 μL de tampon TN (1 mM)
 - 10 μL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (100 μM)
 - 10 μL de solution d' H_2O_2 dans l'eau (3,5 mM)
 - 380 μL d'eau
- Complexe à 1mM :
 - 50 μL de DMPO (9 mM)
 - 50 μL de tampon TN (1 mM)
 - 100 μL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (1 mM)
 - 10 μL de solution d' H_2O_2 dans l'eau (3,5 mM)
 - 290 μL d'eau

b. VO_2SO_4

- 50 μL de DMPO (9 mM)
- 50 μL de tampon TN (1 mM)
- 10 μL de solution de VO_2SO_4 à 5 mM dans l'eau (100 μM)
- 10 μL de solution d' H_2O_2 dans l'eau (3,5 mM)
- 380 μL d'eau

4. Spin-trapping en présence de MPA

- 50 μL de DMPO (9 mM)
- 50 μL de tampon TN (1 mM)
- 10 μL de solution de complexe à 5 mM dans le DMSO (100 μM)
- 5 μL de solution de MPA à 40 mM dans l'eau (400 μM)
- 385 μL d'eau

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

1. E. L. HEGG, J. N. BURSTYN, Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases : a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry, *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 173, 133-165.
2. A. RADZICKA, R. WOLFENDEN, A proficient enzyme, *Science*, **1995**, 267, 90-93.
3. J. E. THOMPSON, T. G. KUTATELADZE, M. C. SCHUSTER, F. D. VENEGAS, J. M. MESSMORE, R. T. RAINES, Limits to catalysis by ribonuclease A, *Bioorg. Chem.*, **1995**, 23, 471-481.

CHAPITRE I

4. J-J. WAWRZYŃIAK, L'essentiel en chimie organique : ADN-Ac. Désoxyribonucléique, ARN-Ac. Ribonucléique, disponible sur : <http://membres.lycos.fr/jjww/50.htm>.
5. B. DUCLOS, Traitements médicaux des cancers, La chimiothérapie anticancéreuse. Format PDF. Disponible sur : http://www-ulpmed.u-strasbg.fr/medecine/cours_en_ligne/e_cours/cancero/Chimiotherapie_Anticancereuse.pdf.
6. A. M. KAYASTHA, P. PRABHAKAR, O. P. MALHOTRA, Advances in the molecular recognition of DNA - a step towards therapeutic drug design, *Biochem. Educ.*, **1995**, 23, 56-64.
7. P. R. TURNER, W. A. DENNY, The genome as a drug target : sequence specific minor groove binding ligands, *Curr. Drug Targets*, **2000**, 1, 1-14.
8. B. S. P. REDDY, S. M. SONDHI, J. W. LOWN, Synthetic DNA minor groove-binding drugs, *Pharmacol. Therapeut.*, **1999**, 84, 1-111.
9. P. SLICKERS, M. HILLEBRAND, L. KITTLER, G. LÖBER, J. SÜHNEL, Molecular modelling and footprinting studies of DNA minor groove binders : bisquaternary ammonium heterocyclic compounds, *Anti-Cancer Drug Des.*, **1998**, 13, 463-488.
10. P. B. DERVAN, Molecular recognition of DNA by small molecules, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 2215-2235.
11. S. E. SWALLEY, E. E. BAIRD, P. B. DERVAN, Discrimination of 5'-GGGG-3', 5'-GCGC-3', and 5'-GGCC-3' sequences in the minor groove of DNA by eight-ring hairpin polyamides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 6953-6961.
12. P. B. DERVAN, R. W. BÜRLI, Sequence-specific DNA recognition by polyamides, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, 3, 688-693.
13. A. R. URBACH, J. W. SZEWCZYK, S. WHITE, J. M. TURNER, E. E. BAIRD, P. B. DERVAN, Sequence selectivity of 3-hydroxypyrrole/pyrrole ring pairings in the DNA minor groove, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 11621-11629.
14. S. WHITE, J. M. TURNER, J. W. SZEWCZYK, E. E. BAIRD, P. B. DERVAN, Affinity and specificity of multiple hydroxypyrrole/pyrrole ring pairings for coded recognition of DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 260-261.
15. P. E. FLOREANCIG, S. E. SWALLEY, J. W. TRAUGER, P. B. DERVAN, Recognition of the minor groove of DNA by hairpin polyamides containing α -substituted- β -amino acids, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 6342-6350.

16. L. WANG, C. BAILLY, A. KUMAR, D. DING, M. BAJIC, D. W. BOYKIN, W. D. WILSON, Specific molecular recognition of mixed nucleic acid sequences : an aromatic dication that binds in the DNA minor groove as a dimer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, 97, 12-16.
17. L. WANG, C. CARRASCO, A. KUMAR, C. E. STEPHENS, C. BAILLY, D. W. BOYKIN, W. D. WILSON, Evaluation of the influence of compound structure on stacked-dimer formation in the DNA minor groove, *Biochemistry*, **2001**, 40, 2511-2521.
18. C. BAILLY, C. TARDY, L. WANG, B. ARMITAGE, K. HOPKINS, A. KUMAR, G. B. SCHUSTER, D. W. BOYKIN, W. D. WILSON, Recognition of ATGA sequences by the unfused aromatic dication DB 293 forming stacked dimers in the DNA minor groove, *Biochemistry*, **2001**, 40, 9770-9779.
19. N. T. THUONG, C. HÉLÈNE, Sequence-specific recognition and modification of double-helical DNA by oligonucleotides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32, 666-690.
20. B. JANSEN, U. ZANGEMEISTER-WITTKKE, Antisense therapy for cancer - the time of truth, *Lancet*, **2002**, 3, 672-683.
21. D. PRASEUTH, A. L. GUIEYSSE, C. HÉLÈNE, Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression, *Biochim. Biophys. Acta*, **1999**, 1489, 181-206.
22. J-F. MOUSCADET, C. KETTERLÉ, H. GOULAOUIC, S. CARTEAU, F. SUBRA, M. LE BRET, C. AUCLAIR, Triple helix formation with short oligonucleotide-intercalator conjugates matching the HIV-1 U3 LTR end sequence, *Biochemistry*, **1994**, 33, 4187-4196.
23. S. VINOGRADOV, V. ROIG, Z. SERGUEEVA, C. H. NGUYEN, P. ARIMONDO, N. T. THUONG, E. BISAGNI, J-S. SUN, C. HELENE, U. ASSELINE, Synthesis and binding properties of oligo-2'-deoxyribonucleotides conjugated with triple-helix-specific intercalators : benzo[e] and benzo[g] pyridoindoles, *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 14, 120-135.
24. A. N. SINYAKOV, V. A. RYABININ, G. N. GRIMM, A. S. BOUTORINE, Stabilization of DNA triple helices using conjugates of oligonucleotides and synthetic ligands, *Mol. Biol.*, **2001**, 35, 251-260.
25. D. NOVOPASHINA, A. SINYAKOV, V. RYABININ, A. VENYAMINOVA, A. BOUTORINE, Conjugates of oligo(2'-O-methylribonucleotides) with minor groove binders as new sequence-specific agents recognizing both grooves of double-stranded DNA, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, **2003**, 22, 1179-1182.
26. W. K. POGOZELSKI, T. D. TULLIUS, Oxidative strand scission of nucleic acids : routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1089-1107.
27. C. J. BURROWS, J. G. MULLER, Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission, *Chem. Rev.*, **1998**, 98, 1109-1151.
28. S. S. MANDAL, U. VARSHNEY, S. BHATTACHARYA, Role of the central metal ion and ligand charge in the DNA binding and modification by metallosalen complexes, *Bioconjugate Chem.*, **1997**, 8, 798-812.
29. D.S. SIGMAN, A. MAZUMDER, D. M. PERRIN, Chemical nucleases, *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 2295-2316.
30. G. PRATVIEL, J. BERNADOU, B. MEUNIER, Selective DNA cleavage by metalloporphyrin derivatives, *Met. Ions Biol. Syst.*, **1996**, 33, 399-426.
31. C. J. BURROWS, S. E. ROKITA, Nickel complexes as probes of guanine sites in nucleic acid folding, *Met. Ions Biol. Syst.*, **1996**, 33, 537-560.

32. B. MEUNIER, Potassium monopersulfate : just another primary oxidant or a highly versatile oxygen atom donor in metalloporphyrin-mediated oxygenation and oxidation reactions, *New J. Chem.*, **1992**, 16, 203-211.
33. S. BORAH, M. S. MELVIN, N. LINDQUIST, R. A. MANDERVILLE, Copper-mediated nuclease activity of a tambjamine alkaloid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4557-4562.
34. U. S. SINGH, R. T. SCANNELL, H. AN, B. J. CARTER, S. M. HECHT, DNA cleavage by di- and trihydroxyalkylbenzenes. Characterization of products and the roles of O₂, Cu (II) and alkali, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 12691-12699.
35. C. BOLDRON, S. A. ROSS, M. PITIÉ, B. MEUNIER, Acridine conjugates of 3-Clip-Phen : influence of the linker on the synthesis and the DNA cleavage activity of their copper complexes, *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 1013-1020.
36. B. C. BALES, M. PITIÉ, B. MEUNIER, M. M. GREENBERG, A minor groove binding copper-phenanthroline conjugate produces direct strand breaks via β -elimination of 2-deoxyribonolactone, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 9062-9063.
37. A. S. BOUTORINE, P. B. ARIMONDO, Sequence-specific cleavage of double-stranded DNA, *Nucleic Acids Mol. Biol.*, **2004**, 13, 243-268.
38. P. B. ARIMONDO, A. S. BOUTORINE, J-C. FRANÇOIS, Oligonucleotide-conjugates targeted to single-stranded and double-stranded nucleic acids, *Recent Res. Dev. Bioconj. Chem.*, **2002**, 1, 29-53.
39. A. S. BOUTORINE, D. BRAULT, M. TAKASUGI, O. DELGADO, C. HÉLÈNE, Chlorin-oligonucleotide conjugates : synthesis, properties, and red light-induced photochemical sequence-specific DNA cleavage in duplexes and triplexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9469-9476.
40. C. GIOVANNANGELI, S. DIVIACCO, V. LABROUSSE, S. GRYAZNOV, P. CHARNEAU, C. HÉLÈNE, Accessibility of nuclear DNA to triplex-forming oligonucleotides : the integrated HIV-1 provirus as a target, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 79-84.
41. T. DA ROS, G. SPALLUTO, A. BOUTORINE, M. PRATO, Fullerene derivatives as potential DNA photoprobes, *Aust. J. Chem.*, **2001**, 54, 223-224.
42. M-P. TEULADE-FICHO, D. PERRIN, A. BOUTORINE, D. POLVERARI, J-P. VIGNERON, J-M. LEHN, J-S. SUN, T. GARESTIER, C. HELENE, Direct photocleavage of HIV-DNA by quinacridine derivatives triggered by triplex formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 9283-9292.
43. G. N. GRIMM, A. S. BOUTORINE, P. LINCOLN, B. NORDÉN, C. HÉLÈNE, Formation of DNA triple helices by an oligonucleotide conjugated to a fluorescent ruthenium complex, *ChemBioChem.*, **2002**, 3, 324-331.
44. T. LE DOAN, L. PERROUULT, C. HÉLÈNE, M. CHASSIGNOL, N. T. THUONG, Targeted cleavage of polynucleotides by complementary oligonucleotides covalently linked to iron-porphyrins, *Biochemistry*, **1986**, 25, 6736-6739.
45. P. BIGEY, G. PRATVIEL, B. MEUNIER, DNA cleavage by a "metalloporphyrin-spermine-oligonucleotide" molecule, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 181-182.
46. S. TSUKAHARA, J. SUZUKI, K. USHIJIMA, K. TAKAI, H. TAKAKU, Nonenzymatic sequence-specific cleavage of duplex DNA via triple-helix formation by homopyrimidine phosphorothioate oligonucleotides, *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, 4, 2219-2224.
47. S. A. STROBEL, H. E. MOSER, P. B. DERVAN, Double-strand cleavage of genomic DNA at a single site by triple-helix formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 7927-7929.

48. M. FOOTER, M. EGHOLM, S. KRON, J. M. COULL, P. MATSUDAIRA, Biochemical evidence that a D-loop is part of a four-stranded PNA-DNA bundle. Nickel-mediated cleavage of duplex DNA by a Gly-Gly-His Bis-PNA, *Biochemistry*, **1996**, 35, 10673-10679.
49. J-C. TRUFFERT, U. ASSELINE, A. BRACK, N. T. THUONG, Synthesis, purification and characterization of two peptide-oligonucleotide conjugates as potential artificial nucleases, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 3005-3016.
50. M. MATTEUCCI, K-Y. LIN, T. HUANG, R. WAGNER, D. D. STERNBACH, M. MEHROTRA, J. M. BESTERMAN, Sequence-specific targeting of duplex DNA using a camptothecin-triple helix forming oligonucleotide conjugate and topoisomerase I, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 6939-6940.
51. P. B. ARIMONDO, P. MOREAU, A. BOUTORINE, C. BAILLY, M. PRUDHOMME, J-S. SUN, T. GARESTIER, C. HELENE, Recognition and cleavage of DNA by rebeccamycin- or benzopyridoquinoxaline conjugated of triple helix-forming oligonucleotides, *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 8, 777-784.
52. P. B. ARIMONDO, A. BOUTORINE, B. BALDEYROU, C. BAILLY, M. KUWAHARA, S. M. HECHT, J-S. SUN, T. GARESTIER, C. HELENE, Design and optimization of camptothecin conjugates of triple helix-forming oligonucleotides for sequence-specific DNA cleavage by topoisomerase I, *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 3132-3140.
53. C. A. CLAUSSEN, E. C. LONG, Nucleic acid recognition by metal complexes of bleomycin, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2797-2816.
54. E. C. THEIL, Transition metal coordination complexes as probes of mRNA structure : the IRE (Iron Regulatory Element) of ferritin mRNA as a case study, *New J. Chem.*, **1994**, 18, 435-441.
55. D. S. SIGMAN, M. D. KUWABARA, C-H. B. CHEN, T. W. BRUCE, Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper in study of protein-DNA interactions, *Method. Enzymol.*, **1991**, 208, 414-433.
56. E. C. LONG, P. D. EASON, Q. LIANG, Synthetic metallopeptides as probes of protein-DNA interactions, *Met. Ions Biol. Syst.*, **1996**, 33, 427-452.
57. P. B. DERVAN, Characterization of protein-DNA complexes by affinity cleaving, *Method. Enzymol.*, **1991**, 208, 497-515.
58. S. ROUTIER, Synthèses, propriétés physico-chimiques et biologiques de complexes de salènes fonctionnalisés, - 227p. Th : Chimie Organique et Macromoléculaire, Lille 1, **1996**, 1854.
59. S. ROUTIER, J-L. BERNIER, M. J. WARING, P. COLSON, C. HOUSIER, C. BAILLY, Synthesis of a functionalized salen-copper complex and its interaction with DNA, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 2326-2331.
60. S. ROUTIER, J-L. BERNIER, J-P. CATTEAU, C. BAILLY, Highly preferential cleavage of unpaired guanines in DNA by a functionalized salen-nickel complex, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 63-66.
61. S. ROUTIER, N. COTELLE, J-P. CATTEAU, J-L. BERNIER, M. J. WARING, J-F. RIOU, C. BAILLY, Salen-Anthraquinone conjugates. Synthesis, DNA-binding and cleaving properties, effects on topoisomerases and cytotoxicity, *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, 4, 1185-1196.
62. S. ROUTIER, J-L. BERNIER, J-P. CATTEAU, C. BAILLY, Recognition and cleavage of DNA by a distamycin-salen copper conjugate, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, 7, 1729-1732.

63. S. ROUTIER, V. JOANNY, A. ZAPARUCHA, H. VEZIN, J-P. CATTEAU, J-L. BERNIER, C. BAILLY, Synthesis of metal complexes of 2,9-bis(2-hydroxyphenyl)-1,10-phenanthroline and their DNA binding and cleaving activities, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**, 4, 863-868.
64. E. LAMOUR, *Synthèse et étude physico-chimique de métalloalènes à activité nucléasique*, - 248p. Th : Chimie Organique et Macromoléculaire, Lille 1, **1999**, 2547.
65. E. LAMOUR, S. ROUTIER, J-L. BERNIER, J-P. CATTEAU, C. BAILLY, H. VEZIN, Oxidation of Cu^{II} to Cu^{III}, free radical production, and DNA cleavage by hydroxy-salen copper complexes. Isomeric effects studied by ESR and electrochemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 1862-1869.
66. S. ROUTIER, H. VEZIN, E. LAMOUR, J-L. BERNIER, J-P. CATTEAU, C. BAILLY, DNA cleavage by hydroxy-salicylidene-ethylenediamine iron complexes, *Nucleic Acids Res.*, **1999**, 27, 4160-4166.
67. V. GUERNIOU, Etude de ligands dirigés contre l'ARN TAR du virus VIH-1, -40p. D.E.A. : Chimie Organique et Macromoléculaire, Lille 1, **2000**.
68. C. BAILLY, V. GUERNIOU, E. LAMOUR, J-L. BERNIER, F. VILLAIN, H. VEZIN, Site-specific cleavage of the HIV-1 TAR RNA by a hydroxy-salen Copper (III) complex, *ChemBioChem.*, **2003**, 1, 112-114.
69. H. VEZIN, E. LAMOUR, S. ROUTIER, F. VILLAIN, C. BAILLY, J-L. BERNIER, J-P. CATTEAU, Free radical production by hydroxy-salen manganese complexes studied by ESR and XANES, *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, 92, 177-182.

CHAPITRE II

70. D. REHDER, The bioinorganic chemistry of vanadium, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 148-167.
71. D. REHDER, The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 182, 297-322.
72. E. J. BARAN, Oxovanadium (IV) and oxovanadium (V) complexes relevant to biological systems, *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, 80, 1-10.
73. K. H. THOMPSON, C. ORVIG, Coordination chemistry of vanadium in metallopharmaceuticals candidate compounds, *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, 219-221, 1033-1053.
74. D. REHDER, Biological and medicinal aspects of vanadium, *Inorg. Chem. Commun.*, **2003**, 6, 604-617.
75. A. M. EVANGELOU, Vanadium in cancer treatment, *Crit. Rev. Oncol. Hemat.*, **2002**, 42, 249-265.
76. T. OTIENO, M. R. BOND, L. M. MOKRY, R. B. WALTER, C. J. CARRANO, Plasmid DNA cleavage by oxo-bridged vanadium (III) dimers without added co-oxidants or reductants, *Chem. Commun.*, **1996**, 1, 37-38.
77. D. R. LLOYD, D. H. PHILLIPS, P. L. CARMICHAEL, Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack, *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**, 10, 393-400.

78. D. R. LLOYD, P. L. CARMICHAEL, D. H. PHILLIPS, Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by Fenton reactions, *Chem. Res. Toxicol.*, **1998**, 11, 420-427.
79. S. J. HEATER, M. W. CARRANO, D. RAINS, R. B. WALTER, D. JI, Q. YAN, R. S. CZERNUSZEWICZ, C. J. CARRANO, Interaction of oxo-bridged vanadium (III) phenanthroline and bipyridine dimers with DNA, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 3881-3889.
80. A. J. STEMMLER, C. J. BURROWS, Guanine versus deoxyribose damage in DNA oxidation mediated by vanadium (IV) and vanadium (V) complexes, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2001**, 6, 100-106.
81. X. SHI, P. WANG, H. JIANG, Y. MAO, N. AHMED, N. DALAL, Vanadium (IV) causes 2'-deoxyguanosine hydroxylation and deoxyribonucleic acid damage via free radical reactions, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **1996**, 26, 39-49.
82. X. SHI, H. JIANG, Y. MAO, J. YE, U. SAFFIOTTI, Vanadium (IV)-mediated free radical generation and related 2'-deoxyguanosine hydroxylation and DNA damage, *Toxicology*, **1996**, 106, 27-38.
83. J. KUWAHARA, T. SUZUKI, Y. SUGIURA, Effective DNA cleavage by bleomycin-vanadium (IV) complex plus hydrogen peroxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1985**, 129, 368-374.
84. J. KUWAHARA, L. L. GUAN, Y. SUGIURA, Binding and cleavage characteristics of DNA by bleomycin-vanadium complex, *Bull. Inst. Chem. Res.*, **1991**, 69, 511-519.
85. H. SAKURAI, H. TAMURA, K. OKATANI, Mechanism for a new antitumor vanadium complex : hydroxyl radical-dependent DNA cleavage by 1,10-phenanthroline-vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, 206, 133-137.
86. R. P. BANDWAR, C. P. RAO, Transition metal saccharide chemistry and biology : vanadyl-monosaccharide complexes and their *in vitro* effect on pUC-18 DNA, *J. Inorg. Biochem.*, **1997**, 68, 1-6.
87. S. HASHIMOTO, K. YAMAMOTO, T. YAMADA, Y. NAKAMURA, Synthesis of bis(*N*-methylpyrrole oligopeptide-linked hydroxamic acids) and effective DNA cleavage by their vanadyl complexes, *Heterocycles*, **1998**, 48, 939-947.
88. S. HASHIMOTO, T. INUI, Y. NAKAMURA, Effect of polymethylene and phenylene linking groups on the DNA cleavage specificity of distamycin-linked hydroxamic acid-vanadyl complexes, *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, 48, 603-609.
89. A. SREEDHARA, N. SUSAN, C. P. RAO, Vanadate and chromate reduction by saccharides and L-ascorbic acid : effect of the isolated V(IV) and Cr(III) products on DNA nicking, lipid peroxidation, cytotoxicity and on enzymatic and non-enzymatic antioxidants, *Inorg. Chim. Acta*, **1997**, 263, 189-194.
90. D. W. J. KWONG, O. Y. CHAN, R. N. S. WONG, S. M. MUSSER, L. VACA, S. I. CHAN, DNA-photocleavage activities of vanadium (V)-peroxo complexes, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 1276-1277.
91. C. HIORT, J. GOODISMAN, J. C. DABROWIAK, Chemically and photochemically initiated DNA cleavage by an insulin-mimetic bisperoxovanadium complex, *Mol. Cell. Biochem.*, **1995**, 153, 31-36.
92. T. HIRAO, Redox reactions via vanadium-induced electron transfer, *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, 80, 27-33.

93. Y. N. BELOKON, B. GREEN, N. S. IKONNIKOV, M. NORTH, T. PARSONS, V. I. TARAROV, Optimized catalysts for the asymmetric addition of trimethylsilyl cyanide to aldehydes and ketones, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 771-779.
94. Z. LIU, F. C. ANSON, Schiff base complexes of vanadium (III, IV, V) as catalysts for the electroreduction of O₂ to H₂O in acetonitrile, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 1329-1333.
95. Z. LIU, F. C. ANSON, Electrochemical properties of vanadium (III, IV, V)-salen complexes in acetonitrile. Four-electron reduction of O₂ by V(III)-salen, *Inorg. Chem.*, **2000**, 39, 274-280.
96. E. TSUCHIDA, K. OYAZU, E.L. DEWI, T. IMAI, F. C. ANSON, Catalysis of the electroreduction of O₂ to H₂O by vanadium-salen complexes in acidified dichloromethane, *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 3704-3708.
97. F. VAN DE VELDE, I. W. C. E. ARENDS, R. A. SHELDON, Biocatalytic and biomimetic oxidations with vanadium, *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, 80, 81-89.
98. L. CANALI, D. C. SHERRINGTON, Utilisation of homogeneous and supported chiral metal(salen) complexes in asymmetric catalysis, *Chem. Soc. Rev.*, **1999**, 28, 85-93.
99. J. SKARZEWSKI, E. OSTRYCHARZ, R. SIEDLECKA, Vanadium catalyzed enantioselective oxidation of sulfides : easy transformation of bis(arylthio)alkanes into C₂ symmetric chiral sulfoxides, *Tetrahedron : Asymmetry*, **1999**, 10, 3457-3461.
100. S. BUNCE, R. J. CROSS, L. FARRUGIA, S. KUNCHANDY, L. L. MEASON, K. W. MUIR, M. O'DONNELL, R. D. PEACOCK, D. STIRLING, S. J. TEAT, Chiral schiff base complexes of copper (II), vanadium (IV) and nickel (II) as oxidation catalysts. X-ray crystal structures of [Cu(*R*-salpn)(OH₂)] and [Cu(±-busalcx)], *Polyhedron*, **1998**, 17, 4179-4187.
101. H. SCHMIDT, M. BASHIRPOOR, D. REHDER, Structural characterisation of possible intermediates in vanadium-catalysed sulfide oxidation, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1996**, 19, 3865-3870.
102. K. NAKAJIMA, K. KOJIMA, M. KOJIMA, J. FUJITA, Preparation and characterisation of optically active schiff base-oxovanadium (IV) and -oxovanadium (V) complexes and catalytic properties of these complexes on asymmetric oxidation of sulfides into sulfoxides with organic hydroperoxides, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1990**, 63, 2620-2630.
103. K. NAKAJIMA, M. KOJIMA, K. TORIUMI, K. SAITO, J. FUJITA, Crystal structures of [VO(sal-L-ala)(OCH₃)(CH₃OH)] (sal-L-ala = *N*-salicylidene-L-alaninate) and {[VO(sal-L-ala)]₂O}₂.2CH₂Cl₂, and the catalytic activity of these and related complexes on asymmetric oxidation of methyl phenyl sulfide with *t*-butyl hydroperoxide, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1989**, 62, 760-767.
104. C. J. CHANG, J. A. LABINGER, H. B. GRAY, Aerobic epoxidation of olefins catalyzed by electronegative vanadyl salen complexes, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 5927-5930.
105. D. U. WARAD, C. D. SATISH, V. H. KULKARNI, C. S. BAJGUR, Synthesis, structure and reactivity of zirconium (IV), vanadium (IV), cobalt (II), nickel (II) and copper (II) complexes derived from carbonylhydrazide schiff base ligands, *Indian J. Chem., Sect. A*, **2000**, 39, 415-420.
106. J. C. PESSOA, I. CAVACO, I. CORREIA, D. COSTA, R. T. HENRIQUES, R. D. GILLARD, Preparation and characterisation of new oxovanadium (IV) schiff base complexes derived from salicylaldehyde and simple dipeptides, *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, 305, 7-13.

107. J. C. PESSOA, I. CAVACO, I. CORREIA, M. T. DUARTE, R. D. GILLARD, R. T. HENRIQUES, F. J. HIGES, C. MADEIRA, I. TOMAZ, Preparation and characterisation of new oxovanadium (IV) schiff base complexes derived from amino acids and aromatic *o*-hydroxyaldehydes, *Inorg. Chim. Acta*, **1999**, 293, 1-11.
108. N. F. CHOUDHARY, N. G. CONNELLY, P. B. HITCHCOCK, G. J. LEIGH, New compounds of tetradentate schiff bases with vanadium (IV) and vanadium (V), *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1999**, 24, 4437-4446.
109. G. HAAS, G. L. SCHIMEK, W. T. PENNINGTON, J. W. KOLIS, [*N, N'*-ethylenebis(3-*tert*-butyl-5-methylsalicylidene-aminato)]oxovanadium (IV), *Acta Cryst.*, **1998**, C54, 1263-1265.
110. J. R. ZAMIAN, E. R. DOCKAL, G. CASTELLANO, G. OLIVA, Synthesis and characterisation of [*N, N'*-ethylenebis(3-ethoxysalicylideneaminato)]oxovanadium (IV), *Polyhedron*, **1995**, 14, 2411-2418.
111. V. JOSHI et N. K. KAUSHIK, Synthesis and characterisation of bis(η^5 -cyclopentadienyl)-*N, N'*-disubstituted schiff base complexes of titanium (IV), *Indian J. Chem., Sect. A*, **1992**, 31, 61-63.
112. G. HOSHINA, M. TSUCHIMOTO, S. OHBA, K. NAKAJIMA, H. UEKUSA, Y. OHASHI, H. ISHIDA and M. KOJIMA, Thermal dehydrogenation of oxovanadium (IV) complexes with schiff base ligands derived from *meso*-1,2-diphenyl-1,2-ethanediamine in the solid state, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 142-145.
113. H. SCHMIDT, D. REHDER, The preparation and synthetic potential of chlorovanadium (V and IV) complexes supported by enamines and bis(enamines), *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 267, 229-238.
114. J. A. BONADIES, C. J. CARRANO, Vanadium phenolates as models for vanadium in biological systems. 1. Synthesis, spectroscopy and electrochemistry of vanadium complexes of ethylenebis[*o*-hydroxyphenyl]glycine] and its derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 4088-4095.
115. C. R. CORNMAN, K. M. GEISER-BUSH, S. P. ROWLEY, P. D. BOYLE, Structural and Electron Paramagnetic Resonance studies of the square pyramidal to trigonal bipyramidal distortion of vanadyl complexes containing sterically crowded schiff base ligands, *Inorg. Chem.*, **1997**, 36, 6401-6408.
116. R. COUSIN, D. COURCOT, E. ABI-AAD, S. CAPELLE, J-P. AMOUREUX, M. DOURDIN, M. GUELTON, A. ABOUKAÏS, ^{51}V MAS NMR characterization of V-Ce-O catalysts, *Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects*, **1999**, 158, 43-49.
117. E. BLOUET-CRUSSON, M. RIGOLE, M. FOURNIER, A. ABOUKAÏS, F. DAUBREGE, G. HEQUET, M. GUELTON, Oxidative dehydrogenation of isobutyric acid with cupric salts of molybdovanadophosphoric acid ($\text{Cu}_x\text{H}_{4-2x}\text{PVMo}_{11}\text{O}_{40}$). Investigation of catalyst activation and deactivation, *Appl. Catal. A*, **1999**, 178, 69-83.

118. M. MATHEW, A. J. CARTY, G. J. PALENIK, An unusual complex containing bridging vanadyl groups. The crystal structure of *N,N'*-propylenebis(salicylaldiminato)oxovanadium (IV), *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 3197-3198.
119. G. BLONDIN, Y-M. FRAPART, La résonance paramagnétique électronique, *L'Act. Chim. (Ec)*, **1996**, 7, 112-124.
120. E. ABI-AAD, Préparations, caractérisations et aspects catalytiques d'oxydes ternaires à base de cuivre, aluminium et cérium, - 182p. Th : Spectrochimie, Lille 1, **1996**, 1681.
121. F. E. MABBS, Some aspects of the electron paramagnetic resonance spectroscopy of *d*-transition metal compounds, *Chem. Soc. Rev.*, **1993**, 22, 313-324.
122. J. SELBIN, The chemistry of oxovanadium (IV), *Chem. Rev.*, **1965**, 65, 153-175.
123. T. S. SMITH II, R. LOBRUTTO, V. L. PECORARO, Paramagnetic spectroscopy of vanadyl complexes and its applications to biological systems, *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 228, 1-18.
124. R. ANDO, H. ONO, T. YAGYU, M. MAEDA, Spectroscopic characterization of mononuclear, binuclear, and insoluble polynuclear oxovanadium(IV)-schiff base complexes and their oxidation catalysis, *Inorg. Chim. Acta*, **2004**, 357, 817-823.
125. N. F. ALBANESE, N. D. CHASTEEN, Origin of the electron paramagnetic resonance line widths in frozen solutions of the oxovanadium(IV) ion, *J. Phys. Chem.*, **1978**, 82, 910-914.
126. R. WILSON, D. KIVELSON, ESR linewidths in solution. I. Experiments on anisotropic and spin-rotational effects, *J. Chem. Phys.*, **1966**, 44, 154-168.
127. N. COTELLE, E. TREMOLIERES, J-L. BERNIER, J-P. CATTEAU, J-P. HÉNICHART, Redox chemistry of complexes of nickel(II) with some biologically important peptides in the presence of reduced oxygen species : an ESR study, *J. Inorg. Biochem.*, **1992**, 46, 7-15.
128. J. R. HARBOUR, M. L. HAIR, Spin trapping of the $\cdot\text{CO}_2^-$ radical in aqueous medium, *Can. J. Chem.*, **1979**, 57, 1150-1152.
129. W. T. DIXON, R. O. C. NORMAN, A. L. BULEY, Electron spin resonance studies of oxidation. Part II. Aliphatic acids and substituted acids, *J. Chem. Soc.*, **1964**, 3625-3634.
130. G. VERQUIN, G. FONTAINE, M. BRIA, E. ZHILINSKAYA, E. ABI-AAD, A. ABOUKAÏS, B. BALDEYROU, C. BAILLY, J-L. BERNIER, DNA modification by oxovanadium(IV) complexes of salen derivatives, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2004**, 9, 345-353.

CHAPITRE III

131. D. MULLER, I. ZELTSER, G. BITAN, C. GILON, Building units for N-backbone cyclic peptides. 3. Synthesis of protected *N*^ε-(ω-aminoalkyl)amino acids and *N*^ε-(ω-carboxyalkyl)amino acids, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 411-416.
132. J. ALTMAN, D. BEN-ISHAI, Selectively protected chiral 1,2,4-triaminobutanes and chiral vicinal 1,2-diamines, *Tetrahedron : Asymmetry*, **1994**, 5, 887-894.

133. B. CASTRO, J-R. DORMOY, B. DOURTOGLOU, G. EVIN, C. SELVE, J-C. ZIEGLER, Peptide coupling reagents VI. A novel, cheaper preparation of benzotriazolylloxytris(dimethylamino)-phosphonium hexafluorophosphate (BOP reagent), *Synthesis*, **1976**, 751-752.
134. J. PEISACH, W. E. BLUMBERG, Structural implications derived from the analysis of Electron Paramagnetic Resonance spectra of natural and artificial copper proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1974**, 165, 691-708.
135. R. BECHARA, A. D'HUYSSER, C. F. AÏSSI, M. GUELTON, J-P. BONNELLE, A. ABOUKAÏS, Preparation and characterization of copper-thorium oxide catalysts. 2. ESR study of copper (II) ion pairs and correlation with the selective hydrogenation of isoprene, *Chem. Mater.*, **1990**, 2, 522-526.
136. A. ABOUKAÏS, A. BENNANI, C. F. AÏSSI, G. WROBEL, M. GUELTON, J. C. VEDRINE, Highly resolved electron paramagnetic resonance spectrum of copper (II) ion pairs in CuCe oxide, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1992**, 88, 615-620.
137. R. CEJUDO, G. ALZUET, J. BORRAS, M. LIU-GONZALEZ, F. SANZ-RUIZ, Crystal structure, magnetic and spectroscopic properties of copper(II) formate dimethylformamide : a new tetracarboxylato-bridged copper(II) dimer, *Polyhedron*, **2002**, 21, 1057-1061.
138. Y. SONG, I. A. KOVAL, P. GAMEZ, G. A. VAN ALBADA, I. MUTIKAINEN, U. TURPEINEN, J. REEDIJK, Solution studies and structure of a dinuclear-based double-stranded helicate of [Cu₂(*p*-xysal)₂] (H₂-*p*-xysal = bis(hydroxylbenzyl)diaminoxylene), *Polyhedron*, **2004**, 23, 1769-1775.
139. R. C. AGGARWAL, N. K. SINGH, R. P. SINGH, Magnetic and spectroscopic studies on *N*-(picolinamido)salicylaldehyde complexes of some bivalent 3d metal ions, *Inorg. Chem.*, **1981**, 20, 2794-2798.
140. W. A. ALVES, R. H. DE ALMEIDA SANTOS, A. PADUAN-FILHO, C. C. BECERRA, A. C. BORIN, A. M. DA COSTA FERREIRA, Molecular structure and intra- and intermolecular magnetic interactions in chloro-bridged copper(II) dimers, *Inorg. Chim. Acta*, **2004**, 357, 2269-2278.
141. R. DAMODER, K. M. MORE, G. R. EATON, S. S. EATON, Metal-nitroxyl interactions. 30. Single-crystal EPR spectra of two spin-labeled copper porphyrins, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 2147-2154.
142. S. S. EATON, G. R. EATON, C. K. CHANG, Synthesis and geometry determination of cofacial diporphyrins. EPR spectroscopy of dicopper diporphyrins in frozen solution, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 3177-3184.
143. S. S. EATON, K. M. MORE, B. M. SAWANT, G. R. EATON, Use of the EPR half-field transition to determine the interspin distance and the orientation of the interspin vector in systems with two unpaired electrons, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 6560-6567.
144. M. M. BHADHABDE, D. SRINIVAS, Effects on molecular association, chelate conformation and reactivity toward substitution in Cu(5-X-salen) complexes, salen²⁻ = *N,N'*-ethylenebis-(salicylideneaminate), X = H, CH₃O and Cl : synthesis, X-ray structures and EPR investigations, *Inorg. Chem.*, **1993**, 32, 6122-6130.

145. E. BILLIG, R. WILLIAMS, I. BERNAL, J. H. WATERS, H. B. GRAY, The electronic structures of square-planar metal complexes. II. The complexes of maleonitriledithiolate with copper(II), nickel(II), palladium(II), and platinum(II), *Inorg. Chem.*, **1964**, 3, 663-666.
146. I. BERTINI, G. CANTI, R. GRASSI, A. SCOZZAFAVA, Effects of planar and tetrahedral distortions on the ESR parameters of bis(salicylaldiminato)copper(II) complexes, *Inorg. Chem.*, **1980**, 19, 2198-2200.
147. H. YOKOI, A. W. ADDISON, Spectroscopic and redox properties of pseudotetrahedral copper (II) complexes. Their relationship to copper proteins, *Inorg. Chem.*, **1977**, 16, 1341-1349.
148. R. M. DUPEYRE, H. LEMAIRE, A. RASSAT, Nitroxides. XIV. A stable biradical in the nitroxide series, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 3771-3772.
149. H. YOKOI, ESR and optical absorption studies of various bis(*N*-salicylidenealkylaminato)-copper(II) complexes with tetrahedrally-distorted coordination geometry, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1974**, 47, 3037-3040.
150. P. A. N. REDDY, B. K. SANTRA, M. NETHAJI, A. R. CHAKRAVARTY, Metal-assisted light-induced DNA cleavage activity of 2-(methylthio)phenylsalicylaldimine schiff base copper(II) complexes having planar heterocyclic bases, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 377-386.
151. R. KLEMENT, F. STOCK, H. ELIAS, H. PAULUS, P. PELIKAN, M. VALKO, M. MAZUR, Copper(II) complexes with derivatives of salen and tetrahydrosalen : a spectroscopic, electrochemical and structural study, *Polyhedron*, **1999**, 18, 3617-3628.

CHAPITRE IV

152. C. LADJEL, Synthèse d'aminoquinazolines inhibiteurs potentiels de kinases à visée anticancéreuse, -53p. D.E.A. : Chimie Organique et Macromoléculaire, Lille 1, **2002**.
153. W. C. PATT, X-M. CHENG, J. T. REPINE, C. LEE, B. R. REISDORPH, M. A. MASSA, A. M. DOHERTY, K. M. WELCH, J. W. BRYANT, M. A. FLYNN, D. M. WALKER, R. L. SCHROEDER, S. J. HALEEN, J. A. KEISER, Butenolide endothelin antagonists with improved aqueous solubility, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 2162-2168.
154. R. SEN, D. CHAKRAVARTY, 6-aldehydo-coumarin and dyes derived from it, *J. Am. Chem. Soc.*, **1928**, 50, 2428-2436.
155. A. R. FORRESTER, J. HENDERSON, S. P. HEPBURN, Nitroxide radicals. Part 20. Formation and reactions of *t*-butyl-*p*-formylphenyl nitroxide and its derivatives, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1981**, 4, 1165-1172.
156. M. PAVENTI, A. S. HAY, Novel synthesis of *N,N*-diarylmethanamines from *N*-(arylmethylene)arenamines and (arylmethoxy)arenes, *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 5875-5882.
157. P.K. BOWYER, D. STC. BLACK, D. C. CRAIG, A. D. RAE, A. C. WILLIS, Indole-based mono- and polynuclear acyclic chelating systems : syntheses and selected transition metal complexes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2001**, 1948-1958.

158. S. M. KIM, J-S. KIM, D-M. SHIN, Y. K. KIM, Y. HA, Synthesis and application of the novel azomethine metal complexes for the organic electroluminescent devices, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2001**, 22, 743-747.
159. G. A. MORRIS, H. ZHOU, C. L. STERN, S. T. NGUYEN, A general high-yield route to bis(salicylaldimine) zinc (II) complexes : application to the synthesis of pyridine-modified salen-type zinc (II) complexes, *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 3222-3227.
160. H. HOUJOU, S-K. LEE, Y. HISHIKAWA, Y. NAGAWA, K. HIRATANI, Highly selective formation of 2:2 macrocycles from a novel hydroxybenzaldehyde derivative and diamines, *Chem. Commun.*, **2000**, 2197-2198.
161. F. M. MENGER, U. V. VENKATARAM, A microscopic hydrophobicity parameter, *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2980-2984.
162. W. HERZ, D. S. RADEN, D. R. K. MURTY, The synthesis of 1- and 2-pyrrolealkylamines, *J. Org. Chem.*, **1956**, 21, 896-898.
163. L. M. RICE, C. H. GROGAN, E. E. REID, Hypotensive agents. III. Dialkylaminoalkylpyrrolidine derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 2261-2262.
164. S. J. RHOADS, R. D. REYNOLDS, R. RAULINS, Further studies of anomalous alkylations with β -dialkylaminoethyl chlorides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1952**, 74, 2889-2891.
165. L. C. ECHOLS, V. P. MAIER, S. M. POLING, P. R. STERLING, New bioregulators of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, *Phytochemistry*, **1981**, 20, 433-437.

PARTIE EXPERIMENTALE

166. S. DI BELLA, I. FRAGALA, I. LEDOUX, M. A. DIAZ-GARCIA, T. J. MARKS, Synthesis, characterisation, optical spectroscopic, electronic structure, and second-order non linear optical (NLO) properties of a novel class of donor-acceptor bis(salicylaldiminato) nickel (II) schiff base NLO chromophores, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9550-9557.
167. C. SERGHERAERT, P. MÄES, A. TARTAR, Specific covalent fixation of chelating agents on peptides, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1986**, 1061-1064.