



Ligands de structures G-quadruplex d'acides nucléiques : modélisation, synthèse et activité antivirale

Tiffany Rundstadler

► To cite this version:

Tiffany Rundstadler. Ligands de structures G-quadruplex d'acides nucléiques : modélisation, synthèse et activité antivirale. Chimie de coordination. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30295 . tel-03881023

HAL Id: tel-03881023

<https://theses.hal.science/tel-03881023>

Submitted on 1 Dec 2022

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

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



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Tiffany RUNDSTADLER

Le 16 décembre 2021

**Ligands de structures G-quadruplex d'acides nucléiques :
modélisation, synthèse et activité antivirale**

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :
LCC - Laboratoire de Chimie de Coordination

Thèse dirigée par
Geneviève PRATVIEL et Jean-Luc STIGLIANI

Jury

M. Vincent SOL, Rapporteur
M. Florent DI MEO, Rapporteur
Mme Daniela VERGA, Examinatrice
M. Jean-Marc ESCUDIER, Examineur
Mme Geneviève PRATVIEL, Directrice de thèse
M. Jean-Luc STIGLIANI, Co-directeur de thèse
M. Remi CHAUVIN, Membre invité
M. Samir AMRANE, Membre invité

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je me dois d'adresser mes remerciements au Docteur Azzedine Bousseksou, directeur de recherches CNRS et directeur du Laboratoire de Chimie de Coordination, pour m'avoir accueillie au sein de son établissement.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Vincent Sol, directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de Limoges ainsi qu'au Docteur Florent Di Meo, chargé de recherches à l'INSERM de Limoges, pour avoir accepté de juger mon travail. Votre présence au sein de mon jury de thèse a constitué un grand honneur.

Je voudrais également remercier le Docteur Daniela Verga, chargée de recherches à l'Institut Curie et le Docteur Jean-Marc Escudier, directeur de recherches CNRS à l'Université de Toulouse d'avoir accepté d'évaluer mon manuscrit et de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinateurs.

Enfin, je tiens à remercier en leur qualité de membres invités d'une part le Docteur Samir Amrane, de l'Institut Européen de Chimie et Biologie de Bordeaux ainsi que le Professeur Remi Chauvin de l'Université de Toulouse, d'avoir accepté également de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier le Docteur Geneviève Pratviel, directrice de recherches au laboratoire, qui a été ma directrice de thèse pendant ces trois ans, pour d'une part son accueil au sein de son équipe et de son projet mais également pour toute l'aide et le soutien qu'elle m'a apporté tout du long de la thèse. J'ai appris énormément à son contact, bien sûr la chimie des porphyrines qui m'était jusque-là inconnue, mais aussi des notions de rigueur et de sérieux qui pouvaient me faire défaut pour un travail aussi intense que celui d'une thèse de recherche. J'ai souvent été prise de doute, surtout passé la première moitié de la thèse, mais elle s'est toujours montrée disponible et à l'écoute, qu'il s'agisse de problèmes ayant trait directement à la capricieuse chimie que je faisais ou alors d'aspects plus généraux concernant la thèse.

Rien de tout ceci n'aurait pu être accompli sans ton aide précieuse, autant dans le bureau qu'à la paillasse et je n'oublierai pas.

Également, je me dois de remercier tout aussi chaleureusement mon co-directeur de thèse, le Docteur Jean-Luc Stigliani, Maître de Conférences à l'université Paul Sabatier. Il est vrai que notre collaboration à proprement parler a été un peu plus courte, mais du début à la fin de la thèse, il a toujours su me prêter une oreille attentive, qu'il s'agisse d'exprimer mes échecs ou mes réussites à la paillasse ou simplement de discuter de choses et d'autres. J'ai eu grâce à lui une nouvelle fois la chance de pouvoir enseigner (ou du moins faire semblant) auprès de ses étudiants où j'ai pu apprendre beaucoup. Enfin, lorsque nous nous sommes lancés tant bien que mal dans les premiers calculs, il a toujours fait son maximum pour m'aider à avancer, prenant le temps de me former à ces méthodes de calculs que je ne connaissais que de nom (et encore) tout en étant d'un soutien sans faille alors que nous rencontrions de plus en plus de difficultés.

J'ai beaucoup aimé travailler avec toi et je tiens donc encore à te remercier pour le soutien inébranlable que tu m'as apporté pendant ces trois ans.

Je souhaiterais également remercier le Professeur Pierre Verhaeghe, l'ancien chef de l'équipe dans laquelle j'ai débuté ma thèse, qui m'a accueillie dans son équipe au début de ces travaux. Nous ne nous sommes que peu croisés pendant ces trois ans, cependant j'ai toujours pu le solliciter pour des questions de chimie, notamment sur mes premiers

REMERCIEMENTS

couplages au palladium, puis sur d'autres choses. Je te souhaite une très bonne continuation dans ta carrière loin du LCC.

Il me faut à présent remercier les premières personnes avec qui j'ai échangé lors de cette thèse. D'une part Michel Nguyen, de l'équipe V, qui a été mon premier interlocuteur dans le labo lors de mon arrivée. J'ai non seulement pu le solliciter pour sa grande expertise lorsque nous étions colocataires mais également profité de discussions agréables et variées en sa compagnie et ça a toujours été un plaisir de te croiser dans les couloirs.

Je tiens également à remercier Emmanuelle Mothes, ma première collaboratrice sur cet épineux projet porphyrines. Je ne compte plus les bons moments passés à manipuler côte à côte dans le labo, à papoter de choses et d'autres tout en manipulant (proprement pour ta part, quant à moi... avec un style différent, dirons-nous). J'ai vraiment beaucoup appris grâce à ton professionnalisme et ta gentillesse et ce fut un plaisir d'être voisines de paillasse.

Enfin, pour conclure ce paragraphe équipe K, je me dois de remercier Antoine Tronnet, qui fut un temps mon colocataire de bureau. Nous avons eu quelques occasions d'échanger sur des choses et d'autres et bien que nous ne soyons pas toujours d'accord, j'ai toujours beaucoup aimé discuter avec toi et avoir ton point de vue. Ton côté sérieux et réfléchi sont des points sur lesquels j'ai eu à cœur de m'inspirer et je suis sûre que tu feras une brillante carrière dans la recherche. Je te souhaite le meilleur pour ta soutenance et ta paternité (très prochaines toutes les deux).

J'aimerais adresser des remerciements tout particuliers à Clément Rulmont, mon stagiaire de master 2 qui a par la suite intégré le laboratoire pour y poursuivre une thèse bien méritée. J'ai été impressionnée par tes qualités d'étudiant d'abord puis de chercheur ensuite. Le sujet que l'on a commencé ensemble n'était pas facile, ton sujet de thèse ne l'est pas beaucoup plus et pourtant tu t'en es sorti et tu t'en sortiras, j'en suis sûre, avec brio. Tu as l'étoffe d'un grand chimiste et j'ai beaucoup appris à tes côtés. J'ai adoré travailler avec toi (on se rappellera l'incident, hilarant, du pistolet à porph) et je pense pouvoir dire sans problème que tu es la personne la plus gentille qui soit.

J'ai donc par la suite eu la chance d'être recueillie avec le reste de feu l'équipe K au sein de l'équipe F où j'ai pu faire la connaissance de beaucoup de personnes et en redécouvrir d'autres que je ne faisais jusque-là que croiser. Je pense notamment aux Docteurs Christelle Hureau et Charlène Esmieu, et en particulier à Léonie. Je tiens à remercier, d'une façon générale d'abord, chacun et chacune d'entre vous pour avoir pris le temps de m'aider à préparer mon oral de thèse. Si l'oral s'est bien passé, c'est grâce à votre préparation efficace et à vos remarques pertinentes. Pour tout cela, merci à vous tous.

Sur une note plus personnelle à présent, je n'ai eu que peu d'occasions de discuter avec Christelle et Charlène, mais elles se sont avérées être un soutien sans faille dans les mois précédant la fin de ma thèse et je leur serai toujours reconnaissante pour leur écoute et leur disponibilité. Je tiens donc à vous remercier pour cela. Je ne regrette qu'une chose, que nous n'ayons pas eu l'occasion de team builder davantage.

Je souhaiterais ensuite remercier Léonie, pour ta grande gentillesse et ton écoute attentive lorsque ça n'allait pas fort durant cette dernière année. Je regrette que nous n'ayons pas commencé à échanger plus tôt dans la mesure où j'ai réalisé durant ma dernière année à quel point tu étais une personne sympathique et bienveillante. Je te souhaite toute la réussite du monde pour ta soutenance et l'après thèse. En espérant que l'on se reverra, peut-être autour d'un verre après avoir cassé beaucoup de verrerie...

Je voudrais également remercier Émilie Mathieu, pour sa gentillesse et son écoute depuis son arrivée au labo, ainsi que

REMERCIEMENTS

pour les petites sorties sympathiques qui j'espère ne s'arrêteront pas là. Je te remercie d'avoir pris le temps de m'aider à préparer ma soutenance orale et de m'avoir préparée avec des questions pertinentes et intéressantes. De façon plus impersonnelle, je tiens à saluer ton engagement écologique au sein du labo dans la mesure où tu sais que cela me tient également à cœur.

Je tiens ensuite à remercier Marielle, première stagiaire de Clément (la roue tourne) qui a également intégré l'équipe en tant que doctorante, pour sa grande gentillesse et les très bons moments partagés dans le labo (notamment à casser les oreilles de Geneviève par exemple, à chanter du Jean-Jacques François et du Claude Goldman quand ce n'était pas la Reine des Neiges) comme en dehors. J'ai eu la chance encore une fois de rencontrer une étudiante brillante, humble et adorable et je suis sûre que tu feras de grandes choses dans la recherche. Je n'oublierai jamais les moments partagés avec toi ainsi que ta patience et ton aide dans mon projet professionnel et je compte bien devenir ton élève par la suite. Bon courage à toi pour l'aventure de la thèse, j'espère être invitée à la soutenance ahaha.

J'aimerais aussi adresser un petit mot de remerciements à Margot, qui a elle aussi rejoint l'équipe en thèse après un stage de M2. Nous n'avons pas beaucoup échangé et pourtant j'ai pris beaucoup de plaisir à discuter avec toi. On s'aperçoit rapidement que tu es quelqu'un de très gentil et agréable et je te souhaite également le meilleur pour l'aventure de la thèse.

Je tiens à présent à remercier les membres de l'équipe D, nos voisins d'étage, avec qui j'ai eu l'occasion d'échanger pendant la thèse. Je tiens à remercier en particulier d'une part Cécile Barthes, pour sa bonne humeur, son soutien et son écoute bienveillante ainsi que les supers moments passés à l'extérieur du labo. Chaque moment a été un plaisir et je compte bien continuer les soirées filles après mon départ !

D'autre part, je tiens également à remercier François-Xavier « FX », ancien membre de l'équipe K puis de l'équipe D, avec qui j'ai partagé énormément de choses tant au labo qu'en dehors. J'ai apprécié chacun de ces moments et je garde un très bon souvenir de chacun d'entre eux. Je voudrais te remercier pour ton aide et ton soutien durant les deux années que tu as passé au laboratoire.

Enfin, je tiens à remercier une seconde fois Remi Chauvin, pour ses nombreux encouragements et son soutien durant la période charnière de ces derniers mois de thèse. J'ai autant apprécié parler de chimie que d'autres choses et vos petits mots de soutien m'ont beaucoup touchée.

Enfin, je remercie Margaux pour les quelques échanges et sorties partagées, en espérant qu'il y en ait d'autres !

Je ne remercie pas Dylan aka Tocardo, pour les interminables et inutiles sessions au confessionnal, tant d'heures de ma vie de perdues que je ne récupérerai jamais tant les conseils que tu m'y as donnés ce sont avérés nacs. Je ne te remercierai pas pour ton cruel manque d'assiduité aux fameux « café bâtard » tout comme je ne te remercierai pas pour ton manque flagrant de discernement concernant mon génie dans l'élaboration de tiktoks de qua-li-té (papoooooooooy). Concernant ta nomination en thèse au labo... je ne dirai qu'une chose : si j'ai pu le faire, franchement il y a moyen que même toi tu y arrives. Bon courage à toi, tu as un avenir tout tracé dans la saltimbanquerie chimique d'après ce que j'ai vu.

Je remercie chaleureusement le Docteur Dennis Gomez, qui a collaboré avec nous sur le projet et qui m'a accueillie dans son laboratoire à l'IPBS. J'ai beaucoup appris en peu de temps, notamment l'exécution des expériences de FRET,

REMERCIEMENTS

indispensables à la bonne caractérisation des porphyrines Tu as été un très bon formateur, calme, patient et rigoureux et je te remercie d'avoir pris le temps de me former.

Je voudrais adresser quelques remerciements particuliers. Tout d'abord à Christian Bijani, pour son aide précieuse quant à l'interprétation de mes nombreuses RMNs de porphyrines, parfois bien alambiquées ! Merci à toi d'avoir pris le temps de m'aider et merci aussi pour les petites discussions sympathiques de temps à autre en se croisant dans les couloirs !

J'aimerais également remercier Philippe Prono et Philippe Supra du magasin. Philippe Prono d'abord, qui a eu à cœur de me garder hydratée au dichlo pendant ces trois ans d'une part et Philippe Supra d'autre part qui s'est montré extrêmement gentil et patient à mon égard les quelques fois où nous nous sommes croisés.

Je tiens ensuite sur une note plus personnelle à remercier mes amies longue distance, Élise, Claire, Guillaume et Raphael d'une part, qui avez suivi ma thèse de loin mais en étant toujours là pour moi à tout instant même à plus de 1000 km. Chacun de vous est si précieux à mes yeux. Je vous aime. Chaque moment de retrouvailles était un plaisir et je regrette seulement de n'avoir pu partager davantage d'aventures toulousaines avec vous ! Je remercie également Clarissa, qui a fait le chemin avec Élise pour assister à ce grand moment qu'a été ma soutenance de thèse. J'ai partagé un appartement avec toi mais aujourd'hui c'est une merveilleuse amitié qui nous lie. Merci pour ton soutien durant ces trois ans et pour nos escapades multiples notamment celle mémorable de Londres ! Tu rends ma vie plus belle.

Je voudrais ensuite remercier deux autres amies à distance. D'une part Cécile, de qui je me suis beaucoup rapprochée durant ces trois ans. Nos aventures similaires (balance ascendant capricorne) nous ont beaucoup rapprochées et je suis très heureuse de pouvoir te compter parmi mes plus proches amies aujourd'hui. Merci à toi d'avoir toujours su être présente pour moi pendant cette période. Nous avons partagé nos joies, nos peines et bien plus encore et aujourd'hui je suis très heureuse de cette amitié forte qui nous lie.

D'autre part, je voudrais remercier une de mes plus vieilles amies à ce jour, Clarisse, qui a également égayé mes journées de ses messages loufoques tout en étant toujours à l'écoute pour moi. Cela fait 13 ans que l'on se connaît et je ne compte pas te lâcher.

Concernant mes amies toulousaines à présent, je tiens premièrement à remercier Camille, que je connais depuis peu mais de qui je me suis rapidement sentie proche. Merci à toi de t'être ouverte à moi et d'être devenue une amie précieuse à mes yeux. J'adore partager sorties et moments chill à tes côtés et j'espère que de nombreuses aventures nous attendent !

Je souhaiterai également remercier mes « copines de karaté » Mélanie et Serena d'une part pour les nombreuses soirées copines karaté et en dehors que nous avons partagées et sans lesquelles ma vie à Toulouse aurait été bien moins drôle ! Je tiens à adresser des remerciements tout particuliers à Sixtine (si j'étais convenablement vêtue à ma soutenance de thèse, c'est bien grâce à elle), avec qui j'ai passé la majorité de mes soirées folles à Toulouse (et que j'ai appris à boire). Le confinement de 2020 nous a rapprochées et j'espère ne jamais te perdre. Tu es rapidement devenue une personne indispensable sans qui mon aventure toulousaine aurait été bien triste. Plus que ma Cristina Cordula attitrée, tu es devenue l'une de mes plus proches amies. Nous avons partagé nos galères de thésardes, nos galères tout

REMERCIEMENTS

court et plus encore de moments incroyables grâce auxquels j'ai pu grandir et prendre conscience de beaucoup de choses. Merci pour tout.

Je tiens à adresser mes pénultièmes remerciements à mon professeur de physique-chimie de mes années lycée, Stéphane Steiner. Mon goût de la chimie a vu le jour dans sa salle de classe où j'ai appris non seulement beaucoup de choses en termes de sciences, mais également appris ce que c'était que d'avoir un excellent professeur. J'ai depuis pour ambition d'exercer le même métier avec au moins la même force et le même engagement, une façon de rendre un peu de ce qui m'a été donné. Bien que j'aie appris à ne jamais sous-estimer la puissance du égal, j'espère un jour devenir la vôtre en termes de compétences, d'engagement et de bienveillance. J'ai trouvé ma voie grâce à vous et après un petit détour sympathique, je sais où je vais. Finalement, cette thèse, c'est aussi un peu aussi la vôtre alors, merci pour tout.

Enfin, je remercie ma famille d'avoir toujours été là pour moi pendant cette aventure qui s'est clôturée à ma soutenance de thèse. Chaque moment passé en famille était une bouffée d'air frais et j'espère vous avoir rendus fiers de mon parcours. L'aventure continue et je sais que vous serez toujours là. Je vous aime.

Un mot pour mon grand-père Eugène, décédé à peine deux semaines avant que je ne débute ma thèse. Tu vois, je suis devenue Dr Rundstadler finalement.

LISTE DES ABBREVIATIONS

A	Adénine
C	Cytosine
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
d	Doublet
DMF	Diméthyl formamide
DMSO	Diméthyl sulphoxide
ds26	5'-d(CAATCGGATCG AATTCGATCCGATTG)
EtOAc	Acétate d'éthyle
F21T	5'-d(GGG(TTAGGG) ₃)
FAM	6-carboxyfluorescéine
Fenyl	<i>meso</i> -tetrakis[(4-(<i>N</i> -methylpyridinium-2-yl)-2,3,5,6-tetrafluorophenyl]porphyrin
FRET	Förster Resonance Energy Transfert
Fyridine	<i>meso</i> -tetrakis[(4-(3,4,5,6-tetrafluoro- <i>N</i> -methylpyridinium-2-yl)phenyl]porphyrin
Fyrrole	<i>meso</i> -tetrakis[(4-(<i>N</i> -methylpyridinium-2-yl)phenyl)]β-octafluoroporphyrin
G	Guanine
G ₄	G-quadruplex
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IC ₅₀	concentration qui inhibe de 50% une activité
KNO ₃	Nitrate de potassium
m	Multiplet
MeCN	Acétonitrile
MeOH	Méthanol
PDB	Protein Data Bank
ppm	partie par million
q	Quadruplet
RMN	Résonance magnétique nucléaire
s	Singulet
SiO ₂	Silice
SM-ES ⁺	Spectrométrie de Masse (Electrospray positif)
SMHR-ES ⁺	Spectrométrie de Masse Haute Résolution (Electrospray positif)
T	Thymine
t	Triplet
TAMRA	Carboxytétraméthylrhodamine
TFA	Acide trifluoroacétique
TMPyP ₄	<i>meso</i> -tetrakis[4-(<i>N</i> -methylpyridinium)]porphyrin
UV-vis	Domaine du visible et de l'ultraviolet

INTRODUCTION	1
REFERENCES DE L'INTRODUCTION	4
CHAPITRE 1	5
I. Les G-quadruplex d'acides nucléiques	5
I. 1. Généralités	5
I. 1. i. Définition	5
I. 1. ii. Topologie des G ₄ s	6
I. 1. iii. Dispersion des G ₄ s dans le génome	7
I. 2. Rôles des G ₄ s dans le vivant chez l'Homme et les pathogènes non viraux	8
I. 2. i. Chez l'Homme	8
I. 2. ii. Rôles des G ₄ s chez les micro-organismes non viraux	12
I. 3. Intérêt thérapeutique des G ₄ s	13
I. 3. i. Dans le traitement des cancers	13
I. 3. ii. Les G ₄ s comme aptamères	14
I. 3. iii. Les G ₄ comme transporteurs	15
I. 3. iv. Les G ₄ s comme cibles d'antibiotiques ou agents antimicrobiens	15
II. Rôles et intérêt thérapeutique des G ₄ s chez les virus	17
II. 1. Rôles des G ₄ s chez les virus	19
II. 1. i. Cycle viral	19
II. 1. ii. Les G ₄ s et le phénomène de latence	19
II. 2. Intérêt thérapeutique des G ₄ s	20
III. Ligands de structures G quadruplex	21
III. 1. BRACO-19	22
III. 2. Les dérivés du pérylène et du naphtalène	23
III. 3. Les dérivés bisquinolinium	24
III. 3. i. La pyridostatine	24
III. 3. ii. Les phenanthrolines	25
IV. Méthodes pour l'étude des interactions ligand /G ₄	27
IV. 1. Méthodes structurales	27
IV. 1. i. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	27

TABLES DES MATIERES

IV. 1. ii.	La diffraction aux rayons X (RX)	27
IV. 2.	Méthodes indirectes	28
IV. 2. i.	Le Dichroïsme Circulaire (CD)	28
IV. 2. ii.	Förster Energy Transfert (FRET)	29
IV. 2. iii.	Fluorescence Intercalator Displacement (FID)	30
IV. 2. iv.	La chromatographie d'affinité	31
IV. 2. v.	La spectroscopie UV-visible	31
IV. 3.	Méthodes quantitatives	32
IV. 3. i.	La Résonance Plasmonique de Surface (SPR)	32
IV. 3. ii.	La Titration Calométrique Isotherme (ITC)	33
IV. 3. iii.	La spectrométrie de masse	34
IV. 4.	Méthode enzymatique : l'inhibition de la télomérase.	34
V.	Les porphyrines	34
V. 1.	Les porphyrines chez l'Homme	35
V. 1. i.	L'hémoglobine	35
V. 1. ii.	Les protéines héminiques	36
V. 2.	Les porphyrines en tant que molécules thérapeutiques	36
V. 2. i.	Usages des porphyrines en tant que molécules anticancéreuses	36
V. 2. ii.	Porphyrines antivirales	38
V. 3.	Les porphyrines comme ligand de G4s	38
V. 4.	Les travaux antérieurs du groupe	39
V. 4. i.	Les porphyrines cationiques	39
V. 4. ii.	Les résultats biologiques	40
RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 1		42
CHAPITRE 2		55
I.	Introduction	55
II.	Principes généraux de synthèse des porphyrines	59
II. 1.	Méthode dite « <i>mixed aldehydes</i> » et mécanisme	59
II. 2.	Purification des porphyrines	60
III.	Synthèse des porphyrines	61

TABLE DES MATIERES

III. 1.	Stratégie de départ	61
III. 1. i.	La porphyrine 5-(4-bromophenyl)-10,15,20-tris[4-(pyridin-2-yl)phenyl]porphyrin 4	61
III. 1. ii.	Mise au point des conditions du couplage de Suzuki-Miyaura	62
III. 1. iii.	Mise en place des conditions d'alkylation	64
III. 2.	Stratégies potentielles	67
III. 2. i.	Le couplage de Buchwald-Hartwig	67
III. 2. ii.	La synthèse d'aldéhydes fonctionnalisés	69
III. 2. iii.	Le retour au couplage de Suzuki-Miyaura mais en conditions aqueuses	71
III. 3.	Stratégie finale	73
III. 3. i.	Synthèse du précurseur fonctionnalisé par un bras COOH : Au(MA)₃COOH	73
III. 3. ii.	Synthèse du composé biotinylé : Au(MA)₃biotine	75
IV.	Etude de la relation structure/affinité pour les G ₄ s à l'aide d'une série de porphyrines.	80
IV. 1.	Les porphyrines synthétisées	80
IV. 1. i.	La porphyrine Au(MA)₂Br₂	80
IV. 1. ii.	La porphyrine Au(MA)₃Br	81
IV. 1. iii.	La porphyrine Au(MA₄)₄	82
IV. 1. iv.	La porphyrine Au(MA)₃MA₄	83
IV. 2.	Méthylation des groupements pyridines	83
IV. 3.	Méallation	84
V.	Relation structure/affinité pour les G ₄ s : tests de FRET melting	85
V. 1.	Principe du FRET melting	85
V. 2.	Résultats des tests de FRET melting	86
V. 2. i.	FRET sur l'oligonucléotide F21T	86
V. 2. ii.	Essais de compétitions entre l'ADN G-quadruplex F21T et l'ADN duplex	88
VI.	Conclusion du chapitre	89
REFERENCES DU CHAPITRE 2		90
CHAPITRE 3		93
I.	Les méthodes de calcul de l'énergie libre de liaison	93
I. 1.	Les fonctions de score	93
I. 2.	Les méthodes basées sur les calculs de dynamique moléculaire	94

TABLES DES MATIERES

II.	Conception d'un cycle thermodynamique permettant de calculer l'énergie libre absolue de liaison	97
II. 1.	Les contraintes de position	99
II. 2.	Mise en place des états intermédiaires	100
II. 3.	Les porphyrines d'or(III)	102
II. 3. i.	Validation de la méthode	102
II. 3. ii.	Résultats	103
III.	La modélisation de nouvelles porphyrines vers la synthèse de meilleurs dérivés	104
III. 1.	Modélisation de nouvelles porphyrines	104
III. 1. i.	Les porphyrines fluorées	104
III. 1. ii.	Des composés aux 2-pyridinium substitués	107
III. 2.	Les essais de synthèses	109
III. 2. i.	La porphyrine « Fenyl » 19	109
III. 2. ii.	La porphyrine « Fyrrole »	110
III. 2. iii.	La porphyrine « PGF »	111
III. 2. iv.	La rétrosynthèse proposée de AuMA NpNO₂	113
IV.	Conclusion du chapitre	114
RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 3		115
MATERIEL ET MÉTHODES		119
I.	Matériels et produits	119
II.	Expériences de FRET	119
III.	Spectroscopie UV-Vis	120
IV.	Synthèse des composés	120
V.	Modélisation Moléculaire	156
REFERENCES DE LA PARTIE MATERIEL & METHODES		159
CONCLUSION		163

INTRODUCTION

De nombreuses épidémies majeures voire pandémies survenues au cours de l'histoire ont réécrit les chroniques de l'humanité tant elles ont été dévastatrices. D'origines multiples, elles ont en commun leurs conséquences sociales, économiques et politiques dramatiques. Les différents épisodes de peste, notamment aux VI^{ème}, IX^{ème} et XIV^{ème} siècles, sont un bon exemple des ravages que peuvent occasionner de grandes périodes infectieuses.

Les progrès de la médecine et de la pharmacie ont permis de mieux gérer et prévenir de nouveaux épisodes infectieux. Du développement de nouveaux médicaments à une meilleure compréhension des mécanismes pathogènes, il serait logique de penser que de tels événements puissent être contenus voire être évités. Il y a cependant une multiplication des épisodes infectieux depuis le début de l'époque moderne.

En effet, au cours du siècle dernier, l'humanité a vu émerger près de dix épidémies majeures dont certaines ont par la suite évolué en pandémies. Toutes sont d'origines virales et ont été transmises à l'homme par contact via un animal infecté. On parle alors de zoonoses, des maladies qui sont transmissibles de l'animal à l'homme et vice versa^{1,2}. L'introduction de ces maladies peut s'expliquer de plusieurs façons. La domestication de certaines espèces, la consommation de viande d'animaux sauvages issue du braconnage ou l'industrialisation de l'élevage sont autant de situations qui facilitent l'apparition de zoonoses. En effet, ce rapport avec les animaux d'élevage destinés à l'alimentation humaine entraîne un contact prolongé tout à fait propice à l'apparition de pathogènes capables de traverser la barrière inter-espèces. Le cas de la pandémie de SARS-Cov-2 dit Covid-19 est un bon exemple des conséquences que peuvent avoir une zoonose non contenue. Un autre cas bien connu de zoonose ayant entraîné une pandémie qui sévit encore de nos jours est celui du virus VIH-1 qui trouve son origine chez les primates non-humains.

Depuis le début de la pandémie de VIH-1 déclarée officiellement dans les années 80, des millions de personnes ont été victimes du virus. En 2020, près de 38 millions d'individus sont infectés et presque autant sont décédés des suites de la maladie (site de l'ONU SIDA <https://www.unaids.org/fr/resources/fact-sheet>).

À l'heure actuelle, l'OMS définit cette situation comme étant un problème majeur de santé publique. La maladie progresse et de nouvelles personnes découvrent chaque jour leur séropositivité. Il n'existe actuellement aucun traitement curatif à l'infection par le VIH-1. Ces traitements sont difficiles à mettre en place dans la mesure où peu de cibles sont connues chez les virus.

Les virus représentent une catégorie particulière d'agents pathogènes. Ces particules nanoscopiques dont la qualification d'êtres vivants est sujette à débat, sont des agents infectieux définis par leur nécessité d'un hôte pour survivre et se propager. Ils s'accaparent la machinerie métabolique de l'hôte infecté pour se reproduire. Ils coexistent avec toutes les formes de vie et peuvent se retrouver au sein d'hôtes extrêmophiles³. Il en existe donc aussi bien dans les océans qu'en région polaire ou équatoriale.

Les traitements anti viraux que nous avons à notre disposition sont relativement limités. En effet, à l'inverse des infections par d'autres pathogènes, comme des parasites ou des bactéries, les infections virales ne peuvent qu'être ralenties jusqu'à ce que le système immunitaire prenne le relais. Dans le cadre d'une infection par un pathogène non

INTRODUCTION GÉNÉRALE

viral, le recours à un médicament antibiotique qui souvent cible une voie métabolique propre au pathogène, mène à sa mort en perturbant sa biochimie. Lors d'une infection virale, les cibles, et donc les types de médicaments, sont assez limitées. Il existe trois grandes familles de médicaments antiviraux : ceux qui empêchent le virus de coloniser la cellule, ceux qui perturbent le cycle de réplication du génome viral et ceux qui bloquent la formation de nouveaux virions. Le premier médicament anti-viral autorisé sur le marché en 1963, est l'idoxuridine⁴, un inhibiteur nucléosidique d'ADN polymérase utilisé contre le virus de l'herpès.

À l'heure actuelle, le moyen le plus efficace de se prémunir d'une infection virale est la vaccination. Ce processus consiste à inoculer à un patient sain des particules virales non pathogènes ou des protéines virales immunisantes. De ce fait, il est généré artificiellement une réponse immunitaire à une infection peu virulente. De cette manière, l'organisme est capable de reconnaître l'agent infectieux lors d'une véritable infection et donc de se défendre. Le système immunitaire serait éventuellement assisté par des médicaments antiviraux mais en aucun cas ces traitements ne détruisent les virions. C'est là tout l'aspect dramatique de l'infection par le virus VIH-1. Celui-ci, comme tous les virus, colonise les cellules de l'hôte, et détourne la machinerie cellulaire à ses propres fins de réplication. Or, les cellules ciblées par le VIH-1 sont justement celles du système immunitaire, rendant l'infection impossible à combattre sans traitement.

Il existe actuellement un traitement symptomatique de l'infection par le VIH-1. Il consiste en l'administration de plusieurs médicaments antirétroviraux destinés à bloquer le cycle viral et à lutter contre la résistance en employant des molécules aux modes d'actions différents. Si ce traitement permet aux personnes séropositives au VIH-1 d'avoir une espérance de vie similaire à celle d'une personne saine et empêche la transmission du virus, il est nécessaire de trouver un traitement curatif afin d'endiguer la progression de la pandémie. D'autre part, Il devient indispensable de trouver de nouvelles cibles afin d' étoffer l'arsenal thérapeutique dont nous disposons.

Lors de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la conception de porphyrines d'or(III), pour le ciblage des acides nucléiques G-quadruplex (ou G₄s) du virus VIH-1. Ces structures particulières d'acides nucléiques à quatre brins, apparaissent aujourd'hui comme des éléments clés dans la régulation des mécanismes fondamentaux du vivant et en particulier dans la régulation du cycle des virus, incluant le VIH-1. Cibler ces structures avec des petites molécules ou ligands perturbe leur fonctionnement et peut mener à l'interruption du cycle viral lorsque des G₄s y sont impliqués. Une corrélation entre la capacité des porphyrines à lier les G₄s et leur potentiel inhibiteur de la réplication du VIH-1 *in vitro* avait déjà été mise en évidence par le groupe. Durant cette thèse, les porphyrines d'or(III), ligands de G₄s, seront conçues non seulement en vue de rechercher des meilleures molécules antivirales potentielles contre le virus du VIH-1 mais aussi comme outil d'investigation quant aux mécanismes biologiques de G₄s impliqués chez le VIH-1.

Dans le premier chapitre bibliographique, nous aborderons les G₄s ainsi que leurs implications multiples au sein du vivant. Les différents aspects topologiques des structures en G₄ seront décrits ainsi que leurs différents rôles chez l'Homme, les procaryotes non viraux puis les virus. Il sera ensuite discuté de leur intérêt en tant que cibles thérapeutiques chez l'Homme, notamment dans les cas de cancers, ou en tant que cibles potentielles chez les micro-organismes et en particulier les virus. Il sera présenté un ensemble de molécules appartenant à la famille des porphyrines ayant démontré un potentiel antiviral dû à leurs propriétés de ligands des G₄s. Enfin, le chapitre se

poursuivra sur la place des porphyrines au sein de l'arsenal thérapeutique actuel et de leur potentiel en tant que ligand de G4s. Une attention particulière sera accordée aux porphyrines d'or(III) pour lesquelles nous constatons un intérêt grandissant en tant que molécules anti cancéreuses. Nous aborderons ensuite leur potentiel en tant que ligands de G4 viraux et les travaux réalisés par nos collaborateurs bordelais.

Dans le second chapitre, seront présentées les différentes voies de synthèse menées lors de ces travaux de thèse afin de préparer une sonde moléculaire à base de porphyrine d'or(III) pour réaliser des études de *pull down* des G4 viraux impliqués dans le cycle de réplication du virus VIH-1.

Différentes porphyrines d'or(III) ont été préparées puis évaluées dans des expériences de FRET melting afin de réaliser une étude de relations structure/affinité. Elles ont été classées selon leur affinité pour les G4s. Cette étude a permis de définir la meilleure structure de base pour la construction d'un conjugué porphyrine d'or-biotine dont la synthèse sera ensuite décrite.

Le troisième chapitre présentera les travaux de modélisation moléculaire réalisés. Dans un premier temps, la méthode alchimique choisie pour réaliser les études structure/affinité théoriques a été validée sur la base des résultats expérimentaux présentés dans le chapitre précédent. Les énergies libres d'interaction des porphyrines de la librairie de FRET ont été calculées. Finalement, de nouvelles porphyrines ont été modélisées suivant cette procédure et les premiers résultats ont mis en avant des modifications structurales potentiellement intéressantes, susceptibles d'augmenter l'interaction entre les porphyrines cationiques et les G4s. Les essais de synthèse desdites porphyrines seront également présentés.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

REFERENCES DE L'INTRODUCTION

- (1) Wolfe, N. D.; Dunavan, C. P.; Diamond, J. Origins of Major Human Infectious Diseases. *Nature* **2007**, *447* (7142), 279–283. <https://doi.org/10.1038/nature05775>.
- (2) Kooriyama, T.; Okamoto, M.; Yoshida, T.; Nishida, T.; Tsubota, T.; Saito, A.; Tomonaga, M.; Matsuzawa, T.; Akari, H.; Nishimura, H.; Miyabe-Nishiwaki, T. Epidemiological Study of Zoonoses Derived from Humans in Captive Chimpanzees. *Primates* **2013**, *54* (1), 89–98. <https://doi.org/10.1007/s10329-012-0320-8>.
- (3) Gil, J. F.; Mesa, V.; Estrada-Ortiz, N.; Lopez-Obando, M.; Gómez, A.; Plácido, J. Viruses in Extreme Environments, Current Overview, and Biotechnological Potential. *Viruses* **2021**, *13* (1), 81. <https://doi.org/10.3390/v13010081>.
- (4) Prusoff, W. H. Synthesis and Biological Activities of Iododeoxyuridine, an Analog of Thymidine. *Biochim. Biophys. Acta* **1959**, *32*, 295–296. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(59\)90597-9](https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90597-9).

CHAPITRE 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les G-quadruplex d'acides nucléiques

I. 1. Généralités

I. 1. i. Définition

Les nucléotides sont les briques constitutives du génome. Fondations des acides nucléiques du vivant que sont l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) et de l'Acide RiboNucléique (ARN), ils sont constitués d'un sucre de type ribose ou 2-désoxyribose, d'un groupement phosphate et d'une base azotée. La structure des principales bases constitutives de l'ADN et de l'ARN ainsi qu'un enchaînement de plusieurs nucléotides formant un brin d'ADN sont présentés sur la **Figure 1**. La liaison entre nucléotides est une liaison phosphodiester, elle se fait entre le groupement hydroxyle en 3' d'un nucléotide et le groupement hydroxyle en 5' du suivant. Une séquence d'ADN se lit de l'extrémité 5'-OH libre vers l'extrémité 3'-OH libre.

Les interactions entre les différents nucléotides permettent la structuration des brins. La structure la plus connue est celle de l'ADN double brin permise par les interactions de type liaisons hydrogènes entre les nucléotides deux à deux. Ces liaisons hydrogène se font par appariement sur la face appelée Watson-Crick (en violet sur la **Figure 1**)¹. Le Prix Nobel de médecine¹ qui a été attribué en 1962 à ces auteurs, sur la base des travaux de Rosalind Franklin a marqué l'importance de cette structure. Ces appariements dits canoniques concernent les interactions entre les bases adénine (A) et thymine (T), cytosine (C) et guanine (G), deux à deux de type A=T et C≡G.

L'appariement en double brin d'ADN n'est pas le seul existant cependant. Des appariements de plusieurs types sont connus également, entre des bases non canoniques par exemple ou suivant une face différente de la face Watson-Crick, qui permettent des structurations différentes indispensables au bon fonctionnement d'un organisme vivant. Ce sont ces dernières qui vont nous intéresser plus particulièrement.

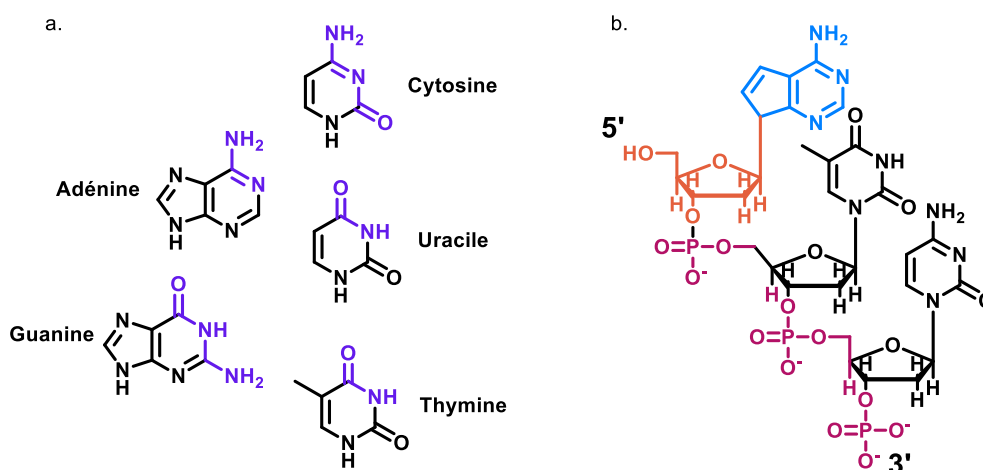


Figure 1 : a. Représentation des cinq principales bases nucléiques. b. Représentation d'un enchaînement de trois nucléotides dans un brin d'ADN.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

En effet, les travaux présentés ci-après portent sur des structures d'acides nucléiques constitués d'assemblages à quatre brins d'ADN ou d'ARN que l'on appelle des G-quadruplex (G₄s). On les appelle ainsi car ces assemblages supramoléculaires se forment grâce aux guanines qui interagissent via des liaisons hydrogènes par leur face Hoogsteen² (en rose sur la **Figure 2a**) et non pas Watson-Crick (en violet sur la **Figure 2a**) pour former ce que l'on appelle un plateau (quartet en anglais) de quatre guanines. On parle aussi de tétrade de guanines. Ces plateaux peuvent se superposer par deux ou par trois par exemple grâce à des interactions de π -stacking entre les surfaces aromatiques des guanines et former un assemblage supramoléculaire (**Figure 2b**). Au centre de ces structures on retrouve des ions cationiques monovalents, potassium ou sodium, qui stabilisent encore davantage l'ensemble.

I. 1. ii. Topologie des G₄s

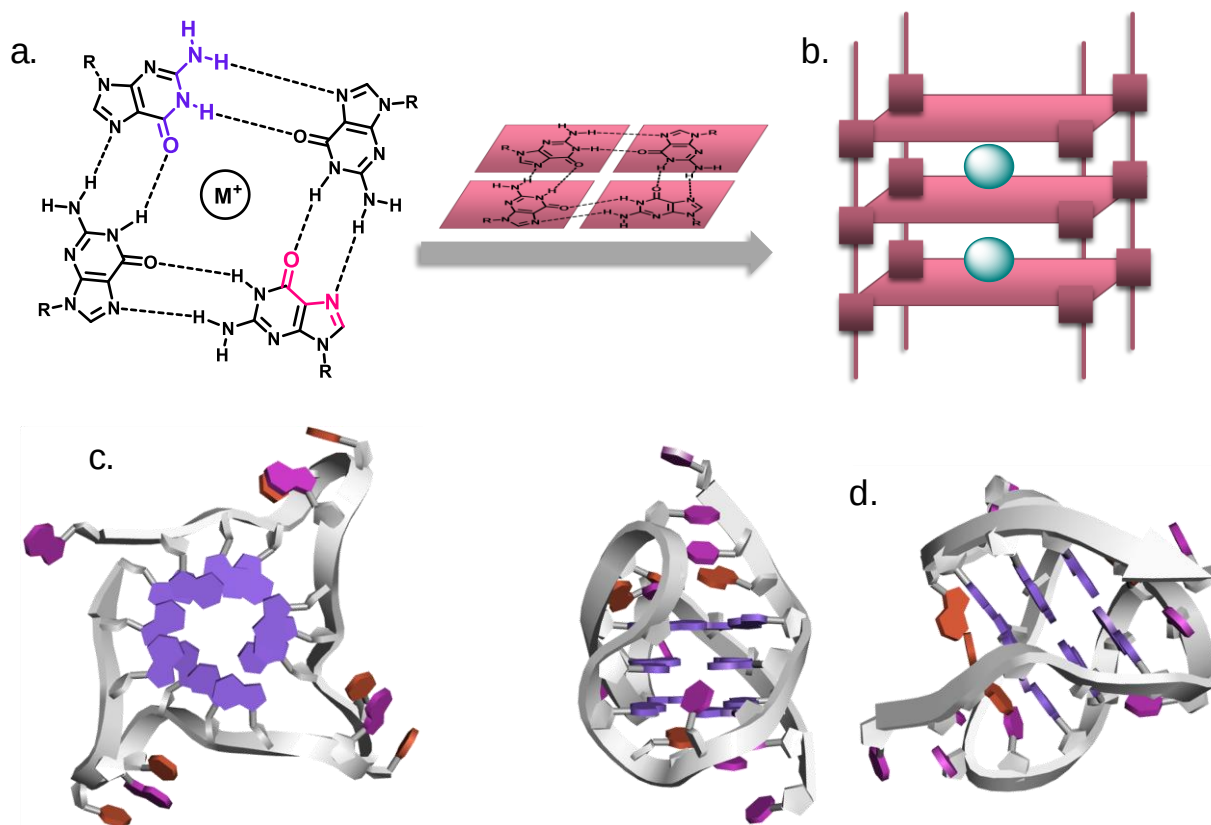


Figure 2 : a. Structure d'un plateau de guanines b. Une représentation schématique d'un quadruplex formé par l'empilement de trois plateaux. c. Vue supérieure d'un G₄ télomérique (PDB : 1KF1) dont la structure, déterminée par rayons X, est parallèle. d. vues latérales d'une autre structure G₄ (PDB : 2JPZ) dont la structure a été déterminée par RMN. Les G sont en violet, les A sont rose, les T sont orange.

Les G₄s sont des structures qui présentent un certain polymorphisme illustré sur la **Figure 3**³. Cette variation de topologie implique plusieurs aspects. On peut citer notamment l'orientation relative des brins impliqués. Par exemple, si tous les brins sont orientés dans le même sens, on parlera d'un G₄ parallèle. Si les brins sont orientés dans le même sens que deux à deux, on parlera de G₄ antiparallèle. Enfin, si une structure dite 3+1 présente trois brins de même sens et un brin de sens opposé, on parlera de G₄ hybride. Il existe des G₄s inter et intramoléculaires. La position relative des bases au sein de l'assemblage par rapport aux sucres est également un facteur de polymorphisme. En effet selon que

les bases sont placées en position *syn* ou en position *anti*, le G₄ aura une géométrie différente.

On peut également s'intéresser au nombre de nucléotides qui composent les boucles ou encore aux différentes boucles possibles entre les brins etc.^{4,5} Ainsi des boucles externes (en forme d'hélice) relieront entre eux des brins parallèles tandis que des boucles latérales relieront des brins d'orientation antiparallèles. Les boucles diagonales relient deux brins d'orientation opposées mais diamétralement opposés l'un par rapport à l'autre. Il est intéressant de noter que la taille des boucles a une incidence sur la stabilité et la cinétique de formation des G₄s⁶⁻⁸.

I. 1. iii. Dispersion des G₄s dans le génome

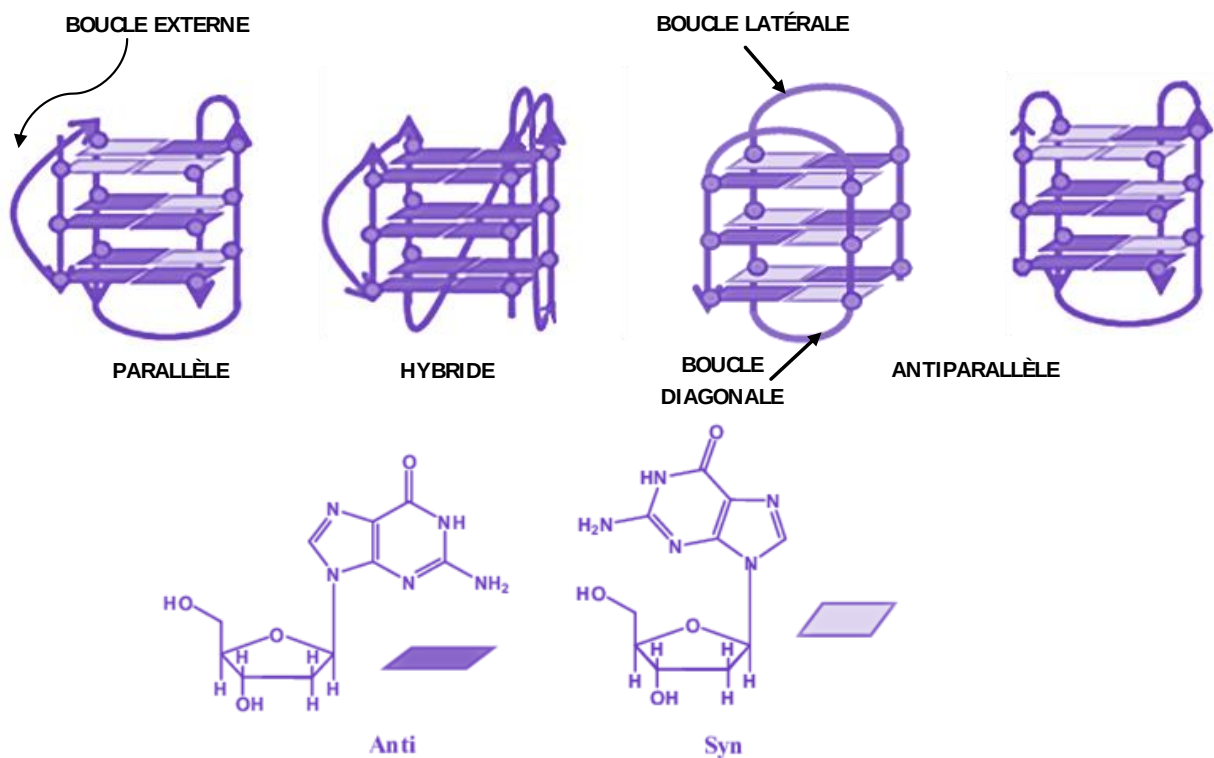


Figure 3 : Illustration du polymorphisme des G₄. Adaptée de Kaushnik *et al.*³

Des assemblages de guanine sont connus depuis les années 60⁹. On les a observés une première fois dans une solution tampon contenant un gel de guanosine 5'-monophosphate. Par la suite, il sera mis en évidence que des assemblages à 4 brins peuvent également se former dans un ADN monobrin contenant des régions à forte proportion de guanine¹⁰ en conditions physiologiques. Des séquences riches en guanines existent au sein du génome humain au niveau des chaînes lourdes des immunoglobulines^{10,11}, de l'ADN ribosomal¹² ou encore des télomères^{13,14}. Bien qu'il s'agisse de structures dynamiques au sein du vivant, ces G₄s peuvent s'avérer être également des structures extrêmement stables¹⁵. Leur dynamisme *in vivo* est régulé par des protéines¹⁵.

Des études bio-informatiques montrent qu'il existe chez l'Homme plus de 350 000 séquences susceptibles de former des G₄s *in vivo*¹⁶⁻¹⁸. On peut également remarquer la prévalence de G₄s potentiels dans certaines zones bien précises du génome, au niveau des télomères bien sûr mais également au niveau des promoteurs de certains gènes, ce qui

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

suggère que les G4s peuvent jouer un rôle à différentes étapes de la transcription de ces gènes^{19–21}.

Les séquences contenant des G4s sont également très largement conservées dans le vivant aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes, ce qui confirme leur importance pour certaines fonctions biologiques^{20,22–24}.

Pour réaliser ces fonctions au niveau de l'ADN, les G4s doivent pouvoir se former. Cependant, pour que cela se produise, l'ADN doit se trouver sous la forme simple brin, ce qui ne se produit qu'à certaines occasions particulières (réplication, transcription). La plupart du temps, l'ADN est condensé pour pouvoir être contenu dans une cellule procaryote ou dans le noyau des cellules eucaryotes. Cette structure condensée porte un nom, il s'agit de la chromatine. L'élément constitutif de la chromatine est appelé nucléosome, qui est lui-même formé par un assemblage de huit histones. Une histone est une protéine autour de laquelle s'enroule la molécule d'ADN, lui donnant ainsi un aspect dit en collier de perles. Il existe deux types de chromatine durant l'interphase cellulaire. On parle d'hétérochromatine lorsque celle-ci est extrêmement condensée et d'euchromatine lorsqu'elle l'est peu. L'hétérochromatine, en effet, contient peu de régions transcrites, majoritairement des séquences répétées ayant un rôle structural comme les centromères ou les télomères. L'euchromatine, en revanche, est relativement accessible à la machinerie cellulaire de transcription lors de l'interphase. Elle contient la majorité des gènes transcrits. Ce n'est que lorsque l'ADN est sous sa forme monocaténaire qu'il est susceptible de former ou non des G4s, ce qui renforce l'idée d'un rôle transcriptionnel de ces structures.

En résumé, les G4s sont des structures dynamiques qui se forment dans des régions du génome riches en guanine comme par exemple les régions des promoteurs ou les télomères. Du fait de leur localisation non aléatoire et de la forte conservation des séquences contenant des G4s, il est supposé une pression de conservations de ces assemblages aussi bien que des rôles majeurs dans plusieurs fonctions biologiques, notamment durant la transcription ou la division cellulaire²⁵.

I. 2. Rôles des G4s dans le vivant chez l'Homme et les pathogènes non viraux

Dans cette partie nous aborderons les différents rôles attribués aux G4s depuis leur découverte au sein du vivant chez l'Homme et chez les micro-organismes non viraux. La partie II sera tout particulièrement dédiée aux cas des virus.

I. 2. i. Chez l'Homme

I. 2. i. a. Les télomères

Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques qui contiennent des séquences répétées non codantes d'ADN qui se situent en fin de chromosome. Chez les eucaryotes cette séquence est (TTAGGG)_n. Ils servent à la protection de la molécule d'ADN dans la mesure où l'ADN polymérase, responsable de la synthèse d'une nouvelle molécule d'ADN lors de la division cellulaire, est incapable de copier la fin de la séquence dupliquée²⁶. Ce sont donc les télomères situés en fin de chromosome qui diminuent à chaque réplication cellulaire et non pas les régions codantes, pour éviter une perte de l'information génétique et donc la mort cellulaire. Une cellule humaine en culture *in vitro* peut se diviser en moyenne 50 fois avant d'entrer en phase de sénescence²⁷. Ce nombre de division limite est appelé limite de Hayflick et est directement corrélé à la longueur des télomères.

Nous l'avons abordé plus haut, les séquences télomériques sont des séquences riches en guanine qui peuvent former des G₄s²⁸. La capacité des régions télomériques à former des G₄s est hautement conservée dans le vivant ce qui suggère un rôle participatif de ces structures au bon fonctionnement des télomères²⁹. Leur extrémité, qui est linéaire et monobrin du fait de la réplication incomplète des chromosomes, peut se structurer de sorte à recouvrir l'extrémité du télomère. On appelle cette structure le *G-overhang*²⁹⁻³¹ (**Figure 4**²⁹). Cette structure particulière joue un rôle protecteur des télomères en permettant la formation de la T-loop (Telomere Loop) en fin de séquence télomérique³². Cette boucle protège le télomère de la dégradation par les enzymes de réparation de l'ADN qui pourrait confondre la terminaison simple brin avec une cassure de l'ADN. Elle se forme par insertion de la portion simple brin du télomère dans la boucle de réplication, la D-loop³³. L'extrémité simple brin sert également de substrat à la télomérase.

La télomérase est une ADN polymérase ARN dépendante. Elle est composée de deux sous-unités, une sous-unité à activité polymérase que l'on appelle la sous-unité TERT (TElomerase Reverse Transcriptase) et une sous-unité portant le motif ARN qui sert de template à la synthèse de l'ADN télomérique. Son rôle est d'allonger les séquences télomériques pour pallier leur raccourcissement. Son activité est généralement très faible dans les cellules somatiques dans lesquelles la région codant pour la sous-unité TERT est placée sous haute régulation transcriptionnelle³⁴.

La télomérase est inhibée par les G₄s. En effet, elle doit trouver l'extrémité 3'-OH du chromosome pour commencer à polymériser l'ADN. Si cette extrémité est masquée de par le repliement en G₄ du simple-brin télomérique, elle ne sera pas accessible et l'allongement du télomère n'aura pas lieu. Par contre, il est intéressant de constater que des G₄s peuvent avoir aussi un effet positif sur la télomérase^{35,36}. Le repliement en G₄ du brin d'ADN neosynthétisé au sein du complexe de la télomérase active joue un rôle positif sur son efficacité à polymériser.

Il est à noter qu'il existe des TERRA, des ARN télomériques, qui peuvent jouer un rôle stabilisant au sein des structures télomériques²⁹, comme par exemple la T-loop.

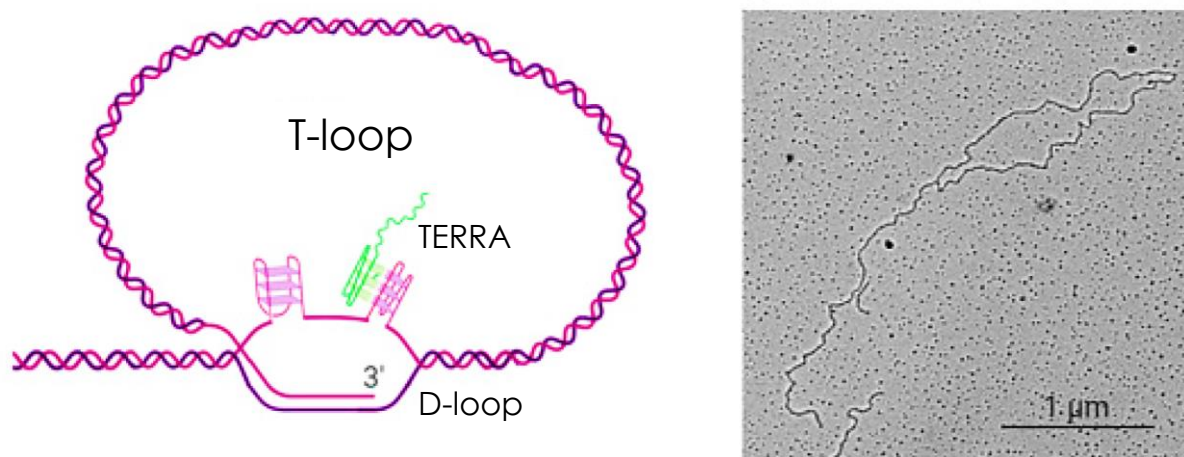


Figure 4 : À gauche, une représentation de la T-loop qui se forme par intercalation du G overhang, lui-même pouvant se structurer en G₄. Est également montré la participation potentielle d'un ARN télomérique (en vert) à la stabilisation des G₄s. À droite, un cliché du phénomène observé en microscopie électronique dans une lignée de cellules HeLa. Schéma de Bryan *et al.*, 2020²⁹.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

I. 2. i. b. Les G₄s impliqués dans les phénomènes de transcription et traduction.

Les promoteurs de gènes sont des séquences précises qui se situent en amont de la séquence codante d'un gène. C'est cette région qui est reconnue par l'ARN polymérase. Elle contient des séquences régulatrices qui permettent de contrôler le taux d'expression des gènes et après les télomères, ce sont les zones du génome les plus enrichies en G₄s. En effet, près de 40% des promoteurs de gènes contiennent au moins une séquence susceptible de former un G₄¹⁹.

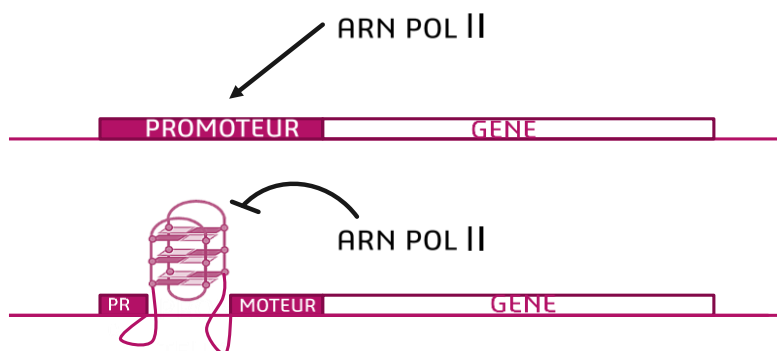


Figure 5 : Impact de la présence d'un G₄ structuré sur l'étape de transcription.

Il est intéressant de remarquer que la plupart des promoteurs de proto-oncogènes^{19,37} possèdent des zones riches en guanines capables de former des G₄s alors qu'au niveau des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs la probabilité de trouver des séquences riches en guanines est très faible²⁰. Des G₄s ont été identifiés dans les séquences de certains de ces gènes *in vitro*³⁸. Le premier G₄ à avoir été démontré comme ayant une activité de régulation sur l'expression des gènes a été identifié au niveau du promoteur de l'oncogène *c-myc*, responsable de la régulation positive de la transcription de nombreux gènes impliqués dans la réplication cellulaire et donc le cancer^{37,39}. Si la séquence promotrice présente un G₄ structuré, elle devient inaccessible à la machinerie de transcription. Cela suggère un rôle des G₄s dans la régulation de l'expression des gènes (Figure 5).

On retrouve un enrichissement en G₄s dans le 1^{er} intron de certains gènes en aval de leur site de début de transcription, mais cette fois ci sur le brin non transcrit²¹. La formation d'un G₄ à cet endroit induit une pause de l'ARN polymérase II, qui est responsable de 90% de la transcription des gènes. Ainsi les G₄s auraient un rôle supplémentaire dans la régulation de l'expression des gènes (Figure 6).

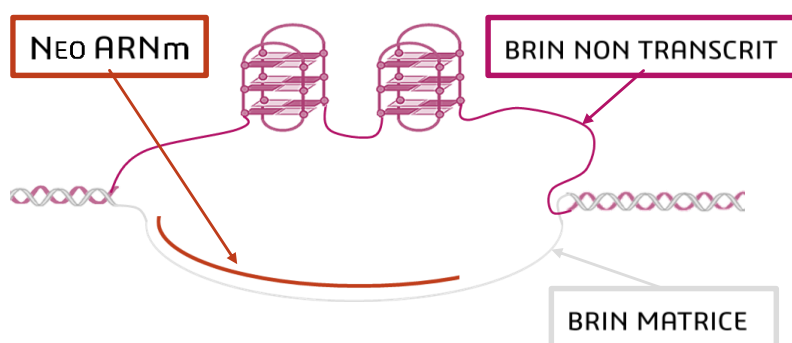


Figure 6 : Région riche en G du brin non transcrit qui forme une G-loop.

La présence de séquences de G₄s dans le brin non transcrit implique leur présence également au sein de l'ARNm résultant. Cela suggère la possibilité d'un rôle des G₄s lors de l'étape de traduction.

1. 2. i. c. Les G₄s dans la réplication, réparation et recombinaison

La réplication de l'ADN est un phénomène hautement régulé. C'est un processus qui s'effectue lors de la division cellulaire et qui consiste en la duplication de la totalité de l'ADN contenu dans la cellule. Cette réplication est initiée à plusieurs endroits différents au sein du génome que l'on appelle origine de réplication (ORI). C'est à l'ORI que s'effectue l'ouverture de la double hélice d'ADN permettant la copie par la polymérase. Des séquences potentielles de G₄s ont été identifiées près de certaines ORI, ce qui suggère que les premières étapes de la réplication pourraient être régulées par la formation de ces G₄s^{40,41}.

Lors de la réplication, les brins d'ADN se retrouvent un certain temps sous la forme simple brin, rendant possible la formation de G₄s. Ces G₄s sont des obstacles potentiels à la progression de l'ADN polymérase. Heureusement, il existe des hélicases particulières pouvant déplier les G₄s et permettant d'éviter une perte d'information lors de la réplication du fait de l'arrêt des ADN polymérases⁴². Ces zones sont donc à risque de forte instabilité génomique. En effet la présence de G₄s au niveau des télomères, des centrosomes ou des ORI peut induire un phénomène de translocation⁴³ qui est normalement inhibé par la présence d'hélicases.

Le phénomène de recombinaison permet l'échange de brins d'ADN entre deux brins possédant des séquences similaires. Il intervient aussi au niveau des échanges de séquences des chaînes lourdes des immunoglobulines^{44,45}. Des séquences de G₄ ont été identifiées dans le voisinage de zones sujettes à la recombinaison, ce qui indique que les structures G₄s pourraient jouer un rôle de signalisation dans ce phénomène⁴⁶.

1. 2. i. d. Les quadruplex d'ARN chez l'Homme

Jusqu'à présent nous n'avons abordé que les G₄s d'ADN chez l'Homme. Cependant il est à noter que des G₄s d'ARN existent également. Bien que cela ne soit pas détaillé, il est cependant important de mentionner quelques propriétés et rôles de ces G₄s lorsque ceux-ci diffèrent de ceux de G₄s d'ADN.

Comme souligné plus haut, pour que les G₄s puissent se former, il faut que l'acide nucléique soit sous forme simple brin. Pour l'ADN cela implique une rupture des liaisons Watson-Crick au profit de la formation des liaisons Hoogsteen. Cependant, l'ARN est quant à lui déjà sous une forme simple brin et des G₄s peuvent également s'y former. Il a même été montré que les G₄s d'ARN étaient plus stables que les G₄s d'ADN^{47,48}, du fait de la présence de ribose à la place du désoxyribose^{47,48}.

Certains ARNs contiennent donc des séquences potentielles de G₄s. Par exemple, il a été déterminé par séquençage bio-informatique qu'il existerait près de 3000 séquences potentielles de G₄s dans les régions 5'UTRs des ARNm (UTR : UnTranslated Region), des régions non traduites qui participent à la régulation post-transcriptionnelle des gènes^{49,50}. La présence de G₄ dans la région 5'UTR inhibe la traduction.

On peut citer le rôle de G₄s dans la traduction des ARNm, des modifications post-transcriptionnelles de ces ARNm ou encore le maintien de l'homéostasie des télomères. Les différentes fonctions des G₄s d'ARN sont documentées dans

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

plusieurs revues^{48,51-53}.

En conclusion de cette partie, les G4s sont des structures extrêmement intéressantes à étudier dans la mesure où leurs fonctions dans le génome sont très diverses et bien que déjà documentées, de nombreux mécanismes de fonctionnement restent inconnus. De cette importance dans nombre de fonctions biologiques, il paraît évident que ces structures pourraient tout aussi bien être impliquées dans des mécanismes délétères amenant à un phénotype pathogène. Comprendre le fonctionnement des G4s peut aider à mieux s'en servir comme cible thérapeutique et cela sera abordé dans la partie I. 3 pour l'Homme et les micro-organismes, et dans la partie II. 1 pour le cas particulier des virus.

I. 2. ii. Rôles des G4s chez les micro-organismes non viraux

On ne s'intéresse que depuis récemment aux différents G4s existants chez les micro-organismes. Si certains de leurs rôles peuvent être similaires à ceux trouvés chez l'Homme, il existe d'autres intérêts évolutifs des G4s chez ces pathogènes qui seront abordés ci-dessous⁵⁴.

Tout comme pour l'Homme, des analyses bio-informatiques ont été menées afin d'identifier la présence de structures potentielles de G4s chez les pathogènes²². Il s'avère que, tout comme pour l'Homme, leur distribution au sein du génome n'est pas aléatoire. Il s'agit de séquences hautement conservées²²⁻²⁴ qui seraient de plus associées à la virulence de ces pathogènes⁵⁵⁻⁵⁷.

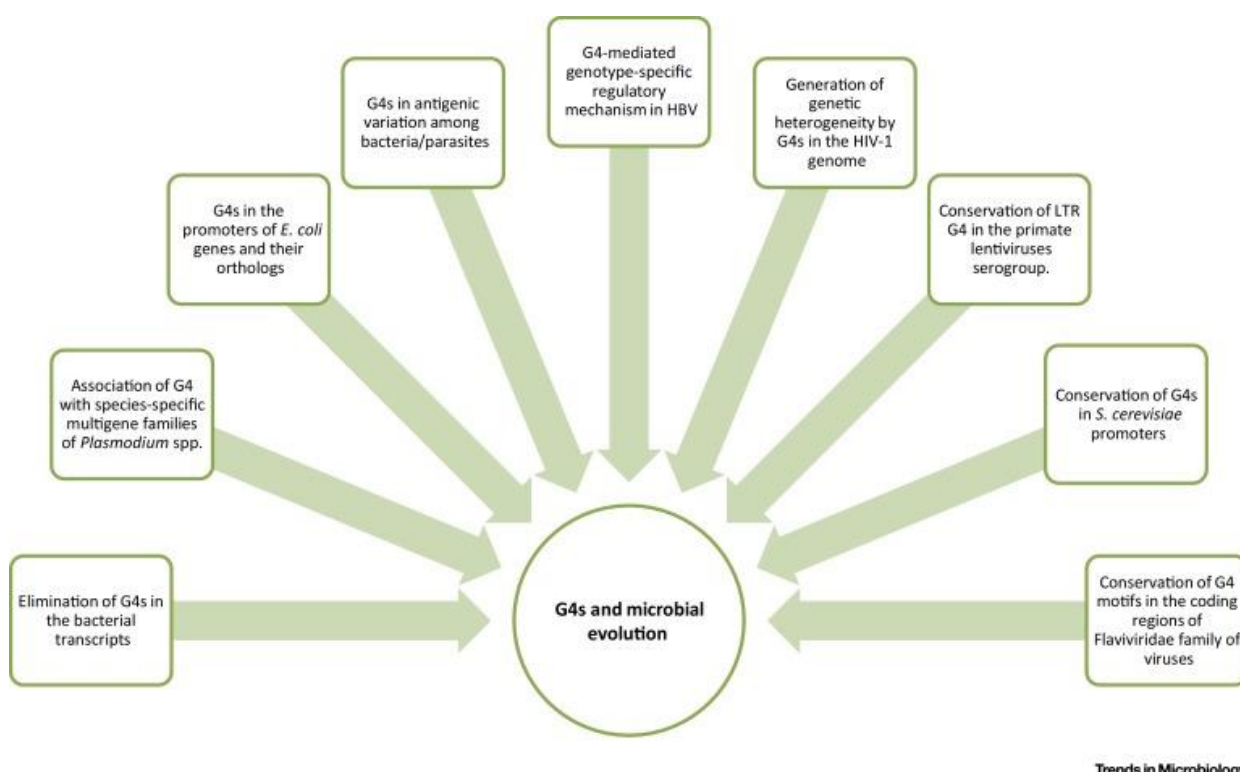


Figure 7 : Les différents rôles des G4s chez les micro-organismes. Qu'ils soient conservés ou non au fur et à mesure de l'évolution, ces structures sont impliquées dans leur évolution et introduisent de la variabilité au sein des espèces via différents mécanismes. Figure issue de Saranathan et Vivekanandan, 2019⁵⁶.

La **Figure 7** résume les différents rôles des G4s chez les micro-organismes. Dans la suite de cette partie nous n'aborderons que les pathogènes non viraux, les G4s viraux étant développés dans la partie II.

I. 2. ii. a. Fonctions des G4s chez les pathogènes

Les recherches des G4s dans le génome des pathogènes mettent en évidence que ceux-ci, lorsqu'ils existent, se concentrent au niveau des séquences régulatrices. Les séquences de G4s sont importantes chez les micro-organismes dans la régulation de l'expression des gènes lors de la transcription⁵⁸⁻⁶⁰. Leur stabilisation affecte la transcription⁶¹. Chez les bactéries, il a été mis en évidence *in vitro* que le contrôle de la terminaison de la transcription est potentiellement régulé par la formation d'un G4 hybride intermoléculaire entre de l'ADN et de l'ARN⁶². Chez d'autres bactéries encore, les G4s sont impliqués dans le métabolisme de l'azote de ces mêmes bactéries, et leur stabilisation par un ligand de G4s empêche l'expression des gènes nécessaires au bon développement de la bactérie en milieu azoté⁵⁶.

I. 2. ii. b. Les G4s et la variation antigénique.

Le phénomène de recombinaison sert un intérêt tout particulier chez certains microorganismes. Chez les bactéries par exemple, ou certains parasites, le recours à la recombinaison génique permet à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte en modifiant les séquences codant pour des protéines de surface⁵⁸ qui sont ciblées par le système immunitaire, leur permettant de générer une forme de résistance^{43,63}. Ce processus est appelé variation antigénique. Il existe des cas rapportés où ce phénomène implique la formation de séquences de G4s^{43,63}. On peut citer par exemple la bactérie responsable de la gonorrhée, *Neisseria gonorrhoeae*^{64,65} ou encore chez le parasite *Plasmodium falciparum*^{57,66,67}.

I. 3. Intérêt thérapeutique des G4s

I. 3. i. Dans le traitement des cancers

Les G4s sont des structures connues depuis des dizaines d'années et les premiers efforts dans la recherche les concernant se sont surtout centrés sur leur intérêt en tant que cible dans le traitement des cancers⁶⁸. En effet, cela a été abordé plus haut, les G4s sont impliqués dans le fonctionnement des télomères et de la télomérase mais sont également très représentés dans les promoteurs des proto-oncogènes. Ce sont les deux voies majeures de la recherche de nouvelles molécules ciblant les G4s. D'ailleurs, les nouveaux ligands sont très souvent évalués de par leur affinité pour un G4 donné mais également de par leur potentiel inhibiteur de la télomérase.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

I. 3. i. a. Ciblage des G4s télomériques

La télomérase est réactivée dans 90% des cancers⁶⁹ chez l'Homme. Elle est peu exprimée dans les cellules somatiques, qui se divisent très peu. Son activité augmentée dans les cellules entraîne une capacité de division cellulaire infinie du fait d'un rallongement des séquences télomériques. Cette transformation est nécessaire à l'apparition de traits cancéreux³⁴. Il a été prouvé que l'utilisation de ligands stabilisants les G4s entraîne une chute de l'activité télomérase *in vivo* et *in vitro* avec pour conséquence le raccourcissement des télomères qui entraîne la sénescence, puis la mort des cellules tumorales^{70,71}. Le principe de la recherche de ligands de G4 pour inhiber la télomérase et ainsi provoquer la mort des cellules cancéreuses est attractif dans la mesure où cette enzyme étant non exprimée dans les cellules normales on peut espérer une sélectivité d'action sur les cellules cancéreuses.

Beaucoup de ligands de G4s ont vu leur activité inhibitrice de la télomérase testée^{70,72-74}.

I. 3. i. b. Ciblage des G4s dans les promoteurs des proto-oncogènes

Les G4s sont connus pour exister au sein de nombreux promoteurs de proto-oncogènes^{38,75}. Les proto-oncogènes sont surexprimés dans les cellules tumorales et participent à favoriser leur croissance. Les G4s font partie des structures de régulation négatives pour ces gènes, ce qui signifie que leur formation régule de façon négative l'expression de ces gènes. Outre le proto-oncogène c-myc abordé plus haut comme étant le premier gène dont le promoteur contenait un G4 impliqué dans son expression^{37,76}, il existe d'autres proto-oncogènes comme c-kit, KRAS³⁹, VEGF⁷⁷, dont l'expression est placée sous le contrôle d'une séquence de G4 qui, lorsqu'elle est structurée ne permet pas la transcription de ces gènes. Stabiliser les structures de G4s correspondantes est un bon moyen de bloquer l'expression de ces gènes et ainsi bloquer les tumeurs cancéreuses dans leur expansion.

En conclusion sur cette partie, la recherche sur l'utilisation des G4s comme cibles thérapeutiques est prometteuse et ces recherches ne cessent de se multiplier. Bien qu'aucun ligand de G4 ne soit encore employé comme anticancéreux, certains composés ont toutefois été en évaluation à différentes phases cliniques sans succès jusqu'à présent⁷⁸. Les essais sur la quarfloxine ont été arrêtés à cause de problèmes de biodisponibilité.

Les chercheurs concentrent leurs efforts sur le design de ligands capables de se lier sélectivement à un G4 précis mais les mécanismes les impliquant dans le cas des cancers sont multiples, aussi avoir des ligands capables d'induire un effet sur plusieurs G4s impliqués dans la pathogénicité des tumeurs peut se relever un très bon point⁷⁹. De plus, la formation des G4s étant directement liés au fort taux de réplication des cellules tumorales (promoteurs très stimulés, télomérase sollicitée à chaque division) il est possible que l'emploi de ligands de G4s occasionne moins de toxicité sur les cellules saines.

I. 3. ii. Les G4s comme aptamères

Il s'agit ici d'utiliser un oligonucléotide structuré en G4 comme un ligand afin de cibler directement une protéine donnée. Ces aptamères sont généralement obtenus par la méthode SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by*

EXponential enrichment, Evolution Systématique de Ligands par Enrichissement Exponentiel en français). Il s'agit de générer de façon aléatoire une séquence avec des propriétés de liaison données et dont le début et la fin de la séquence sont connues. Ces séquences sont ensuite discriminées par leur capacité à se lier avec une affinité suffisante à une cible, ce qui permet l'accès à plusieurs séquences intéressantes.

Dans ce cas-ci la séquence en question est une séquence formant un G₄. Leur intérêt réside dans leur stabilité dans les conditions physiologiques, leur résistance à de nombreuses nucléases, leur potentiel aspect inoffensif en termes de réponse immunitaire. Ainsi, en se liant à une protéine choisie, on obtient un effet thérapeutique.⁸⁰

Un exemple d'aptamère à base de G₄ est un inhibiteur de la thrombine humaine utilisé comme anticoagulant par liaison à la protéine⁸¹. Ces aptamères peuvent également être utilisés de façon similaire à des anticorps lorsqu'il s'agit d'identifier une molécule particulière⁸².

Ainsi, certains aptamères à base de G₄ sont étudiés en vue d'en faire de nouvelles options thérapeutiques anticancéreuses⁷⁰ tandis qu'une séquence particulière appelée séquence de Hotoda a été identifiée comme inhibiteur du VIH par reconnaissance de ses glycoprotéines de surface⁸³. On peut citer AS1411 qui a été identifié comme aptamère de la nucléoline, une protéine surexprimée dans les cellules cancéreuses.⁸⁴

Les aptamères de G₄s constituent un domaine de recherche intéressant de par la pluralité de leur usage. Il est rapporté dans la littérature des aptamères employés comme anticoagulants, agents anticancéreux, antiviraux ou même détecteurs de molécules et on parle alors d'aptasensor^{63,85,86}.

I. 3. iii. Les G₄ comme transporteurs

Les G₄s suscitent un certain intérêt dans le développement de transporteurs de petites molécules actives. Il s'agit d'exploiter leur potentiel en tant qu'aptamères pour les détourner en *drug carriers*. Par leur capacité à pénétrer à l'intérieur des cellules en se liant à un récepteur membranaire, il s'avère très intéressant de développer des séquences de G₄s capables de séquestrer une petite molécule et de l'acheminer jusqu'à son site d'action, par exemple une tumeur cancéreuse. Leur grande stabilité thermodynamique et le fait qu'il s'agisse d'oligonucléotides non modifiés, donc faciles à métaboliser, fait de ces G₄s des transporteurs de choix.

Cette capacité est surtout étudiée dans le cas de la thérapie anticancéreuse⁸⁷ mais cette technique peut être amenée à se diversifier par la suite pour l'adapter à d'autres problématiques. Un exemple de G₄ transporteur est l'aptamère AS1411⁸⁴ employé pour l'adressage de l'acridine orange au sein de tumeurs du col de l'utérus dont les cellules surexpriment la nucléoline sur leur surface externe⁸⁸.

I. 3. iv. Les G₄s comme cibles d'antibiotiques ou agents antimicrobiens

Les G₄s ont été identifiés dans plusieurs processus biologiques importants chez certains pathogènes comme des bactéries ou des parasites. Certains de ces processus sont liés à la virulence de ces microorganismes et mieux les comprendre pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques en employant par exemple des ligands de G₄s.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

Dans la mesure où l'apparition de résistance concerne de plus en plus de pathogènes, une cible pharmacologique comme les G4s est à considérer car ces séquences ne sont pas sujettes à mutations et donc ne seront pas responsables de l'apparition de résistance. De plus, si l'on considère que le cycle de réplication du pathogène est plus actif que celui de l'hôte, il est possible qu'une sélectivité discriminant les G4s de l'hôte et du pathogène ne soit pas nécessaire.

Cependant il est à noter que la recherche se concentre surtout sur les G4s chez les virus en tant que nouvelles cibles thérapeutiques, davantage que chez d'autres organismes.

En conclusion sur cette partie, si les rôles des G4s sont nombreux dans le vivant, leur exploitation en tant qu'agents thérapeutiques est en pleine expansion bien que surreprésentée dans le cas de la recherche contre le cancer ou les virus par rapport aux antibiotiques. On leur trouve un intérêt en tant que cible directe dans le cas du ciblage des G4s *in vivo*, qu'il s'agisse de ceux de l'Homme ou d'un pathogène donné mais également en tant qu'agent actif comme dans le cas des aptamères de G4s ou des transporteurs.

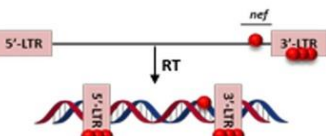
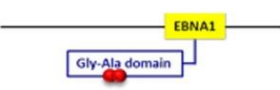
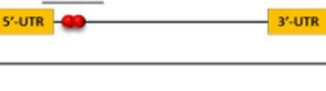
II. Rôles et intérêt thérapeutique des G4s chez les virus

Les virus sont un type particulier de pathogènes puisque ceux-ci n'ont pas de machinerie cellulaire propre. En effet, lors d'une infection virale, le pathogène pénètre les cellules de l'hôte et entame un processus de détournement de la machinerie cellulaire de l'hôte qu'il infecte. Ainsi, c'est la machinerie cellulaire de l'hôte qui est responsable de la transcription puis de la traduction des protéines virales qui viennent alors perturber le bon fonctionnement de la cellule jusqu'à entraîner sa mort.

Les virus peuvent être présents dans l'organisme de façon extracellulaire où ils évoluent dans l'organisme sous forme infectieuse (une capside virale renfermant le matériel génétique viral) ou intracellulaire. Dans la cellule, le virus peut être en réplication active ou au contraire en phase latente, comme par exemple le VIH qui est un rétrovirus, ce qui le rend difficile à éliminer par le système immunitaire.

Les virus sont des pathogènes difficiles à combattre sans tuer la cellule qui les abrite. Depuis la découverte du premier agent antiviral utilisé, l'idoxuridine, nous avons à notre disposition quelques inhibiteurs viraux utilisés dans le traitement d'infections virales⁸⁹ ainsi que des vaccins.

● = G4

Virus	Genome	G4s in Genome	G4s in mRNA G4s in G4 binding proteins	n° G4s	Compounds
 HIV-1 Ø 120 nm	(+)ssRNA 9.75 kb			12 ⁴⁶	B19 ^{46,55,62} TMPyP4 ^{48,62} PIPER ⁴⁸ c-exNDI ⁶¹
 HSV-1 Ø 125 nm	dsDNA 152 kb			316 ^{68,69}	B19 ⁶⁹ c-exNDI ⁸²
 EBV Ø 120-180 nm	dsDNA 172 kb			13 ⁶⁸	B19 ⁷¹ PDS ⁷⁵ PhenDC3 ⁷³
 KSHV Ø 125 nm	dsDNA 170 kb			52 ^{68,77}	PhenDC3 ⁷⁷
 HHV-6 Ø 200 nm	dsDNA 162 kb			43 ⁶⁸	B19 ⁸¹
 HCV Ø 60 nm	(+)ssRNA 9.6 kb			2 ⁸⁹	TMPyP4 ⁸⁹ PDP ⁸⁹
 HPV Ø 60 nm	circular dsDNA 8 kb			8 ⁸⁴	

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

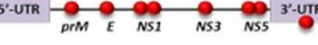
 ZIKV Ø 50 nm	(+)ssRNA 11 kb			8 ⁹⁰	
 SARS Co-V Ø 125 nm	(+)ssRNA 30 kb				
 HBV Ø 42 nm	partially circular dsDNA 3.2 kb			1 ⁸⁵	B19 ⁸⁵ PDS ⁸⁵
 EBOV cylindric Ø 80 nm	(-)ssRNA 18.9 kb			1 ⁹¹	TMPyP4 ⁹¹

Figure 8 : Liste des virus contenant des G4s connus jusqu'à présent. Sont indiqués les types de virus, les localisations des G4s, la présence de protéine de liaison connue et les ligands ayant été testés sur ces G4s. Figure de Ruggiero *et al.*, 2018⁹⁶.

Certaines maladies d'origine virale n'ont toujours pas de traitements définitifs. C'est notamment le cas des maladies provoquées par la famille des virus herpétiques, du virus Ebola ou encore du virus du VIH.

Il y a peu de recherches sur les G4s dans le cadre du développement de nouveaux composés ciblant les microorganismes comme les bactéries où les parasites parce que la recherche peut se focaliser sur d'autres cibles biochimiques propre au pathogène très différentes de celle de l'hôte. Cela n'est pas possible lorsqu'il s'agit de rechercher de nouveaux antiviraux dans la mesure où le virus ne présente que très peu de cibles potentielles. Les options disponibles sont les quelques protéines virales ou le ciblage de l'acide nucléique viral. Les G4s viraux constituent ainsi une nouvelle cible prometteuse dans le cadre de la recherche d'antiviraux.

Des études bio-informatiques ont permis de mettre en lumière la présence de structures potentielles de G4s chez ces nombreux types de virus, indépendamment du fait qu'il s'agisse de virus à ADN ou à ARN. Ces séquences sont également hautement conservées malgré le fort taux de mutations existant chez ces pathogènes et ne sont pas disposées au hasard. Cela indique un rôle majeur de ces dernières^{90,91}.

L'inventaire actuel montre que des structures de G4s sont impliquées chez SARS-COV⁹², chez HIV-1, chez le virus Epstein-Barr (EBV)⁹³ et les autres virus herpétiques humains⁹⁴, ainsi que les virus des hépatites B et C⁹⁵. La **Figure 8** recense les G4s viraux connus⁹⁶.

II. 1. Rôles des G4s chez les virus

II. 1. i. Cycle viral

Les G4s des virus sont impliqués dans la réplication, la recombinaison, l'encapsidation, la régulation de la virulence de ces pathogènes^{43,63,96-98}.

Le virus du VIH-1 fait partie des virus les plus étudiés. Quelques fonctions de G4s chez le VIH-1 sont répertoriées ci-après : (i) trois G4s d'ADN (qui s'excluent mutuellement) dans la région U₃ du promoteur LTR de VIH-1⁹⁹⁻¹⁰². Cette région fixe les facteurs de transcription comme Sp1 et NF-κB. La région où sont localisés ces G4s est sous le contrôle de deux protéines de l'hôte : la nucléoline, qui stabilise les G4s, et la ribonucléoprotéine hnRNP, une hélicase qui déplie les G4s. On trouve donc des G4s dans une région qui régule la transcription et donc la réplication du virus (ii) trois G4s dans la région U₃ de l'ARN viral. Un rôle dans la dimérisation des ARNs lors de l'encapsidation est évoqué et un rôle dans la recombinaison au niveau de la région U₃ est proposé (iii) un G4 dans le gène *gag* qui serait impliqué dans la dimérisation des deux brins d'ARN dans la capsid du nouveau virion et stimulerait la recombinaison (iv) des G4 dans la région centrale du génome de VIH-1 (dans le gène *pol*) près de la région cPPT (central polypurine tract) jouent un rôle dans la formation du « DNA flap » impliqué dans le transport de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte¹⁰³ (v) trois G4 dans le gène *nef*¹⁰⁴ essentiel pour la réplication et la virulence du virus.

Le génome du virus Herpes simplex HSV-1 montre plusieurs clusters de séquences répétées qui forment des G4 très stables et qui sont impliquées dans la réplication¹⁰⁵. Cependant, tous les rôles de ces clusters ne sont pas encore clairement identifiés.

La régulation associée aux G4s est souvent une régulation négative, c'est-à-dire que la structuration du G4 affecte négativement le cycle viral. Cela peut être mis en place par le virus lui-même lors du phénomène appelée latence virale.

II. 1. ii. Les G4s et le phénomène de latence

Dans le cas des herpès virus, le cas des G4s est particulièrement intéressant dans la mesure où près de 90% de la population humaine est infectée par ces virus¹⁰⁶ et pourtant reste asymptomatique. La capacité à passer inaperçu dans l'organisme caractérise la latence de ces virus, qui ne se révèlent qu'à certains moments et peuvent être responsables de cancers associés, comme par exemple le sarcome de Kaposi provoqué par le virus (KSHV ou HHV-8). Divers rôles sont évoqués pour des G4s impliqués dans la latence des virus.

La régulation négative de la production de protéines virales repose sur des protéines virales qui répriment leur propre synthèse et sont appelées des « genome maintenance proteins ». Pour cela, les virus utiliseraient des G4s ARN comme éléments de régulation en cis. La faible quantité de ces protéines empêche la détection du virus par le système immunitaire, participant à son évasion immunitaire.

On peut citer l'exemple des virus KSHV et EBV, deux membres de la famille des virus herpétiques humains. Chez KSHV,

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

la présence d'une séquence de G₄ dans l'ARNm de sa protéine régulatrice LANA (latence associated nuclear antigen) inhibe sa traduction¹⁰⁷. Dans le cas d'EBV, la protéine EBNA1 (EBV encoded nuclear antigen) lie des ARNs G₄. Son ARNm présente des G₄s qui régulent sa traduction⁹³ et entraîne une diminution de la présentation des antigènes à la surface des cellules¹⁰⁸. La capacité d'EBNA1 à lier des ARNs G₄ participe aussi à sa capacité à recruter des facteurs cellulaires en relation avec l'établissement d'une origine de réplication¹⁰⁹.

Le virus herpétique HHV-6A/B intègre son génome dans les télomères des cellules hôtes. Cette intégration serait possible grâce à une recombinaison homologue entre les extrémités du génome viral composées de séquences mimant la séquence télomérique et les télomères¹¹⁰.

Chez les virus herpétiques, une analyse bioinformatique des séquences susceptibles de former des G₄s montre en outre comment une coévolution des virus avec leurs hôtes permettent aux G₄s viraux de s'adapter au recrutement de facteurs de transcription ou de sélectionner des séquences mimant les séquences télomériques¹¹¹.

II. 2. Intérêt thérapeutique des G₄s

Les G₄s sont donc des structures associées à une régulation souvent négative du cycle viral chez les virus infectant l'Homme. Stabiliser les G₄s chez les virus amène souvent à une diminution de la réplication⁹⁶ ou une altération du mécanisme de l'évasion immunitaire, révélant le virus à l'hôte et déclenchant une réponse immunitaire¹⁰⁷. Il s'agit donc de très bonnes cibles thérapeutiques pour la lutte contre les infections virales. De plus, ces séquences revêtent une importance majeure pour les organismes viraux et ne sont donc pas sujettes à des mutations, ce qui en fait des cibles d'autant plus intéressantes que les cibler ne déclencherait a priori pas de phénomène de résistance. C'est par exemple pour éviter un phénomène de résistance du VIH-1 que les traitements sont constitués de différents inhibiteurs viraux administrés en même temps.

Il est de plus mis en lumière par Abiri *et al.*, que cibler les G₄s viraux de façon non spécifique peut contribuer au traitement⁹⁸. En effet, on peut craindre l'utilisation de ligands de G₄s chez l'Homme alors qu'il existe également des G₄s humains impliqués dans de nombreux mécanismes. Certains de ces mécanismes cependant sont directement impliqués dans la réponse immunitaire antivirale⁹⁸. Dans le cas des oncovirus de la famille des virus herpétiques, il est établi par exemple que les proto-oncogènes chez l'Homme, lorsqu'ils sont exprimés, participent également de façon générale à l'inhibition de la réponse immunitaire, favorisant ainsi l'infection virale. Ainsi, des ligands de G₄s pourraient à la fois participer à la régulation négative de la réplication de ces virus mais également empêcher l'expression d'oncogènes favorisant la baisse de la réponse immunitaire.

Dans le cas de KSHV les ligands de G₄s sont capables de réduire le nombre de copies de génome viral dans les cellules infectées⁹⁴. Dans le cas des virus herpétiques HHV-6 A/B, il a été démontré qu'un ligand de G₄s (BRACO-19) était capable d'empêcher l'insertion du génome viral dans celui de l'hôte¹¹⁰. En effet, la séquence virale porte à ses extrémités des séquences pouvant former des G₄s, ce qui participerait à leur intégration au niveau des télomères humains.

En résumé, il reste beaucoup de recherches nécessaires à une bonne utilisation des G4s comme cibles thérapeutiques, même si elles s'avèrent prometteuses. La majorité de la recherche sur les G4s viraux provient de l'étude du virus du VIH-1, et tous les constats faits ne sont pas applicables à tous les virus.

Afin de bien utiliser ces structures comme cible, il est nécessaire de bien identifier leur existence *in vivo* au sein d'un virus donné puis d'établir si son rôle est important pour la virulence et le maintien du cycle viral. Enfin, même s'il est vrai que dans une cellule dont la réplication est peu active, il peut être intéressant de chercher de nouveaux moyens de cibler sélectivement des G4s pathogènes afin d'éviter des interactions non désirées au sein d'une cellule où les sites de fixation pour un ligand potentiel restent nombreux.

III. Ligands de structures G quadruplex

Les G4s sont une famille de structures qui regroupent un certain nombre de topologies différentes. La partie invariable de ces G4s est la tétrade de guanine qui est à la base de l'assemblage en G4. La très large majorité des ligands des G4s qui existent établissent une interaction avec une tétrade de guanine. Si d'autres interactions sont possibles, notamment avec les sillons des G4s^{112,113}, comme dans le cas de la distamycin A ou le TOxapy, le ciblage d'une tétrade de guanines reste le principal mode de reconnaissance rencontré.

Un bon ligand de G4s est caractérisé par une surface aromatique large pour interagir par π -stacking avec les quatre surfaces aromatiques d'une tétrade de guanines, mais aussi une (des) charge(s) positive(s) afin de contracter des interactions électrostatiques avec les groupements phosphates. De plus l'incorporation de charges au sein de la molécule présente un avantage en termes de solubilité en milieu aqueux.

Il est également important de s'assurer de la sélectivité des ligands vis-à-vis des G4 pour éviter des effets non spécifiques. Cette sélectivité peut être obtenue par (i) une surface aromatique plus large que celle requise pour un intercalant de l'ADN (ii) l'ajout des substituants encombrants et/ou flexibles sur la plateforme aromatique pour empêcher l'intercalation entre les plateaux de paires de bases de l'ADN double brin (iii) ou la conception de ligands possédant plusieurs parties aromatiques mobiles qui ne deviennent coplanaires que lorsqu'un π -stacking sur une tétrade de guanines s'opère. Dans ce cas, aucune des parties aromatiques ne constitue à elle seule un bon intercalant de l'ADN.

De très nombreux ligands de G4s ont été décrits dans la littérature^{70,114–116}. Nous avons sélectionné dans cette partie les ligands de G4 ayant été étudiés en rapport avec des G4s viraux. Ils interagissent tous par π -stacking sur une tétrade externe du quadruplex.

III. 1. BRACO-19

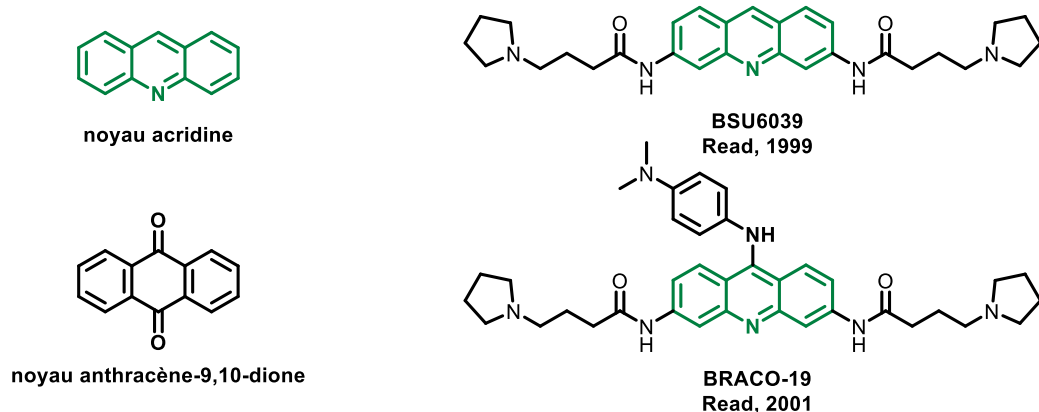


Schéma 1 : Structures de BSU6039, un dérivé d'acridine disubstitué et de BRACO-19, le dérivé trisubstitué

Le groupe de Neidle a mis point il y a près de vingt ans un ligand extrêmement sélectif des G₄s qui est aujourd'hui encore un composé de référence dans l'étude de ces structures, il s'agit de BRACO-19 dont l'interaction avec un G₄ télomérique est montré sur la **Figure 9**. Il s'agit une structure cristalline du G₄ qui a été co-cristallisée avec son ligand. Les deux premières familles de composés à avoir été évaluées sont d'une part des dérivés d'anthracène-9,10-dione¹¹⁷ et d'autre part des dérivés d'acridine à laquelle appartient BRACO-19.

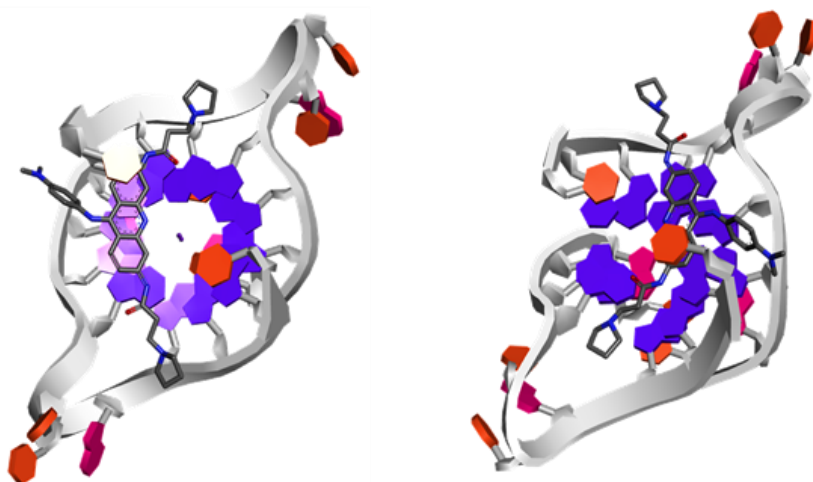


Figure 9 : Interaction de BRACO-19 avec un G₄ télomérique bimoléculaire (PDB :3CE5)

Les résultats théoriques (utilisant la méthode LIE (*Linear Interaction Energy*) pour le calcul de l'énergie d'interaction) et expérimentaux (mesure des constantes d'affinité) donnent la faveur aux composés dérivés de l'acridine¹¹⁸. Un premier composé se démarque, il s'agit de la 3,6-bis(3-pyrrolidinopropionamido)acridine (BSU6039 sur le **Schéma 1**) dont la constante d'affinité pour les G₄s télomériques est de l'ordre de 10^5 M^{-1} . Par la suite, une troisième chaîne a été incorporée sur le noyau acridine conduisant ainsi au composé BRACO-19. L'ajout de la chaîne permet de gagner deux ordres de grandeur en terme d'affinité pour les G₄s⁷² et le composé est 100 fois plus affiné pour les G₄s que pour l'ADN duplex. Ce composé interagit avec les guanines par des interactions de π -stacking via son noyau acridine mais est

également capable d'interagir avec les sillons du G₄ par ses chaînes latérales¹¹⁹. Cette découverte a fait l'objet d'un brevet¹²⁰. Il a été le premier ligand de G₄ à démontrer une activité antitumorale^{121,122}.

Le composé BRACO-19 a conduit par ailleurs à une chute du taux de réplication *in vitro* du virus Epstein-Barr¹⁰⁹, d'autres virus de la famille des herpès¹⁰⁵ ainsi que du virus VIH-1. BRACO-19 est capable d'inhiber la réplication virale chez le VIH-1 avec un IC₅₀ de l'ordre de 10⁻⁶ M.¹²³.

BRACO-19 entraîne *in vitro* une chute de l'activité du promoteur LTR de la transcription de VIH-1. Cette inhibition est due à une stabilisation d'un G₄ dans la séquence du LTR.⁹⁹

III. 2. Les dérivés du pérylène et du naphthalène

Si beaucoup de ligands de G₄s interagissent avec la tétrade extérieure du G₄ structuré, les dérivés du pérylène sont les premiers ligands à avoir été identifiés comme capable d'induire la formation d'un G₄¹²⁴. Ils ont été caractérisés pour la première fois comme inhibiteurs de la télomérase par stabilisation de G₄s télomériques¹²⁵.

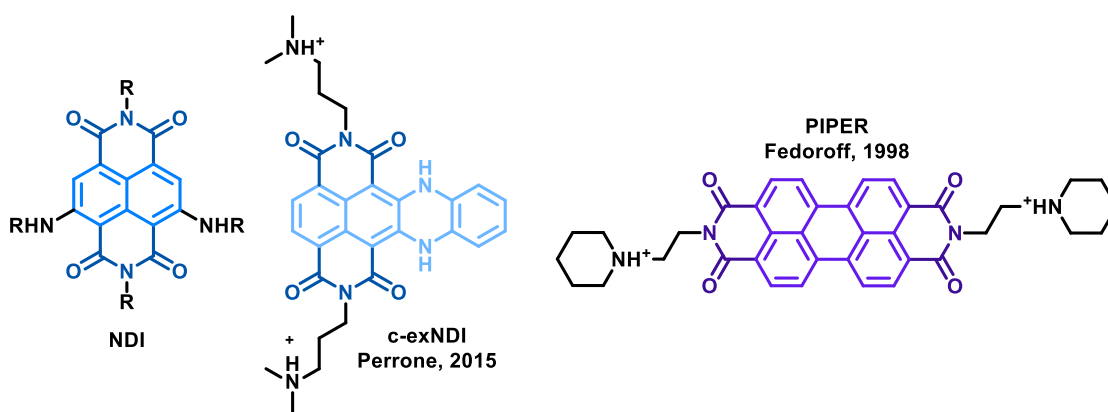


Schéma 2 : Structures de dérivés de **naphthalène diimide** (à gauche) et de **pérylène** (à droite).

L'étude de ces composés en tant que ligands potentiels a mis en avant des critères importants pour l'élaboration de ligands pérylènes diimides efficaces. Premièrement, la distance entre le cœur aromatique et les chaînes latérales protonées est importante, car d'elle dépend la forte liaison avec des G₄s et également la solubilité de la molécule, les cœurs pérylène ayant une faible solubilité en milieu aqueux. De plus, synthétiser des composés chargés est nécessaire pour limiter l'auto agrégation des molécules^{126,127}. La synthèse d'analogues solubles et non chargés prouve que les charges induites par les chaînes latérales sont importantes¹²⁸.

L'étude de ces composés s'est poursuivie par des études visant à déterminer l'importance de la taille du cœur aromatique sur l'affinité pour les G₄s¹²⁷. Il a été démontré qu'à partir de quatre cycles aromatiques on observe une inhibition de la télomérase avec une IC₅₀ de l'ordre du micromolaire et on commence alors à s'intéresser à des polycycles de taille plus modeste comme par exemple des dérivés du naphthalène (**Schéma 2**)

Les composés naphthalènes diimides (NDI) sont connus pour interagir avec l'ADN duplex, leur conférant des propriétés anticancéreuses mais également une grande toxicité¹²⁹.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

Le groupe de Neidle s'intéresse à ces composés NDI et leur ajoute des chaînes latérales afin de les rendre plus sélectifs des Gs₄^{130,131}. Ils élaborent des molécules portant jusqu'à quatre chaînes latérales aminées contre seulement deux pour les pérylènes^{73,132}. Par la suite, sont élaborés par le groupe de Richter des dérivés dits *core extended naphthalene diimide* à visée antivirale. Cette fois-ci l'effort n'est plus concentré sur les chaînes latérales mais sur le cycle naphthalène qui est étendu¹³³. Ces travaux ont conduit à la découverte d'un composé très intéressant dont le cœur NDI a été fusionné avec un noyau dihydrobenzophenazine, (**Schéma 2**) qui a été évalué sur les séquences de G₄s présentes dans la région LTR du virus VIH-1. Le composé présenté sous l'appellation c-exNDI dans le **Schéma 2** a démontré une remarquable activité anti-VIH (IC₅₀ = 13,2 nM) et antiherpétique¹³⁴ (IC₅₀ = 18,4 nM).

III. 3. Les dérivés bisquinolinium

III. 3. i. La pyridostatine

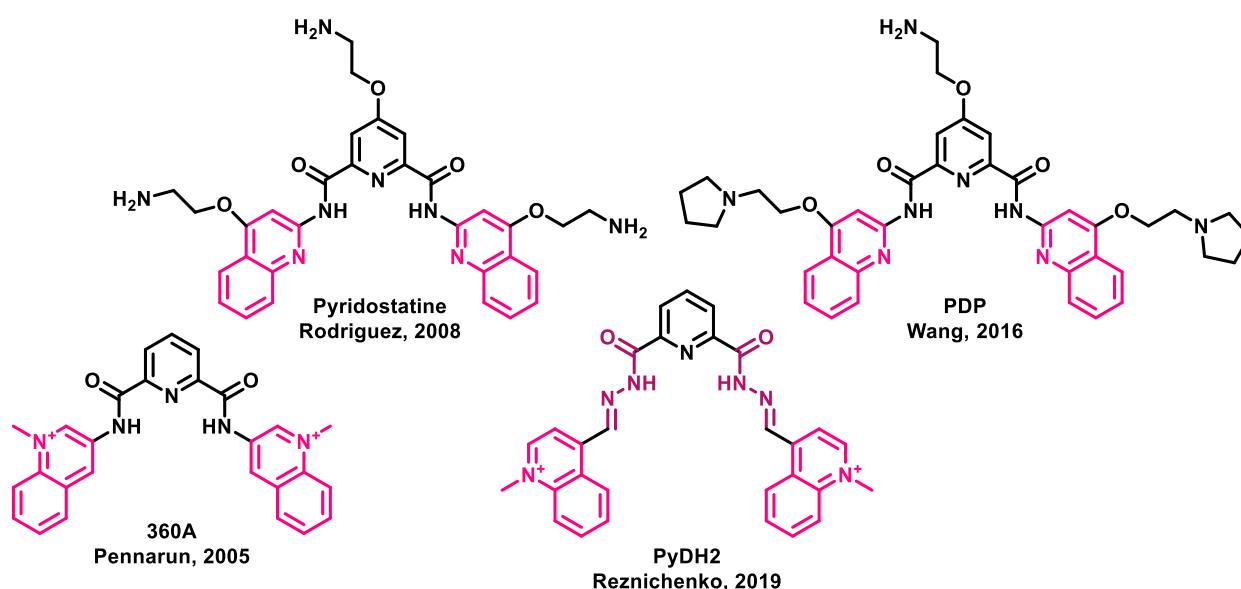


Schéma 3 : Structures de dérivés bisquinoline à base pyridine.

Les premiers composés dérivés de noyau bisquinoline étudiés le sont par le groupe de Riou dans les années 2000. Il s'agit d'abord de molécules portant un cœur triazine¹³⁵ et deux bras bisquinoline avant d'évoluer vers un cœur pyridine dicarboxamide^{136,137} (**Schéma 3**) dont le meilleur ligand de G₄ est le composé **360A**¹³⁷. S'ils ont d'abord été testés comme inhibiteurs de la télomérase, il est apparu par la suite que ces composés étaient également capables de cibler le G₄ qui se formait dans la région promotrice de c-myc avec une bonne sélectivité des structures de G₄s¹³⁶. Ces travaux mettent en évidence un composé efficace quant à son activité anticancéreuse qui servira de base à la synthèse du composé pyridostatine (PDS) quelques années plus tard par l'ajout de trois chaînes protonables *in situ* dont une sur le cœur pyridine¹³⁸. La PDS et ses dérivés s'avèrent être de très bons ligands de G₄s, capable de très bien discriminer entre les G₄s et l'ADN double brin⁷⁴ avec une IC₅₀ envers les cellules cancéreuses de l'ordre du micromolaire.

La pyridostatine a démontré une activité antivirale contre des virus d'Epstein-Barr et de l'hépatite B^{93,97}.

Un dérivé de la PDS, la PDP, a ensuite été synthétisé par le groupe de Balasubramanian également, pour réaliser des expériences de *pool down* sur des G4s télomériques en fonctionnalisant l'amine primaire libre avec un dérivé biotinylé¹³⁹. Ce composé sans la biotine a démontré une activité antivirale contre le virus de l'hépatite C en se liant à un G4 présent dans la séquence du gène codant pour la protéine de la capsid du virus⁹⁵. Quant au ligand PyDH2, il s'agit d'un dérivé du composé 360A, à la différence que le lien entre le cycle pyridine et les quinolines est un lien acylhydrazone¹⁴⁰, employé ici pour ses propriétés pharmacologiques¹⁴¹. Ce composé a été élaboré par Reznichenko *et al*, dans le but de lutter contre le phénomène de latence au sein du virus d'Epstein-Barr qui, comme de nombreux virus de la famille des herpès humains pratique l'évasion immunitaire.

III. 3. ii. Les phenanthrolines

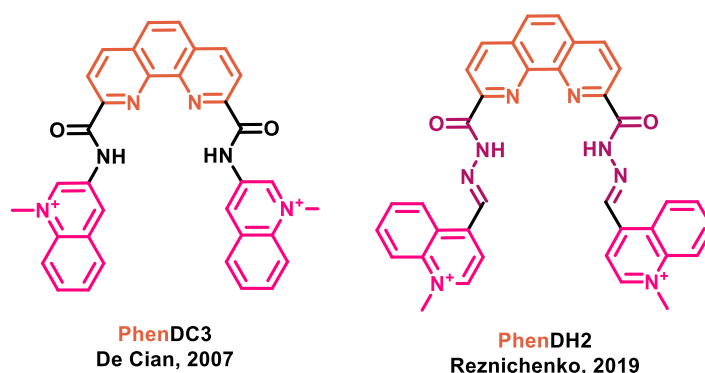


Schéma 4 : Structures de dérivés bisquinolinium à base phénanthroline.

En s'inspirant des composés à base de pyridine dicarboxamide, des molécules analogues avec un cœur aromatique étendu ont été préparées. Il s'agit d'une part d'insérer une charge positive fixe sur les quinolines à la place de chaînes protonables et d'autre part de relier les unités bisquinolinium par un noyau phénanthroline, conférant au ligand une forme en U tout à fait adaptée au recouvrement des tétrades des G4s^{142,143} (**Figure 10**).

Ce ligand a été évalué en FRET melting assay en utilisant l'oligomère fonctionnalisé F21T et démontre une température de stabilisation d'environ 30 °C à une concentration de 3 μM. Comme tous les ligands présentés dans cette partie, l'objectif initial était de cibler les G4s télomériques. En effet, ce ligand a montré une grande sélectivité à l'encontre de l'ADN duplex par rapport à son analogue 307A ne comportant qu'un noyau pyridine.

PhenDC3 a été employé dans une étude visant à déterminer l'importance des structures de G4s dans le cycle de latence du virus de l'herpès HHV-8⁹⁴. En effet, comme de nombreux virus de la famille des herpès humains, celui-ci se retrouve à l'état latent chez son hôte et est impossible à détruire dans la mesure où il pratique l'évasion immunitaire.

Ce phénomène d'évasion immunitaire chez les virus de la famille des herpès humains a été associé à la présence de G4s qui participent à la réduction de l'expression des gènes à un niveau suffisant pour que le système immunitaire compétent ne soit pas en mesure de détecter la présence du virus^{107,140}.

Le ligand PhenDH2 a été synthétisé lors de la même étude que PyDH2¹⁴⁰ dans le cadre de la lutte contre l'évasion

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

immunitaire du virus d'Epstein-Barr qui, comme le virus HHV-8, possède des séquences de G₄s dont l'interaction avec un ligand exogène empêche la régulation de l'expression de sa protéine génératrice d'antigène. De ce fait, le taux de cette protéine n'étant plus régulée, le virus revient visible aux yeux du système immunitaire.

En conclusion de cette partie, s'il existe de nombreux ligands connus à ce jour dans la littérature comme étant capables de se lier à des structures de G₄, peu d'entre eux ont été testés dans le cas d'une infection virale alors que les G₄s sont identifiés comme des structures secondaires d'acides nucléiques aux rôles multiples et prépondérant dans la virulence de nombreux pathogènes, allant de la simple régulation du cycle viral à des processus bien plus complexes comme l'évasion immunitaire. Il s'agit d'une cible d'autant plus intéressante que les séquences les contenant sont hautement conservées au sein des espèces virales qui sont pourtant connues pour avoir un taux de mutations très élevés du fait de leur réplication extrêmement rapide.

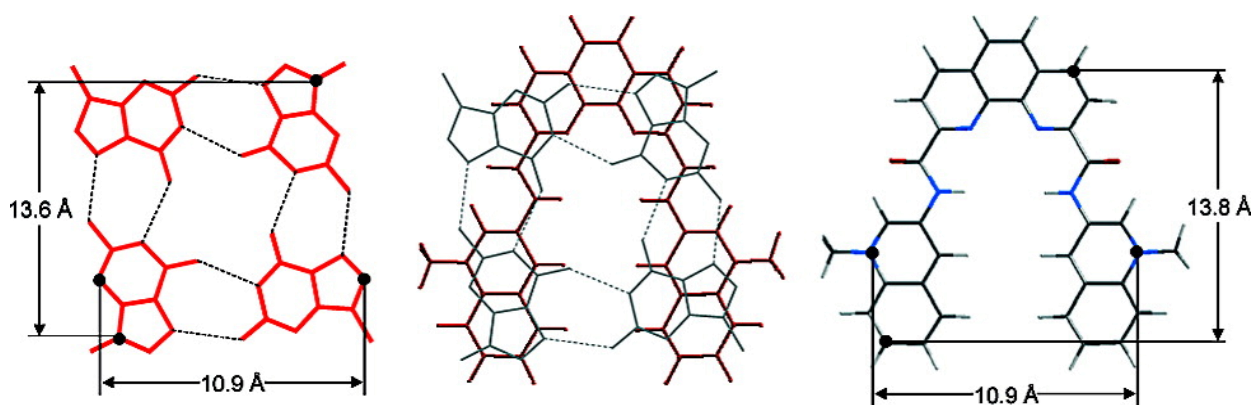


Figure 10 Recouvrement du ligand PhenDC₃ optimal sur une tétrade de G₄. (Figure de De Cian *et al.* 2007¹⁴²)

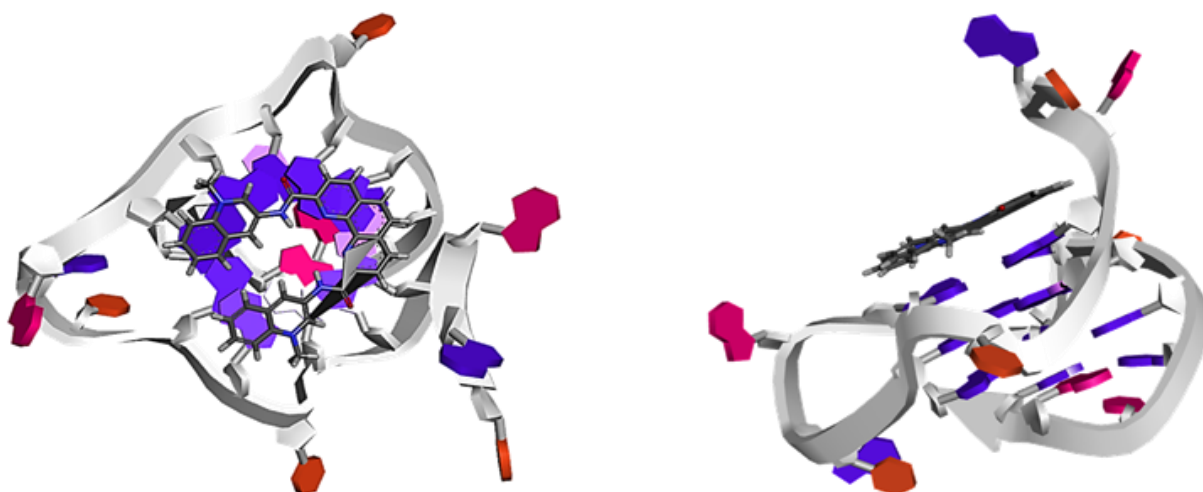


Figure 11 : Interaction de PhenDC₃ avec le quadruplex parallèle Pu2₄T de Chung *et al.*¹⁴³ (PDB : 2MGN). Les G sont en violet, les adénines en rose et les thymine en orange.

IV. Méthodes pour l'étude des interactions ligand /G₄

Les méthodes d'évaluation des ligands de G₄s permettent de caractériser soit directement soit indirectement la liaison du ligand (constante d'affinité K_A/K_D ou affinités relatives d'un ligand par rapport à un autre) et le mode de reconnaissance (stœchiométrie de l'interaction, mode d'interaction) sur une structure de G₄. Ces méthodes doivent également permettre d'évaluer la sélectivité des ligands vis-à-vis des structures G₄s par rapport à l'ADN duplex.

Plusieurs de ces méthodes sont souvent employées car elles apportent des informations complémentaires. Ces méthodes peuvent être classées en plusieurs catégories, les méthodes structurales (la RMN et la diffraction aux rayons X), les méthodes indirectes (le dichroïsme circulaire, le FRET, la FID), les méthodes quantitatives (la Résonance Plasmonique de Surface (SPR), la Titration Calométrique Isotherme (ITC) et la spectrométrie de masse) et les méthodes enzymatiques (Telomerase Repeat Amplification Protocol (TRAP)).

IV. 1. Méthodes structurales

IV. 1. i. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La spectroscopie RMN est très utilisée afin d'obtenir des informations structurales sur des macromolécules du vivant comme des protéines ou des chaînes d'acides nucléiques. Cela permet d'obtenir une résolution atomique de ces macromolécules et donc une structure en solution. Cette méthode a permis la résolution d'un certain nombre de structures de G₄s^{143,144}. Elle peut également être employée afin d'observer des changements dynamiques au sein d'une même structure ou d'étudier les interactions entre ces macromolécules et des ligands.

Dans le cas de l'étude des G₄s, la RMN permet de caractériser de façon très précise leur interaction avec des ligands. La RMN est une méthode extrêmement précise qui permet l'accès aux structures naturelles des G₄s en solution et permet de caractériser au niveau atomique les interactions avec leurs ligands. Cependant il s'agit d'une méthode qui requiert une certaine quantité de produit et une grande expertise pour l'analyse des données.

IV. 1. ii. La diffraction aux rayons X (RX)

La diffraction aux rayons X donne l'accès aux structures de G₄s et de complexes ligand/G₄ après l'obtention d'un monocristal. Cela nécessite une certaine quantité de produit. De plus les conditions de cristallisation ne reflètent pas forcément la réalité biologique, le G₄ peut donc avoir une conformation différente de celle qui existe en solution.

IV. 2. Méthodes indirectes

IV. 2. i. Le Dichroïsme Circulaire (CD)

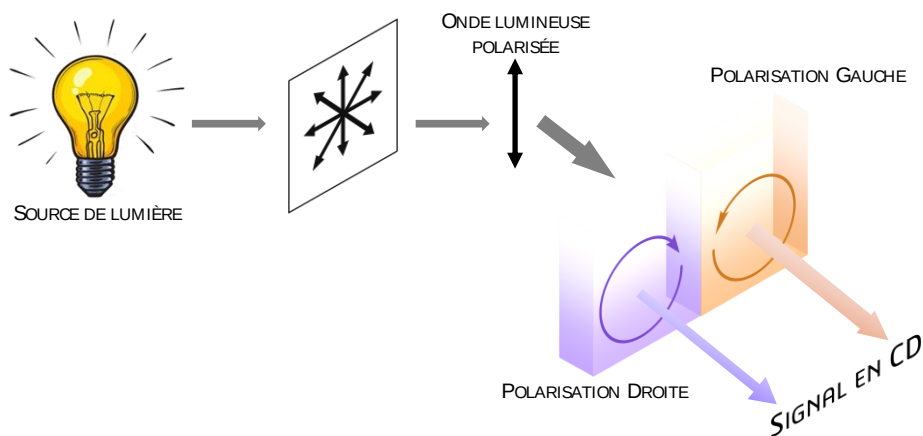


Figure 12 : Représentation du dichroïsme circulaire. Une lumière polarisée est envoyée sur un échantillon dont les polarisations gauche et droite ne sont pas absorbées de la même façon.

Le dichroïsme circulaire est une méthode optique non destructive qui repose sur le principe suivant : une molécule ou une structure chirale possède un dichroïsme circulaire lorsque la lumière est absorbée différemment selon sa polarisation. On parle de polarisation droite et de polarisation gauche. Si la molécule absorbe préférentiellement l'une des deux lumières polarisées, alors elle a un dichroïsme circulaire. On présente alors la différence entre les deux absorbances à une longueur d'onde donnée comme spectre de CD (**Figure 12**).

Cette méthode est bien adaptée à l'étude des molécules du vivant, puisque le monde vivant est chiral, et permet également l'étude des changements structuraux d'un assemblage donné en temps réel. Dans le cas des acides nucléiques, le signal en CD provient de l'asymétrie du squelette osidique ainsi que de la structure hélicoïdale de la chaîne d'acides nucléiques¹⁴⁵. Le CD mesuré via l'absorbance en UV des bases nucléiques renseigne sur leurs positions mutuelles. Cette méthode permet, lors de l'étude des G4s, de discriminer entre différentes topologies puisque chacune a sa propre signature en CD. De ce fait, il est possible de suivre un changement de conformation milieu-dépendant ou induit par le ligand^{73,146–148}.

Ainsi des G4 de topologies différentes auront des spectres distinguables en CD. Un G4 parallèle aura une bande positive à 260 nm et une bande négative à 240 nm. Un G4 anti parallèle aura deux bandes positives à 295 et 240 nm ainsi qu'une bande négative à 260 nm. Enfin, un G4 hybride aura une bande positive avec un épaulement à 290 et 270 nm et une bande négative à 240 nm¹⁴⁷. Si plusieurs conformations existent dans le milieu, le spectre sera la résultante moyenne de toutes les conformations.

Le CD est une technique classique dans la caractérisation des structures de G4s et de leurs interactions avec un ligand donné. Elle est facile à mettre en place, requiert peu de matériel et peut être utilisée pour suivre des changements de conformation en temps réel.

IV. 2. ii. Förster Energy Transfert (FRET)

Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) repose sur un principe de transfert d'énergie sans émission de lumière entre deux dipôles. Ces deux dipôles, dont l'un est défini comme le donneur et l'autre l'accepteur, sont dans ce cas deux fluorophores dont les zones d'absorption et d'émission respectives se chevauchent (**Figure 13**). En effet, un premier fluorophore est excité à une longueur d'onde précise. Il y aura dans un deuxième temps émission d'un photon à une longueur d'onde compatible avec la zone d'absorption du second fluorophore. Ce dernier est excité à son tour et émettra un photon. Le phénomène de FRET est mis en évidence à l'aide d'un fluorimètre qui mesure l'apparition ou la disparition du signal lumineux.

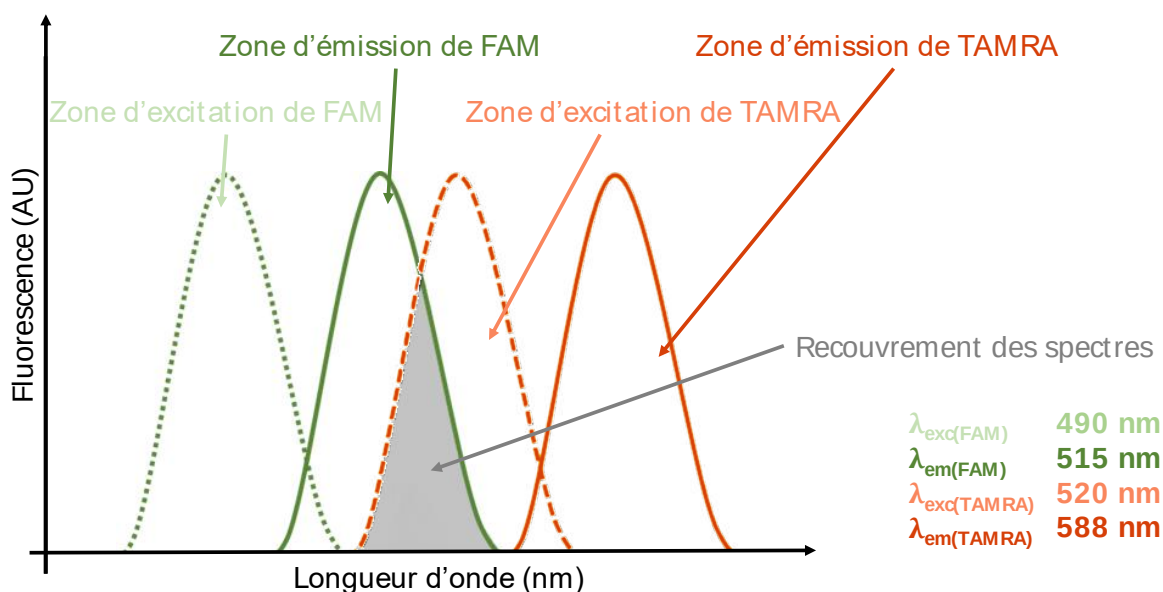


Figure 13 : Représentation schématique des prérequis pour l'obtention d'un signal en FRET. Les zones d'excitation des fluorophores sont représentées en pointillés tandis que les zones d'émission sont représentées par des traits pleins. La zone grisée est la zone de chevauchement entre les zones d'émission et d'absorption des deux partenaires.

Pour que le transfert d'énergie soit possible, les deux composés doivent se trouver dans un intervalle de distance n'excédant pas le rayon de Förster qui caractérise la distance à laquelle le transfert énergétique est à 50% efficace. Plus les fluorophores s'éloignent l'un de l'autre, plus la probabilité d'un transfert énergétique non radiatif entre les deux parties diminue. Suivant ce principe, les expériences de FRET sont très utiles pour déterminer les interactions dynamiques entre deux espèces, notamment en milieu biologique. Cette technique présente de nombreux avantages dont en particulier une certaine facilité à mettre en œuvre et une grande sensibilité.

Cette méthode a été adaptée à la caractérisation des interactions entre les G4s et les ligands évalués dans les années 2000 par Jean-Louis Mergny et Jean-Claude Maurizot¹⁴⁹. Pour cela, il y a recours à un oligonucléotide comportant une séquence télomérique capable de se structurer en G4 en solution qui est fonctionnalisée de part et d'autre avec un couple de fluorophores. Cet oligonucléotide est F21T et le couple de fluorophore employé est le couple FAM/TAMRA (6-carboxyfluorescéine/ carboxytétraméthylrhodamine). Le rayon de Förster associé à ce couple est compris entre 3,5 et 5,2 nm. C'est traditionnellement cet oligonucléotide qui est employé lors des tests de FRET. Lorsque le G4 est structuré la fluorescence de FAM est éteinte.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

Ainsi l'étude de l'affinité apparente d'un ligand pour la séquence F21T repose sur la libération de fluorescence de FAM lors de la dénaturation de la chaîne d'acides nucléiques induite par chauffage. La dénaturation du G₄ F21T implique l'éloignement des deux fluorophores et donc la disparition du FRET. La fluorescence retrouvée du fluorophore donneur, FAM, est celle qui est mesurée. Cela permet de déterminer la température de demi-dénaturation du G₄ qui est la température à laquelle la moitié du G₄ est dénaturée. Cette température est caractéristique de la séquence du G₄. L'application d'un ligand de G₄ stabilise la structure et induit une augmentation de la température de demi-dénaturation. Cette différence entre la température de demi-dénaturation du G₄ seul et du G₄ avec son ligand ($\Delta T_{1/2}$) est la valeur qui permet de caractériser indirectement l'affinité du ligand pour le G₄. Plus cette différence est importante, plus le ligand interagit de manière forte.

Cette méthode permet également d'étudier la sélectivité des ligands pour une forme G₄ en les mettant en compétition avec de l'ADN duplex. Ainsi, lorsque l'ajout d'ADN duplex dans le milieu n'a pas d'incidence sur le $\Delta T_{1/2}$ entre le G₄ lié et le G₄ libre, cela indique une préférence du ligand pour la structure G₄ et donc sa sélectivité.

IV. 2. iii. Fluorescence Intercalator Displacement (FID)

La méthode repose sur l'emploi d'une sonde d'acides nucléiques dont la fluorescence augmente de manière significative lorsqu'elle se trouve liée à une chaîne d'acides nucléiques. La méthode a été appliquée à l'étude des ligands de G₄ par l'équipe de Teulade-Fichou en 2006¹⁵⁰ (**Figure 14**). En effet, si on incube la séquence de G₄ avec la sonde, par exemple du thiazole orange (TO) comme dans l'exemple cité, on observe une fluorescence induite par l'interaction du TO avec le G₄. Le TO se lie aux G₄s avec une constante d'affinité de l'ordre de 10^{-6} M⁻¹. L'introduction dans le milieu d'un meilleur ligand entraînera un déplacement du TO et une chute de la fluorescence.

L'expérience consiste donc à évaluer la capacité d'un ligand à déplacer ou non le TO d'un G₄ donné. Il est également possible de varier les sondes s'il y a risque d'interférence avec la fluorescence du ligand utilisé. Le FID est une technique facile à mettre en œuvre, elle est d'une sensibilité suffisante pour travailler avec de petites quantités de produits et ne nécessite pas l'emploi d'oligomères marqués comme pour le FRET par exemple. De plus, dans la mesure où les sondes utilisées se lient également sur l'ADN duplex, on peut s'en servir pour des études de sélectivité si le ligand ne déplace pas la sonde en présence de duplex.

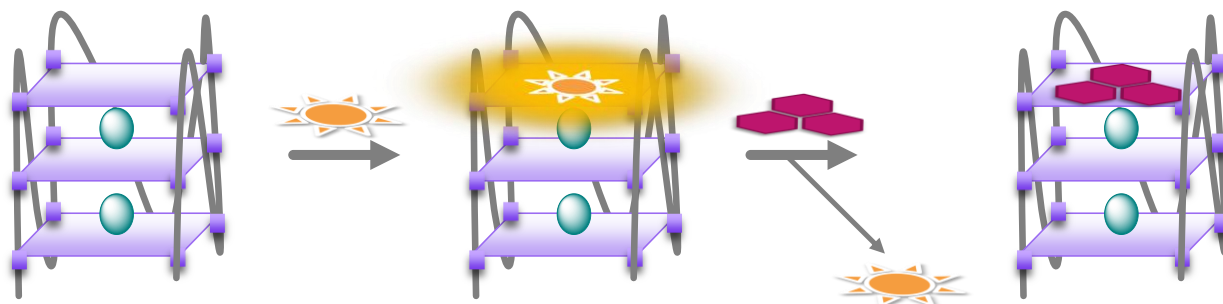


Figure 14 : Représentation du déplacement de la sonde d'acides nucléiques fluorescente par l'insertion d'un ligand compétiteur.

Il n'en reste pas moins que, tout comme le FRET, le FID est une méthode indirecte d'accès à l'affinité d'un ligand donné pour une structure de G₄ donné. En effet, par la mesure de la concentration en ligand capable de déplacer 50% de la sonde, on peut classer les ligands selon leur capacité à déplacer la sonde et donc leur affinité apparente pour les G₄s.

IV. 2. iv. La chromatographie d'affinité

La chromatographie d'affinité permet d'isoler l'un des partenaires d'un complexe d'interaction (ex ligand /récepteur, ligand / G₄) en ayant recours à l'immobilisation sur une colonne de l'autre partenaire. Seuls les complexes d'interaction spécifique sont retenus sur la colonne. C'est un procédé qui est applicable aux G₄s¹⁵¹. On peut fixer un ligand de G₄ sur une colonne et faire un screening d'oligonucléotides. Cette méthode ne fournit cependant aucune information structurale sur le G₄, elle n'est destinée qu'à isoler la séquence du reste de la librairie. Il est également possible de réaliser l'inverse, c'est-à-dire un screening de ligands potentiels en utilisant cette fois une colonne contenant des G₄s dans laquelle on ferait passer un mélange de molécules¹⁵².

IV. 2. v. La spectroscopie UV-visible

Dans le cas des ligands qui absorbent dans le visible, en particulier les porphyrines¹⁵³, il est possible de suivre les variations du spectre d'absorption UV-visible du ligand en présence d'ADN (ou d'ARN) G-quadruplex. L'interaction de π -stacking entre le ligand et l'acide nucléique se traduit par un déplacement bathochrome de la bande d'absorption du ligand ainsi que d'un effet hypochrome (**Figure 15**). Une titration de l'interaction en présence de concentrations croissantes d'acide nucléique permet de tracer des courbes de saturation dont la valeur du K_D est extraite ainsi que la stoechiométrie de l'association. Une limitation de cette méthode est la sensibilité de détection, c'est à dire la gamme

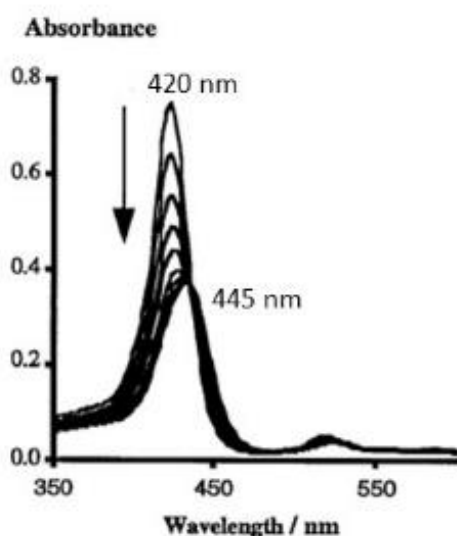


Figure 15 : Représentation de l'effet hypochrome et du déplacement bathochrome de la bande de Soret de la porphyrine TMPyP₄ lorsqu'elle interagit avec de l'ADN G₄ (TTAGGG) (Wheelhouse *et al.*, 1998¹⁵³).

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

de concentrations à laquelle on peut travailler puisque pour mesurer une constante d'affinité il faut se trouver à une concentration inférieure au K_D .

IV. 3. Méthodes quantitatives

IV. 3. i. La Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

La résonance plasmonique de surface (ou SPR en anglais) est une méthode qui permet de déterminer la constante d'affinité d'un composé pour une cible donnée. Cela est possible par l'étude de l'interaction lumière-matière. Une onde lumineuse est envoyée sur une surface recouverte d'or et fonctionnalisée par une espèce donnée, dans notre cas des G4s structurés.

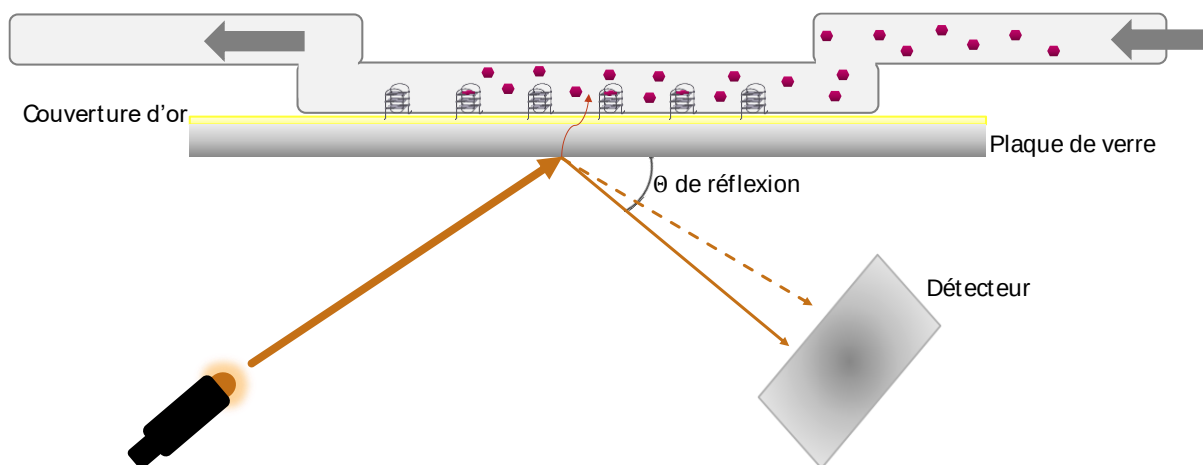


Figure 16 : Représentation du phénomène de SPR. Un faisceau lumineux monochrome est envoyé vers le milieu imbibé de solution tampon contenant le ligand et la différence d'angle de résonance est mesurée.

Un faisceau lumineux monochromatique est projeté sur cette surface de verre et est donc réfléchi par cette surface. Cependant la partie du faisceau qui est réfracté dans le milieu va entrer en résonance avec les nombreux électrons libres présents au sein de la couche d'or. Cette perturbation énergétique est observable dans le faisceau réfléchi qui est alors analysé. En effet, on observera une chute d'intensité du rayon réfléchi lorsque celui-ci est réfléchi à l'angle de résonance. Ce phénomène est donc appelé résonance plasmonique de surface et ce qui est mesuré lors de l'analyse, est la variation d'angle de résonance lorsque le faisceau touche une molécule couplée ou non à son ligand, dans la mesure où le couplage au ligand indique un changement de réfringence du milieu. La surface est plongée dans une solution contenant un flot continu de tampon contenant le ligand. Le signal de résonance, traduit en RU (resonance unity) obtenu est analysé sur un sensorgramme qui permet de visualiser la phase d'association du ligand, suivie par une phase d'équilibre avant d'entamer la phase de dissociation lorsque le milieu est rincé avec la solution tampon ne contenant pas de ligand (**Figure 16**). On peut ainsi mesurer les constantes cinétiques d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) (**Figure 17**) et donc en déduire la constante d'association à l'équilibre $K_A = k_{on} / k_{off}$.

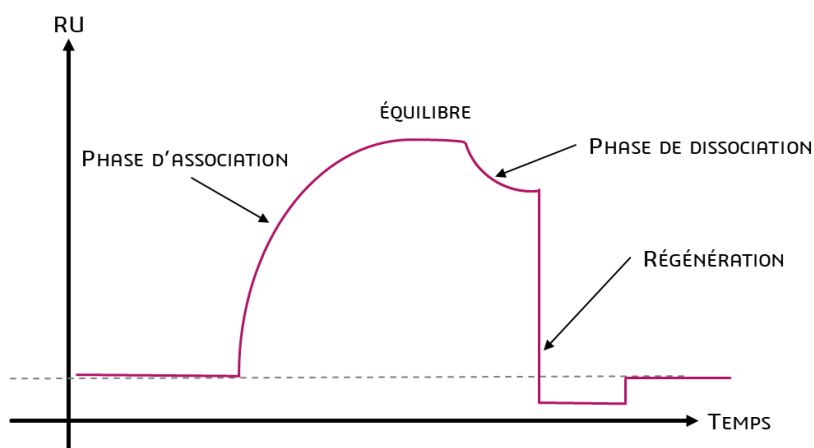


Figure 17 : Représentation schématique d'un sensogramme. Les mesures des temps d'association et dissociation donnent accès à la constante d'affinité.

Cette méthode est extrêmement sensible et est donc réalisable avec peu de produit, non marqué de surcroît. Elle permet également de déterminer les constantes d'affinité des différents ligands évalués ainsi que le suivi en temps réel de la liaison des ligands sur les G4s. Cependant, elle requiert un certain appareillage et il faut s'assurer que les G4s resteront bien structurés après avoir été immobilisés sur la surface d'or. Généralement l'immobilisation de l'oligonucléotide est réalisée par un accrochage biotine/streptavidine.

IV. 3. ii. La Titration Calométrique Isotherme (ITC)

La Titration Calométrique Isotherme (ITC) est une méthode quantitative qui permet de mesurer directement les paramètres de liaisons entre deux entités dans leur état natif. Elle permet d'avoir accès à l'enthalpie de liaison entre deux molécules et est largement répandue dans l'étude des biomolécules et est applicable aux G4s et à leurs ligands¹⁵⁴. C'est une méthode complète qui permet de déterminer les énergies mises en jeu lors de l'association ligand-molécule, elle permet lors de la même mesure de déterminer la constante de liaison K_D , l'enthalpie de liaison ΔH , l'entropie de liaison ΔS et la stoechiométrie de l'association n .

Il s'agit de placer dans une cuve adiabatique deux cellules dont l'une servira de référence, l'autre étant la cellule d'échantillonnage contenant la biomolécule, ici le G4. Cette méthode requiert l'emploi d'un calorimètre d'une grande sensibilité qui permet de mesurer les différences de chaleur prenant place dans la cuve. Un titrage par le ligand va induire une variation de chaleur au sein de la cuve qui sera mesurée par le calorimètre. Après chaque ajout de ligand, la cellule d'échantillonnage est ramenée à la même température que la cellule de référence et un nouvel aliquot de ligand est ajouté, saturant progressivement la cellule d'échantillonnage jusqu'à ce qu'aucun échange ne soit détecté, indiquant une saturation de l'échantillon.

C'est une méthode très utile qui permet d'avoir accès à beaucoup de données en une seule expérience et qui en plus ne requiert aucun marquage. Cependant c'est une méthode coûteuse en produit et il est nécessaire de réaliser l'expérience en solution dans l'eau.

IV. 3. iii. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode utilisée pour analyser les biomolécules puisque celles-ci sont facilement ionisables au niveau des chaînes phosphates pour les acides nucléiques ou des acides aminés pour les protéines.

Dans le cas des G₄s, la spectrométrie de masse est une méthode intéressante dans l'étude des interactions avec les ligands parce qu'elle permet de mesurer la stoechiométrie de liaison entre le ligand et le G₄. Si elle requiert peu de matériel, une grande expertise dans l'analyse des données est toutefois nécessaire.

IV. 4. Méthode enzymatique : l'inhibition de la télomérase.

Les ligands de G₄s peuvent être évalués en fonction de leur capacité à inhiber l'enzyme télomérase. En effet, les télomères sont des régions enrichies en G₄s et la télomérase est inhibée par la présence de ligands stabilisant les G₄s. Une méthode classique dans la caractérisation des G₄s est donc le recours à la TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocole)^{155,156}. Cela consiste en l'utilisation d'une séquence télomérique prête à servir de substrat à l'élongation par la télomérase. Les brins d'ADN télomérique rallongés par la télomérase sont ensuite analysés par amplification PCR. L'analyse de la longueur des brins néosynthétisés permet de quantifier directement l'activité télomérase. La présence d'un ligand de G₄ va venir interagir avec le G₄ *in situ* et bloquer la progression de la télomérase. Ainsi, le potentiel inhibiteur du ligand est directement corrélé à l'affinité du ligand pour les structures de G₄s.

V. Les porphyrines

Les porphyrines sont des macrocycles aromatiques constitués de quatre unités pyrroles reliées ensemble par des ponts méthynes. L'origine de leur nom vient du grec *porphyra* qui désigne la couleur violette caractéristique de ces composés. Du fait de leur large surface aromatique, ces composés absorbent fortement dans le visible et possèdent une signature UV-vis caractéristique. Ces molécules en effet possèdent une bande d'absorption unique aux environs de 400 nm que l'on désigne comme étant la bande de Soret.

Il existe de nombreuses déclinaisons de ces composés selon l'état d'oxydation du cœur pyrrolique. Ainsi, si l'un des cycles pyrroles est réduit on parle alors de chlorine. Une réduction à 6 électrons conduit au porphyrinogène (**Schéma 5**). Les porphyrines sont également connues pour être capables de coordonner les métaux, leur conférant des propriétés redox dans le cas de métaux rédox actifs. Il s'agit dans ce cas d'un ligand de type L₂X₂ qui pourra coordonner des métaux du groupe d ayant une sphère de coordination plan carrée, or(III), pyramidale à base carrée, zinc(II) ou octaédrique, cobalt(III), fer(III), manganèse(III).

Ce sont des molécules qui existent dans le vivant en tant que groupement prostétiques sous forme de métallo-porphyrines. C'est le cas des porphyrines de fer présentes dans le site actif de l'hémoglobine et responsable du transport des gaz dans le corps humain ou des cytochromes de la chaîne respiratoire qui servent de transporteur d'électrons, ou encore des cytochromes P₄₅₀ et peroxydases qui sont des enzymes d'oxydation.

Nous verrons dans cette partie que les porphyrines sont d'une part une famille de molécules très importantes dans le vivant mais qu'elles possèdent également des propriétés intéressantes en tant qu'agents thérapeutiques potentiels dans plusieurs affections allant du cancer aux infections par des pathogènes. Il sera consacré une partie à leur potentiel en tant que ligand des G4s viraux.

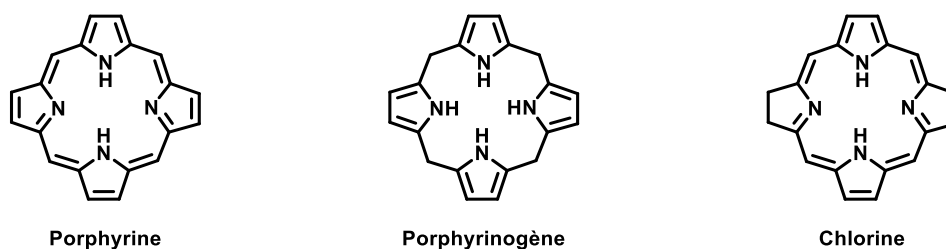


Schéma 5 : Structures du cœur porphyrine et deux analogues courants.

V. 1. Les porphyrines chez l'Homme

V. 1. i. L'hémoglobine

Les globules rouges, aussi appelées hématies, sont des cellules de la circulation sanguine qui sont fabriquées par la moelle osseuse. Ce type de cellules possède une particularité, il s'agit de cellules eucaryotes qui sont énucléées lors de leur maturation, constituant un groupe de cellules dépourvues d'information génétique. Elles contiennent en revanche une grande quantité d'hémoglobine, ce qui leur donne leur couleur rouge caractéristique.

L'hémoglobine est une protéine hétéro-tetramérique constituée de quatre sous-unités identiques deux à deux et responsable du transport de l'oxygène et du dioxyde de carbone. Elle est capable de se lier à d'autres gaz également comme le monoxyde d'azote ou le monoxyde de carbone. Le transport des gaz est possible grâce à un complexe métallique constituant le site actif de cette protéine. Ce complexe métallique est une porphyrine de fer particulière que l'on appelle l'hème. Le ligand porphyrine entoure un ion fer(II) sur lequel va se coordonner le gaz transporté.

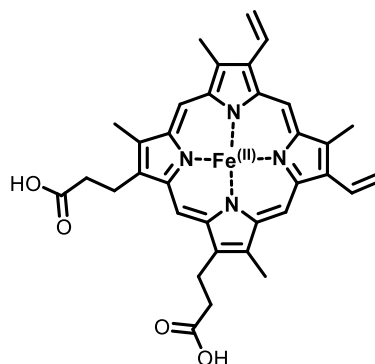


Schéma 6 La porphyrine héminique.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

V. 1. ii. Les protéines héminiques

Les cytochromes sont une famille de protéines impliquées dans la chaîne respiratoire et qui possèdent elles aussi l'hème (ou un dérivé). On en connaît quatre types. Ces cytochromes utilisent les capacités de cycle redox de la porphyrine de fer se trouvant dans le site actif¹⁵⁷.

Il existe une autre famille de protéines héminiques, les enzymes d'oxydation comme les peroxydases et les cytochromes P450, caractérisées par une bande de Soret à 450 nm lorsqu'ils sont à l'état réduit et complexés avec du monoxyde de carbone. Ces peroxydases ou monooxygénases sont quant à elles impliquées dans les réactions d'oxydation du métabolisme cellulaire et de la détoxification. Leur mécanisme catalytique met en jeu des espèces actives de type métal-oxo de haut degré d'oxydation du fer.

V. 2. Les porphyrines en tant que molécules thérapeutiques

V. 2. i. Usages des porphyrines en tant que molécules anticancéreuses

Nous aborderons dans cette partie des propriétés variées des porphyrines comme leurs propriétés redox et leur potentiel en tant que molécule ligand d'acides nucléiques.

V. 2. i. a. Les porphyrines, des photosensibilisateurs en thérapie photodynamique (PDT)

La thérapie photodynamique, ou photodynamic therapy en anglais (PDT), est une méthode de traitement qui implique l'usage de lumière et d'une molécule ayant des propriétés phototoxiques, c'est-à-dire qui devient toxique en présence de lumière et d'oxygène moléculaire. La molécule est activée par un rayon lumineux, ce qui induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La présence de ROS dans les tissus est délétère puisque ce sont des espèces connues pour être extrêmement réactives. (Figure 18).

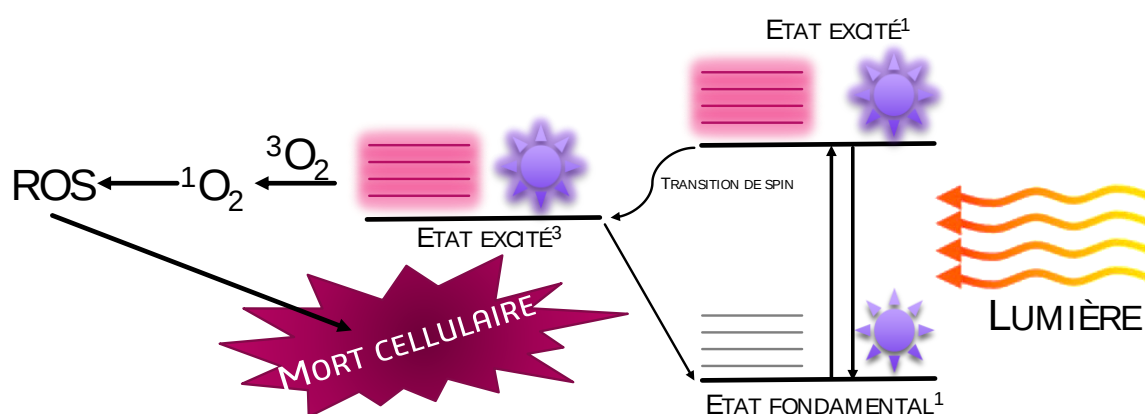


Figure 18 : Mode d'action de la PDT. Génération *in situ* d'oxygène singulet qui à son tour génère d'autres ROS responsables de l'inflammation locale et de la mort des cellules touchées.

Elle est surtout utilisée dans le traitement de maladies de surface, notamment des maladies de peau incluant des cancers mais également de l'acné, du psoriasis ou encore de l'herpès^{158,159}. L'intérêt d'une telle méthode est qu'elle est

non invasive, sélective (effet défini par la zone irradiée) et peut-être utilisée en complément d'une chirurgie ou d'une chimiothérapie.

Les porphyrines, de par leurs propriétés spectroscopiques uniques (forte absorption) sont globalement compatibles avec la PDT. Elles possèdent une longueur d'onde d'excitation dans le visible et sont capables de produire de l'oxygène singulet. Ces propriétés en font des photosensibilisateurs de choix¹⁶⁰. La première génération de composés employés en PDT était des dérivés de porphyrines et la première molécule approuvée par la FDA pour un usage en PDT était aussi une porphyrine (Photofrin **Schéma 7**). Cependant, du fait d'une bande d'absorption d'intensité assez faible dans le rouge (les longueurs d'ondes qui sont le mieux transmises dans les tissus sont comprises entre 650 et 800 nm), les générations suivantes de molécules employées en PDT sont des porphyrines ou analogues modifiés dont la surface aromatique a été étendue afin de les rendre plus efficaces¹⁶¹.

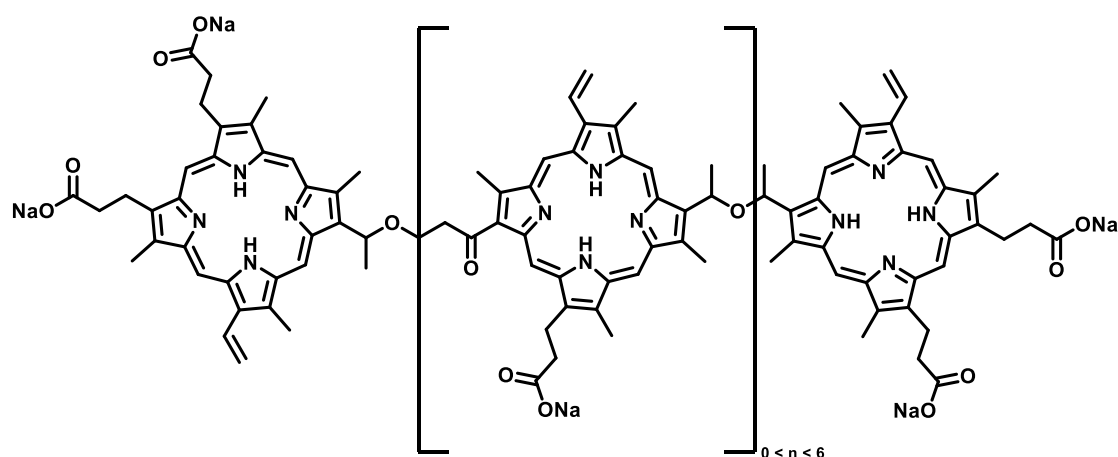


Schéma 7 : Structure du polymère Photofrin (Sodium Porfimer).

V. 2. i. b. Autres modes d'actions des porphyrines anticancéreuses

En plus des porphyrines et dérivés employés en PDT, les porphyrines sont également étudiées pour des propriétés anticancéreuses ne faisant pas intervenir la lumière^{162–165}. De plus, cela reste compatible avec leurs propriétés en PDT, ce qui en fait des composés très attractifs.

Des porphyrines d'or(III) hydrophobes peuvent pénétrer dans des cellules cancéreuses et montrent des activités anticancéreuses. La coordination de l'or(III) au cœur de la porphyrine est stable dans l'environnement réducteur intracellulaire¹⁶⁶. Des porphyrines d'or(III), non fonctionnalisées en position *meso*, sont capables de se lier de manière covalente au glutathion ou sur des protéines comportant des résidus cystéines et reliées aux caractères cancéreux d'une cellule, ce qui peut expliquer leur activité anticancéreuse¹⁶⁷. Elles sont également capables d'induire l'apoptose cellulaire ou d'interagir avec la protéine chaperone mitochondriale Hsp60^{163,168}.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

V. 2. ii. Porphyrines antivirales

Il est rapporté quelques exemples dans la littérature de porphyrines ayant des propriétés antivirales, notamment anti VIH-1. Des porphyrines anioniques ont montré des activité antivirales qui sont corrélées à leur liaison avec la glycoprotéine de surface gp120 du VIH-1 conduisant à l'inhibition de son interaction avec le récepteur CD4, empêchant ainsi la pénétration du virus dans la cellule hôte^{169,170}.

Dans le cas du virus de la grippe, il est rapporté un exemple de l'accrochage d'une porphyrine sur une molécule antivirale, le zanamivir. La photoactivation de la porphyrine permet de générer de l'oxygène singulet *in situ* de sorte à apporter une toxicité supplémentaire sur le virus¹⁷¹.

Enfin, des dérivés de porphyrines ont été évalués sur plusieurs classes de virus et seraient capables d'interagir avec l'enveloppe virale, empêchant la formation de nouveaux virions¹⁷².

Les porphyrines (et dérivés) sont donc des composés aux propriétés multiples qui leur confèrent un potentiel en thérapeutique. Ainsi, des porphyrines d'or démontrent une cytotoxicité intéressante dans le cas des cancers tandis que des porphyrines non-métallées ou (métallées par du zinc) sont plus utilisées pour leur propriété à générer *in situ* de l'oxygène singulet. Enfin, testées sur des virus, elles se montrent capables d'interagir à plusieurs niveaux pour limiter la progression de l'infection.

À toutes ces propriétés s'ajoutent celle de ligands de G4s qui sera détaillée dans le paragraphe suivant. En effet, nous avons vu que ces structures étaient très étudiées pour mieux comprendre leur impact sur le cycle viral de nombreux pathogènes et que leur stabilisation pouvait avoir un effet antiviral.

V. 3. Les porphyrines comme ligand de G4s

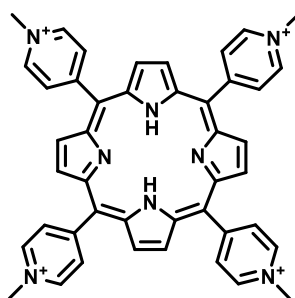


Schéma 8 : Structure de H₂TMPyP₄.

Les porphyrines sont des molécules qui correspondent tout à fait au cahier des charges d'un ligand classique de G4s. Ce sont de larges molécules aromatiques et planes qui, une fois fonctionnalisées de sorte à introduire une charge positive, seraient capable d'interagir à la fois avec le plateau extérieur des G4s mais également par interaction électrostatiques avec les phosphates et éventuellement les sillons des G4s.

La porphyrine tetracationique **H₂TMPyP₄** est très utilisée comme ligand de G₄ de référence (**Schéma 8**)¹⁵³. Cependant, elle n'est pas spécifique des G₄s⁹⁶. Les modifications structurales à partir de cette porphyrine simple ont conduit à des porphyrines cationiques de deuxième génération plus affines et plus spécifiques.

V. 4. Les travaux antérieurs du groupe

V. 4. i. Les porphyrines cationiques

La porphyrine de référence **H₂TMPyP₄** est capable de se lier avec une bonne affinité aux G₄s ($K_D \sim 10^{-6}$ M) mais n'est pas sélective car elle peut s'intercaler entre les plateaux de paires de bases de l'ADN double brin ($K_D \sim 10^{-6}$ M) et peut interagir dans le petit sillon des zones riches en AT ($K_D \sim 10^{-6}$ - 10^{-7} M). Pour empêcher ces deux types d'interactions, des porphyrines plus encombrées ont été synthétisées : **H₂LA**, **H₂MA** et **H₂PG** (**Schéma 9**). Elles s'avèrent aussi affines (**H₂LA**) ou plus affines (**H₂MA** et **H₂PG**) pour les G₄s et toutes sont par contre plus sélectives que **H₂TMPyP₄**¹⁷³⁻¹⁷⁶.

Des analogues métallés par le nickel(II), le manganèse(III) et le cobalt(III) de ces porphyrines ont également été préparés. L'introduction d'un cœur métallique sur **H₂LA** ne change pas l'affinité des porphyrines pour les G₄s de manière claire par contre, pour la série des TMPyP₄, lorsque le métal central porte deux ligands axiaux, l'affinité diminue clairement^{173,174}.

Les analogues métallés de **H₂MA** et **H₂PG** avec les ions nickel(II)¹⁷⁵, manganèse(II)¹⁷⁷ et cobalt(III)¹⁷⁶ montrent que l'ajout d'un centre métallique (en apportant une charge positive pour le cobalt et le manganèse ou un effet acide de Lewis pour le nickel) augmente l'affinité des porphyrines MA et PG pour les G₄s, même dans le cas du cobalt(III) et du manganèse(III) qui présentent des ligands axiaux susceptibles de gêner les interactions avec les plateaux de guanine¹⁷⁴. Des porphyrines d'or(III) ont aussi été synthétisées. On peut attendre de l'or(III) coordiné au cœur de la porphyrine l'apport d'une charge supplémentaire à la molécule, la diminution de la densité électronique sur la structure aromatique et surtout l'absence de ligands axiaux du fait de sa sphère de coordination carrée plane. Cela en fait un ion métallique prometteur et les résultats expérimentaux confirment cette hypothèse.

En effet, l'ajout d'un ion d'or(III) au cœur des porphyrines **H₂TMPyP₄**, **H₂MA** et **H₂PG** a pour effet d'améliorer leur affinité pour les G₄s^{178,179}. La métallation de la porphyrine **H₂MA** par l'or a pour effet de multiplier par trois sa

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

température de stabilisation des G4s en FRET ($\Delta T_{1/2} = 10^\circ\text{C}$ pour **H₂MA** contre $\Delta T_{1/2} = 30^\circ\text{C}$ pour **AuMA**) et de faire gagner un ordre de grandeur sur la constante d'affinité, le K_D de **AuMA** pour les G4s étant de l'ordre de 50 nM^{180} .

V. 4. ii. Les résultats biologiques

Le virus HIV-1 est un retrovirus. Son génome consiste en deux brins d'ARN de 9,2 kb. Lors de l'infection, l'ARN viral est retrotranscrit en un ADN double brin de 9,6 kb incluant deux extrémités régulatrices long terminal repeat (LTR).

L'ADN viral est ensuite intégré au génome de la cellule hôte puis transcrit et traduit par la machinerie cellulaire pour produire de nouvelles particules virales. La présence de G4s dans la région U₃ des LTRs a été mise en évidence⁹⁹⁻¹⁰². Dans le 5'LTR, la séquence formant des G4s se situe sur le site de fixation du facteur de transcription SP1 et sert de promoteur pour la transcription du génome entier. D'autres séquences potentielles de G4 ont été identifiées^{103,180,181}.

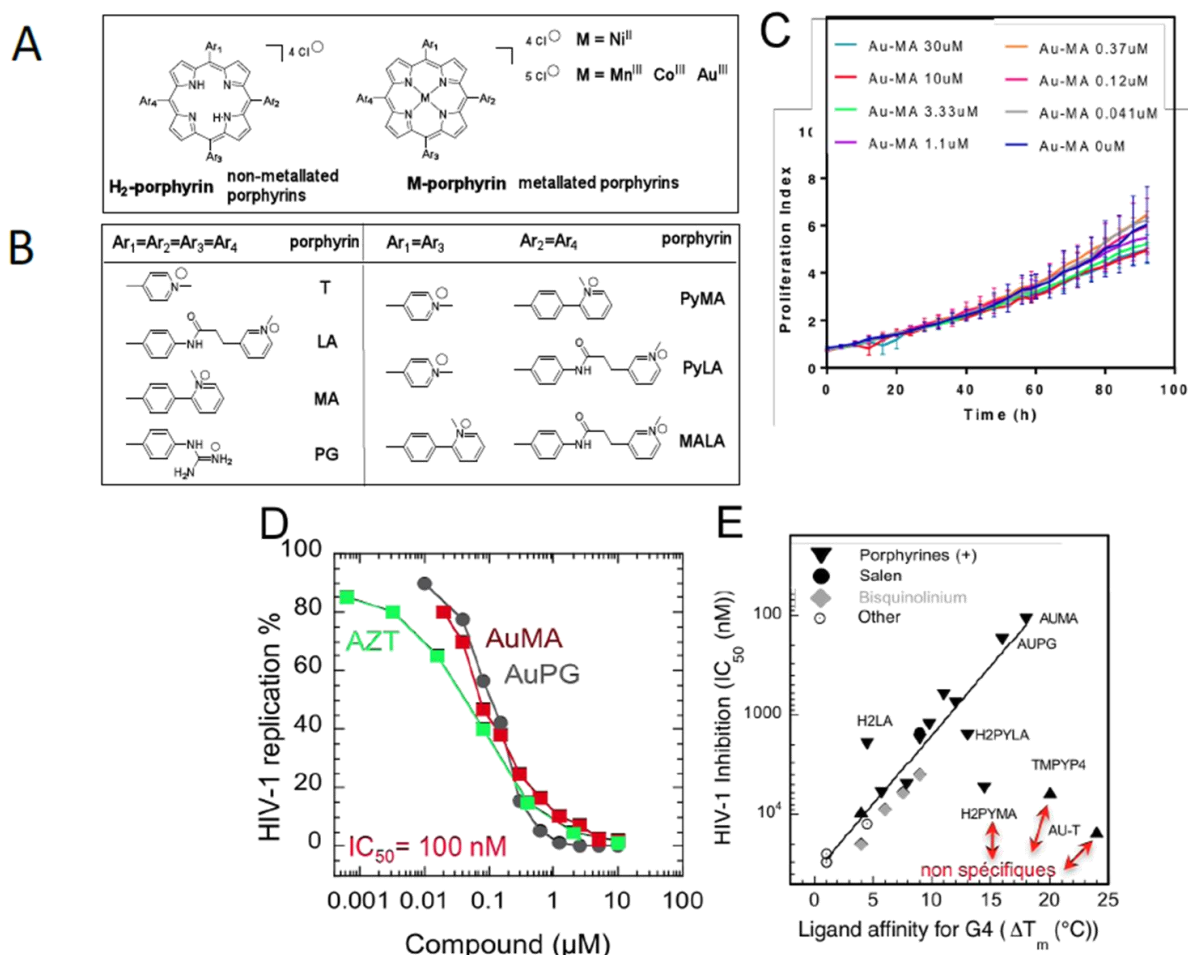


Figure 19 : **A.** Les métaux utilisés pendant l'étude des porphyrines cationiques. **B.** Les différentes structures des porphyrines. **C.** Prolifération des cellules HeLa sous concentration croissantes de **AuMA** pour attester de la non cytotoxicité de **AuMA**. **D.** L'inhibition de la réplication du VIH-1 dans les cellules incubées avec de l'AZT ou les porphyrines **AuMA** et **AuPG**. **E.** Corrélation entre l'affinité des porphyrines évaluées en FRET et leur activité antivirale.

Parmi ces séquences potentielles de G₄ très conservées il en existe 8 qui forment des structures G₄ stables en ARN et 5 stables en version ADN *in vitro*¹⁸⁰.

Le Docteur Samir Amrane (Institut Européen de Chimie Biologie, Pessac) a montré que les porphyrines cationiques interagissent fortement avec les trois G₄ de la région U₃ en version ADN et établi une relation structure / affinité qui désigne **AuMA** et **AuPG** comme les meilleurs ligands (**Figure 19 A,B,E**).

En parallèle, le Docteur Marie-Line Andreola (Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, Bordeaux) a montré que les porphyrines cationiques d'or peuvent être d'excellents inhibiteurs du VIH-1. L'activité antivirale atteint même celle de l'AZT pour les deux meilleures porphyrines **AuMA** et **AuPG** (**Figure 19D et E**)^{179,180}. **AuMA** ne montre pas de toxicité sur les cellules HeLA (**Figure 19C**).

Fait remarquable : on observe une corrélation entre la capacité des porphyrines cationiques (et autres ligands de G₄ inclus dans la série de molécules) à stabiliser les G₄s ($\Delta T_{1/2}$ FRET melting) et leur capacité à inhiber la réplication de HIV-1 (**Figure 19E**). Le mécanisme d'action des porphyrines cationiques sur HIV-1 pourrait donc passer par leur reconnaissance d'un G₄ viral.

De nombreux G₄s ont été identifiés à différents endroits de la séquence, et chacun avec un rôle différent^{101,104,104,182}. Cependant les travaux de l'équipe de Bordeaux mettent en lumière que l'action des porphyrines a lieu au cours des événements précoces de l'infection, en inhibant l'initiation de la reverse transcription.

Ce travail démontre l'implication déterminante d'un G₄ viral dans les premières étapes de l'infection et ouvre la perspective du ciblage de ce G₄ dans une stratégie thérapeutique.

L'un des objectifs des travaux de ma thèse est de contribuer à l'étude de la formation des G₄s viraux *in cellulo*. Pour cela, il a été envisagé de préparer une sonde moléculaire afin d'isoler le G₄ responsable de l'inhibition de la reverse transcription. Cette sonde sera constituée d'une entité porphyrine cationique d'or(III) semblable à **AuMA** ou **AuPG** afin de conserver l'excellente affinité pour les G₄s pour laquelle ces porphyrines ont été optimisées, et un bras fonctionnalisé portant un tag qui permettra l'isolement de la séquence de G₄ par chromatographie d'affinité. La séquence d'ARN viral sera ensuite amplifiée afin d'identifier le G₄ qui, lors de son interaction avec un ligand stabilisateur, inhibe la transcription reverse chez le VIH-1. Pour la réalisation de ces travaux, il a été décidé de travailler sur la porphyrine **AuMA** liée à un tag biotine.

RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 1

- (1) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- (2) Hoogsteen, K. The Crystal and Molecular Structure of a Hydrogen-Bonded Complex between 1-Methylthymine and 9-Methyladenine. *Acta Crystallogr.* **1963**, *16* (9), 907–916. <https://doi.org/10.1107/S0365110X63002437>.
- (3) Kaushik, M.; Kaushik, S.; Bansal, A.; Saxena, S.; Kukreti, S. Structural Diversity and Specific Recognition of Four Stranded G-Quadruplex DNA. *Curr. Mol. Med.* **2011**, *11* (9), 744–769. <https://doi.org/10.2174/156652411798062421>.
- (4) Keniry, M. A. Quadruplex Structures in Nucleic Acids. *Biopolymers* **2001**, *56* (3), 24.
- (5) Neidle, S.; Parkinson, G. N. The Structure of Telomeric DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13* (3), 275–283. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(03\)00072-1](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(03)00072-1).
- (6) Hazel, P.; Huppert, J.; Balasubramanian, S.; Neidle, S. Loop-Length-Dependent Folding of G-Quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (50), 16405–16415. <https://doi.org/10.1021/ja045154j>.
- (7) Rachwal, P. A.; Brown, T.; Fox, K. R. Sequence Effects of Single Base Loops in Intramolecular Quadruplex DNA. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (8), 1657–1660. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.040>.
- (8) Kumar, N.; Sahoo, B.; Varun, K. A. S.; Maiti, S.; Maiti, S. Effect of Loop Length Variation on Quadruplex-Watson Crick Duplex Competition. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (13), 4433–4442. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn402>.
- (9) Gellert, M.; Lipsett, M.; Davies, D. Helix Formation by Guanlylic Acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **1962**, *48* (12), 2013–2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.12.2013>.
- (10) Sen, D.; Gilbert, W. Complexes by Guanine-Rich Motifs in DNA and Its Implications for Meiosis. *Nature* **1988**, *334*, 364–366.
- (11) Dunnick, W.; Hertz, G. Z.; Scappino, L.; Gritzmacher, C. DNA Sequences at Immunoglobulin Switch Region Recombination Sites. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21* (3), 365–372. <https://doi.org/10.1093/nar/21.3.365>.
- (12) Hanakahi, L. A.; Sun, H.; Maizels, N. High Affinity Interactions of Nucleolin with G-G-Paired RDNA. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (22), 15908–15912. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15908>.
- (13) Sundquist, W. I.; Klug, A. Telomeric DNA Dimerizes by Formation of Guanine Tetrads between Hairpin Loops. *Nature* **1989**, *342*, 825–829.
- (14) Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Pluckthun, A. In Vitro Generated Antibodies Specific for Telomeric Guanine-Quadruplex DNA React with Stylonychia Lemnae Macronuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, *98* (15), 8572–8577. <https://doi.org/10.1073/pnas.141229498>.

- (15) Lipps, H. J.; Rhodes, D. G-Quadruplex Structures: In Vivo Evidence and Function. *Trends Cell Biol.* **2009**, *19* (8), 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.05.002>.
- (16) Todd, A. K. Highly Prevalent Putative Quadruplex Sequence Motifs in Human DNA. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2901–2907. <https://doi.org/10.1093/nar/gki553>.
- (17) Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. Prevalence of Quadruplexes in the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2908–2916.
- (18) Bedrat, A.; Lacroix, L.; Mergny, J.-L. Re-Evaluation of G-Quadruplex Propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (4), 1746–1759.
- (19) Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. G-Quadruplexes in Promoters throughout the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (2), 406–413. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1057>.
- (20) Eddy, J.; Maizels, N. Conserved Elements with Potential to Form Polymorphic G-Quadruplex Structures in the First Intron of Human Genes. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (4), 1321–1333. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1138>.
- (21) Eddy, J.; Vallur, A. C.; Varma, S.; Liu, H.; Reinhold, W. C.; Pommier, Y.; Maizels, N. G4 Motifs Correlate with Promoter-Proximal Transcriptional Pausing in Human Genes. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (12), 4975–4983. <https://doi.org/10.1093/nar/gkro79>.
- (22) Rawal, P. Genome-Wide Prediction of G4 DNA as Regulatory Motifs: Role in Escherichia Coli Global Regulation. *Genome Res.* **2006**, *16* (5), 644–655. <https://doi.org/10.1101/gr.4508806>.
- (23) Yadav, V. K.; Abraham, J. K.; Mani, P.; Kulshrestha, R.; Chowdhury, S. QuadBase: Genome-Wide Database of G4 DNA Occurrence and Conservation in Human, Chimpanzee, Mouse and Rat Promoters and 146 Microbes. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *36* (Database), D381–D385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm781>.
- (24) Capra, J. A.; Paeschke, K.; Singh, M.; Zakian, V. A. G-Quadruplex DNA Sequences Are Evolutionarily Conserved and Associated with Distinct Genomic Features in Saccharomyces Cerevisiae. *PLoS Comput. Biol.* **2010**, *6* (7), e1000861. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000861>.
- (25) Rhodes, D.; Lipps, H. J. G-Quadruplexes and Their Regulatory Roles in Biology. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (18), 8627–8637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv862>.
- (26) Calado, R. T.; Young, N. S. Telomere Diseases. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361* (24), 2353–2365. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0903373>.
- (27) Hayflick, L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp. Cell Res.* **1965**, *37* (3), 614–636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9).
- (28) Huppert, J. L. Four-Stranded Nucleic Acids: Structure, Function and Targeting of G-Quadruplexes. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37* (7), 1375. <https://doi.org/10.1039/b702491f>.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

- (29) Bryan, T. M. G-Quadruplexes at Telomeres: Friend or Foe? *Molecules* **2020**, 25 (16), 3686. <https://doi.org/10.3390/molecules25163686>.
- (30) Makarov, V. L.; Hirose, Y.; Langmore, J. P. Long G Tails at Both Ends of Human Chromosomes Suggest a C Strand Degradation Mechanism for Telomere Shortening. *Cell* **1997**, 88 (5), 657–666. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81908-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81908-X).
- (31) Griffith, J. D.; Comeau, L.; Rosenfield, S.; Stansel, R. M.; Bianchi, A.; Moss, H.; de Lange, T. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* **1999**, 97 (4), 503–514. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80760-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80760-6).
- (32) Dai, X.; Huang, C.; Bhusari, A.; Sampathi, S.; Schubert, K.; Chai, W. Molecular Steps of G-Overhang Generation at Human Telomeres and Its Function in Chromosome End Protection. *EMBO J.* **2010**, 29 (16), 2788–2801. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.156>.
- (33) Turner, K.; Vasu, V.; Griffin, D. Telomere Biology and Human Phenotype. *Cells* **2019**, 8 (1), 73. <https://doi.org/10.3390/cells8010073>.
- (34) Akincilar, S. C.; Unal, B.; Tergaonkar, V. Reactivation of Telomerase in Cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, 73 (8), 1659–1670. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2146-9>.
- (35) Jansson, L. I.; Hentschel, J.; Parks, J. W.; Chang, T. R.; Lu, C.; Baral, R.; Bagshaw, C. R.; Stone, M. D. Telomere DNA G-Quadruplex Folding within Actively Extending Human Telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **2019**, 116 (19), 9350–9359. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814777116>.
- (36) Oganessian, L.; Graham, M. E.; Robinson, P. J.; Bryan, T. M. Telomerase Recognizes G-Quadruplex and Linear DNA as Distinct Substrates. *Biochemistry* **2007**, 46 (40), 11279–11290. <https://doi.org/10.1021/bi700993q>.
- (37) Siddiqui-Jain, A.; Grand, C. L.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H. Direct Evidence for a G-Quadruplex in a Promoter Region and Its Targeting with a Small Molecule to Repress c-MYC Transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99 (18), 11593–11598. <https://doi.org/10.1073/pnas.182256799>.
- (38) Kumar, N.; Maiti, S. A Thermodynamic Overview of Naturally Occurring Intramolecular DNA Quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36 (17), 5610–5622. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn543>.
- (39) Todd, A. K.; Haider, S. M.; Parkinson, G. N.; Neidle, S. Sequence Occurrence and Structural Uniqueness of a G-Quadruplex in the Human c-Kit Promoter. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35 (17), 5799–5808. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm609>.
- (40) Besnard, E.; Babled, A.; Lapasset, L.; Milhavet, O.; Parrinello, H.; Dantec, C.; Marin, J.-M.; Lemaitre, J.-M. Unraveling Cell Type-Specific and Reprogrammable Human Replication Origin Signatures Associated with G-Quadruplex Consensus Motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, 19 (8), 837–844. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2339>.
- (41) Valton, A.-L.; Prioleau, M.-N. G-Quadruplexes in DNA Replication: A Problem or a Necessity? *Trends Genet.* **2016**, 32 (11), 697–706. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.09.004>.

- (42) Tarsounas, M.; Tijsterman, M. Genomes and G-Quadruplexes: For Better or for Worse. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425* (23), 4782–4789. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.026>.
- (43) Seifert, H. S. Above and Beyond Watson and Crick: Guanine Quadruplex Structures and Microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **2018**, *72* (1), 49–69. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062629>.
- (44) Duquette, M. L. Intracellular Transcription of G-Rich DNAs Induces Formation of G-Loops, Novel Structures Containing G₄ DNA. *Genes Dev.* **2004**, *18* (13), 1618–1629. <https://doi.org/10.1101/gad.1200804>.
- (45) Maizels, N. Immunoglobulin Gene Diversification. *Annu. Rev. Genet.* **2005**, *39* (1), 23–46. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.110544>.
- (46) Mani, P.; Yadav, V. K.; Das, S. K.; Chowdhury, S. Genome-Wide Analyses of Recombination Prone Regions Predict Role of DNA Structural Motif in Recombination. *PLoS ONE* **2009**, *4* (2), e4399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004399>.
- (47) Sacca, B. The Effect of Chemical Modifications on the Thermal Stability of Different G-Quadruplex-Forming Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (4), 1182–1192. <https://doi.org/10.1093/nar/gki257>.
- (48) Agarwala, P.; Pandey, S.; Maiti, S. The Tale of RNA G-Quadruplex. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (20), 5570–5585. <https://doi.org/10.1039/C4OB02681K>.
- (49) Patel, D. J.; Phan, A. T.; Kuryavyi, V. Human Telomere, Oncogenic Promoter and 5'-UTR G-Quadruplexes: Diverse Higher Order DNA and RNA Targets for Cancer Therapeutics. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (22), 7429–7455. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm711>.
- (50) Huppert, J. L.; Bugaut, A.; Kumari, S.; Balasubramanian, S. G-Quadruplexes: The Beginning and End of UTRs. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (19), 6260–6268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn511>.
- (51) Millevoi, S.; Moine, H.; Vagner, S. G-Quadruplexes in RNA Biology: G-Quadruplexes in RNA Biology. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2012**, *3* (4), 495–507. <https://doi.org/10.1002/wrna.1113>.
- (52) Fay, M. M.; Lyons, S. M.; Ivanov, P. RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. *J. Mol. Biol.* **2017**, *429* (14), 2127–2147. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.017>.
- (53) Małgowska, M. Overview of RNA G-Quadruplex Structures. *Acta Biochim. Pol.* **2017**, *63* (4). https://doi.org/10.18388/abp.2016_1335.
- (54) Yadav, P.; Kim, N.; Kumari, M.; Verma, S.; Sharma, T. K.; Yadav, V.; Kumar, A. G-Quadruplex Structures in Bacteria: Biological Relevance and Potential as an Antimicrobial Target. *J. Bacteriol.* **2021**, *203* (13). <https://doi.org/10.1128/JB.00577-20>.
- (55) Beaume, N.; Pathak, R.; Yadav, V. K.; Kota, S.; Misra, H. S.; Gautam, H. K.; Chowdhury, S. Genome-Wide Study Predicts Promoter-G₄ DNA Motifs Regulate Selective Functions in Bacteria: Radioresistance of *D. Radiodurans* Involves G₄ DNA-Mediated Regulation. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (1), 76–89. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1071>.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

- (56) Saranathan, N.; Vivekanandan, P. G-Quadruplexes: More Than Just a Kink in Microbial Genomes. *Trends Microbiol.* **2019**, *27* (2), 148–163. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.011>.
- (57) Stanton, A.; Harris, L. M.; Graham, G.; Merrick, C. J. Recombination Events among Virulence Genes in Malaria Parasites Are Associated with G-Quadruplex-Forming DNA Motifs. *BMC Genomics* **2016**, *17* (1), 859. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3183-3>.
- (58) Shao, X.; Zhang, W.; Umar, M. I.; Wong, H. Y.; Seng, Z.; Xie, Y.; Zhang, Y.; Yang, L.; Kwok, C. K.; Deng, X. RNA G-Quadruplex Structures Mediate Gene Regulation in Bacteria. *mBio* **2020**, *11* (1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02926-19>.
- (59) Holder, I. T.; Hartig, J. S. A Matter of Location: Influence of G-Quadruplexes on Escherichia Coli Gene Expression. *Chem. Biol.* **2014**, *21* (11), 1511–1521. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.09.014>.
- (60) Perrone, R.; Lavezzo, E.; Riello, E.; Manganelli, R.; Palù, G.; Toppo, S.; Provvedi, R.; Richter, S. N. Mapping and Characterization of G-Quadruplexes in Mycobacterium Tuberculosis Gene Promoter Regions. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 5743. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05867-z>.
- (61) Waller, Z. A. E.; Pinchbeck, B. J.; Buguth, B. S.; Meadows, T. G.; Richardson, D. J.; Gates, A. J. Control of Bacterial Nitrate Assimilation by Stabilization of G-Quadruplex DNA. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (92), 13511–13514. <https://doi.org/10.1039/C6CC06057A>.
- (62) Wu, R.; Zheng, K.; Zhang, J.; Hao, Y.; Tan, Z. Formation of DNA:RNA Hybrid G-Quadruplex in Bacterial Cells and Its Dominance over the Intramolecular DNA G-Quadruplex in Mediating Transcription Termination. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (8), 2447–2451. <https://doi.org/10.1002/anie.201408719>.
- (63) Harris, L. M.; Merrick, C. J. G-Quadruplexes in Pathogens: A Common Route to Virulence Control? *PLOS Pathog.* **2015**, *11* (2), e1004562. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004562>.
- (64) Cahoon, L. A.; Seifert, H. S. An Alternative DNA Structure Is Necessary for Pilin Antigenic Variation in *Neisseria Gonorrhoeae*. *Science* **2009**, *325* (5941), 764–767. <https://doi.org/10.1126/science.1175653>.
- (65) Rotman, E.; Seifert, H. S. The Genetics of *Neisseria* Species. *Annu. Rev. Genet.* **2014**, *48* (1), 405–431. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092007>.
- (66) Smargiasso, N.; Gabelica, V.; Damblon, C.; Rosu, F.; De Pauw, E.; Teulade-Fichou, M.-P.; Rowe, J.; Claessens, A. Putative DNA G-Quadruplex Formation within the Promoters of Plasmodium Falciparum Var Genes. *BMC Genomics* **2009**, *10* (1), 362. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-362>.
- (67) Merrick, C. J.; Huttenhower, C.; Buckee, C.; Amambua-Ngwa, A.; Gomez-Escobar, N.; Walther, M.; Conway, D. J.; Duraisingh, M. T. Epigenetic Dysregulation of Virulence Gene Expression in Severe Plasmodium Falciparum Malaria. *J. Infect. Dis.* **2012**, *205* (10), 1593–1600. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis239>.
- (68) Sanchez-Martin, V.; Soriano, M.; Garcia-Salcedo, J. A. Quadruplex Ligands in Cancer Therapy. *Cancers* **2021**, *13* (13), 3156. <https://doi.org/10.3390/cancers13133156>.

- (69) Kim, N.; Piatyszek, M.; Prowse, K.; Harley, C.; West, M.; Ho, P.; Coviello, G.; Wright, W.; Weinrich, S.; Shay, J. Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science* **1994**, *266* (5193), 2011–2015. <https://doi.org/10.1126/science.7605428>.
- (70) Carvalho, J.; Mergny, J.-L.; Salgado, G. F.; Queiroz, J. A.; Cruz, C. G-Quadruplex, Friend or Foe: The Role of the G-Quartet in Anticancer Strategies. *Trends Mol. Med.* **2020**, *26* (9), 848–861. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.002>.
- (71) Kosiol, N.; Juranek, S.; Brossart, P.; Heine, A.; Paeschke, K. G-Quadruplexes: A Promising Target for Cancer Therapy. *Mol. Cancer* **2021**, *20* (1), 40. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01328-4>.
- (72) Read, M.; Harrison, R. J.; Romagnoli, B.; Tanious, F. A.; Gowan, S. H.; Reszka, A. P.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S. Structure-Based Design of Selective and Potent G Quadruplex-Mediated Telomerase Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **2001**, *98* (9), 4844–4849. <https://doi.org/10.1073/pnas.081560598>.
- (73) Micco, M.; Collie, G. W.; Dale, A. G.; Ohnmacht, S. A.; Pazitna, I.; Gunaratnam, M.; Reszka, A. P.; Neidle, S. Structure-Based Design and Evaluation of Naphthalene Diimide G-Quadruplex Ligands As Telomere Targeting Agents in Pancreatic Cancer Cells. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (7), 2959–2974. <https://doi.org/10.1021/jm301899y>.
- (74) Müller, S.; Sanders, D. A.; Di Antonio, M.; Matsis, S.; Riou, J.-F.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S. Pyridostatin Analogues Promote Telomere Dysfunction and Long-Term Growth Inhibition in Human Cancer Cells. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (32), 6537. <https://doi.org/10.1039/c2ob2583og>.
- (75) Brooks, T. A.; Kendrick, S.; Hurley, L. Making Sense of G-Quadruplex and i-Motif Functions in Oncogene Promoters: G-Quadruplex and i-Motif in Oncogene Promoters. *FEBS J.* **2010**, *277* (17), 3459–3469. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07759.x>.
- (76) Simonsson, T. DNA Tetraplex Formation in the Control Region of C-Myc. *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26* (5), 1167–1172. <https://doi.org/10.1093/nar/26.5.1167>.
- (77) Sun, D.; Guo, K.; Shin, Y.-J. Evidence of the Formation of G-Quadruplex Structures in the Promoter Region of the Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (4), 1256–1265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq926>.
- (78) Xu, H.; Di Antonio, M.; McKinney, S.; Mathew, V.; Ho, B.; O’Neil, N. J.; Santos, N. D.; Silvester, J.; Wei, V.; Garcia, J.; Kabeer, F.; Lai, D.; Soriano, P.; Banáth, J.; Chiu, D. S.; Yap, D.; Le, D. D.; Ye, F. B.; Zhang, A.; Thu, K.; Soong, J.; Lin, S.; Tsai, A. H. C.; Osako, T.; Algara, T.; Saunders, D. N.; Wong, J.; Xian, J.; Bally, M. B.; Brenton, J. D.; Brown, G. W.; Shah, S. P.; Cescon, D.; Mak, T. W.; Caldas, C.; Stirling, P. C.; Hieter, P.; Balasubramanian, S.; Aparicio, S. CX-5461 Is a DNA G-Quadruplex Stabilizer with Selective Lethality in BRCA1/2 Deficient Tumours. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 14432. <https://doi.org/10.1038/ncomms14432>.
- (79) Beauvarlet, J.; Bensadoun, P.; Darbo, E.; Labrunie, G.; Rousseau, B.; Richard, E.; Draskovic, I.; Londono-Vallejo, A.; Dupuy, J.-W.; Nath Das, R.; Guédin, A.; Robert, G.; Orange, F.; Croce, S.; Valesco, V.; Soubeyran, P.; Ryan, K. M.; Mergny, J.-L.; Djavaheri-Mergny, M. Modulation of the ATM/Autophagy Pathway by a G-Quadruplex Ligand

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

Tips the Balance between Senescence and Apoptosis in Cancer Cells. *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47 (6), 2739–2756. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz095>.

(80) O. Tucker, W.; T. Shum, K.; A. Tanner, J. G-Quadruplex DNA Aptamers and Their Ligands: Structure, Function and Application. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, 18 (14), 2014–2026. <https://doi.org/10.2174/138161212799958477>.

(81) Tasset, D. M.; Kubik, M. F.; Steiner, W. Oligonucleotide Inhibitors of Human Thrombin That Bind Distinct Epitopes. *J. Mol. Biol.* **1997**, 272 (5), 688–698. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1275>.

(82) Stoltenburg, R.; Krafčíková, P.; Víglaský, V.; Strehlitz, B. G-Quadruplex Aptamer Targeting Protein A and Its Capability to Detect Staphylococcus Aureus Demonstrated by ELONA. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (1), 33812. <https://doi.org/10.1038/srep33812>.

(83) Romanucci, V.; Zarrelli, A.; Di Fabio, G. Hotoda's Sequence and Anti-HIV Activity: Where Are We Now? *Molecules* **2019**, 24 (7), 1417. <https://doi.org/10.3390/molecules24071417>.

(84) Bates, P. J.; Reyes-Reyes, E. M.; Malik, M. T.; Murphy, E. M.; O'Toole, M. G.; Trent, J. O. G-Quadruplex Oligonucleotide AS1411 as a Cancer-Targeting Agent: Uses and Mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2017**, 1861 (5), 1414–1428. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.12.015>.

(85) Roxo, C.; Kotkowiak, W.; Pasternak, A. G-Quadruplex-Forming Aptamers—Characteristics, Applications, and Perspectives. *Molecules* **2019**, 24 (20), 3781. <https://doi.org/10.3390/molecules24203781>.

(86) Platella, C.; Riccardi, C.; Montesarchio, D.; Roviello, G. N.; Musumeci, D. G-Quadruplex-Based Aptamers against Protein Targets in Therapy and Diagnostics. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **2017**, 1861 (5), 1429–1447. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.027>.

(87) Lopes-Nunes, J.; Oliveira, P.; Cruz, C. G-Quadruplex-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Pharmaceuticals* **2021**, 14 (7), 671. <https://doi.org/10.3390/ph14070671>.

(88) Santos, T.; Pereira, P.; Campello, M. P. C.; Paulo, A.; Queiroz, J. A.; Cabrita, E.; Cruz, C. RNA G-Quadruplex as Supramolecular Carrier for Cancer-Selective Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, 142, 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.07.017>.

(89) De Clercq, E.; Li, G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, 29 (3), 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>.

(90) Lavezzo, E.; Berselli, M.; Frasson, I.; Perrone, R.; Palù, G.; Brazzale, A. R.; Richter, S. N.; Toppo, S. G-Quadruplex Forming Sequences in the Genome of All Known Human Viruses: A Comprehensive Guide. *PLOS Comput. Biol.* **2018**, 14 (12), e1006675. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006675>.

(91) Métifiot, M.; Amrane, S.; Litvak, S.; Andreola, M.-L. G-Quadruplexes in Viruses: Function and Potential Therapeutic Applications. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42 (20), 12352–12366. <https://doi.org/10.1093/nar/gku999>.

- (92) Tan, J.; Vonnrhein, C.; Smart, O. S.; Bricogne, G.; Bollati, M.; Kusov, Y.; Hansen, G.; Mesters, J. R.; Schmidt, C. L.; Hilgenfeld, R. The SARS-Unique Domain (SUD) of SARS Coronavirus Contains Two Macrodomains That Bind G-Quadruplexes. *PLoS Pathog.* **2009**, *5* (5), e1000428. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000428>.
- (93) Murat, P.; Zhong, J.; Lekieffre, L.; Cowieson, N. P.; Clancy, J. L.; Preiss, T.; Balasubramanian, S.; Khanna, R.; Tellam, J. G-Quadruplexes Regulate Epstein-Barr Virus-Encoded Nuclear Antigen 1 mRNA Translation. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10* (5), 358–364. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1479>.
- (94) Madireddy, A.; Purushothaman, P.; Loosbroock, C. P.; Robertson, E. S.; Schildkraut, C. L.; Verma, S. C. G-Quadruplex-Interacting Compounds Alter Latent DNA Replication and Episomal Persistence of KSHV. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (8), 3675–3694. <https://doi.org/10.1093/nar/gkwo38>.
- (95) Wang, S.-R.; Min, Y.-Q.; Wang, J.-Q.; Liu, C.-X.; Fu, B.-S.; Wu, F.; Wu, L.-Y.; Qiao, Z.-X.; Song, Y.-Y.; Xu, G.-H.; Wu, Z.-G.; Huang, G.; Peng, N.-F.; Huang, R.; Mao, W.-X.; Peng, S.; Chen, Y.-Q.; Zhu, Y.; Tian, T.; Zhang, X.-L.; Zhou, X. A Highly Conserved G-Rich Consensus Sequence in Hepatitis C Virus Core Gene Represents a New Anti-Hepatitis C Target. *Sci. Adv.* **2016**, *2* (4), e1501535. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501535>.
- (96) Ruggiero, E.; Richter, S. N. G-Quadruplexes and G-Quadruplex Ligands: Targets and Tools in Antiviral Therapy. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (7), 3270–3283. <https://doi.org/10.1093/nar/gky187>.
- (97) Biswas, B.; Kandpal, M.; Vivekanandan, P. A G-Quadruplex Motif in an Envelope Gene Promoter Regulates Transcription and Virion Secretion in HBV Genotype B. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (19), 11268–11280. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx823>.
- (98) Abiri, A.; Lavigne, M.; Rezaei, M.; Nikzad, S.; Zare, P.; Mergny, J.-L.; Rahimi, H.-R. Unlocking G-Quadruplexes as Antiviral Targets. *Pharmacol. Rev.* **2021**, *73* (3), 897–923. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000230>.
- (99) Perrone, R.; Nadai, M.; Frasson, I.; Poe, J. A.; Butovskaya, E.; Smithgall, T. E.; Palumbo, M.; Palù, G.; Richter, S. N. A Dynamic G-Quadruplex Region Regulates the HIV-1 Long Terminal Repeat Promoter. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (16), 6521–6530. <https://doi.org/10.1021/jm400914r>.
- (100) Amrane, S.; Kerkour, A.; Bedrat, A.; Vialet, B.; Andreola, M.-L.; Mergny, J.-L. Topology of a DNA G-Quadruplex Structure Formed in the HIV-1 Promoter: A Potential Target for Anti-HIV Drug Development. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (14), 5249–5252. <https://doi.org/10.1021/ja501500c>.
- (101) Piekna-Przybylska, D.; Sullivan, M. A.; Sharma, G.; Bambara, R. A. U₃ Region in the HIV-1 Genome Adopts a G-Quadruplex Structure in Its RNA and DNA Sequence. *Biochemistry* **2014**, *53* (16), 2581–2593. <https://doi.org/10.1021/bi4016692>.
- (102) De Nicola, B.; Lech, C. J.; Heddi, B.; Regmi, S.; Frasson, I.; Perrone, R.; Richter, S. N.; Phan, A. T. Structure and Possible Function of a G-Quadruplex in the Long Terminal Repeat of the Proviral HIV-1 Genome. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (13), 6442–6451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw432>.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

- (103) Lyonais, S. G-Quartets Assembly within a G-Rich DNA Flap. A Possible Event at the Center of the HIV-1 Genome. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (23), 5276–5283. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf644>.
- (104) Perrone, R.; Nadai, M.; Poe, J. A.; Frasson, I.; Palumbo, M.; Palù, G.; Smithgall, T. E.; Richter, S. N. Formation of a Unique Cluster of G-Quadruplex Structures in the HIV-1 Nef Coding Region: Implications for Antiviral Activity. *PLoS ONE* **2013**, *8* (8), e73121. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073121>.
- (105) Artusi, S.; Nadai, M.; Perrone, R.; Biasolo, M. A.; Palù, G.; Flamand, L.; Calistri, A.; Richter, S. N. The Herpes Simplex Virus-1 Genome Contains Multiple Clusters of Repeated G-Quadruplex: Implications for the Antiviral Activity of a G-Quadruplex Ligand. *Antiviral Res.* **2015**, *118*, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.016>.
- (106) Lan, K.; Luo, M.-H. Herpesviruses: Epidemiology, Pathogenesis, and Interventions. *Virol. Sin.* **2017**, *32* (5), 347–348. <https://doi.org/10.1007/s12250-017-4108-2>.
- (107) Dabral, P.; Babu, J.; Zareie, A.; Verma, S. C. LANA and HnRNP A1 Regulate the Translation of LANA mRNA through G-Quadruplexes. *J. Virol.* **2020**, *94* (3). <https://doi.org/10.1128/JVI.01508-19>.
- (108) Tellam, J. T.; Zhong, J.; Lekieffre, L.; Bhat, P.; Martinez, M.; Croft, N. P.; Kaplan, W.; Tellam, R. L.; Khanna, R. mRNA Structural Constraints on EBNA1 Synthesis Impact on In Vivo Antigen Presentation and Early Priming of CD8+ T Cells. *PLoS Pathog.* **2014**, *10* (10), e1004423. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004423>.
- (109) Norseen, J.; Johnson, F. B.; Lieberman, P. M. Role for G-Quadruplex RNA Binding by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 in DNA Replication and Metaphase Chromosome Attachment. *J. Virol.* **2009**, *83* (20), 10336–10346. <https://doi.org/10.1128/JVI.00747-09>.
- (110) Gilbert-Girard, S.; Gravel, A.; Artusi, S.; Richter, S. N.; Wallaschek, N.; Kaufer, B. B.; Flamand, L. Stabilization of Telomere G-Quadruplexes Interferes with Human Herpesvirus 6A Chromosomal Integration. *J. Virol.* **2017**, *91* (14). <https://doi.org/10.1128/JVI.00402-17>.
- (111) Puig Lombardi, E. P.; Londoño-Vallejo, A.; Nicolas, A. Relationship Between G-Quadruplex Sequence Composition in Viruses and Their Hosts. *Molecules* **2019**, *24* (10), 1942. <https://doi.org/10.3390/molecules24101942>.
- (112) Martino, L.; Virno, A.; Pagano, B.; Virgilio, A.; Di Micco, S.; Galeone, A.; Giancola, C.; Bifulco, G.; Mayol, L.; Randazzo, A. Structural and Thermodynamic Studies of the Interaction of Distamycin A with the Parallel Quadruplex Structure [d(TGGGGT)]₄. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (51), 16048–16056. <https://doi.org/10.1021/ja075710k>.
- (113) Hamon, F.; Largy, E.; Guédin-Beaurepaire, A.; Rouchon-Dagois, M.; Sidibe, A.; Monchaud, D.; Mergny, J.-L.; Riou, J.-F.; Nguyen, C.-H.; Teulade-Fichou, M.-P. An Acyclic Oligoheteroaryle That Discriminates Strongly between Diverse G-Quadruplex Topologies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (37), 8745–8749. <https://doi.org/10.1002/anie.201103422>.
- (114) Sun, Z.-Y.; Wang, X.-N.; Cheng, S.-Q.; Su, X.-X.; Ou, T.-M. Developing Novel G-Quadruplex Ligands: From Interaction with Nucleic Acids to Interfering with Nucleic Acid–Protein Interaction. *Molecules* **2019**, *24* (3), 396. <https://doi.org/10.3390/molecules24030396>.

- (115) Santos, T.; Salgado, G. F.; Cabrita, E. J.; Cruz, C. G-Quadruplexes and Their Ligands: Biophysical Methods to Unravel G-Quadruplex/Ligand Interactions. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (8), 769. <https://doi.org/10.3390/ph14080769>.
- (116) Shan, C.; Tan, J.-H.; Ou, T.-M.; Huang, Z.-S. Natural Products and Their Derivatives as G-Quadruplex Binding Ligands. *Sci. China Chem.* **2013**, *56* (10), 1351–1363. <https://doi.org/10.1007/s11426-013-4920-y>.
- (117) Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B. E.; Salazar, M.; Kerwin, S. M.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Hurley, L. H. Inhibition of Human Telomerase by a G-Quadruplex-Interactive Compound. *J. Med. Chem.* **1997**, *40* (14), 2113–2116. <https://doi.org/10.1021/jm970199z>.
- (118) Read, M. A.; Wood, A. A.; Harrison, J. R.; Gowan, S. M.; Kelland, L. R.; Dosanjh, H. S.; Neidle, S. Molecular Modeling Studies on G-Quadruplex Complexes of Telomerase Inhibitors: Structure–Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **1999**, *42* (22), 4538–4546. <https://doi.org/10.1021/jm990287e>.
- (119) Campbell, N. H.; Parkinson, G. N.; Reszka, A. P.; Neidle, S. Structural Basis of DNA Quadruplex Recognition by an Acridine Drug. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (21), 6722–6724. <https://doi.org/10.1021/ja8016973>.
- (120) Neidle, S.; Harrison, J. R.; Kelland, L. R.; Gowan, S. M.; Read, M.; Reszka, T. Preparation of Bis(Aminoalkanamido)Acridine-9-Amines and Analogs as Telomerase Inhibitors. WO2002008193, January 31, 2002.
- (121) Gowan, S. M.; Harrison, J. R.; Patterson, L.; Valenti, M.; Read, M. A.; Neidle, S.; Kelland, L. R. A G-Quadruplex-Interactive Potent Small-Molecule Inhibitor of Telomerase Exhibiting in Vitro and in Vivo Antitumor Activity. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61* (5), 1154–1162. <https://doi.org/10.1124/mol.61.5.1154>.
- (122) Burger, A. M.; Dai, F.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J.; Double, J. A.; Neidle, S. The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function. *Cancer Res.* **2005**, *65* (4), 1489–1496. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2910>.
- (123) Perrone, R.; Butovskaya, E.; Daelemans, D.; Palu, G.; Pannecouque, C.; Richter, S. N. Anti-HIV-1 Activity of the G-Quadruplex Ligand BRACO-19. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69* (12), 3248–3258. <https://doi.org/10.1093/jac/dku280>.
- (124) Han, H.; Cliff, C. L.; Hurley, L. H. Accelerated Assembly of G-Quadruplex Structures by a Small Molecule. *Biochemistry* **1999**, *38* (22), 6981–6986. <https://doi.org/10.1021/bi9905922>.
- (125) Fedoroff, O. Yu.; Salazar, M.; Han, H.; Chemeris, V. V.; Kerwin, S. M.; Hurley, L. H. NMR-Based Model of a Telomerase-Inhibiting Compound Bound to G-Quadruplex DNA. *Biochemistry* **1998**, *37* (36), 12367–12374. <https://doi.org/10.1021/bi981330n>.
- (126) Kern, J. T.; Kerwin, S. M. The Aggregation and G-Quadruplex DNA Selectivity of Charged 3,4,9,10-Perylenetetracarboxylic Acid Diimides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (23), 3395–3398. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00763-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00763-1).

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

- (127) Sissi, C.; Lucatello, L.; Paul Krapcho, A.; Maloney, D. J.; Boxer, M. B.; Camarasa, M. V.; Pezzoni, G.; Menta, E.; Palumbo, M. Tri-, Tetra- and Heptacyclic Perylene Analogues as New Potential Antineoplastic Agents Based on DNA Telomerase Inhibition. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (1), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.09.029>.
- (128) Samudrala, R.; Zhang, X.; Wadkins, R. M.; Mattern, D. L. Synthesis of a Non-Cationic, Water-Soluble Perylenetetracarboxylic Diimide and Its Interactions with G-Quadruplex-Forming DNA. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (1), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.09.075>.
- (129) Yen, S. F.; Gabbay, E. J.; Wilson, W. D. Interaction of Aromatic Imides with DNA. 1. Spectrophotometric and Viscometric Studies. *Biochemistry* **1982**, *21* (9), 2070–2076. <https://doi.org/10.1021/bio0538a014>.
- (130) Cuenca, F.; Greciano, O.; Gunaratnam, M.; Haider, S.; Munnur, D.; Nanjunda, R.; Wilson, W. D.; Neidle, S. Tri- and Tetra-Substituted Naphthalene Diimides as Potent G-Quadruplex Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (5), 1668–1673. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.01.050>.
- (131) Hampel, S. M.; Sidibe, A.; Gunaratnam, M.; Riou, J.-F.; Neidle, S. Tetrasubstituted Naphthalene Diimide Ligands with Selectivity for Telomeric G-Quadruplexes and Cancer Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (22), 6459–6463. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.066>.
- (132) Collie, G. W.; Promontorio, R.; Hampel, S. M.; Micco, M.; Neidle, S.; Parkinson, G. N. Structural Basis for Telomeric G-Quadruplex Targeting by Naphthalene Diimide Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (5), 2723–2731. <https://doi.org/10.1021/ja2102423>.
- (133) Perrone, R.; Doria, F.; Butovskaya, E.; Frasson, I.; Botti, S.; Scalabrin, M.; Lago, S.; Grande, V.; Nadai, M.; Freccero, M.; Richter, S. N. Synthesis, Binding and Antiviral Properties of Potent Core-Extended Naphthalene Diimides Targeting the HIV-1 Long Terminal Repeat Promoter G-Quadruplexes. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (24), 9639–9652. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01283>.
- (134) Callegaro, S.; Perrone, R.; Scalabrin, M.; Doria, F.; Palù, G.; Richter, S. N. A Core Extended Naphthalene Diimide G-Quadruplex Ligand Potently Inhibits Herpes Simplex Virus 1 Replication. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 2341. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02667-3>.
- (135) Riou, J. F.; Guittat, L.; Mailliet, P.; Laoui, A.; Renou, E.; Petitgenet, O.; Megnin-Chanet, F.; Helene, C.; Mergny, J. L. Cell Senescence and Telomere Shortening Induced by a New Series of Specific G-Quadruplex DNA Ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* **2002**, *99* (5), 2672–2677. <https://doi.org/10.1073/pnas.052698099>.
- (136) Lemarteleur, T.; Gomez, D.; Paterski, R.; Mandine, E.; Mailliet, P.; Riou, J.-F. Stabilization of the C-Myc Gene Promoter Quadruplex by Specific Ligands' Inhibitors of Telomerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *323* (3), 802–808. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.150>.
- (137) Pennarun, G.; Granotier, C.; Gauthier, L. R.; Gomez, D.; Hoffschir, F.; Mandine, E.; Riou, J.-F.; Mergny, J.-L.; Mailliet, P.; Boussin, F. D. Apoptosis Related to Telomere Instability and Cell Cycle Alterations in Human Glioma Cells Treated by New Highly Selective G-Quadruplex Ligands. *Oncogene* **2005**, *24* (18), 2917–2928. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208468>.

- (138) Rodriguez, R.; Müller, S.; Yeoman, J. A.; Trentesaux, C.; Riou, J.-F.; Balasubramanian, S. A Novel Small Molecule That Alters Shelterin Integrity and Triggers a DNA-Damage Response at Telomeres. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (47), 15758–15759. <https://doi.org/10.1021/ja805615w>.
- (139) Müller, S.; Kumari, S.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S. Small-Molecule-Mediated G-Quadruplex Isolation from Human Cells. *Nat. Chem.* **2010**, *2* (12), 1095–1098. <https://doi.org/10.1038/nchem.842>.
- (140) Reznichenko, O.; Quillévéré, A.; Martins, R. P.; Loaëc, N.; Kang, H.; Lista, M. J.; Beauvineau, C.; González-García, J.; Guillot, R.; Voisset, C.; Daskalogianni, C.; Fähræus, R.; Teulade-Fichou, M.-P.; Blondel, M.; Granzhan, A. Novel Cationic Bis(Acylhydrazones) as Modulators of Epstein–Barr Virus Immune Evasion Acting through Disruption of Interaction between Nucleolin and G-Quadruplexes of EBNA1 mRNA. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *178*, 13–29. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.042>.
- (141) Thota, S.; Rodrigues, D. A.; Pinheiro, P. de S. M.; Lima, L. M.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. N-Acylhydrazones as Drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28* (17), 2797–2806. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.07.015>.
- (142) De Cian, A.; DeLemos, E.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Monchaud, D. Highly Efficient G-Quadruplex Recognition by Bisquinolinium Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (7), 1856–1857. <https://doi.org/10.1021/jao67352b>.
- (143) Chung, W. J.; Heddi, B.; Hamon, F.; Teulade-Fichou, M.-P.; Phan, A. T. Solution Structure of a G-Quadruplex Bound to the Bisquinolinium Compound Phen-DC₃. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (4), 999–1002. <https://doi.org/10.1002/anie.201308063>.
- (144) Adrian, M.; Heddi, B.; Phan, A. T. NMR Spectroscopy of G-Quadruplexes. *Methods* **2012**, *57* (1), 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.05.003>.
- (145) Vorlíčková, M.; Kejnovská, I.; Bednářová, K.; Renčiuk, D.; Kypr, J. Circular Dichroism Spectroscopy of DNA: From Duplexes to Quadruplexes: CD SPECTROSCOPY OF DNA. *Chirality* **2012**, *24* (9), 691–698. <https://doi.org/10.1002/chir.22064>.
- (146) Marchand, A.; Granzhan, A.; Iida, K.; Tsushima, Y.; Ma, Y.; Nagasawa, K.; Teulade-Fichou, M.-P.; Gabelica, V. Ligand-Induced Conformational Changes with Cation Ejection upon Binding to Human Telomeric DNA G-Quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (2), 750–756. <https://doi.org/10.1021/ja5099403>.
- (147) Carvalho, J.; Queiroz, J. A.; Cruz, C. Circular Dichroism of G-Quadruplex: A Laboratory Experiment for the Study of Topology and Ligand Binding. *J. Chem. Educ.* **2017**, *94* (10), 1547–1551. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00160>.
- (148) Ma, Y.; Iida, K.; Nagasawa, K. Topologies of G-Quadruplex: Biological Functions and Regulation by Ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *531* (1), 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.103>.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

- (149) Mergny, J. L.; Maurizot, J. C. Fluorescence Resonance Energy Transfer as a Probe for G-Quartet Formation by a Telomeric Repeat. *ChemBioChem* **2001**, 2 (2), 124–132. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20010202\)2:2<124::AID-CBIC124>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20010202)2:2<124::AID-CBIC124>3.0.CO;2-L).
- (150) Monchaud, D.; Allain, C.; Teulade-Fichou, M.-P. Development of a Fluorescent Intercalator Displacement Assay (G₄-FID) for Establishing Quadruplex-DNA Affinity and Selectivity of Putative Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16 (18), 4842–4845. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.06.067>.
- (151) Smith, J. S.; Johnson, F. B. Isolation of G-Quadruplex DNA Using NMM-Sepharose Affinity Chromatography. In *G-Quadruplex DNA*; Baumann, P., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2010; Vol. 608, pp 207–221. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-363-9_13.
- (152) Musumeci, D.; Amato, J.; Randazzo, A.; Novellino, E.; Giancola, C.; Montesarchio, D.; Pagano, B. G-Quadruplex on Oligo Affinity Support (G₄-OAS): An Easy Affinity Chromatography-Based Assay for the Screening of G-Quadruplex Ligands. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (9), 4126–4130. <https://doi.org/10.1021/ac500444m>.
- (153) Wheelhouse, R. T.; Sun, D.; Han, H.; Han, F. X.; Hurley, L. H. Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: The Interaction of Tetra-(*N*-Methyl-4-Pyridyl)Porphine with Quadruplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120 (13), 3261–3262. <https://doi.org/10.1021/ja973792e>.
- (154) Pagano, B.; Mattia, C. A.; Giancola, C. Applications of Isothermal Titration Calorimetry in Biophysical Studies of G-Quadruplexes. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, 10 (7), 2935–2957. <https://doi.org/10.3390/ijms10072935>.
- (155) Mender, I.; Shay, J. Telomerase Repeated Amplification Protocol (TRAP). *BIO-Protoc.* **2015**, 5 (22). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1657>.
- (156) Gomez, D.; Mergny, J.-L.; Riou, J.-F. Detection of Telomerase Inhibitors Based on G-Quadruplex Ligands by a Modified Telomeric Repeat Amplification Protocol Assay. *Cancer Res.* **2002**, 62 (12), 5.
- (157) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature of Electron-Transfer Proteins. Recommendations 1989. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267 (1), 665–677. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48544-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48544-4).
- (158) Carrenho, L. Z. B.; Moreira, C. G.; Vandresen, C. C.; Gomes, R.; Gonçalves, A. G.; Barreira, S. M. W.; Nosedá, M. D.; Duarte, M. E. R.; Ducatti, D. R. B.; Dietrich, M.; Paludo, K.; Cabrini, D. A.; Otuki, M. F. Investigation of Anti-Inflammatory and Anti-Proliferative Activities Promoted by Photoactivated Cationic Porphyrin. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2015**, 12 (3), 444–458. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.05.003>.
- (159) Marotti, J.; Aranha, A. C. C.; Eduardo, C. D. P.; Ribeiro, M. S. Photodynamic Therapy Can Be Effective as a Treatment for Herpes Simplex Labialis. *Photomed. Laser Surg.* **2009**, 27 (2), 357–363. <https://doi.org/10.1089/pho.2008.2268>.
- (160) Kou, J.; Dou, D.; Yang, L. Porphyrin Photosensitizers in Photodynamic Therapy and Its Applications. *Oncotarget* **2017**, 8 (46), 81591–81603. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20189>.

- (161) Lin, Y.; Zhou, T.; Bai, R.; Xie, Y. Chemical Approaches for the Enhancement of Porphyrin Skeleton-Based Photodynamic Therapy. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35* (1), 1080–1099. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1755669>.
- (162) Bera, K.; Maiti, S.; Maity, M.; Mandal, C.; Maiti, N. C. Porphyrin–Gold Nanomaterial for Efficient Drug Delivery to Cancerous Cells. *ACS Omega* **2018**, *3* (4), 4602–4619. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00419>.
- (163) Hu, D.; Liu, Y.; Lai, Y.-T.; Tong, K.-C.; Fung, Y.-M.; Lok, C.-N.; Che, C.-M. Anticancer Gold(III) Porphyrins Target Mitochondrial Chaperone Hsp60. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55* (4), 1387–1391. <https://doi.org/10.1002/anie.201509612>.
- (164) Nishida, K.; Tojo, T.; Kondo, T.; Yuasa, M. Evaluation of the Correlation between Porphyrin Accumulation in Cancer Cells and Functional Positions for Application as a Drug Carrier. *Sci. Rep.* **2021**, *11* (1), 2046. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81725-3>.
- (165) Sengupta, D.; Timilsina, U.; Mazumder, Z. H.; Mukherjee, A.; Ghimire, D.; Markandey, M.; Upadhyaya, K.; Sharma, D.; Mishra, N.; Jha, T.; Basu, S.; Gaur, R. Dual Activity of Amphiphilic Zn(II) Nitroporphyrin Derivatives as HIV-1 Entry Inhibitors and in Cancer Photodynamic Therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *174*, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.051>.
- (166) Tong, K.-C.; Hu, D.; Wan, P.-K.; Lok, C.-N.; Che, C.-M. Anticancer Gold(III) Compounds With Porphyrin or N-Heterocyclic Carbene Ligands. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 587207. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.587207>.
- (167) Tong, K.-C.; Lok, C.-N.; Wan, P.-K.; Hu, D.; Fung, Y. M. E.; Chang, X.-Y.; Huang, S.; Jiang, H.; Che, C.-M. An Anticancer Gold(III)-Activated Porphyrin Scaffold That Covalently Modifies Protein Cysteine Thiols. *Proc Natl Acad Sci USA* **2020**, *117* (3), 1321–1329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915202117>.
- (168) Wang, Y.; He, Q.-Y.; Sun, R. W.-Y.; Che, C.-M.; Chiu, J.-F. Gold(III) Porphyrin 1a Induced Apoptosis by Mitochondrial Death Pathways Related to Reactive Oxygen Species. *Cancer Res.* **2005**, *65* (24), 11553–11564. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2867>.
- (169) Vzorov, A. N.; Dixon, D. W.; Trommel, J. S.; Marzilli, L. G.; Compans, R. W. Inactivation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Porphyrins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (12), 3917–3925. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.3917-3925.2002>.
- (170) Song, R.; Witvrouw, M.; Schols, D.; Robert, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Bemadou, J.; Meunier, B. Anti-HIV Activities of Anionic Metalloporphyrins and Related Compounds. *Antivir. Chem. Chemother.* **1997**, *8* (2), 85–97. <https://doi.org/10.1177/095632029700800202>.
- (171) Wen, W.-H.; Lin, M.; Su, C.-Y.; Wang, S.-Y.; Cheng, Y.-S. E.; Fang, J.-M.; Wong, C.-H. Synergistic Effect of Zanamivir–Porphyrin Conjugates on Inhibition of Neuraminidase and Inactivation of Influenza Virus. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (15), 4903–4910. <https://doi.org/10.1021/jm900515g>.

CHAPITRE 1

Introduction Bibliographique

- (172) Guo, H.; Pan, X.; Mao, R.; Zhang, X.; Wang, L.; Lu, X.; Chang, J.; Guo, J.-T.; Passic, S.; Krebs, F. C.; Wigdahl, B.; Warren, T. K.; Retterer, C. J.; Bavari, S.; Xu, X.; Cuconati, A.; Block, T. M. Alkylated Porphyrins Have Broad Antiviral Activity against Hepadnaviruses, Flaviviruses, Filoviruses, and Arenaviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55* (2), 478–486. <https://doi.org/10.1128/AAC.00989-10>.
- (173) Romera, C.; Bombarde, O.; Bonnet, R.; Gomez, D.; Dumy, P.; Calsou, P.; Gwan, J.-F.; Lin, J.-H.; Defrancq, E.; Pratviel, G. Improvement of Porphyrins for G-Quadruplex DNA Targeting. *Biochimie* **2011**, *93* (8), 1310–1317. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.008>.
- (174) Dejeu, J.; Lavergne, T.; Nora, J. D.; Defrancq, E.; Pratviel, G. Binding of Metalloporphyrins to G-Quadruplex DNA: The Role of the Central Metal. *Inorganica Chim. Acta* **2016**, *452*, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.02.007>.
- (175) Sabater, L.; Nicolau-Travers, M.-L.; De Rache, A.; Prado, E.; Dejeu, J.; Bombarde, O.; Lacroix, J.; Calsou, P.; Defrancq, E.; Mergny, J.-L.; Gomez, D.; Pratviel, G. The Nickel(II) Complex of Guanidinium Phenyl Porphyrin, a Specific G-Quadruplex Ligand, Targets Telomeres and Leads to POT1 Mislocalization in Culture Cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20* (4), 729–738. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1260-8>.
- (176) Sabater, L.; Fang, P.-J.; Chang, C.-F.; Dejeu, J.; Garofalo, A.; Lin, J.-H.; Mergny, J.-L.; Defrancq, E.; Pratviel, G. Cobalt(III)Porphyrin to Target G-Quadruplex DNA. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 3701.
- (177) Romera, C.; Sabater, L.; Garofalo, A.; M. Dixon, I.; Pratviel, G. Interaction of Cationic Nickel and Manganese Porphyrins with the Minor Groove of DNA. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (18), 8558–8567. <https://doi.org/10.1021/ic101178n>.
- (178) Pipier, A.; De Rache, A.; Modeste, C.; Amrane, S.; Mothes-Martin, E.; Stigliani, J.-L.; Calsou, P.; Mergny, J.-L.; Pratviel, G.; Gomez, D. G-Quadruplex Binding Optimization by Gold(III) Insertion into the Center of a Porphyrin. *Dalton Trans.* **2019**, *48* (18), 6091–6099. <https://doi.org/10.1039/C8DT04703K>.
- (179) Amrane, Samir; Andreola Marie-Aline; Pratviel Geneviève; Mergny Jean-Louis. Derivatives of Porphyrins, Their Process of Preparation and Their Use for Treating Antiviral Infections. WO2017072319 A1, May 4, 2017.
- (180) Amrane, S.; Jaubert, C.; Bedrat, A.; Guédin, A.; Andreola, M.-L. Deciphering RNA G-Quadruplex Function during the Early Steps of HIV-1 Infection. *Submitted* **2021**.
- (181) Butovskaya, E.; Soldà, P.; Scalabrin, M.; Nadai, M.; Richter, S. N. HIV-1 Nucleocapsid Protein Unfolds Stable RNA G-Quadruplexes in the Viral Genome and Is Inhibited by G-Quadruplex Ligands. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5* (12), 2127–2135. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.gb00272>.
- (182) Butovskaya, E.; Soldà, P.; Scalabrin, M.; Nadai, M.; Richter, S. N. HIV-1 Nucleocapsid Protein Unfolds Stable RNA G-Quadruplexes in the Viral Genome and Is Inhibited by G-Quadruplex Ligands. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5* (12), 2127–2135. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.gb00272>.

CHAPITRE 2

FONCTIONNALISATION DE LA PORPHYRINE D'OR ANTIVIRALE AUMA EN VUE DE L'ACCROCHAGE COVALENT D'UNE BIOTINE

I. Introduction

L'un des objectifs de la thèse est de fournir un outil moléculaire destiné à l'étude *in cellulo* du mécanisme d'action des porphyrines antivirales sur le virus VIH-1. Ce travail est réalisé en collaboration avec le Docteur. Samir Amrane, Institut Européen de Chimie et Biologie, Pessac et le Docteur. Marie-Line Andreola, Laboratoire Microbiologie fondamentale et pathogénicité, Université de Bordeaux. Les travaux envisagés consistent en un « pull-down » des G₄ potentiellement ciblés par les porphyrines antivirales. Cette sonde moléculaire doit comporter deux parties. La première consistera en une entité porphyrine de structure la plus proche possible par rapport à une porphyrine ayant montré une activité antivirale afin qu'elle se lie au G₄ potentiellement impliqué dans le mécanisme de la rétro transcription¹. La deuxième partie de la sonde consistera en un « tag » de purification.

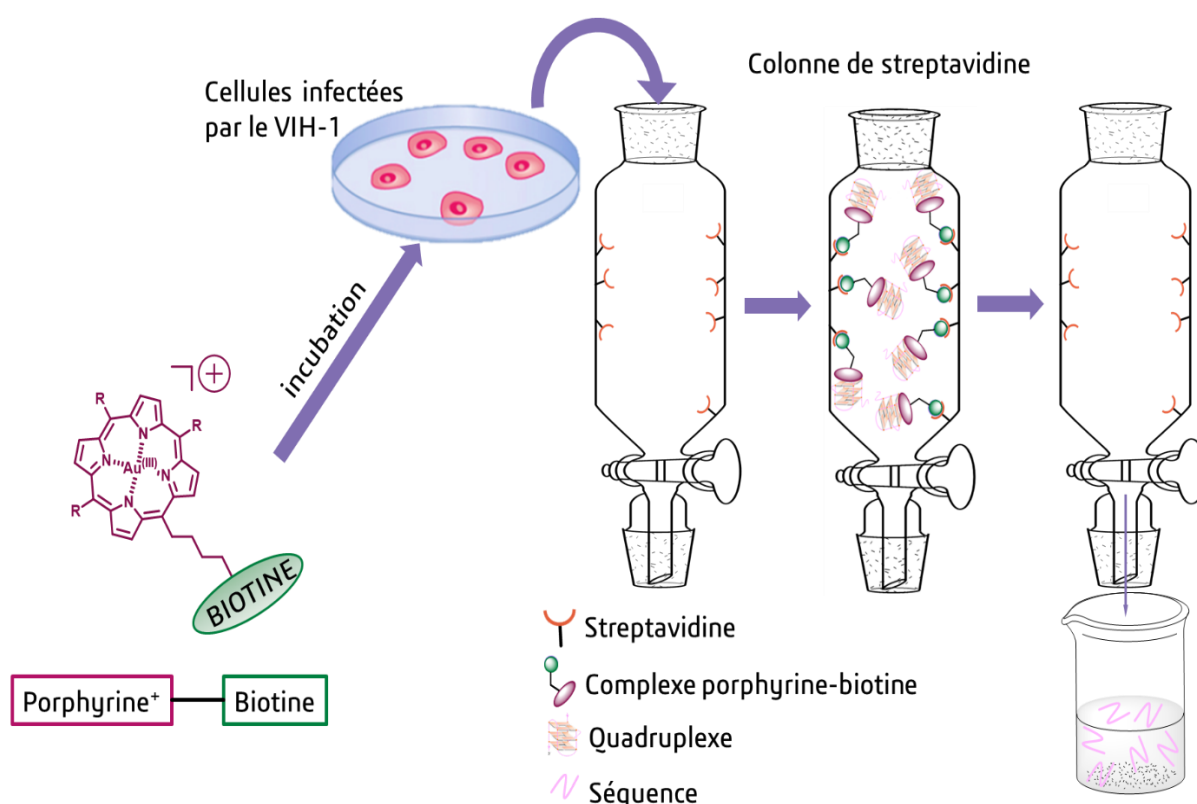


Figure 1 : Purification du milieu biologique avec récupération de la séquence cible par colonne d'affinité recouverte de streptavidine. La séquence cible sera liée à la porphyrine fonctionnalisée avec une biotine.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

Nous l'avons vu précédemment, les porphyrines cationiques sont d'excellents ligands de G4 et en particulier la porphyrine **AuMA**². Cette porphyrine présente une affinité pour les G4 ($K_D < 50$ nM) et une activité antivirale ($IC_{50} = 390$ nM pour l'inhibition de la réplication du virus VIH-1 sur cellules humaines) remarquables³, ce qui en fait un hameçon de choix. Elle a en effet été optimisée tant au niveau de la longueur des bras *meso* que du nombre de charges, l'atome d'or central augmentant significativement l'affinité par rapport aux porphyrines non métallées³. Il a donc été décidé de synthétiser une porphyrine d'or(III) analogue à **AuMA** portant un bras modifié pour l'accrochage de la seconde partie. Il s'agira donc d'une porphyrine de type A₃B.

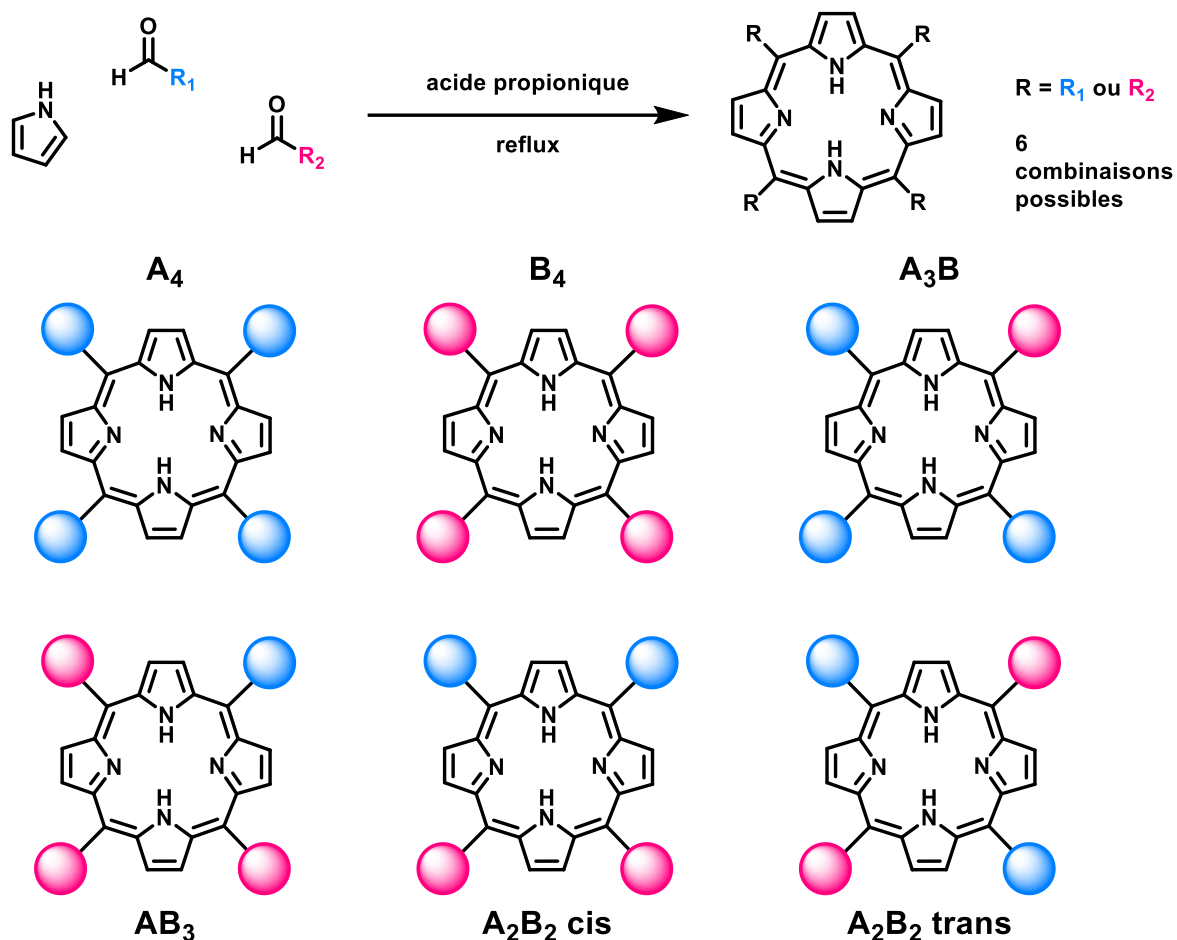


Schéma 1 : Synthèse classique de porphyrine selon Adler et Longo¹³.

Pour la deuxième partie de la sonde il a été envisagé d'attacher une biotine à la porphyrine. La biotine servira à isoler le composé porphyrine lié à sa cible après un passage du milieu biologique sur une colonne d'affinité recouverte de streptavidine. La biotine possède une constante d'affinité pour la streptavidine de l'ordre de 10^{15} M⁻¹ (**Figure 1**). De plus, diverses biotines fonctionnalisées existent dans le commerce offrant ainsi plusieurs options de conjugaison (biotine COOH, biotine NH₂, biotine hydrazide, etc.).

La fonctionnalisation directe d'un seul des substituants *meso* de la porphyrine **AuMA** par mono-alkylation a été écartée. En effet, une gêne stérique due à la position de l'atome d'azote en position 2 des pyridines ne serait pas favorable à une bonne orientation de la biotine. Une porphyrine comportant une entité biotine sur un substituant *meso*

ne présentant pas de charge positive pourrait être préparée. Il s'agirait d'une porphyrine dissymétrique de type A₃B dont le bras B ne porterait pas de charge positive. Cependant, il est déjà connu que le nombre de charges positives est d'une importance capitale pour une bonne affinité pour les G₄⁴⁻⁷. Bien que cette chimie ait déjà été pratiquée dans le groupe^{8,9} (**Schéma 1**), nous avons décidé de privilégier une chimie qui introduise une charge positive sur le « bras » biotinylé. Le conjugué porphyrine-biotine visé remplira donc le cahier des charges suivant : un atome d'or(III) central, trois bras *meso* de type (*N*-methylpyridinium-2-yl)phenyl (type « MA ») et un bras chargé positivement permettant l'accrochage covalent d'une biotine. Le **Schéma 2** représente le composé attendu, la boule rouge représentant le lien entre la porphyrine et la biotine.

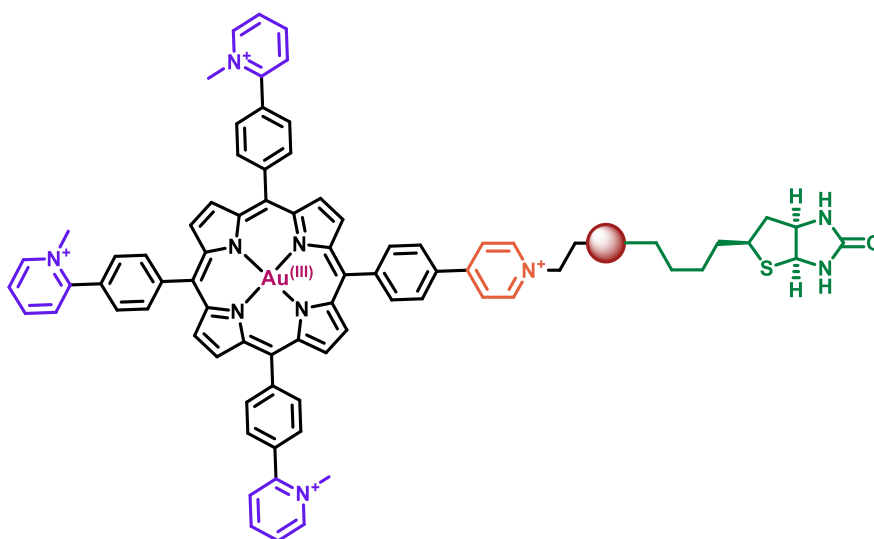


Schéma 2 : Représentation du composé biotinylé final.

La première idée considérée consistait en le remplacement d'une des 2-pyridine d'**AuMA** par une 4-pyridine. On espère ainsi réaliser une fonctionnalisation unique de la porphyrine sur l'azote de la seule 4-pyridine, plus accessible. Le problème d'orientation du bras biotinylé, vers l'extérieur du motif porphyrine, serait également résolu. La monoalkylation d'une porphyrine portant des 4-pyridine a déjà été réalisée¹⁰. D'autre part, les aldéhydes correspondants 4-(pyridin-2-yl)benzaldéhyde et 4-(pyridin-4-yl)benzaldéhyde sont disponibles commercialement.

Cependant, la molécule attendue (**Schéma 3**, composé **5**) présente un inconvénient en termes de purification. En effet, le peu de différence structurale entre les différents produits de synthèse de la porphyrine dissymétrique (4-pyridine versus 2-pyridine) (**Schéma 1**) constituerait un obstacle à la purification déjà difficile d'un mélange de porphyrines.

Il a donc été décidé de passer par un intermédiaire, toujours du type A₃B, dont le bras B serait un bras bromophenyl qui, en plus de permettre par la suite plusieurs types de réactions de couplage, devrait conduire à un dérivé A₃B plus facile à isoler par chromatographie (**Schéma 3**, composé **4**). Ce composé, par couplage de Suzuki-Miyaura avec un dérivé acide boronique porteur d'une 4-pyridine pour l'accrochage de la biotine, nous permettrait d'obtenir la molécule présentée sur le **Schéma 3**. Cette molécule serait engagée dans une mono fonctionnalisation permettant l'accrochage d'une fonction X compatible avec l'accrochage covalent d'une biotine fonctionnalisée (**Schéma 4**). La biotine que nous avons choisie pour ces travaux est un sel de biotine-NH₂.TFA commerciale. Pour réaliser la liaison entre la porphyrine

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

et ce dérivé biotine, un lien peptidique est proposé. La fonctionnalisation de la porphyrine se ferait donc avec une chaîne carbonée comportant à son extrémité une fonction X = acide carboxylique. Ce dérivé a été synthétisé et nous verrons que le chemin qui a mené à ce résultat n'était pas aussi simple que nous l'avions espéré.

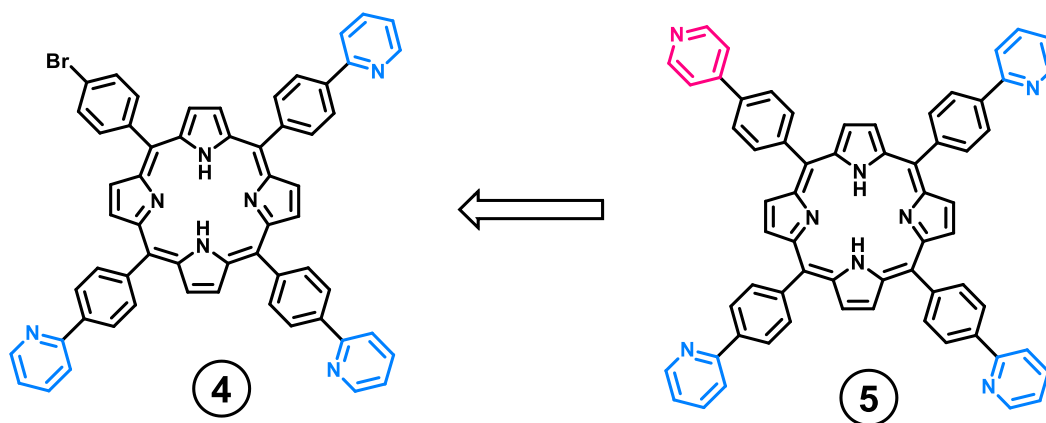


Schéma 3 : Représentation de la porphyrine désirée 5 ainsi que du précurseur choisi 4.

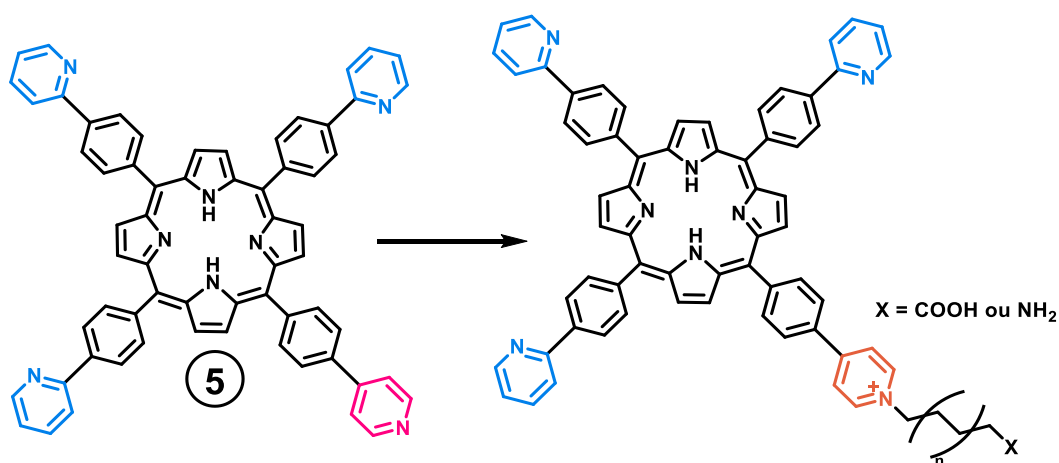


Schéma 4 : Représentation du précurseur A₃B en vue de l'accrochage d'une biotine.

II. Principes généraux de synthèse des porphyrines

II. 1. Méthode dite « *mixed aldehydes* » et mécanisme

La synthèse de porphyrines a été décrite pour la première fois en 1936 par Paul Rothmund^{11,12}. Elle a ensuite été améliorée par Adler et Longo qui réalisent la synthèse non pas dans de la pyridine mais dans de l'acide propionique et à l'air libre, ce qui augmente le rendement d'obtention d'une porphyrine symétrique de 9% à 20%^{13,14}. Leurs synthèses seront reprises et améliorées par Lindsey¹⁵ dans les années 80 en employant des conditions douces et le recours à des catalyseurs de type acide de Lewis ainsi que l'ajout d'un oxydant pour passer du porphyrinogène à la porphyrine. Dans

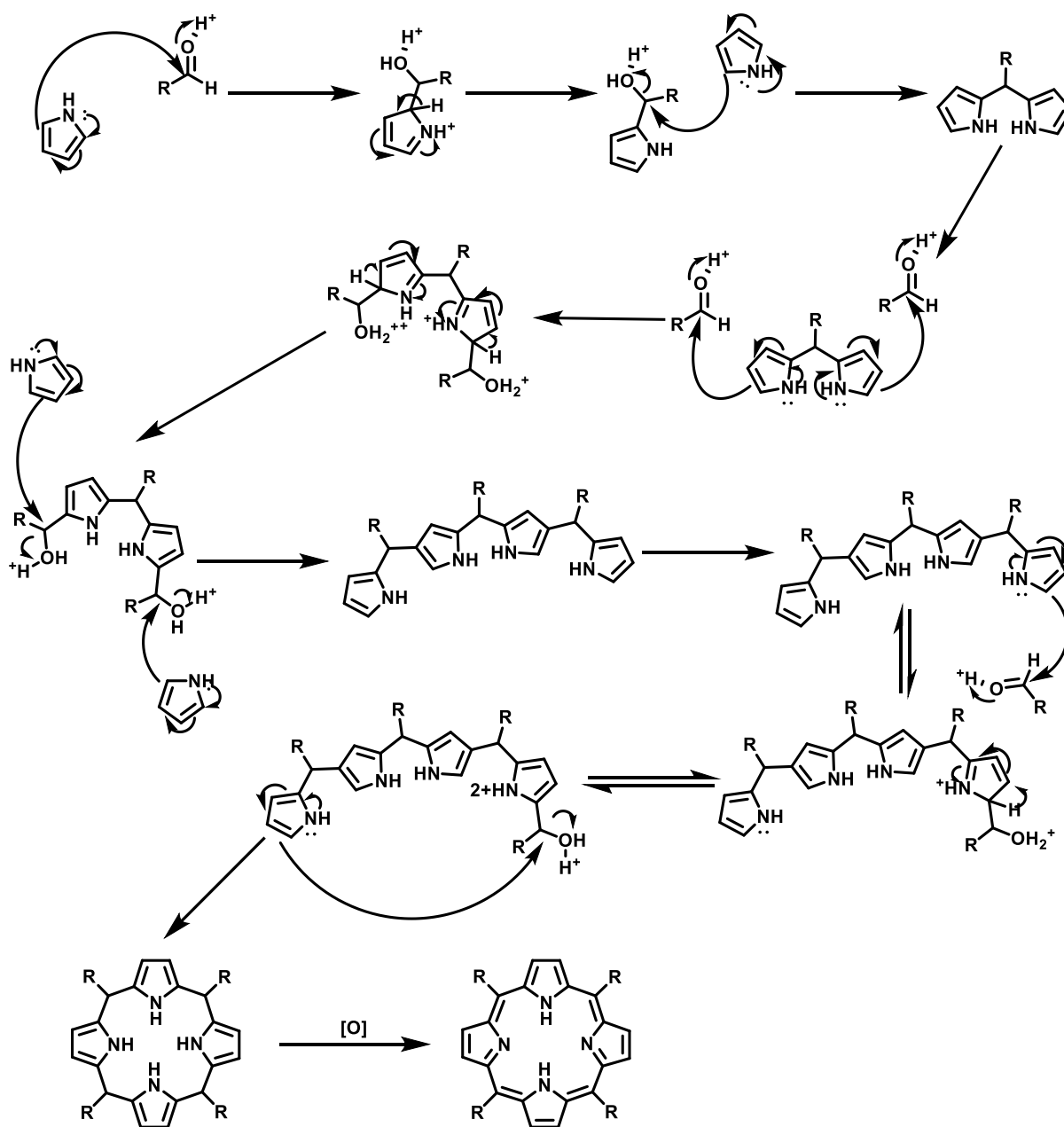


Schéma 5 : Mécanisme proposé de la réaction de synthèse d'une porphyrine.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

tous les cas, la synthèse d'une porphyrine requiert l'usage de pyrrole et du ou des aldéhydes correspondants. Un potentiel mécanisme réactionnel est décrit sur le **Schéma 5**.

Cependant, malgré une amélioration du rendement, la méthode reste peu efficace lorsque la synthèse requiert des aldéhydes multiples dans le cas d'une porphyrine asymétrique. Lorsque l'on utilise deux aldéhydes A et B, le nombre de porphyrines générées est de six : les porphyrines symétriques A₄ et B₄, les 3/1 A₃B et AB₃, les 2/2 A₂B₂ *cis* et *trans* (**Schéma 5**). Les rendements chutent donc d'autant plus. Dans le cas qui nous intéresse, c'est-à-dire la synthèse d'une porphyrine A₃B, nous avons préféré suivre la méthode de Lindsey¹⁶. Cette dernière fait appel à un composé intermédiaire, le dipyrrométhane, ce qui permet de limiter le nombre de sous-produits générés. Le recours à un dipyrrométhane constitué du bras majoritaire ainsi que de deux aldéhydes A et B ne conduit à l'obtention que deux trois composés : A₄, A₃B et A₂B₂ *trans*, l'obtention du composé A₂B₂ *cis* n'étant pas possible (**Schéma 6**).

II. 2. Purification des porphyrines

La purification des porphyrines est sans doute l'étape la plus complexe. En effet, ce genre de composé réclame une grande quantité à la fois de silice et de solvant pour réaliser une séparation efficace. De ce fait, ces purifications sont généralement longues.

La purification de 150 mg du composé A₃B, porphyrine **4**, obtenu conjointement avec le composé **3** (A₂B₂ *trans* portant deux substituants bromophenyl) ainsi que le précurseur d'AuMA (porphyrine symétrique) à partir d'un mélange brut contenant environ 500 mg de porphyrines, a nécessité un kilogramme de silice, soixante litres de solvant et environ quatre jours d'élution. Il est de plus nécessaire d'éluer avec un gradient lent pour éviter un mélange pendant la séparation. Les composés sont élués avec une très faible quantité de méthanol, qui est le solvant rendant les composés mobiles sur la colonne.

La difficulté de purification de ces composés a été le principal argument qui nous a dissuadés de synthétiser la porphyrine **5** par une voie classique de synthèse (**Schéma 1**). En effet, même en n'ayant que trois composés à séparer, ce qui est le cas lors d'une synthèse utilisant un dipyrrométhane A et des aldéhydes A et B (**Schéma 6**), leurs propriétés physico-chimiques risquent de ne pas être suffisamment différentes pour permettre une bonne séparation dans la mesure où leur différence structurale réside dans la position de l'atome d'azote de la pyridine.

Concernant les porphyrines cationiques, il était d'usage dans le groupe de réaliser les purifications après la méthylation et la métallation sur une colonne de phase inverse, Sep Pak C18 5 g, en utilisant comme éluant un mélange d'eau et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). Lorsqu'il s'agit de réaliser un simple dessalage comme dans le cas d'une métallation complète, cela s'avère très efficace. Cependant, lorsqu'il est nécessaire de réaliser une séparation, la faible résolution de la colonne devient un problème car il est parfois nécessaire de faire plusieurs purifications successives.

Nous avons réalisé les purifications de porphyrines cationiques non pas sur ce type de colonne C18, mais sur une colonne de silice classique avec un éluant un peu particulier¹⁷. Il s'agit d'une solution à base d'acétonitrile et d'eau, mais à la place du TFA utilisé sur la colonne C18, on utilise une solution saturée en KNO₃. Les rapports d'eau et d'acétonitrile

sont également inversés puisque sur silice classique, c'est l'eau qui rend les composés mobiles sur la colonne. L'avantage de cette méthode est sa grande rapidité puisqu'il est possible de faire sortir un composé en moins d'une demi-heure d'élution, ce qui est spectaculaire par rapport à la purification de porphyrines non chargées.

Il est à noter cependant que la résolution est moins bonne mais il est possible d'obtenir des fractions pures. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle nécessite l'élimination du KNO_3 après la collecte des produits. Ce dessalage s'avère être un peu fastidieux car il consiste à faire précipiter les sels par ajout de grands volumes d'éthanol aux fractions concentrées.

Une fois la quantité de sels restants estimée suffisamment faible, il est possible, toujours en suivant la méthode de Batinic-Haberle *et al.*, de faire précipiter les porphyrines en changeant le contre-ion NO_3^- par un contre ion PF_6^- plus volumineux, rendant le produit insoluble dans l'eau. Il s'agit par la suite de changer à nouveau ce contre-ion PF_6^- par un contre-ion chlorure pour récupérer un composé soluble dans l'eau. Le protocole employé pour réaliser ces précipitations est décrit dans la partie « Matériels et Méthodes ».

III. Synthèse des porphyrines

III. 1. Stratégie de départ

Cette partie sera consacrée à la synthèse du composé bromé, porphyrine **4** (**Schéma 4**), ainsi qu'aux différents essais réalisés dans la voie de synthèse de la porphyrine visée dans le **Schéma 2**. Nous aborderons ainsi les différentes conditions de réactions testées pour le couplage de Suzuki-Miyaura pour obtenir la porphyrine **5** (**Schéma 4**) puis l'alkylation des pyridines de la porphyrine **5**.

III. 1. i. La porphyrine 5-(4-bromophenyl)-10,15,20-tris[4-(pyridin-2-yl)phenyl]porphyrin **4**

Pour la synthèse du composé **4** on peut envisager deux dipyrrométhanes¹⁶, afin de limiter le nombre de composés formés, le 4-(pyridin-2-yl)phenyl dipyrrométhane (**1**, **Schéma 6**) et le 4-bromophenyl dipyrrométhane (**2**). Les rendements de réaction lorsqu'on utilise deux dipyrrométhanes et un aldéhyde ou deux aldéhydes et un dipyrrométhane ont été comparés. Ces rendements après purification sur colonne sont les mêmes. Nous avons choisi la synthèse impliquant le dipyrrométhane **1** pour la synthèse du précurseur bromé (**Schéma 6**). Elle génère deux sous-produits : la porphyrine **3** A_2B_2 *trans* ainsi que la porphyrine A_4 , composé précurseur de la porphyrine **AuMA**. Ces composés ont été isolés séparément lors de la purification sur colonne de silice. Les rendements sont indiqués sur le **Schéma 6**.

L'étape suivant l'obtention de la porphyrine dissymétrique **4** est le couplage avec l'entité 4-pyridine.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

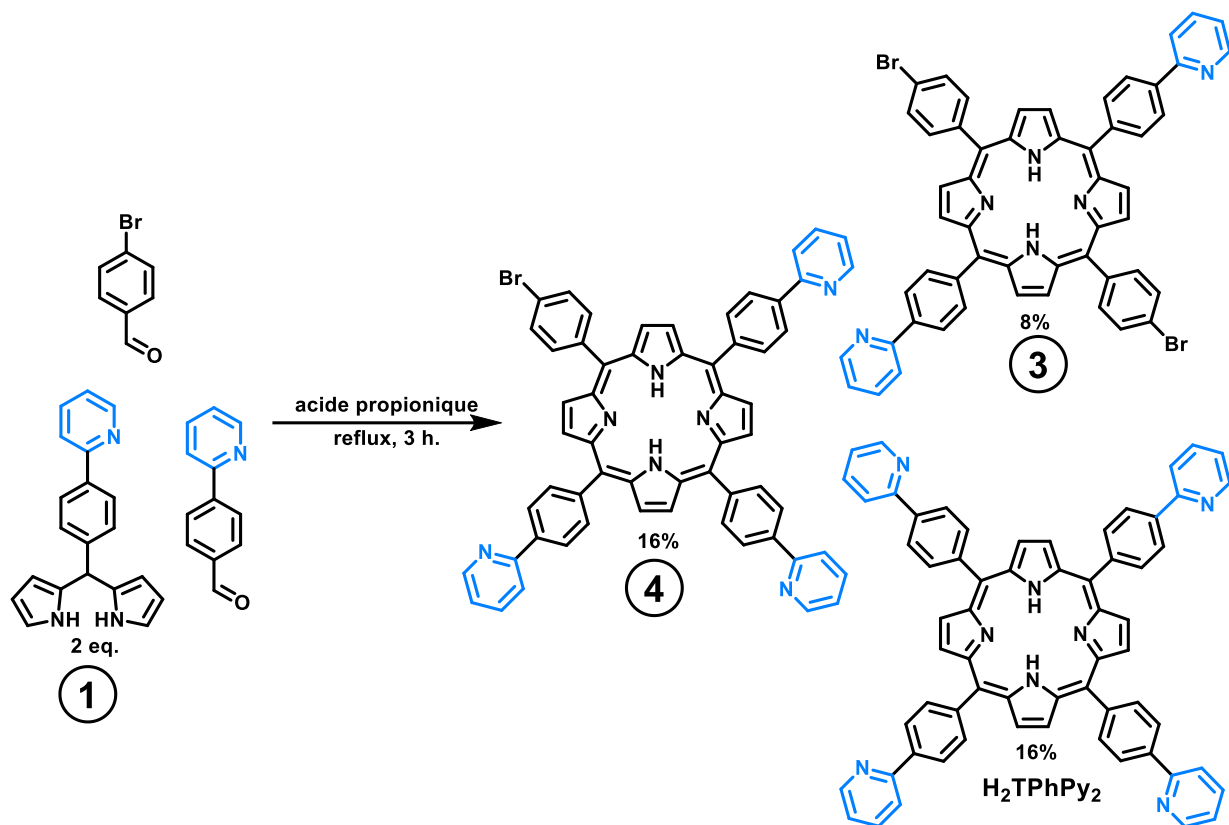


Schéma 6 : Synthèse du précurseur bromé 4.

III. 1. ii. Mise au point des conditions du couplage de Suzuki-Miyaura

Afin de déterminer les meilleures conditions de réaction, des essais de couplage avec l'acide pyridine-4-boronique commercial sur la *meso*-tetrakis(4-bromophenyl)porphyrin (**H₂TBPP**) (disponible au laboratoire) ont été réalisés (**Tableau 1**). Nous avons testé deux complexes de palladium comme catalyseurs, le tetrakis(triphenylphosphine)palladium(o) ($\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$) et le tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(o) ($\text{Pd}^0_2(\text{dba})_3$), trois solvants, le diméthylformamide (DMF), le dioxane et le diméthoxyéthane (DME) et avons choisi comme base le carbonate de césium.

Les différentes réactions ont été suivies en CCM sur SiO_2 (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98/2) afin de déterminer les avancements des réactions. Dans ces conditions, plus la porphyrine porte de groupements pyridine, plus son élution est retardée. Ainsi les analyses en CCM permettent de suivre la disparition du produit de départ au profit de l'apparition de plusieurs produits de réaction (cinq au maximum pour les quatre positions *meso* et les deux composés *cis* et *trans* difonctionnalisés) dont la migration est inversement proportionnelle au nombre de pyridines présentes sur la porphyrine.

Tableau 1 : Essais de couplage sur le substrat **H₂TBPP**. Conditions générales : 0,4 eq. de catalyseur, 12 eq. de base Cs₂CO₃.

Réactions	Catalyseur	Solvant	Eq.AB*	° C	Base	Résultat
1	Pd ⁰ (PPh ₃) ₄	DMF	5	100	Cs ₂ CO ₃	Pas de réaction
2	Pd ⁰ (PPh ₃) ₄	DME	5	90	Cs ₂ CO ₃	+
3	Pd ⁰ (PPh ₃) ₄	dioxane	5	100	Cs ₂ CO ₃	++
4	Pd ⁰ ₂ (dba) ₃	DMF _{anh}	5	100	Cs ₂ CO ₃	Pas de réaction
5	Pd ⁰ (PPh ₃) ₄	dioxane _{anh}	10	100	Cs ₂ CO ₃	+++

*AB pour l'acide pyridine-4-boronique

(+) 2 produits de couplage et produit de départ non totalement consommé

(++) 4 produits de couplage dont 2 majoritaires correspondant aux composés tri et tetra couplés avec disparition du produit de départ.

(+++) 2 produits de couplage correspondant aux composés tri et tetra couplés et disparition du produit de départ.

Le **Tableau 1** rassemble les essais effectués avec différentes conditions expérimentales. La première entrée n'est pas satisfaisante : aucun composé n'est obtenu. Le changement de catalyseur de Pd(PPh₃)₄ par du Pd₂(dba)₃ dans la quatrième entrée, ne donne pas de meilleur résultat. Le DMF est à exclure pour ce couplage. Les essais des entrées 2 et 3 sont plus encourageants. Le changement du solvant DMF par du diméthoxyethane (DME) dans l'entrée 2 permet l'obtention de plusieurs produits et une disparition du produit de départ. Dans le dioxane (entrée 3) on observe deux taches majoritaires en CCM sur SiO₂ (dont les R_f sont les plus bas observés jusqu'à présent) ainsi que des traces des autres produits de moindre couplage et une disparition du produit de départ. Enfin, le recours à du dioxane anhydre (entrée 5) ne donne plus que les deux tâches les plus basses observées correspondant aux composés tri et tetrasubstitués avec disparition du produit de départ.

Les conditions de couplage les plus favorables à l'obtention du produit sont donc celles présentées dans la cinquième entrée du tableau.

Le couplage entre la porphyrine bromée **4** et l'acide pyridine-4-boronique génère bien un unique produit différent du produit de départ que l'on peut espérer être le composé attendu, avec un ratio apparent de 20/80 en faveur du produit de la réaction. Une purification est donc mise en œuvre par colonne de silice en utilisant les mêmes conditions d'élution que pour la purification du composé **4**. Cependant, un très faible rendement de purification est observé. Plusieurs dizaines de milligrammes étaient attendus en sortie de colonne (50 mg de composé **4** mis en jeu, les masses molaires des deux porphyrines sont identiques et on avait observé un fort ratio de produit attendu). Seuls quelques milligrammes ont été laborieusement récupérés.

Il s'avère que le composé **5** présente des propriétés de solubilité telles qu'une purification par colonne de silice est exclue. En effet, la porphyrine **5** est peu soluble dans les solvants organiques et se trouve très retenue par la silice. La quantité isolée lors de cette première synthèse a été suffisante pour sa caractérisation, cependant il n'est pas envisageable de purifier le brut réactionnel.

Nous avons donc décidé d'enchaîner les étapes d'alkylation de la 4-pyridine et de méthylation des 2-pyridines sans purification intermédiaire en tablant sur une purification ultérieure des porphyrines quaternarisées. Pour cela, une optimisation des conditions d'alkylation a été réalisée.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

III. 1. iii. Mise en place des conditions d'alkylation

Les étapes suivantes, à partir de la porphyrine **5**, consistent en deux alkylations successives : une première alkylation de la 4-pyridine nouvellement greffée (par un bras fonctionnalisé) puis une méthylation des 2-pyridine restantes.

Afin de s'assurer du bon déroulement de ces étapes, des essais d'alkylation¹⁰ ont été réalisés sur deux substrats porphyrines différents que sont la *meso*-tetrakis(4-(pyridin-2-yl)phenyl)porphyrin (**H₂TPhPy₂**) et la *meso*-tetrakis(pyridin-4-yl)porphyrin (**H₂TPyP**), en utilisant du 5-bromoalérate d'éthyle (**Schéma 7**). Le but recherché est une alkylation de la 4-pyridine par le bromoalérate d'éthyle dans des conditions pour lesquelles la 2-pyridine moins réactive ne serait pas alkylée.

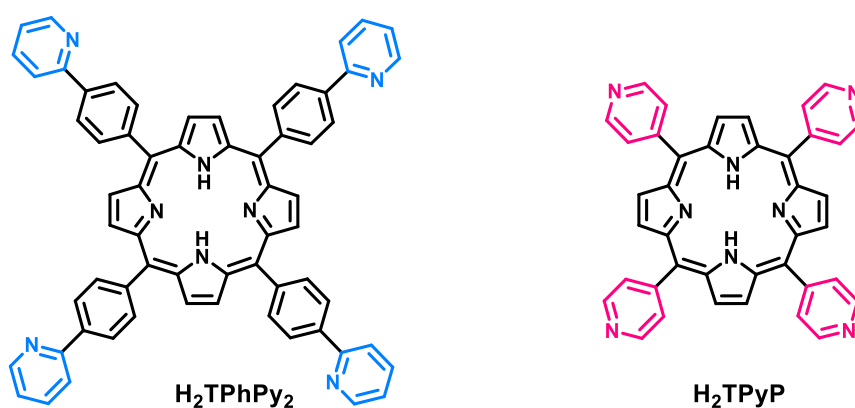


Schéma 7 : Les porphyrines utilisées pour les essais d'alkylation.

Les réactions d'alkylation sont suivies en CCM sur SiO₂ en utilisant MeCN/H₂O/KNO₃ saturé comme éluant pour visualiser la migration des produits cationiques qui se forment, ainsi qu'avec l'éluant classique CH₂Cl₂/MeOH (98/2), afin de vérifier la disparition du produit de départ non chargé qui est le seul produit migrant dans ces conditions. Les conditions de réactions sont résumées dans le **Tableau 2**.

Un protocole de mono-alkylation de la **H₂TPyP** a été décrit¹⁰. La réaction dure six jours dans un mélange chloroforme/éthanol à 60 °C. Nous avons testé également un autre solvant, le DMF à 90 °C pendant quatre jours.

Tableau 2 : Essais d'alkylation des porphyrines tests en présence de 10 équivalents de bromoalérate d'éthyle

Porphyrine	Solvant	°C	Résultats
H₂TPhPy₂	DMF	90	Pas de réaction
H₂TPhPy₂	CHCl ₃ /EtOH (3/1) ¹⁰	60	Pas de réaction
H₂TPyP	DMF	90	++
H₂TPyP	CHCl ₃ /EtOH (3/1) ¹⁰	60	+

(+) Apparition d'une légère tache qui migre en conditions MeCN/H₂O/KNO₃sat.

(++) Apparition de deux taches, toujours en conditions MeCN/H₂O/KNO₃sat.

Les réactions menées sur la porphyrine **H₂TPyP** ont amené pour les deux conditions expérimentales testées à l'apparition d'un produit migrant dans les conditions MeCN/H₂O/KNO₃ (8/1/1), ce qui indique sa nature cationique. Dans le cas de la porphyrine portant les 2-pyridines, quelles que soient les conditions, aucun produit n'a été observé. Il semble alors clair, que sur le composé **5** une alkylation sélective de la 4-pyridine est possible dans les conditions du **Tableau 2**. Les étapes suivant le couplage de Suzuki-Miyaura consistent en une alkylation de la 4-pyridine et une méthylation des 2-pyridine. Nous avons choisi de les réaliser de façon successive puis de purifier le mélange de porphyrines cationiques.

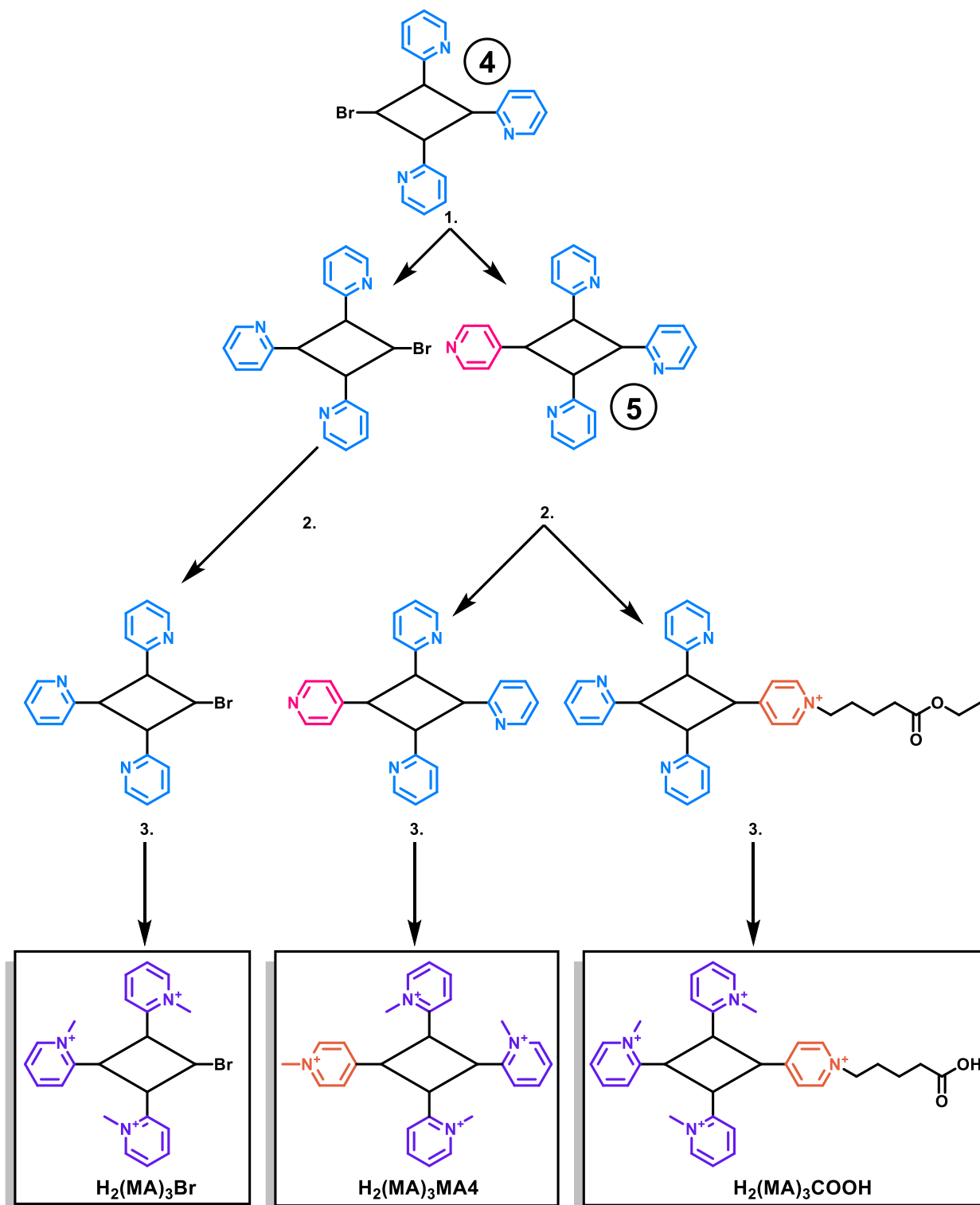
Dans les conditions présentées sur le **Schéma 8**, à la fin de l'enchaînement de réactions, seuls trois composés se retrouvent dans le brut. La porphyrine **4** n'ayant pas réagi lors du couplage de Suzuki ne réagit que lors de la méthylation pour donner la molécule **H₂(MA)₃Br**. La porphyrine **5** réagit dans une certaine mesure dans les conditions d'alkylation mises en place ci-dessus (**Tableau 2**), ce qui génère deux autres produits possibles après la méthylation qui sont, la molécule **H₂(MA)₃(MA₄)** et la molécule attendue, **H₂(MA)₃COOH** après une hydrolyse de l'ester (observé en RMN lors de l'analyse du produit final) qui a probablement eu lieu sur la colonne.

Malheureusement le rendement de la réaction d'alkylation de la 4-pyridine est très bas et la quantité de produit final obtenue infime : inférieure à 10 mg de **H₂(MA)₃COOH** pour 120 mg de porphyrine **4** engagés au départ. Sachant qu'il reste encore une étape de métallation et une étape de couplage avec la biotine, nous devons adopter une nouvelle stratégie.

Malgré tout, cet échantillon de la porphyrine attendue non métallée **H₂(MA)₃COOH** pourra servir de référence dans les futures réactions.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine



1. Couplage de Suzuki
2. Alkylation au 5-bromovalérate d'éthyle.
3. Méthylation

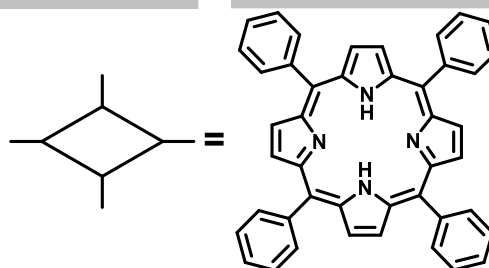


Schéma 8 : Réactions se produisant lors de la synthèse *one pot* du composé $H_2(MA)_3COOH$ attendu.

III. 2. Stratégies potentielles

D'autres stratégies de synthèse ont donc été envisagées. Toutes n'ont pas abouti à un composé exploitable. Les synthèses partielles ainsi que les autres stratégies envisagées seront présentées dans cette partie. Nous aborderons notamment un couplage de Buchwald-Hartwig sur la porphyrine **4** (synthèse partielle) ainsi que la synthèse de différents aldéhydes fonctionnalisés (synthèses en vue d'une stratégie différente) et enfin un couplage de Suzuki-Miyaura réalisé dans des conditions aqueuses (synthèse préliminaire qui va mener à la stratégie finale présentée dans la partie III. 3.).

III. 2. i. Le couplage de Buchwald-Hartwig

Le couplage de Buchwald-Hartwig est, comme le couplage de Suzuki-Miyaura, un couplage pallado-catalysé. Il se produit entre un groupement halogène d'une part et une amine primaire de l'autre¹⁸. Le couplage est réalisé classiquement avec un catalyseur de palladium(II) et l'ajout d'une phosphine. On utilise l'acide 5-aminovalérique pour réaliser ce couplage (**Schéma 9**).

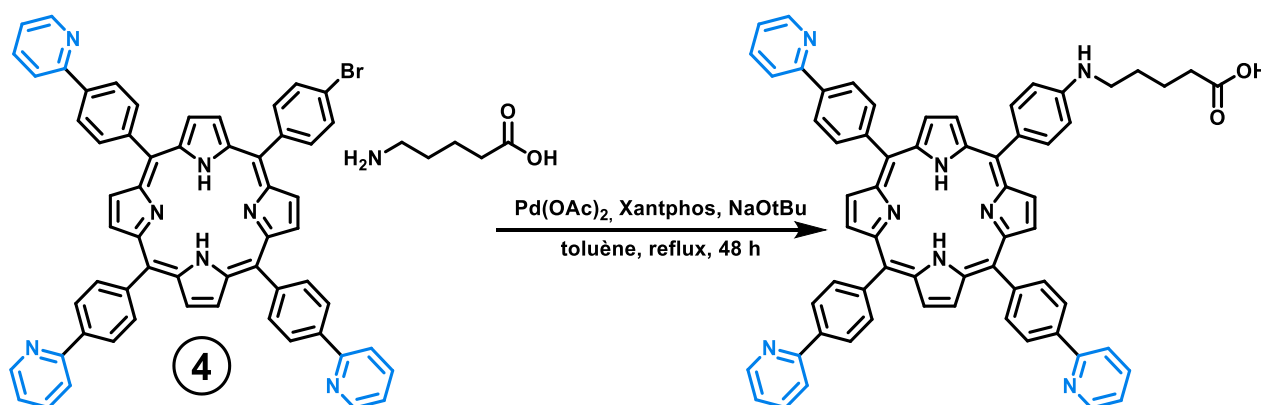


Schéma 9 : Couplage de Buchwald-Hartwig sur la porphyrine **4**.

Cette stratégie présente l'avantage, après méthylation, que l'amine secondaire générée sur le bras nouvellement introduit devrait être protonnée à pH physiologique et donc fournir la charge positive sur le quatrième substituant *meso* de la porphyrine (**Schéma 10**).

Le brut est purifié sur colonne de silice en utilisant l'éluant classique CH₂Cl₂/MeOH (98/2) et caractérisé par RMN du proton et spectrométrie de masse.

La réaction de Buchwald-Hartwig présentée dans le **Schéma 9** a été réalisée à partir de 40 mg de **4** et a conduit à l'obtention, après colonne de silice classique, à une vingtaine de milligrammes de produit. L'analyse en spectrométrie de masse ne donne pas le pic moléculaire de masse attendu à $[M+H]^+ = 961,4$ uma mais un pic à $[M+H]^+ = 943,4$ uma, soit une masse moléculaire correspondant à la perte de 18 uma.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

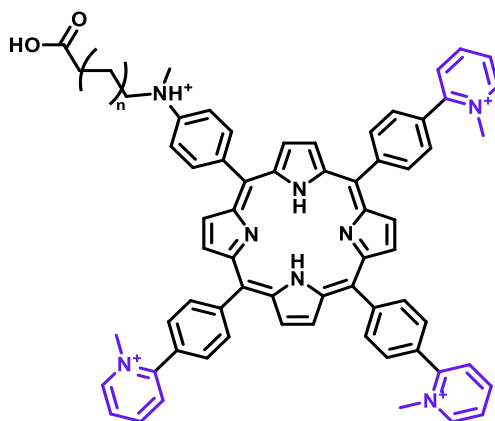


Schéma 10 : Composé attendu après couplage de Buchwald-Hartwig et méthylation. À pH physiologique on attend une protonation de l'amine tertiaire.

D'autre part, le spectre RMN du proton dans le DMSO- d_6 ne présente pas le signal attendu pour l'amine secondaire. Enfin, les protons de la chaîne aliphatique apparaissent comme 2 triplets (chacun comptant pour 2H) à 4,01 et 2,74 ppm et 1 multiplet (4H) vers 2,1 ppm. Si l'amine secondaire était présente, l'un des deux triplets serait dédoublé par la constante de couplage avec le NH. L'ensemble de ces éléments nous amène à proposer une cyclisation de la chaîne par la perte d'une molécule d'eau, formant un cycle à six atomes (**Schéma 11**). La molécule obtenue lors de cette réaction (porphyrine **6**) est donc inutilisable dans la poursuite de la préparation d'un produit de couplage porphyrine-biotine.

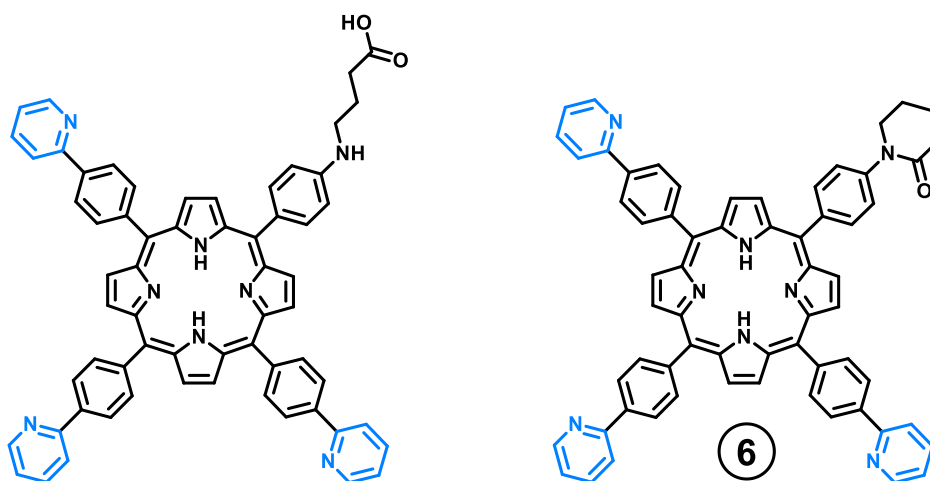


Schéma 11 : Molécule attendue (à gauche) versus la molécule (**6**) obtenue lors du couplage.

Un couplage Buchwald-Hartwig de **4** avec une amine judicieusement choisie pour éviter cette cyclisation intramoléculaire (allongement de la chaîne aliphatique par exemple, changement de fonction terminale) serait certainement envisageable, mais cette voie n'a pas été explorée par manque de temps.

III. 2. ii. La synthèse d'aldéhydes fonctionnalisés

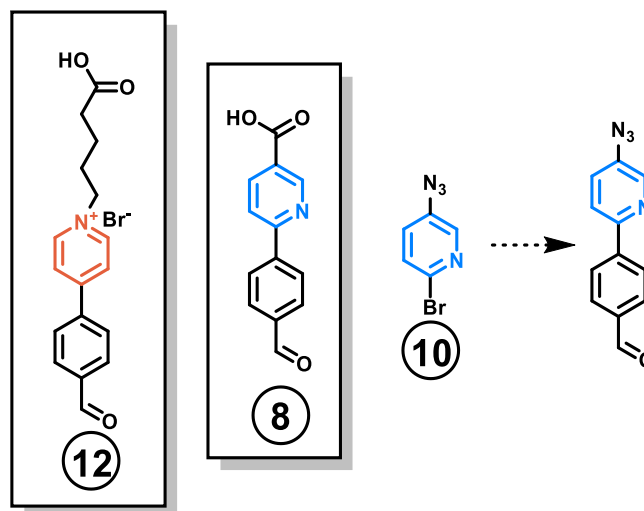


Schéma 12 : Les différents aldéhydes proposés.

Le recours à des aldéhydes fonctionnalisés a été également envisagé. Cela permettrait de générer directement une porphyrine prête à être fonctionnalisée et à concentrer les efforts de synthèses sur des composés plus accessibles. Dans cette voie, deux chemins sont envisageables. D'une part, la conservation d'un motif 4-pyridine sur l'aldéhyde pourrait être une solution. D'autre part, l'utilisation d'aldéhydes conservant le motif 2-pyridine est envisageable. L'avantage d'une telle voie réside notamment dans la conservation plus fidèle du modèle de base de la porphyrine **AuMA**.

Deux aldéhydes portant un groupement fonctionnel en position *meta* de la 2-pyridine ont été envisagés (Schéma 12). L'un d'eux, le composé **8**, décrit dans la littérature¹⁹, a été synthétisé. Le second envisagé aurait dû être préparé à partir du composé **10** mais sa préparation n'a pas abouti, par manque de temps.

De plus, un aldéhyde cationique, le 4-(4-pyridinium-1-pentanoïque) benzaldéhyde (composé **12**), a été également synthétisé. Plusieurs conditions de réactions ont été tentées notamment en faisant varier le solvant et par voie de conséquence la température puisque cette réaction a toujours été menée à reflux.

La quaternarisation de la pyridine par le 5-bromopentanoïque acid a été menée dans du dichlorométhane, de l'acétonitrile, du DMF et du toluène. Ce dernier solvant est apparu comme la meilleure option en termes de rendement et de traitement. Le Schéma 13 présente les synthèses ayant mené à l'obtention des différentes molécules¹⁹⁻²².

Les composés **8** et **12** sont des aldéhydes prêts à être employés dans une synthèse de porphyrine. La fonction acide carboxylique qu'ils présentent servirait à un couplage peptidique direct avec un dérivé de biotine portant une amine terminale.

Malheureusement, nous avons découvert ultérieurement que la présence d'une fonction acide carboxylique sur une porphyrine empêche la métallation par de l'or(III) de par son effet coordonnant qui provoque une

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

précipitation/agrégation de la porphyrine en présence des sels d'or. Il a été ainsi impossible de métaller la porphyrine $\text{H}_2(\text{MA}_3)\text{COOH}$ décrite dans le paragraphe III. 1. iii. Les deux aldéhydes **8** et **12** à notre disposition sont donc inutilisables pour la synthèse du conjugué porphyrine-biotine que nous avons envisagée.

Par contre il est ainsi devenu clair, au fur et à mesure de l'avancement des travaux, que la stratégie d'accrochage d'un dérivé biotine sur une porphyrine fonctionnalisée par un acide carboxylique devait se concevoir avec un ordre précis dans les étapes. Il est nécessaire d'avoir une porphyrine déjà métallée par l'or(III) lors de l'accrochage d'un bras portant une fonction carboxylique. Le même constat serait probablement vrai pour une fonction amine.

La stratégie de synthèse suivante va donc se baser sur une modification de l'ordre des étapes en gardant le principe d'un couplage de Suzuki-Miyaura à partir du composé clé de départ : la porphyrine **4** qui porte un groupement 4-bromophenyl (Schéma 4).

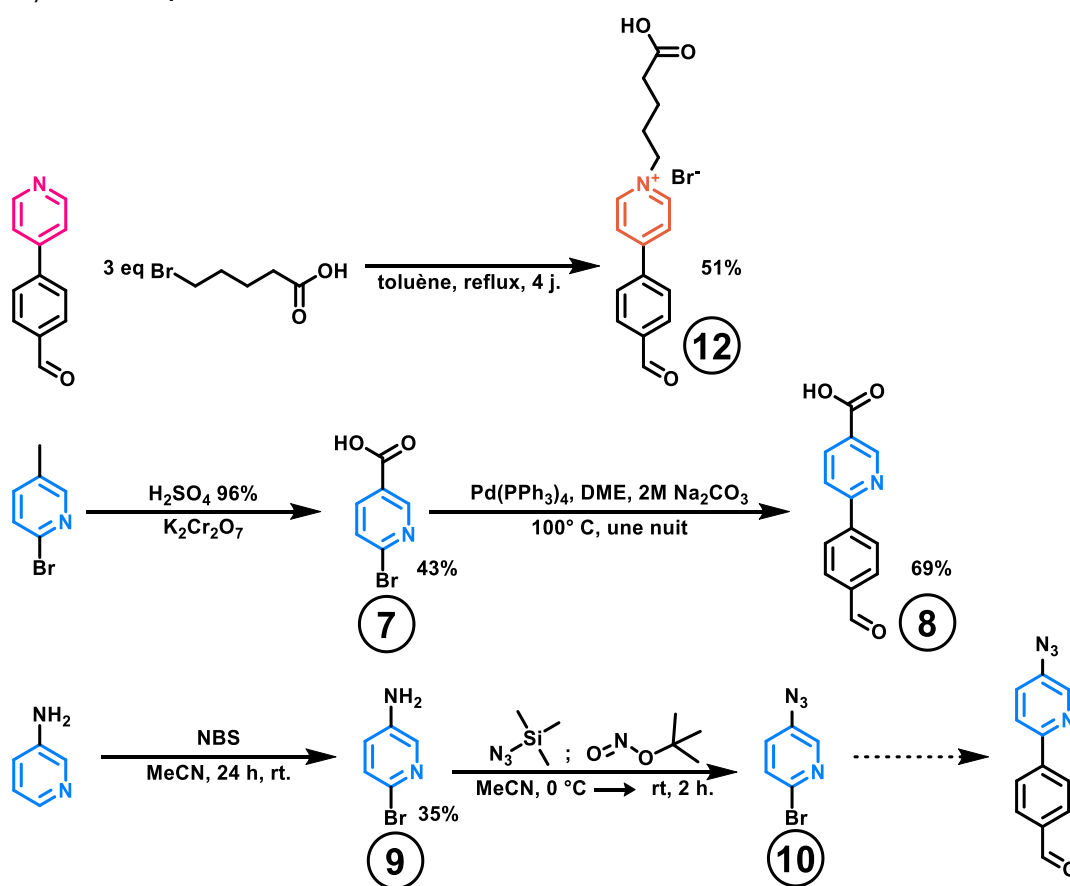


Schéma 13 : Synthèses des différents aldéhydes.

III. 2. iii. Le retour au couplage de Suzuki-Miyaura mais en conditions aqueuses

En cherchant à réaliser un couplage de Suzuki-Miyaura sur une porphyrine déjà méthylée et métallée, on va s'orienter vers des précurseurs de porphyrines hydrosolubles. Un couplage de Suzuki-Miyaura en milieu aqueux a déjà été décrit dans la littérature²³. De plus il sera possible d'utiliser un acide boronique déjà fonctionnalisé et soluble dans des solvants protiques. On pourrait partir d'acides boroniques 2-pyridine ou 4-pyridine. Notre choix s'est porté sur un dérivé de la 4-pyridine.

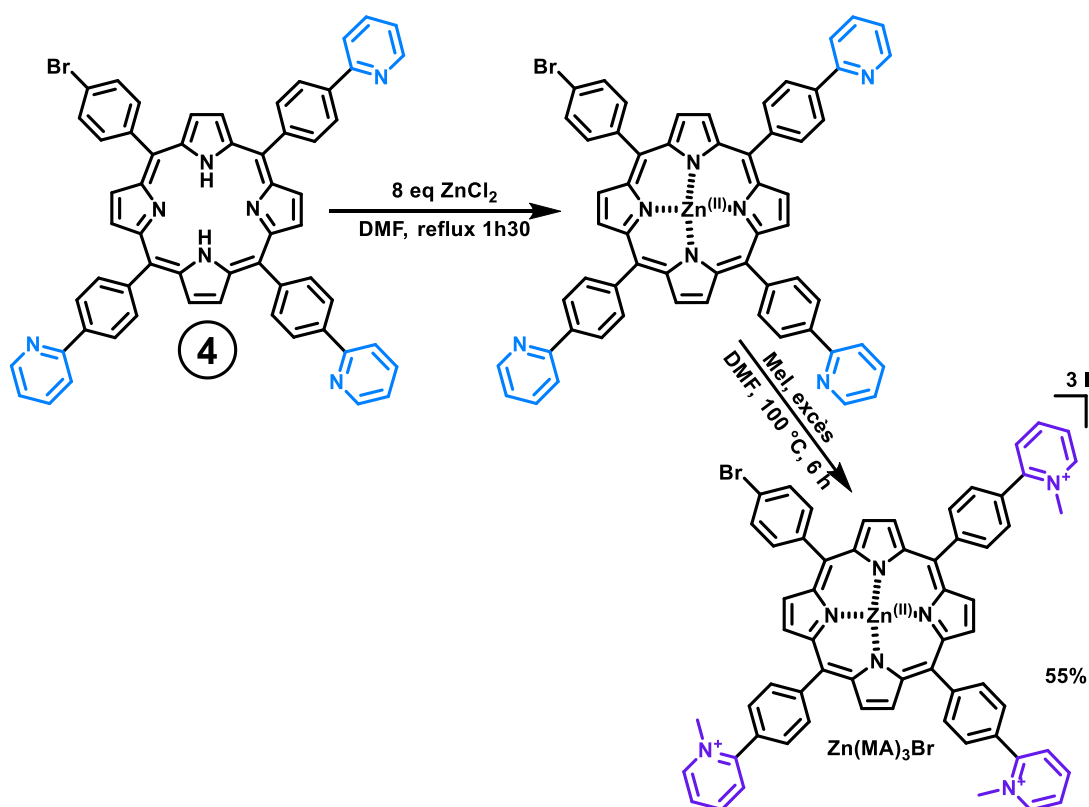


Schéma 14 : Synthèse du précurseur cationique pour le couplage de Suzuki-Miyaura en milieu aqueux.

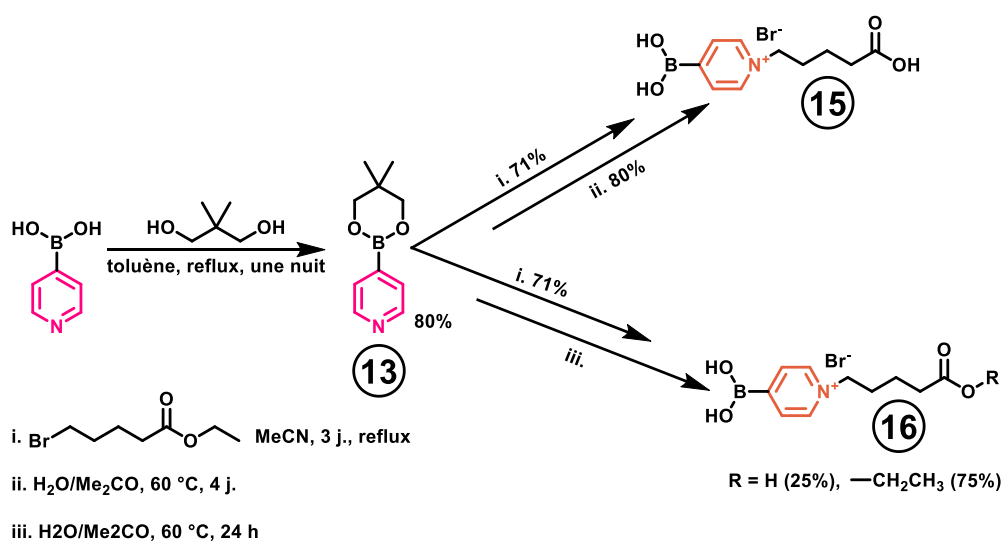


Schéma 15 : Synthèse de l'acide boronique fonctionnalisé 15 et description de l'obtention du mélange 16.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

Une synthèse inspirée des travaux de Gao *et al.*²⁴ a été réalisée et a permis l'obtention d'un acide boronique portant une pyridine quaternarisée, composé **15** ou **16** (Schéma 15). Cette synthèse comporte trois étapes. La première étape est une étape de protection de la fonction acide boronique par le neopentyl glycol pour former un acétal (composé **13**). S'en suit une alkylation par le 5-ethyl bromovalerate conduisant au composé **14**, qui est isolé sous la forme d'une huile jaune, suivie après un lavage du milieu réactionnel, d'une étape de déprotection.

L'étape de déprotection du groupement acide boronique entraîne également une hydrolyse de l'ester. L'hydrolyse de l'ester est incomplète si la déprotection dure 1 nuit (**16** constitué d'un mélange de 75% d'ester et 25% d'acide) ou complète si la déprotection est laissée 4 jours (**15**). Cette hydrolyse de l'ester n'est pas gênante puisqu'elle devra être réalisée *in fine* en vue du couplage avec la biotine. Il est à noter que lors de la première réaction de couplage décrite dans le Schéma 16 ci-dessous, nous avons utilisé le composé partiellement hydrolysé **16** alors que dans les suivantes (Schéma 17), ce sera le composé **15**.

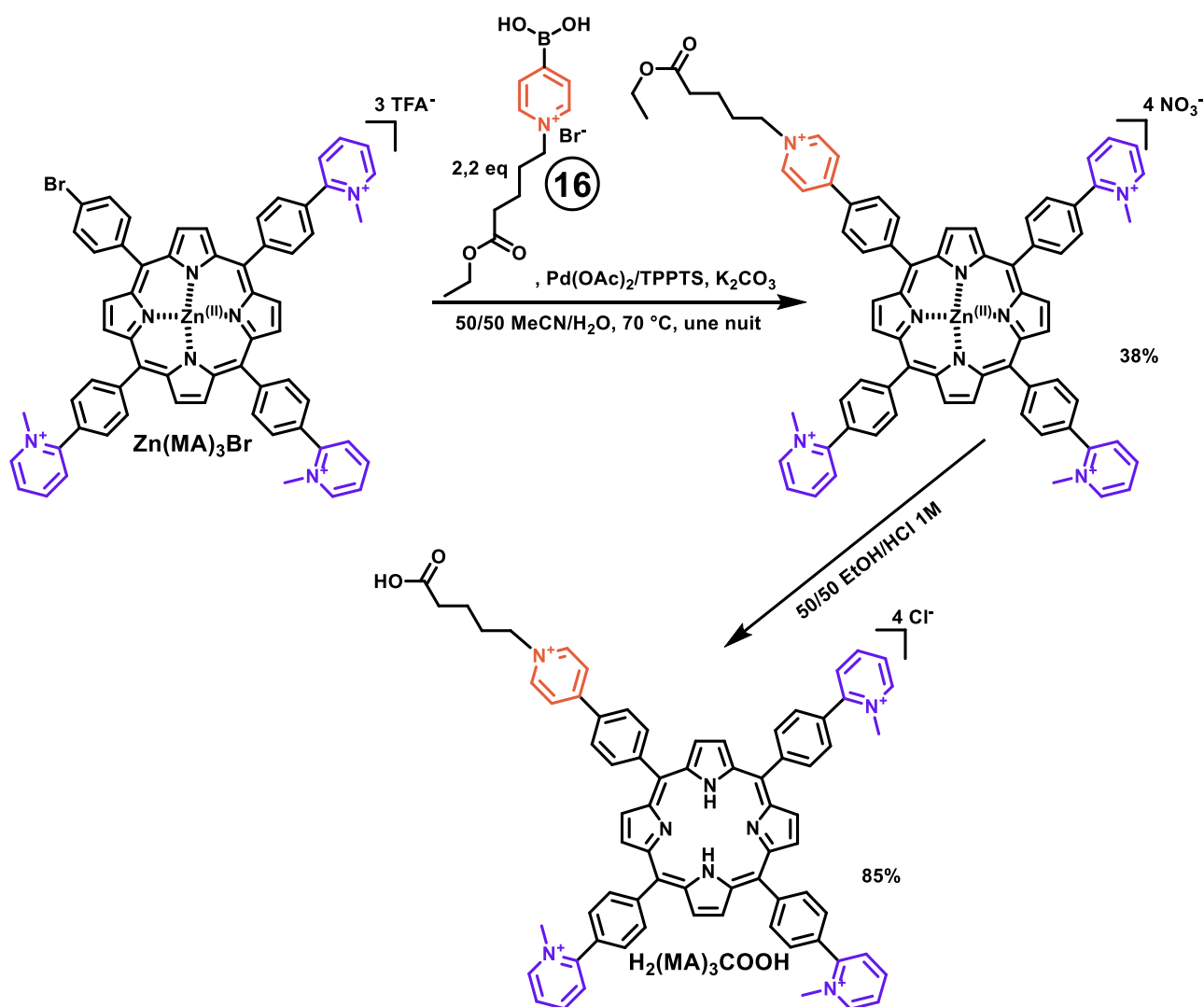


Schéma 16 : Synthèse de la porphyrine cible $\text{H}_2(\text{MA})_3\text{COOH}$.

Le couplage de Suzuki-Miyaura a d'abord été tenté avec des porphyrines métallées avec du zinc(II) (**Schéma 16**) en s'inspirant des travaux de Tremblay-Morin *et al.*²³ qui décrivent des couplages de Suzuki-Miyaura sur des porphyrines cationiques similaires au précurseur **4** employé. La préparation du précurseur métallé **Zn(MA)₃Br** est décrite dans le **Schéma 14**.

La métallation de la molécule **4** est suivie en UV par le déplacement bathochrome de la bande de Soret ainsi que la disparition des bandes Q. La métallation complète est par la suite confirmée en RMN par la disparition du singulet situé dans la région négative du spectre. Une fois le solvant évaporé, le résidu est dissous dans du dichlorométhane et passé sur une colonne de Célite® afin d'éliminer les traces de sels. La méthylation du précurseur est effectuée directement sur le résidu après ajout de DMF et d'iodométhane.

Une fois le précurseur Zn(II) obtenu, le couplage est réalisé dans les conditions indiquées par Tremblay *et al.*²³ (**Schéma 16**). Le couplage met en jeu **Zn(MA)₃Br** et l'acide boronique **16**, en présence de K₂CO₃, de sel de Pd(II)(OAc)₂ et de phosphine TPPTS (triphenylphosphine-3,3',3''-trisulfonic acid trisodium salt) pendant 15 h sous argon à 80 °C, dans un mélange MeCN/H₂O 50/50.

Malgré un faible rendement, le composé attendu a pu être obtenu après purification par colonne de silice en employant MeCN/H₂O/KNO₃sat (8/1/1) comme éluant. S'en suit alors l'étape de démétallation qui se réalise par agitation du composé dans une solution acide à 0,5 M de HCl pour obtenir le composé **H₂(MA)₃COOH** en vue du remplacement du zinc par l'or. La démétallation est suivie en UV, elle est instantanée. La bande de Soret du composé métallé à 425 nm disparaît au profit de la bande caractéristique de la protonation du cœur non métallé à 447 nm. Il a été constaté lors de la caractérisation du composé démétallé, que l'ester présent en bout de chaîne avait été complètement hydrolysé, probablement au cours de l'étape de purification. La porphyrine **H₂(MA)₃COOH** a ensuite été engagée en totalité dans l'étape de métallation avec KAuCl₄. Comme nous l'avons évoqué plus haut, cette étape s'est avérée impossible à réaliser. Un précipité noirâtre s'est formé dans le milieu. Il a été impossible de solubiliser le précipité collecté dans aucun des solvants à notre disposition.

Ce travail a montré qu'un couplage de Suzuki-Miyaura est possible en milieu aqueux entre une porphyrine métallée et méthylée (**Zn(MA)₃Br**) et un acide boronique pré-fonctionnalisé (**16**). L'étape suivante consiste à reproduire ce couplage avec une porphyrine métallée par de l'or(III).

III. 3. Stratégie finale

III. 3. i. Synthèse du précurseur fonctionnalisé par un bras COOH : **Au(MA)₃COOH**

Le couplage pallado-catalysé entre la porphyrine **Au(MA)₃Br** et l'acide boronique fonctionnalisé portant un bras acide pentanoïque **15** (dans des conditions similaires à celles de la porphyrine métallée par le zinc, paragraphe III. 2. iii) a été celle qui a permis d'isoler une porphyrine portant une fonction carboxylique avec le meilleur rendement et la meilleure pureté. Le couplage entre la porphyrine d'or et l'acide boronique fonctionnalisé a été optimisé à plusieurs niveaux.

La dernière étape de la synthèse de l'acide boronique **15** ainsi que son traitement a permis d'isoler un produit solide pur, ce qui n'était pas le cas lors des premières synthèses. Celle présentée sur le **Schéma 16** avait été réalisée avec le

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

composé **16**. En effet, la déprotection du composé **14** pendant 4 jours (**Schéma 14**) a permis d'obtenir l'acide boronique **15** portant une fonction carboxylique sous sa forme pure, qui précipite dans l'acétone, et se présente sous la forme d'un solide plus facile à manipuler.

La synthèse présentée sur le **Schéma 17** représente la pénultième étape de la synthèse du composé final biotinylé présenté sur le **Schéma 2**. Elle a fait l'objet de plusieurs étapes d'optimisation avant d'arriver à une conversion totale du produit de départ.

Les réactions sont suivies en CCM sur SiO₂ en employant MeCN/H₂O/KNO₃ sat. comme éluant, dans la mesure où les composés suivis sont chargés. Ce sont également dans ces conditions que les purifications ont été réalisées.

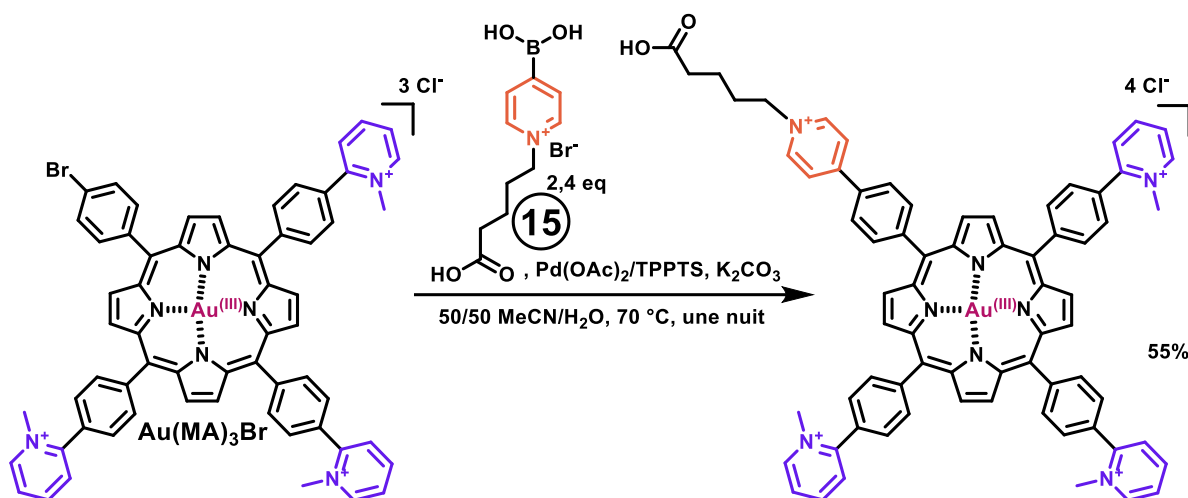


Schéma 17 : Synthèse du composé **Au(MA)₃COOH**.

Tableau 3 : Conditions du couplage de Suzuki-Miyaura sur des porphyrines méthylées et métallées.

Réactions	métal	solvant	eq AB*	AB	base	°C	temps	produit
1	Zn	MeCN/eau	3	16	K ₂ CO ₃	80	15 h	oui ++
2	Au	MeCN/eau	2,4	15	K ₂ CO ₃	70	20 h	oui +++
3	Au	MeCN/eau	2	16	Na ₂ CO ₃	70	20 h	oui +
4	Au	DMF	3	16	Cs ₂ CO ₃	100	8 h	non
5	Au	DMF	3	NF*	Cs ₂ CO ₃	100	8 h	non

AB : acide boronique

*acide pyridine-4-boronique

*NF pour non fonctionnalisé.

(+) Obtention du produit attendu mais présence de sous-produits non identifiés et présence du produit de départ.

(++) Obtention du produit attendu, présence d'un sous-produit non identifié et disparition du produit de départ.

(+++) Obtention du produit attendu, 100% de conversion.

Les porphyrines utilisées lors des essais de couplage décrits dans le **Tableau 3** sont les porphyrine métallées **Au(MA)₃Br** ou **Zn(MA)₃Br**. La réaction 1 du **Tableau 3**, est la réaction présentée précédemment dans la partie III. 2. iii. Les essais de couplages des entrées 2 à 5 ont été réalisés sur la porphyrine **Au(MA)₃Br**. Les entrées 4 et 5 montrent que le DMF n'est pas un solvant compatible avec la réaction. Ce constat est similaire à celui observé lors de la synthèse de **5** présentée dans le **Tableau 1**.

La 2^e entrée du tableau présente les meilleures conditions de couplage. Non seulement le produit a été obtenu mais il l'a été avec une conversion complète du substrat de départ. La différence entre les entrées 2 et 3 est la base utilisée, qui visiblement a un impact important sur le bon fonctionnement de la réaction. Les conditions employées pour l'entrée 1 et 2 sont celles de Tremblay-Morin²³ et s'avèrent donc les plus efficaces pour le couplage sur la porphyrine d'or(III). La purification de cette réaction a été effectuée par précipitations successives de la porphyrine avec des sels d'hexafluorophosphate puis de chlorure²⁷. En effet, les contre-ions PF₆⁻ rendent les porphyrines cationiques insolubles dans l'eau. La porphyrine est en revanche soluble dans l'acétone, dans laquelle elle précipite par ajout de chlorure de tert-butylammonium, l'échange des ions PF₆⁻ par des ions Cl⁻ rendant le composé insoluble dans l'acétone (mais à nouveau dans l'eau). Ainsi, ce passage successif d'un solvant à l'autre permet d'éliminer les réactifs, l'acide boronique **15** et la phosphine TPPTS, ces composés étant solubles dans l'eau. Le palladium est éliminé par centrifugation, ce dernier n'étant soluble ni dans l'eau ni dans l'acétone. Le précurseur **Au(MA)₃COOH** est donc finalement obtenu. Il a été caractérisé par RMN et spectrométrie de masse haute résolution.

III. 3. ii. Synthèse du composé biotinylé : **Au(MA)₃biotine**

Le composé biotinylé est obtenu par couplage peptidique entre le composé **Au(MA)₃COOH** et la biotine cadaverine (commercialisée sous forme de sel de TFA) portant une amine primaire au bout d'une longue chaîne carbonée.

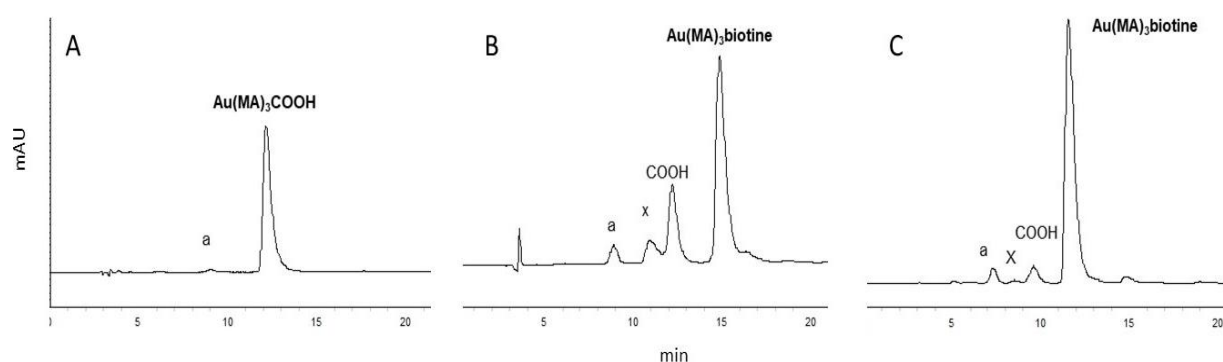


Figure 2 : Chromatogrammes HPLC sur colonne C18 analytique, détection à 408 nm, de (A) **Au(MA)₃COOH** et de deux réactions de couplage avec la biotine dans des conditions illustrant l'importance du pourcentage d'eau sur le rendement de couplage : (B) 20% H₂O, 65% de conjugué **Au(MA)₃biotine** et (C) 2% H₂O, 86% de conjugué. Les annotations correspondent à : a, impureté de la porphyrine de départ, X, porphyrine non identifiée et COOH, **Au(MA)₃COOH**.

Les conditions de couplage requièrent l'activation de l'acide carboxylique terminal par le couple CDI/HOBt dans du DMF en conditions anhydres. L'intérêt de ce couple d'activateurs est de générer le benzotriazolylester capable de

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

réagir sur une amine en conditions aqueuses. En effet, une fois le produit de départ entièrement consommé (3 h à 30 °C), ce qui est suivi en CCM sur SiO₂ avec MeCN/H₂O/KNO₃sat comme éluant, de l'eau est ajoutée pour neutraliser l'excès de CDI n'ayant pas réagi. Le sel de biotine est alors ajouté au milieu réactionnel dans un minimum d'eau. La réaction de couplage se fait dans un mélange contenant 2% d'eau en 1 h à 60 °C. La réaction de couplage est suivie en HPLC afin de vérifier le taux de conversion de l'ester activé en composé biotinylé. Il est de presque 90% dans les conditions optimisées (**Figure 2**)

Les impuretés présentes sont une porphyrine non encore identifiée appelée **X**, un reliquat de synthèse du précurseur non identifié appelé **a** et la porphyrine **Au(MA)₃COOH** de départ. La présence de **Au(MA)₃COOH** peut s'expliquer soit par une activation incomplète non détectée en CCM ou par la désactivation d'une partie de l'ester activé au contact de l'eau ajoutée.

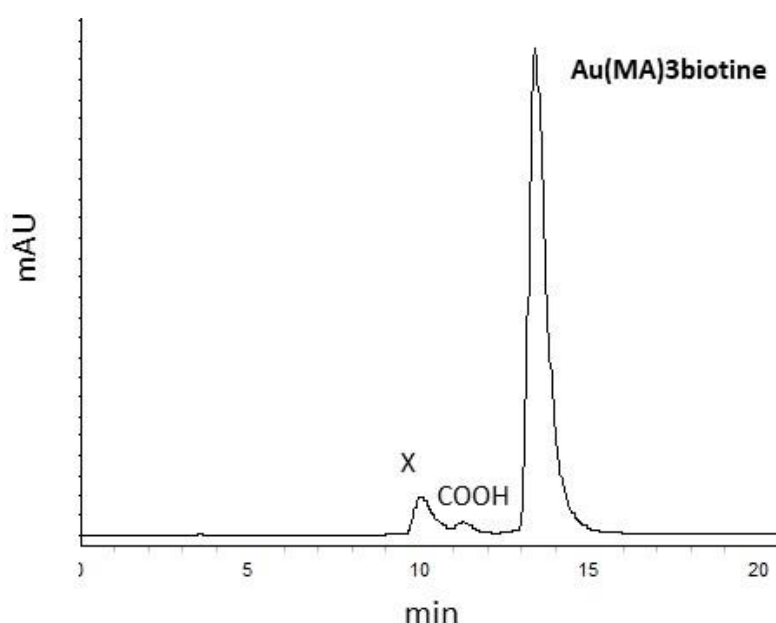


Figure 3 : Exemple de chromatogramme de **Au(MA)₃biotine** purifié. Colonne C18 analytique, détection à 408 nm. Sur ce chromatogramme, la mesure des aires des différents pics donne une pureté de 89,5%.

Quelques remarques sont à faire sur la mise au point des meilleures conditions pour le couplage :

- La porphyrine **Au(MA)₃COOH(CI)** n'est pas bien soluble dans le DMF. Il faut donc veiller à faire l'activation à une concentration inférieure à 1 mM pour assurer une solubilisation complète du milieu d'activation. Pour aider à la solubilisation nous avons procédé à une sonication préalablement à l'ajout du CDI et nous avons effectué l'activation à 30 °C.
- Le couplage avec la biotine doit être réalisé dans un milieu contenant le moins d'eau possible. Dans un milieu contenant 20% d'eau, le rendement de couplage chute à 65%; dans un milieu contenant 30% d'eau, ce dernier chute à 55%.
- L'excès de biotine peut être ramené de 10 à 5 équivalents sans chute du rendement de couplage.
- La biotine peut être dissoute directement dans de l'eau, l'ajout d'un tampon (tampon PIPES 20 mM pH 7,5) ne change pas le rendement du couplage.

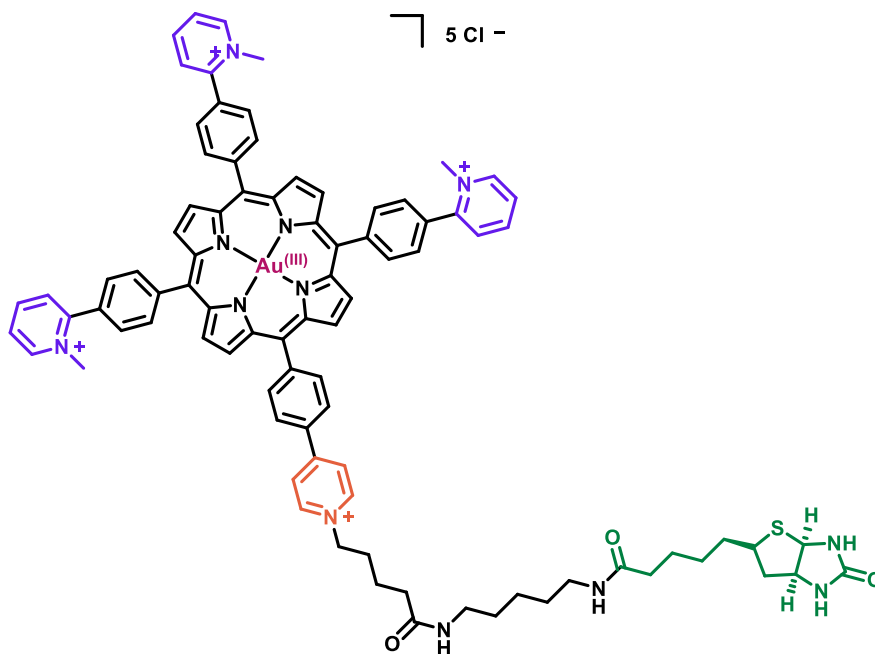


Schéma 18 : Représentation du composé final biotinylé **Au(MA)₃biotine**.

La purification du produit biotinylé (voir **Schéma 18**) a été faite au moyen de deux systèmes de chromatographie : en chromatographie flash ou bien en HPLC semi-préparative. Les deux méthodes conduisent aux mêmes résultats (**Figure 3**). Alors que la séparation en HPLC analytique a pu être optimisée (**Figure 2**) la purification a posé problème puisque bien souvent la pureté du produit récupéré a varié (entre 87 et 95%). Il est troublant de retrouver des porphyrines non couplées dans les fractions d'adduit collectées. Les meilleures qualités de produit sont obtenues lorsqu'on veille à recueillir séparément la fin du pic de l'adduit ce qui se traduit par un rendement de purification très bas.

Les analyses du produit biotinylé en spectrométrie de masse et en RMN confirment la structure attendue (**Figures 4 à 7**). La spectrométrie de masse en haute résolution, du conjugué avec des contre ions TFA, montre les signaux à $m/z = 959,287$ et $599,863$ etc. correspondant respectivement aux ions $[M + 3 \text{ TFA}]^{2+}$ et $[M + 2 \text{ TFA}]^{3+}$ etc. On note une rupture facile de la molécule dans le spectromètre de masse qui est atténuée quand la tension de cône est abaissée à 15 V. Les fragmentations observées correspondent à la rupture de la liaison C-N des pyridiniums (déméthylation, perte du bras alkyle). En RMN du proton on voit bien les deux triplets des protons amides à 7,87 et 7,77 ppm qui prouvent la présence des deux liaisons peptidiques du bras de jonction entre la porphyrine et la biotine. Les intégrations des protons des parties porphyrine et biotine correspondent bien à un rapport de 1 pour 1 des deux entités.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

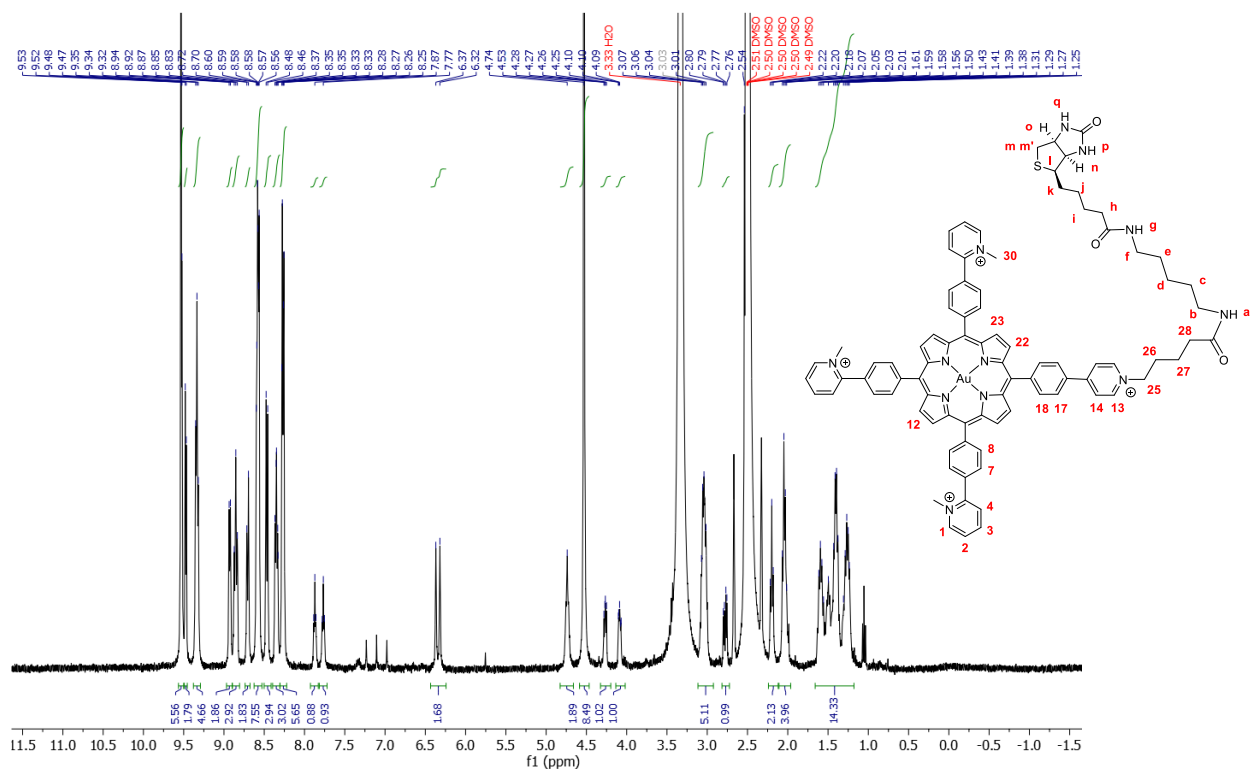


Figure 4 : Spectre ^1H RMN complet de la porphyrine $\text{Au}(\text{MA})_3\text{biotin}$ dans le $\text{DMSO}-d_6$.

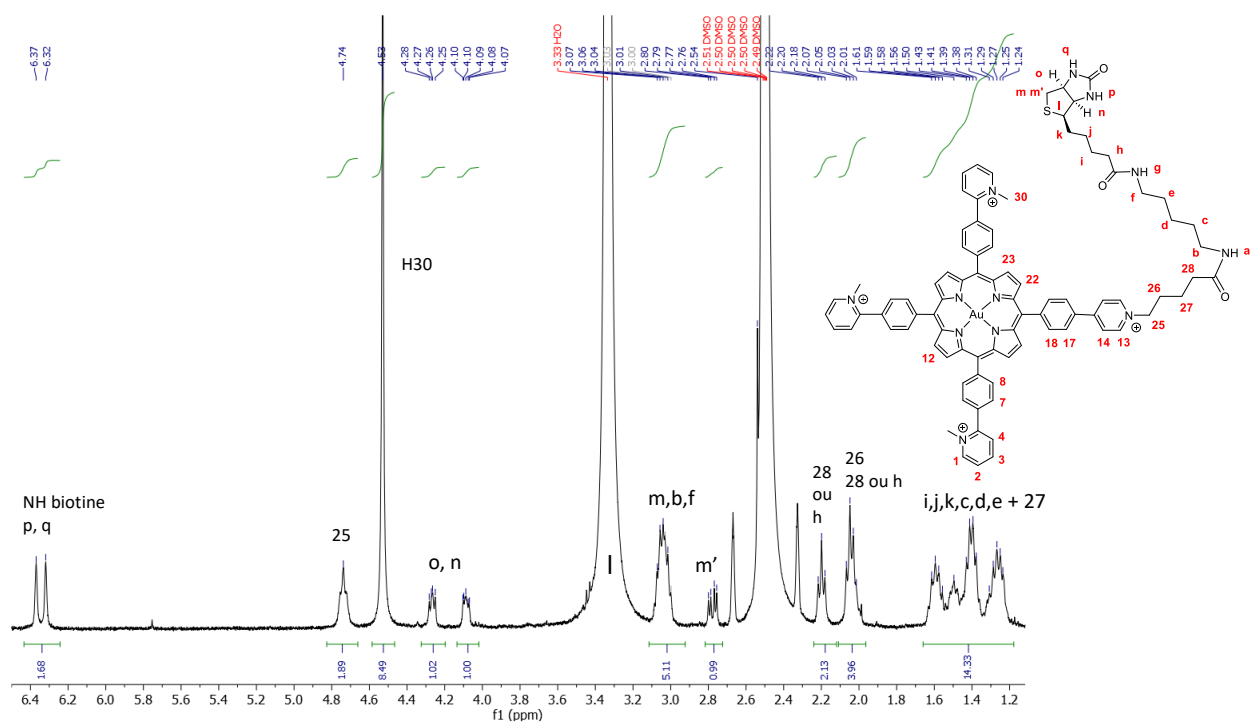


Figure 5 : Spectre ^1H RMN de la porphyrine de 1,2 à 6,4 ppm.

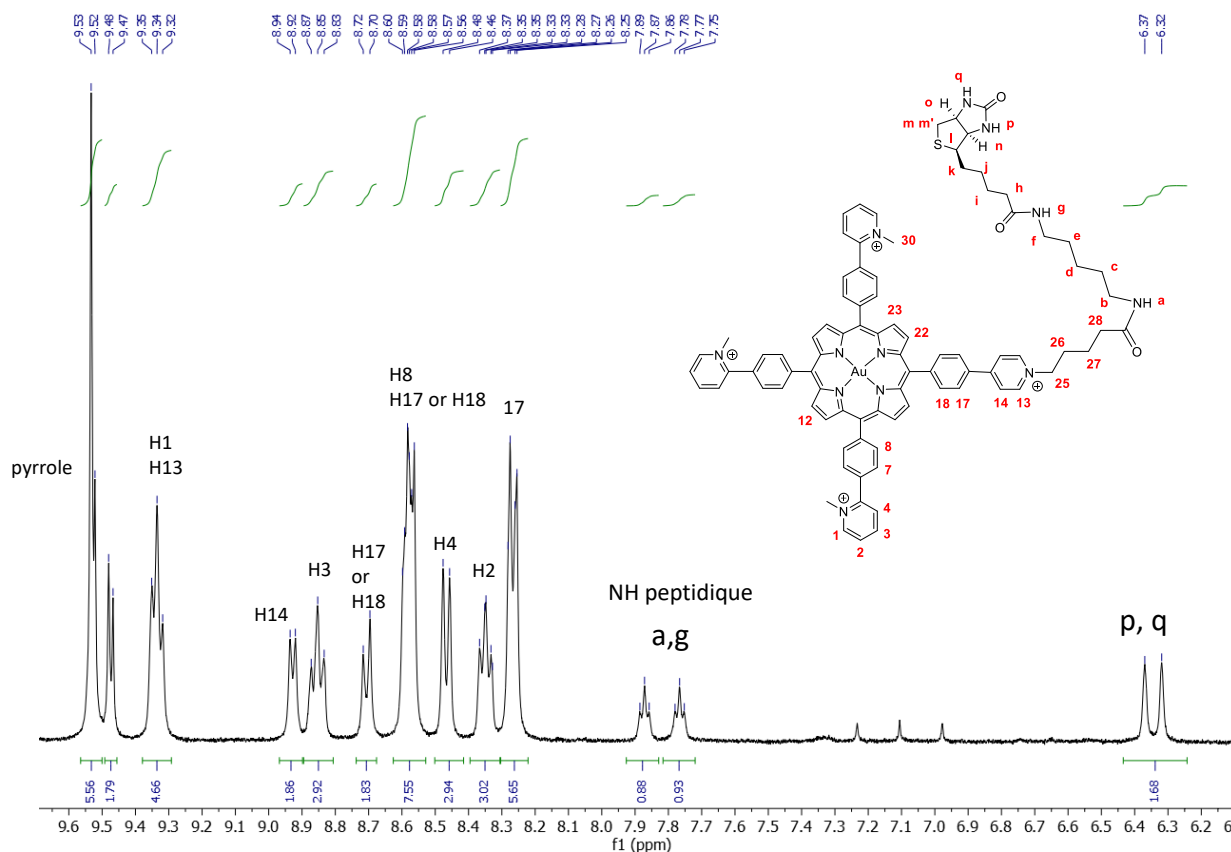


Figure 6 : Spectre ^1H RMN de la porphyrine de 6,2 à 9,6 ppm.

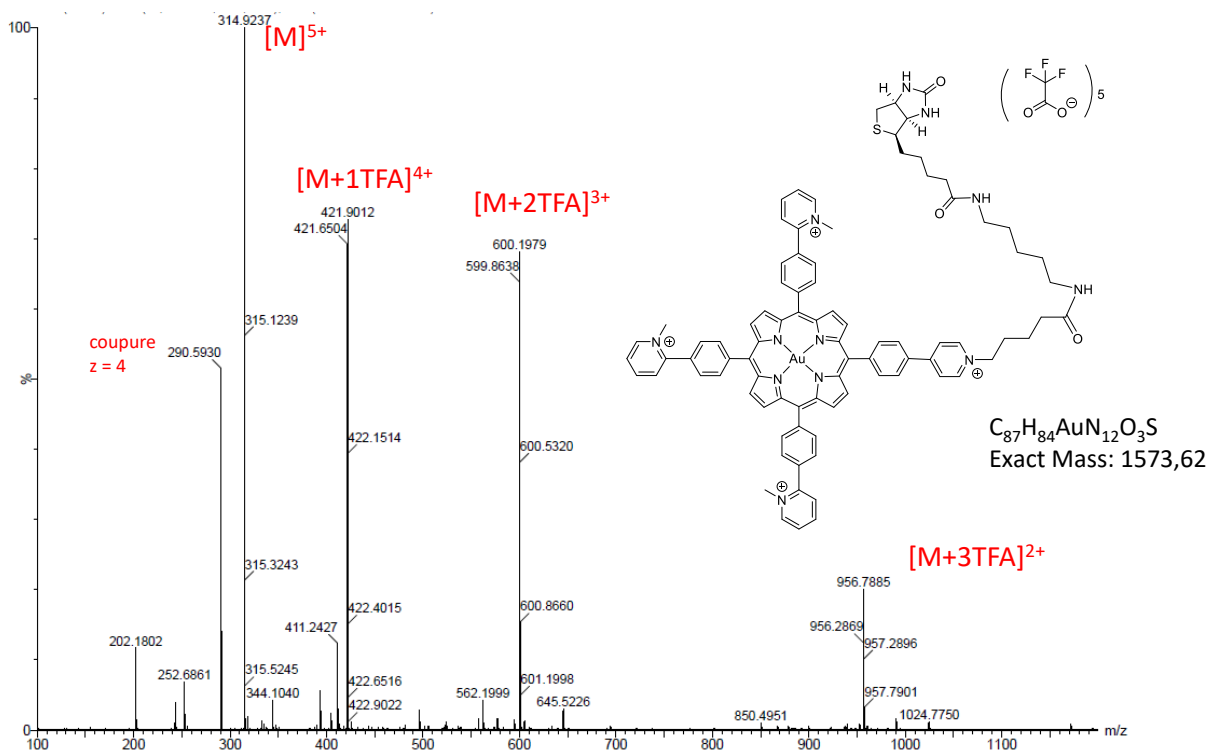


Figure 7 : Spectre de masse en SMHR-ES $^+$ de la porphyrine Au(MA) $_3$ biotine.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

IV. Etude de la relation structure/affinité pour les G4s à l'aide d'une série de porphyrines.

IV. 1. Les porphyrines synthétisées

Les différentes porphyrines dont les synthèses vont être décrites dans cette partie sont présentées sur le **Schéma 19**. Elles ont été synthétisées dans le but d'obtenir une librairie de porphyrines cationiques dont le nombre de charge et la position de la charge varie. Les conditions générales de méthylation et de métallation sont détaillées dans les parties IV. 2 et IV. 3. Cette librairie a été évaluée par des tests de FRET melting présentés ci-après dans la partie V.

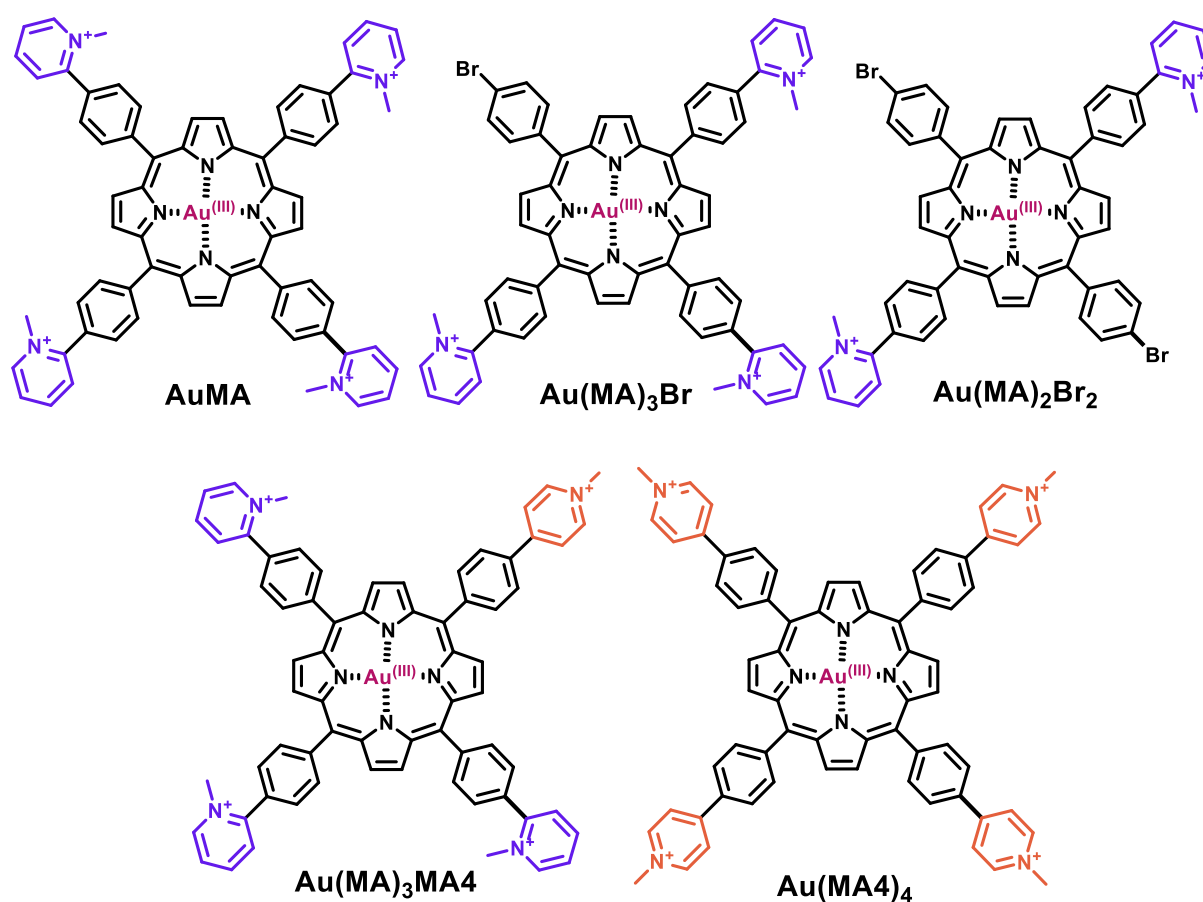


Schéma 19 : Les porphyrines de la librairie test.

IV. 1. i. La porphyrine **Au(MA)₂Br₂**

La porphyrine **3** correspond à un sous-produit de synthèse du précurseur **4** sur lequel est basée notre voie de synthèse (**Schéma 6**). Lors de la synthèse des composés **3** et **4**, le composé attendu était la porphyrine **4**. Lors de la première purification, le composé **3** a été élué très lentement afin de le séparer d'une impureté non identifiée. Lors des synthèses suivantes, il a été élué plus vite afin d'accéder plus rapidement au composé **4**. Il est alors collecté avec cette impureté

non identifiée. Par la suite, lorsque nous avons décidé d'utiliser cette molécule dans notre librairie en tant que porphyrine portant 3 charges positives, elle a subi une seconde purification. Un passage sur colonne de silice avec une élution au dichlorométhane pur permet une séparation efficace et bien plus rapide de l'impureté et du composé **3**.

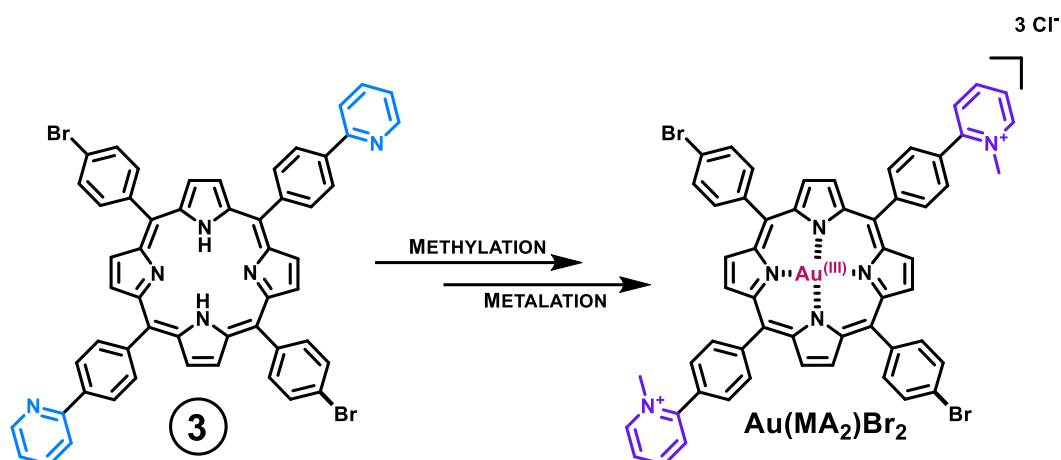


Schéma 20 : Composé tricationique $\text{Au}(\text{MA})_2\text{Br}_2$.

Une fois le composé **3** purifié, il est engagé dans l'étape de méthylation. Le composé méthylé est ensuite purifié sur une colonne Sep Pak C18 5g avec un éluant à base d'acétonitrile, d'eau et de TFA qui conduit au produit $\text{H}_2(\text{MA})_2\text{Br}_2$ avec des contre-ions TFA. Compte tenu du fait que cette molécule ne présente que deux charges positives, sa solubilité dans l'eau est faible. Afin de procéder à la métallation, le produit est dissous dans un mélange d'eau et d'éthanol. La métallation du composé n'est pas complète et une seconde purification sur une colonne Sep Pak C18 5g permet d'obtenir la porphyrine $\text{Au}(\text{MA})_2\text{Br}_2$, toujours avec des contre-ions TFA. Un échange d'anions est réalisé sur une résine échangeuse d'ions (chlorure) pour obtenir le composé final (Schéma 20).

IV. 1. ii. La porphyrine $\text{Au}(\text{MA})_3\text{Br}$

La porphyrine **4** a été notre principal précurseur durant ces travaux de thèse. Le composé **4** est engagé dans les étapes de méthylation et de métallation. Ces deux étapes ont nécessité une purification réalisée non pas sur une phase C18 comme pour le produit précédent, mais sur une colonne de silice classique en utilisant l'éluant à base d'acétonitrile, d'eau et de solution saturée en KNO_3 . L'échange d'ions est réalisé sur une résine échangeuse d'ions chlorure pour obtenir le composé final $\text{Au}(\text{MA})_3\text{Br}$ (Schéma 21).

Ce composé a été introduit dans la librairie de FRET et a également servi de précurseur à la synthèse du composé fonctionnalisé $\text{Au}(\text{MA})_3\text{COOH}$ présenté dans la partie III. 3. i.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

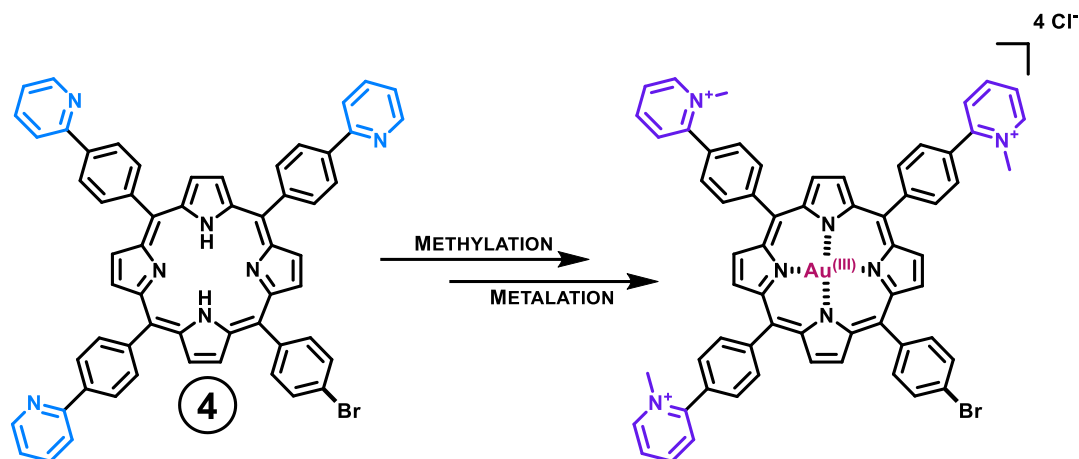


Schéma 21 : Composé tétracationique $\text{Au}(\text{MA})_3\text{Br}$.

IV. 1. iii. La porphyrine $\text{Au}(\text{MA}_4)_4$

La porphyrine $\text{Au}(\text{MA}_4)_4$ (N-méthylée en position 4 du cycle pyridinium) et la porphyrine de référence AuMA (N-méthylée en position 2 du cycle pyridinium) devraient avoir des propriétés similaires quant à leur affinité pour les G4 et donc leurs propriétés antivirales. La molécule a donc été synthétisée selon le protocole publié par Jin *et al.*⁴. La porphyrine présentée sur la gauche du Schéma 22 est isolée après une synthèse classique de porphyrine (Schéma 1) en partant de l'aldéhyde correspondant commercial et de pyrrole.

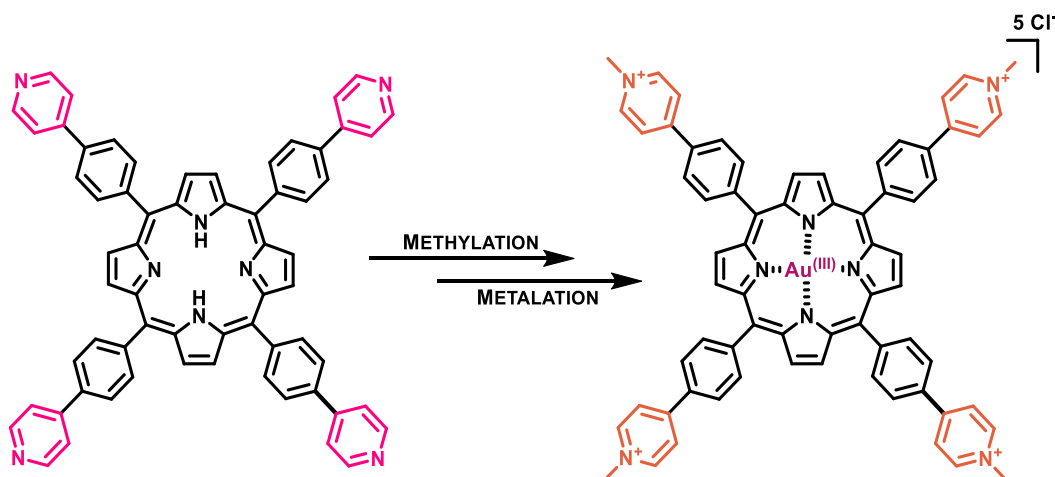


Schéma 22 : Composé pentacationique $\text{Au}(\text{MA}_4)_4$.

Il s'agit d'un composé insoluble quel que soit le solvant utilisé. Le brut réactionnel, après lavage avec du DMF, est employé directement dans l'étape de méthylation, selon le protocole classique (paragraphe IV.2.). Le composé $\text{H}_2(\text{MA}_4)_4$ présente des propriétés de solubilité meilleures que le composé non méthylé mais reste beaucoup moins soluble que les autres porphyrines cationiques comme H_2MA ou $\text{H}_2(\text{MA})_3\text{Br}$ (à l'exclusion de $\text{H}_2(\text{MA})_2\text{Br}_2$, qui ne présente que deux charges positives). Il est possible que l'absence de gêne stérique entre les cycles aromatiques des bras « MA_4 », contrairement au bras « MA » permette aux porphyrines de s'auto agréger, limitant leur solubilité.

Le composé **H2(MA₄)₄(I)** a été directement engagé dans l'étape de métallation sans purification préalable.

La métallation de ce composé étant complète, un simple dessalage est réalisé sur une colonne Sep Pak C18 5g avec de l'eau à 0,1% de TFA. La porphyrine métallée est ensuite éluée avec un mélange composé à 80% d'acétonitrile et à 20% d'eau, l'éluant contenant toujours 0,1% de TFA. Un échange d'ions est réalisé par précipitations successives avec des sels d'hexafluorophosphate puis de chlorure et la porphyrine **Au(MA₄)₄(Cl)** est obtenue (**Schéma 22**).

IV. 1. iv. La porphyrine **Au(MA)₃MA₄**

Ce composé est obtenu par méthylation directe du brut réactionnel de la synthèse de **5** (**Schéma 23**). Il présente une très faible solubilité. Le couplage a donc été réalisé dans les conditions déterminées précédemment (**Tableau 1**). La méthylation a été faite en *one pot*. La méthylation rendant la molécule **4** et la molécule **5** solubles, par ajout de charges positives, dans des solvants polaires tels que l'acétonitrile, une séparation sur colonne de silice a pu être effectuée et a permis d'isoler le composé hybride portant deux motifs *N*-méthylpyridinium différents.

Après la métallation, le composé rejoint la librairie en tant que molécule test. En effet, si l'affinité d'un tel composé

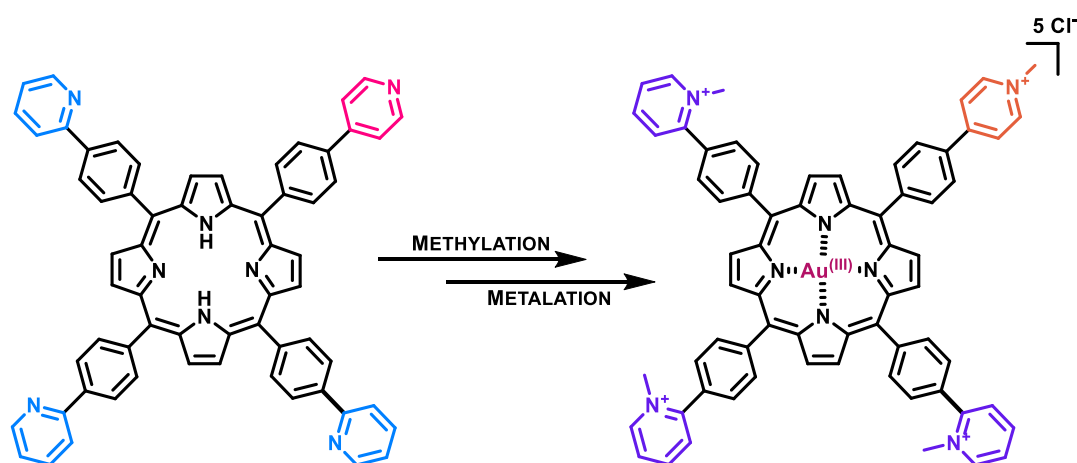


Schéma 23 : Composé pentacationique **Au(MA)₃MA₄**.

pour les G₄ s'avère décevante, notre stratégie de départ pour la synthèse d'un conjugué biotinylé doit être modifiée en conséquence.

IV. 2. Méthylation des groupements pyridines

Les conditions générales de méthylation sont inspirées de la bibliographie²⁵. Dans notre cas, chaque méthylation suit le même protocole. On conserve un large excès d'iodométhane dans le milieu réactionnel mais la température de réaction est maintenue à 100 °C et non pas à reflux. Concernant l'excès d'iodométhane, il a été établi que pour 30 milligrammes de porphyrine, 1 mL d'iodométhane serait mis en jeu (environ 540 équivalents). Cet excès est nécessaire dans la mesure où la température de réaction est très supérieure à la température d'ébullition de l'iodométhane qui est

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

de 42,5 °C. L'excès sert à compenser le réactif perdu par évaporation de sorte qu'il en reste suffisamment dans le milieu pour réaliser la méthylation.

IV. 3. Métallation

Les conditions de métallation sont également standardisées. En dehors des ajustements de solvants réalisés en cas de faible solubilité de la porphyrine comme c'est le cas pour les porphyrines $H_2(MA_4)_4$ et $H_2(MA)_2Br_2$, la métallation se fait en milieu aqueux avec du tetrachloroaurate de potassium ($KAuCl_4$) (entre 2 et 4 équivalents) et un ajout de la base NaOH en solution (entre 4 et 6 équivalents). La métallation est suivie en CCM sur SiO_2 avec MeCN/ H_2O/KNO_3 sat comme éluant mais également en UV-vis (**Figure 8**). En effet, lors de la métallation d'une porphyrine on peut observer un déplacement de la bande de Soret (la bande d'absorption majoritaire correspondant à une transition $\pi-\pi^*$ vers 400 nm) et une disparition des bandes Q (les bandes minoritaires correspondant à des transitions $\pi-\pi^*$ plus faibles)²⁶.

Du fait de la proximité des bandes de Soret du composé non métallé H_2 et du composé métallé par l'or, il est nécessaire de vérifier la disparition de composé non métallé en ajoutant de l'acide dans la cuve. En effet, lors de la protonation du cœur non métallé, le shift de la bande de Soret est bien plus grand. Si deux bandes de Soret sont visibles après l'ajout d'acide, cela trahit la présence du composé non métallé dans le milieu réactionnel. Cette méthode ne peut être utilisée lors de la métallation au zinc, ce métal n'étant pas assez « dur » pour rester au cœur de la porphyrine dans un environnement acide.

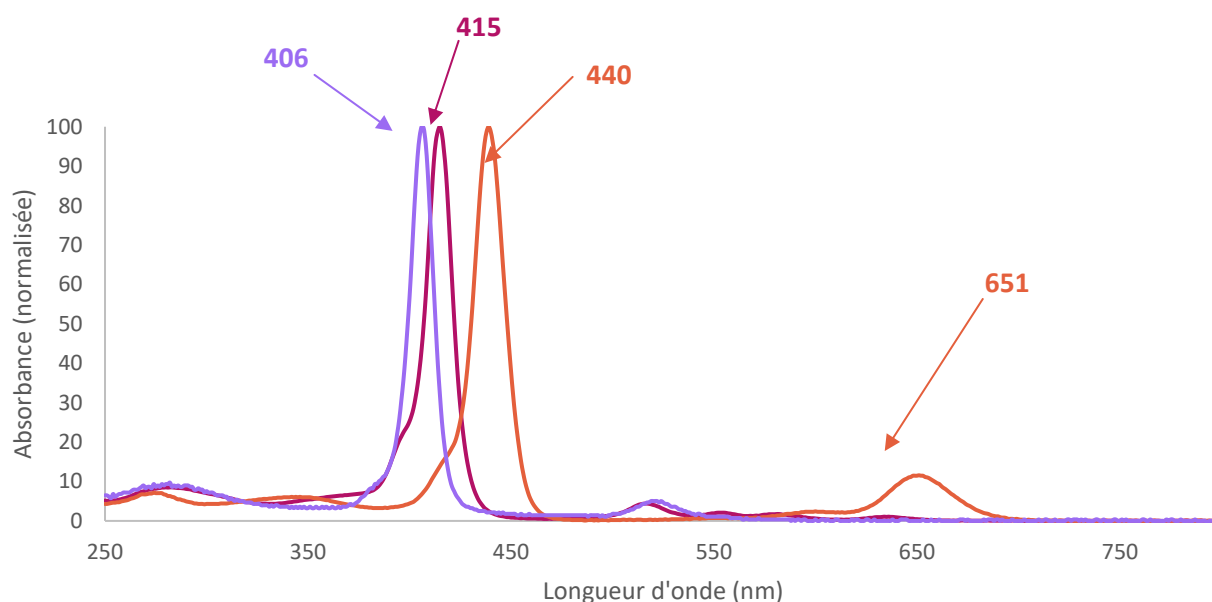


Figure 8 : Spectres UV-Vis dans l'eau de la porphyrine $H_2(MA)_3Br$ (marron), sa forme protonée (orange) et la porphyrine $Au(MA)_3Br$ (violet). On constate la proximité des bandes de Soret entre le composé métallé avec de l'or(III) (406 nm) et le composé non métallé. (415 nm) alors que la bande de Soret de la porphyrine protonée est déplacée à 440 nm. Les courbes ont été normalisées. Les epsilons des porphyrines $H_2(MA)_3Br$ et $Au(MA)_3Br$ sont respectivement de 370×10^3 et $340 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$.

V. Relation structure/affinité pour les G₄s : tests de FRET melting

Après l'obtention des différentes porphyrines constituant la librairie d'évaluation, des tests de FRET melting ont été réalisés. Cette librairie doit permettre d'établir la meilleure stratégie de fonctionnalisation du précurseur **4** permettant de conserver une bonne affinité pour les G₄s.

En effet, pour réaliser des expériences de fishing avec une porphyrine biotinylée, il est nécessaire que le conjugué porphyrine-biotine final soit capable de se fixer sur un G₄ de manière suffisamment stable pour que le G₄ puisse être isolé.

Deux questions se posent:

- o Est-ce qu'avec un atome d'or central apportant une charge positive au complexe on peut se contenter de trois charges positives sur le squelette de la porphyrine (trois substituants meso chargés de type « MA » et un substituant meso non chargé), ce qui nous permettrait une fonctionnalisation plus simple du précurseur ?
- o Est-ce que la substitution d'une 2-pyridine par une 4-pyridine modifie de façon conséquente l'affinité des porphyrines pour les G₄s ?

V. 1. Principe du FRET melting

Les expériences de FRET impliquent une interaction entre deux fluorophores, un donneur et un accepteur de fluorescence dont les zones d'émission et d'absorption respectives se chevauchent. L'oligonucléotide F21T (qui se structure en G₄) porte à son extrémité 5' le fluorophore donneur FAM (6-carboxyfluorescéine) et à son extrémité 3' le fluorophore accepteur TAMRA (tétraméthylrhodamine). Lorsque le quadruplex est structuré, les deux fluorophores sont proches l'un de l'autre et un signal de fluorescence pour TAMRA pourra être observé. Lorsque la température augmente, l'oligonucléotide se dénature et passe sous forme simple brin. La température de demi-dénaturation du F21T (température à laquelle la moitié du G₄ est sous forme dénaturée) est d'environ 55 °C dans les conditions expérimentales choisies. Ainsi, lorsque le G₄ se dénature, les fluorophores s'éloignent l'un de l'autre et la probabilité d'un transfert radiatif diminue (**Figure 9**). On observe alors la fluorescence du fluorophore donneur FAM. Plus la température augmente, plus la fluorescence de FAM s'intensifie (**Figure 9**).

Les porphyrines, en qualité de ligands stabilisateurs des G₄, peuvent être évaluées par ce biais. En effet, lorsqu'une porphyrine se lie à un G-quadruplex, la stabilisation induite augmente la température nécessaire à la dénaturation de la structure G-quadruplex. Plus une porphyrine est fortement liée au G₄, plus la température nécessaire à sa dénaturation sera importante. On mesure le $\Delta T_{1/2}$ qui est la différence entre la température de demi-dénaturation du F21T en présence et en absence de porphyrine. Nous allons par la suite évaluer les $\Delta T_{1/2}$ induits par chacune des porphyrines de la librairie afin de pouvoir les classer en fonction de leur affinité.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

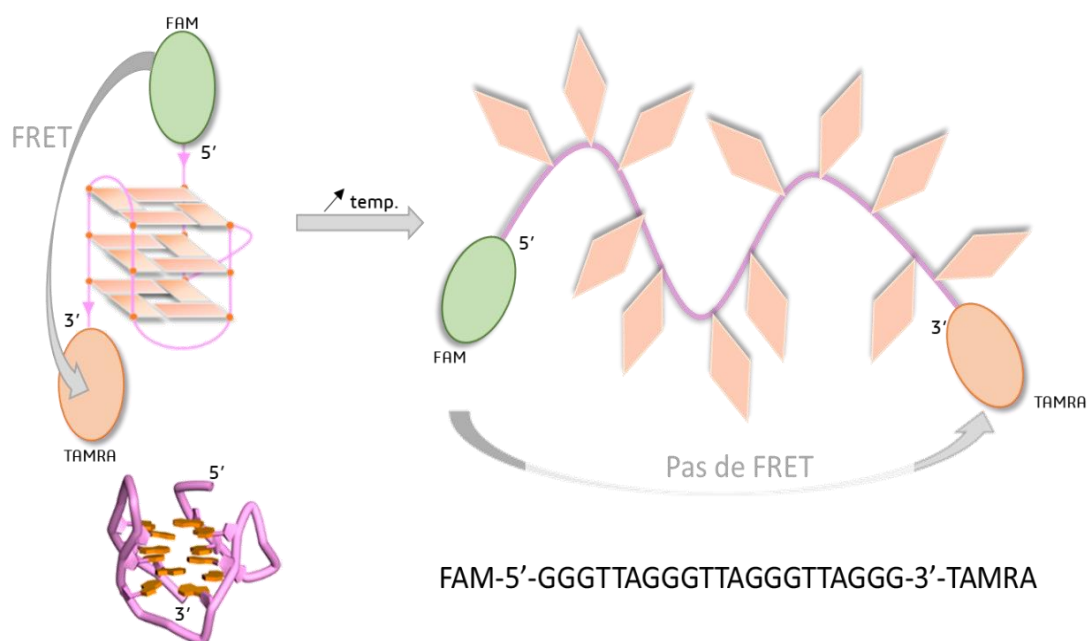


Figure 9 : Représentation de la dénaturation du G4 de F21T par augmentation de la température avec apparition de la fluorescence de FAM.

V. 2. Résultats des tests de FRET melting

V. 2. i. FRET sur l'oligonucléotide F21T

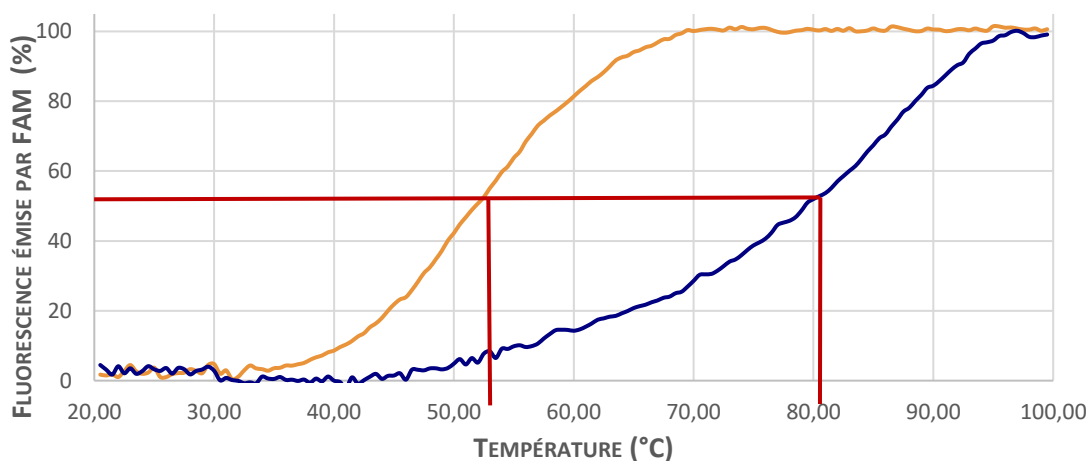


Figure 10 : Représentation des courbes de demi-dénaturation de F21T seul (orange) et F21T avec 2 équivalents de la porphyrine AuMA (bleu) en solution tampon composée de tampon lithium cacodylate pH 7.2 10 mM, 90 mM LiCl, 10 mM KCl. Les $T_{1/2}$ sont respectivement 52 et 80 °C. Le $\Delta T_{1/2}$ d'AuMA est de 28 °C

Les courbes sur la **Figure 10** représentent la mesure de la fluorescence du fluorophore FAM lors de la dénaturation du G4 (**Figure 9**²⁷) en absence et en présence de deux équivalents molaires de porphyrine. Ces courbes sont normalisées. Les températures correspondant à 50% de fluorescence sont relevées et le $\Delta T_{1/2}$ induit par la porphyrine est calculé. L'ensemble des résultats est rassemblé sur le graphique de la **Figure 11**. Ces résultats nous indiquent que les

porphyrines portant cinq charges positives (**Au(MA)₃MA₄**, **Au(MA₄)₄** et **Au-MA**) montrent des $\Delta T_{1/2}$ supérieurs à 15 °C. Elles possèdent donc une plus grande affinité que les porphyrines tetra-cationique (**Au(MA)₃Br**) ou tri-cationique (**Au(MA)₂Br₂**) vis-à-vis du G-quadruplex. Ainsi, si la porphyrine **AuMA** reste la plus affine de toutes ($\Delta T_{1/2} = 32,4 \pm 0,9$ °C)³, son analogue **Au(MA)₃MA₄** ($\Delta T_{1/2} = 23,8 \pm 0,9$ °C) présente une affinité très satisfaisante. Cela nous conforte dans l'idée que modifier la position d'un pyridinium ne constitue pas un obstacle à l'efficacité. Il est donc tout à fait envisageable de fonctionnaliser un bras portant un groupement 4-*N*-méthylpyridinium et d'attendre du composé biotinylé dérivé, des résultats satisfaisants en termes d'affinité pour les G₄ et en termes d'hameçon moléculaire²⁸.

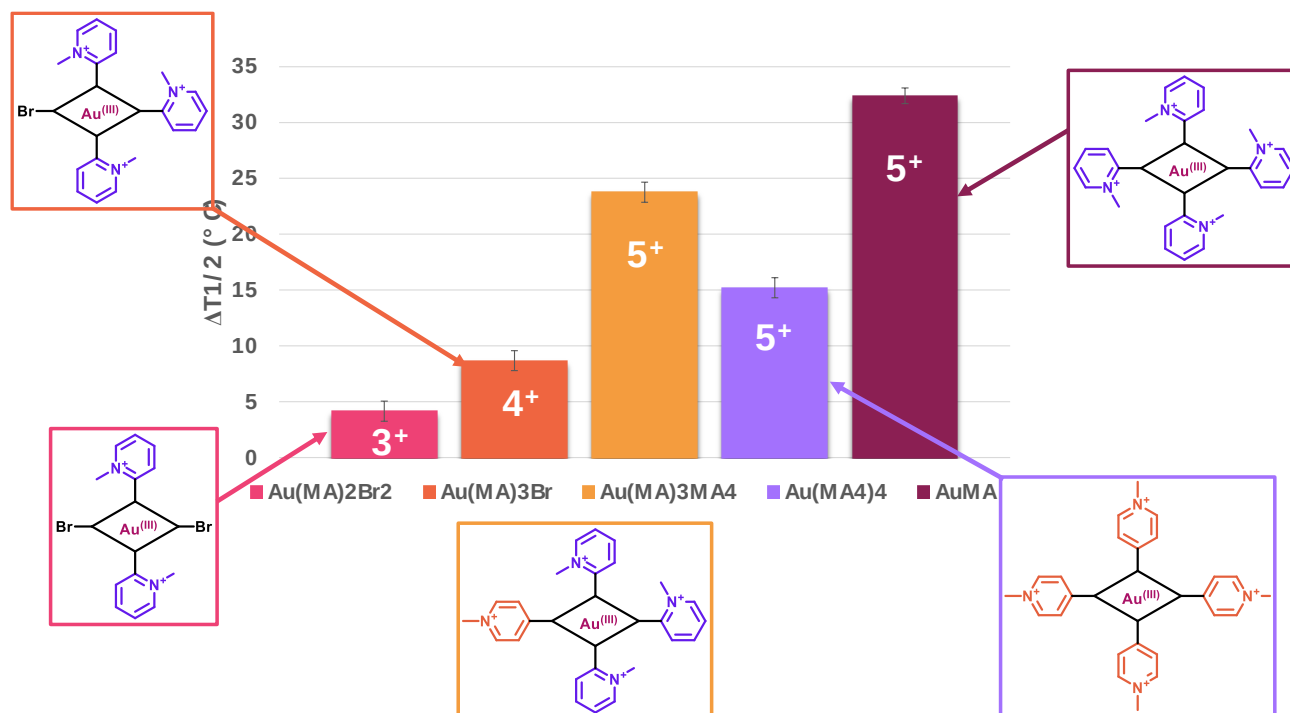


Figure 11 : $\Delta T_{1/2}$ de l'oligonucléotide F21T, 0,2 μ M (1 eq), en présence des différentes porphyrines de la librairie, 0,4 μ M (2 eq.), en solution tampon composée de tampon lithium cacodylate pH 7,2 10 mM, 90 mM LiCl, 10 mM KCl. Les porphyrines sont représentées simplifiées. Le nombre de charges de chaque porphyrine est indiqué.

La faible capacité de la porphyrine **Au(MA₄)₄** à stabiliser le F21T par rapport aux deux analogues portant cinq charges positives peut s'expliquer de par les propriétés de la molécule elle-même. En effet, si les premières expériences de docking ne semblaient pas indiquer de différences significatives avec **AuMA**²⁸, il a été constaté durant les synthèses, comme nous l'avons indiqué dans la partie IV. 1. iii, que cette porphyrine a tendance à former des microagrégats. Bien qu'une fois sous sa forme cationique, la porphyrine est plus soluble et plus facile à manipuler, cela n'est sans doute pas suffisant pour s'opposer aux phénomènes d'agrégation. Il en résulte une baisse de concentration de la porphyrine en solution et donc une affinité apparente plus faible pour les G₄.

Certains résultats sont en accord avec cette possibilité de formation de microagrégats en solution : on remarque en effet que l'épsilon de **Au(MA₄)₄** est plus faible que celui des autres porphyrines pentacationiques (~200 000 M⁻¹ cm⁻¹ versus 400 000 M⁻¹ cm⁻¹ pour **AuMA**) et que sa bande de Soret se trouve décalée vers le rouge (410 nm contre 406 nm pour **AuMA**).

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

Les porphyrines ne portant que trois ($\text{Au}(\text{MA})_2\text{Br}_2$) ou quatre ($\text{Au}(\text{MA})_3\text{Br}$) charges positives sont nettement moins efficaces vis-à-vis de la stabilisation du F21T. Cela indique que le nombre de charges positives est à prendre en considération lors du choix de la porphyrine à fonctionnaliser. Il est donc peu judicieux de fonctionnaliser une porphyrine par un « bras » *meso* non chargé. Cette étude de relation structure/affinité confirme que la porphyrine finale biotinylée devra comporter cinq charges positives.

V. 2. ii. Essais de compétitions entre l'ADN G-quadruplex F21T et l'ADN duplex

Afin de confirmer la sélectivité des composés pour l'ADN G-quadruplex, des expériences impliquant une compétition entre cet ADN G-quadruplex et de l'ADN duplex introduit en excès ont également été menées sur les trois composés pentacationiques. En effet, si lors de l'introduction de cet ADN compétiteur, on notait une chute du $\Delta T_{1/2}$, cela indiquerait que la porphyrine se fixerait préférentiellement sur le compétiteur ADN duplex. Les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions que lors des mesures de $\Delta T_{1/2}$ précédents avec un ajout d'un excès croissant d'ADN duplex allant de 5 à 50 équivalents par rapport au F21T.

Nous voyons dans le graphique de la **Figure 12** que malgré une diminution progressive des valeurs de $\Delta T_{1/2}$, on peut toutefois noter une préférence marquée des composés testés pour la structure G₄ de F21T. Il est nécessaire d'atteindre la barre des 50 équivalents de compétiteur duplex avant d'observer une chute significative du $\Delta T_{1/2}$. Nous pouvons donc conclure que les porphyrines penta-cationiques de cette étude présentent une spécificité importante vis-à-vis des G₄s.

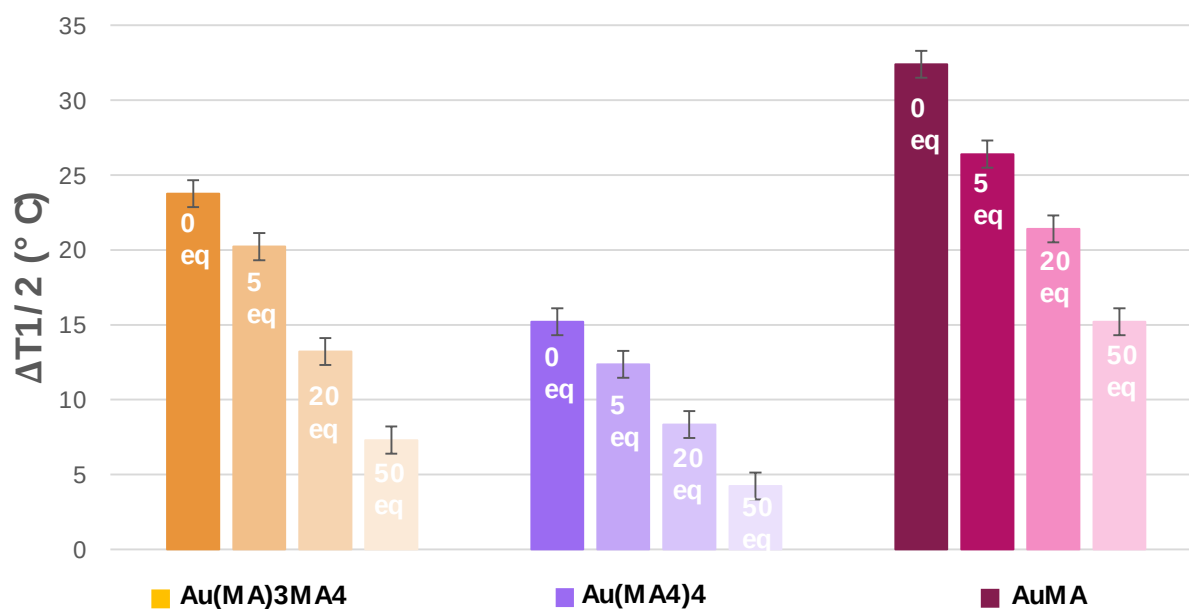


Figure 12 : Sélectivité des trois composés pentacationiques pour la structure G₄ de F21T par la mesure du $\Delta T_{1/2}$ de l'oligonucléotide en présence de quantité croissante d'ADN duplex compétiteur (ds26) (0, 5, 20, 50 mol. equiv. de ds26 par rapport au F21T) en solution tampon composée de tampon lithium cacodylate pH 7.

La conclusion de ces expériences est que les trois composés pentacationiques conservent la sélectivité d'AuMA vis-à-vis de l'ADN G-quadruplex. La porphyrine P-COOH que nous devons préparer devra comporter préférentiellement cinq

charges positives ; la fonctionnalisation sur un bras portant une 4-pyridine ne devrait pas gêner l'interaction du composé avec la cible.

VI. Conclusion du chapitre

En conclusion, nous avons abordé dans ce chapitre le travail de synthèse autour de la porphyrine d'or(III) pentacationique de référence **AuMA**, dotée de propriétés antivirales remarquables *in vitro*. Le but visé était la préparation d'un analogue de **AuMA** biotinylé qui soit structuellement le plus proche possible de la molécule de départ pour étudier le mécanisme soutenant son activité antivirale. A partir de la porphyrine symétrique **AuMA** il a donc fallu modifier l'un des substituants *meso* de la porphyrine par un bras fonctionnalisé permettant l'accrochage covalent de la biotine (et ainsi aboutir à une porphyrine dissymétrique de type A₃B).

Pour définir le type de chimie compatible avec la modification d'un substituant *meso* de **AuMA**, une librairie de porphyrines d'or cationiques a été évaluée dans des expériences de FRET melting, afin de vérifier l'influence du nombre de charges positives portées par la porphyrine et de leur position sur son affinité pour les G₄. La suppression d'une charge positive sur le squelette de la porphyrine diminue sa capacité à stabiliser l'ADN G₄ en « FRET melting », ce qui indique une perte d'affinité du composé pour les G₄s. Par contre le remplacement d'un motif 2-pyridine par un motif 4-pyridine sur une seule des positions *meso* de la porphyrine n'a aucune incidence sur son affinité pour les G₄. Nos efforts de synthèse ont donc porté sur l'introduction d'un motif 4-pyridinium fonctionnalisé sur un des substituants *meso* de la porphyrine de référence **AuMA**.

La porphyrine finale porte en position *meso* trois substituants de type « MA » (*N*-methylpyridinium-2-yl)phenyl et un substituant (*N*-methylpyridinium-4-yl)phenyl sur lequel est greffée la biotine. Sa synthèse consiste, à partir du précurseur dissymétrique A₃B, **Au(MA)₃Br** en un couplage du Suzuki-Miyaura en milieu aqueux avec l'acide boronique, 5-(4-borono-pyridiniu-1-yl)pentanoic acid bromide (**15**), suivi (ii) d'un couplage peptidique avec la biotine cadavérine. Cette molécule est actuellement en cours de test.

REFERENCES DU CHAPITRE 2

- (1) Amrane, S.; Jaubert, C.; Bedrat, A.; Guédin, A.; Andreola, M.-L. Deciphering RNA G-Quadruplex Function during the Early Steps of HIV-1 Infection. *Submitted* **2021**.
- (2) Amrane, Samir; Andreola Marie-Aline; Pratviel Geneviève; Mergny Jean-Louis. Derivatives of Porphyrins, Their Process of Preparation and Their Use for Treating Antiviral Infections. WO2017072319 A1, May 4, 2017.
- (3) Pipier, A.; De Rache, A.; Modeste, C.; Amrane, S.; Mothes-Martin, E.; Stigliani, J.-L.; Calsou, P.; Mergny, J.-L.; Pratviel, G.; Gomez, D. G-Quadruplex Binding Optimization by Gold(III) Insertion into the Center of a Porphyrin. *Dalton Trans.* **2019**, 48 (18), 6091–6099. <https://doi.org/10.1039/C8DT04703K>.
- (4) Jin, S.; Zhao, P.; Xu, L.; Zheng, M.; Lu, J.; Zhao, P.; Su, Q.; Chen, H.; Tang, D.; Chen, J.; Lin, J. Synthesis, G-Quadruplexes DNA Binding, and Photocytotoxicity of Novel Cationic Expanded Porphyrins. *Bioorg Chem* **2015**, 60, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.05.001>.
- (5) Ruan, T. L.; Davis, S. J.; Powell, B. M.; Harbeck, C. P.; Habdas, J.; Habdas, P.; Yatsunyk, L. A. Lowering the Overall Charge on TMPyP₄ Improves Its Selectivity for G-Quadruplex DNA. *Biochimie* **2017**, 132, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.11.003>.
- (6) Rowland, G. B.; Barnett, K.; DuPont, J. I.; Akurathi, G.; Le, V. H.; Lewis, E. A. The Effect of Pyridyl Substituents on the Thermodynamics of Porphyrin Binding to G-Quadruplex DNA. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21 (23), 7515–7522. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.09.036>.
- (7) Ramos, C. I. V.; Tomé, J. P. C.; Santana-Marques, M. G. Charge and Substituent Effects on the Stability of Porphyrin/G-Quadruplex Adducts: Porphyrin / G-Quadruplexes Adducts. *J. Mass Spectrom.* **2012**, 47 (2), 173–179. <https://doi.org/10.1002/jms.2048>.
- (8) Casas, C.; Saint-Jalmes, B.; Loup, C.; Lacey, C. J.; Meunier, B. Synthesis of Cationic Metalloporphyrin Precursors Related to the Design of DNA Cleavers. *J. Org. Chem.* **1993**, 58 (10), 2913–2917. <https://doi.org/10.1021/jo00062a045>.
- (9) Casas, C.; Lacey, C. J.; Meunier, B. Preparation of Hybrid “DNA Cleaver-Oligodeoxyribonucleotide” Molecules Based on a Metallotris (Methylpyridiniumyl)Porphyrin Motif. *Bioconjug. Chem.* **1993**, 4 (5), 366–371. <https://doi.org/10.1021/bc00023a011>.
- (10) Jakobs, A.; Bernadou, J.; Meunier, B. Preparation of Tetracationic Metalloporphyrin–Spermine Conjugates. *J. Org. Chem.* **1997**, 62 (11), 3505–3510. <https://doi.org/10.1021/jo9620831>.
- (11) Rothmund, P. Formation of Porphyrins from Aldehydes and Pyrrole. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57 (10), 2010–2011. <https://doi.org/10.1021/ja01313a510>.
- (12) Rothmund, P. A New Porphyrin Synthesis. The Synthesis of Porphin. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, 58 (4), 625–627. <https://doi.org/10.1021/ja01295a027>.

- (13) Adler, A. D.; Longo, F. R.; Finarelli, J. D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. A Simplified Synthesis for Meso-Tetraphenylporphine. *J. Org. Chem.* **1967**, *32* (2), 476–476. <https://doi.org/10.1021/j001288a053>.
- (14) Pinto, S. M. A.; Henriques, C. A.; Tomé, V. A.; Vinagreiro, C. S.; Calvete, M. J. F.; Dąbrowski, J. M.; Piñeiro, M.; Arnaut, L. G.; Pereira, M. M. Synthesis of Meso -Substituted Porphyrins Using Sustainable Chemical Processes. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2016**, *20* (01n04), 45–60. <https://doi.org/10.1142/S1088424616300020>.
- (15) Lindsey, J. S.; Schreiman, I. C.; Hsu, H. C.; Kearney, P. C.; Marguerettaz, A. M. Rothmund and Adler-Longo Reactions Revisited: Synthesis of Tetraphenylporphyrins under Equilibrium Conditions. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (5), 827–836. <https://doi.org/10.1021/j000381a022>.
- (16) Lindsey, J. S. Synthetic Routes to Meso -Patterned Porphyrins. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (2), 300–311. <https://doi.org/10.1021/ar900212t>.
- (17) Batinic-Haberle, I.; Benov, L.; Spasojevic, I.; Fridovich, I. The Ortho Effect Makes Manganese(III)Meso-Tetrakis(N-Methylpyridinium-2-Yl)Porphyrin a Powerful and Potentially Useful Superoxide Dismutase Mimic. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (38), 24521–24528. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24521>.
- (18) Gao, G. Y.; Chen, Y.; Zhang, X. P. General and Efficient Synthesis of Arylamino- and Alkylamino-Substituted Diphenylporphyrins and Tetraphenylporphyrins via Palladium-Catalyzed Multiple Amination Reactions. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (16), 6215–6221. <https://doi.org/10.1021/j0034576t>.
- (19) Meier, P.; Legraverant, S.; Müller, S.; Schaub, J. Synthesis of Formylphenylpyridinecarboxylic Acids Using Suzuki-Miyaura Coupling Reactions. *Synthesis* **2003**, No. 04, 0551–0554. <https://doi.org/10.1055/s-2003-37663>.
- (20) Roy, S.; Khatua, H.; Das, S. K.; Chattopadhyay, B. Iron(II)-Based Metalloradical Activation: Switch from Traditional Click Chemistry to Denitrogenative Annulation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (33), 11439–11443. <https://doi.org/10.1002/anie.201904702>.
- (21) Cañibano, V.; Rodríguez, J. F.; Santos, M.; Sanz-Tejedor, M. A.; Carreño, M. C.; González, G.; García-Ruano, J. L. Mild Regioselective Halogenation of Activated Pyridines with N-Bromosuccinimide. *Synthesis* **2001**, *14*, 2175–2179. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18070>.
- (22) Smith, C. D.; Greaney, M. F. Zinc Mediated Azide–Alkyne Ligation to 1,5- and 1,4,5-Substituted 1,2,3-Triazoles. *Org. Lett.* **2013**, *15* (18), 4826–4829. <https://doi.org/10.1021/ol402225d>.
- (23) Tremblay-Morin, J.-P.; Ali, H.; van Lier, J. E. Palladium Catalyzed Coupling Reactions of Cationic Porphyrins with Organoboranes (Suzuki) and Alkenes (Heck). *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (18), 3043–3046. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.03.018>.
- (24) Gao, L.; Wang, T.; Jia, K.; Wu, X.; Yao, C.; Shao, W.; Zhang, D.; Hu, X.-Y.; Wang, L. Glucose-Responsive Supramolecular Vesicles Based on Water-Soluble Pillar[5]Arene and Pyridylboronic Acid Derivatives for Controlled Insulin Delivery. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (27), 6605–6614. <https://doi.org/10.1002/chem.201700345>.

CHAPITRE 2

Fonctionnalisation d'AuMA par une biotine

- (25) Romera, C.; Sabater, L.; Garofalo, A.; M. Dixon, I.; Pratviel, G. Interaction of Cationic Nickel and Manganese Porphyrins with the Minor Groove of DNA. *Inorg. Chem.* **2010**, 49 (18), 8558–8567. <https://doi.org/10.1021/ic101178n>.
- (26) Marsh, D.; Mink, L. Microscale Synthesis and Electronic Absorption Spectroscopy of Tetraphenylporphyrin H₂(TPP) and Metalloporphyrins ZnII(TPP) and NiII(TPP). *J. Chem. Educ.* **1996**, 73 (12), 1188. <https://doi.org/10.1021/edo73p1188>.
- (27) Asamitsu, S.; Obata, S.; Yu, Z.; Bando, T.; Sugiyama, H. Recent Progress of Targeted G-Quadruplex-Preferred Ligands Toward Cancer Therapy. *Molecules* **2019**, 24 (3), 429. <https://doi.org/10.3390/molecules24030429>.
- (28) Rundstadler, T.; Mothes, E.; Amrane, S.; Stigliani, J.-L.; Verhaeghe, P.; Pratviel, G. Gold(III) Porphyrins: Synthesis and Interaction with G-Quadruplex DNA. *J. Inorg. Biochem.* **2021**, 223, 111551. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111551>.

CHAPITRE 3

MODELISATION ET OUVERTURE VERS DE NOUVELLES PORPHYRINES

Dans ce chapitre, nous aborderons les travaux de modélisation moléculaire effectués durant la thèse. Il s'agissait, par des calculs de dynamique moléculaire, d'accéder à des informations énergétiques nous permettant d'orienter les futures synthèses vers des dérivés porphyrines intéressants pour le ciblage des G4s.

Notre objectif a consisté en la détermination de l'énergie libre de liaison entre différentes porphyrines dont les données expérimentales étaient connues, ou non, et une structure de G4 de VIH-1 afin de réaliser une étude de relation structure-affinité. Leur classement en fonction des énergies libres d'interaction calculées nous permettrait de déterminer quels dérivés pourraient se révéler prometteurs et donc d'orienter les synthèses à réaliser.

Pour cela, il a été nécessaire de valider la méthode de calcul que nous avons choisie en réalisant les premiers calculs avec des molécules dont les données expérimentales de liaison aux G4s étaient connues. Ces molécules sont les porphyrines d'or(III) présentées au chapitre précédent. Par la suite une série de nouvelles porphyrines a été également évaluée par cette approche théorique et nous verrons que les résultats obtenus ont permis la sélection d'un composé potentiel dont la rétrosynthèse sera présentée.

I. Les méthodes de calcul de l'énergie libre de liaison

De nombreux processus retrouvés en biologie impliquent des interactions entre molécules. Ces interactions non covalentes, telles que celles retrouvées entre les enzymes et leurs substrats, les ligands et les récepteurs protéiques, ou bien encore les protéines et les acides nucléiques, gouvernent la plupart des processus biologiques retrouvés au sein des cellules. Elles impliquent des mécanismes complexes qui mettent en jeu des modifications des interactions électrostatiques et des forces de Van der Waals (vdW) entre les molécules mises en contact. De nombreux événements thermodynamiques vont conduire à des changements conformationnels et entropiques, ou encore des phénomènes de solvation-désolvation^{1,2}.

L'évaluation de l'affinité d'une molécule vis-à-vis d'une biomolécule par des approches théoriques représente de ce fait un défi majeur. La multiplicité des mécanismes mis en jeu rend cependant cette évaluation complexe et les ressources en temps de calculs seront d'autant plus importantes que l'on réduira le nombre d'approximations.

I. 1. Les fonctions de score

Les approches les plus simples et les moins coûteuses en temps calcul pour calculer l'énergie libre d'interaction sont représentées par les fonctions de scores³. Ces méthodes sont généralement implémentées dans les logiciels de « docking moléculaire » et elles ont pour avantage de calculer rapidement l'affinité d'une molécule vis-à-vis d'une cible et peuvent donc être utilisées pour faire du screening virtuel.

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

Ces fonctions de score sont soit :

- empiriques, et sont basées sur la contribution de termes individuels dont la somme donne l'enthalpie libre totale⁴⁻⁶. Les fonctions et les coefficients décrivant chacun de ces termes sont déterminés par régression linéaire multiple, en utilisant un « ensemble d'apprentissage » constitué d'une librairie de complexes ligands-récepteurs résolus par cristallographie, dont les constantes d'affinités expérimentales sont connues.
- basées sur les équations retrouvées dans les champs de force utilisés en mécanique moléculaire^{7,8}. La détermination de l'enthalpie libre nécessite ici aussi un étalonnage à partir d'un ensemble d'apprentissage.

Du fait de leurs conceptions, les fonctions de score sont le fruit de diverses approximations et simplifications ; elles ne prennent en compte que partiellement certains phénomènes physiques qui déterminent la reconnaissance intermoléculaire, en particulier les phénomènes entropiques ainsi que les changements conformationnels. Elles sont par ailleurs fortement dépendantes de l'ensemble d'apprentissage qui a été utilisé pour les modéliser. En conséquence, elles ne présentent pas suffisamment de robustesse pour déterminer de façon précise l'enthalpie libre de liaison des ligands⁹.

I. 2. Les méthodes basées sur les calculs de dynamique moléculaire

À l'opposé des méthodes empiriques précédentes, se trouvent des méthodes faisant appel à des simulations de Monte Carlo ou de dynamique moléculaire. Les énergies libres sont moyennées sur un ensemble de conformations extraites d'une trajectoire plutôt que calculées sur une conformation unique comme pour les fonctions de score. Elles nécessitent un échantillonnage important du complexe et du ligand libre en solution dans le solvant et sont de ce fait nettement plus coûteuses en temps calcul. Plusieurs stratégies existent pour calculer l'énergie libre de liaison. Elles sont basées sur la mise en place d'un cycle thermodynamique. Trois méthodes couramment utilisées peuvent être citées :

- La méthode MM/PBSA (Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area solvation)⁹⁻¹¹ : l'énergie libre de liaison est évaluée selon l'équation : $\Delta G_{\text{liaison}} = G_{\text{PL}} - G_{\text{P}} - G_{\text{L}}$ dans laquelle G est l'énergie libre, d'un ligand (L), d'une protéine (P) et d'un complexe (PL) à l'équilibre. Une seule trajectoire de dynamique moléculaire est réalisée et les énergies libres de P et L sont calculées après isolation à partir du complexe. C'est une méthode qui est très utilisée et globalement plus robuste que les méthodes empiriques sans être aussi lourde en temps de calcul qu'une méthode alchimique.

Le terme entropique, difficile à calculer via cette méthode sans importants temps de calcul, est souvent négligé. Les incertitudes sur les calculs peuvent être importantes⁹.

- La méthode LIE (Linear Interaction Energy)^{12,13} : Tout comme la méthode MM/PBSA, la méthode LIE se présente comme un bon compromis entre les méthodes de docking/scoring et les coûteuses méthodes alchimiques. L'énergie libre de liaison est obtenue selon l'équation suivante :

$$\Delta G_{\text{bind}} = \alpha (\langle V_{\text{lig-solv}}^{\text{vdw}} \rangle_{\text{lié}} - \langle V_{\text{lig-solv}}^{\text{vdw}} \rangle_{\text{libre}}) + \beta (\langle V_{\text{lig-solv}}^{\text{ele}} \rangle_{\text{lié}} - \langle V_{\text{lig-solv}}^{\text{ele}} \rangle_{\text{libre}}).$$

Deux trajectoires de dynamique sont utilisées, l'une pour le ligand seul en solution et l'autre pour le complexe en solution. L'énergie libre de liaison est obtenue par différence entre les contributions électrostatiques et de

Van der Waals issues de ces trajectoires. Cependant, elle présente également des limites, notamment dans l'attribution des valeurs des coefficients α et β qui sont issus d'ajustements et dont les valeurs sont dépendantes des modèles ayant servi à les obtenir.

- Enfin, la méthode alchimique ABFE (Alchemical Binding Free Energy)¹⁴ : Il s'agit d'une méthode, qui repose sur la simulation d'états non physiques (d'où le nom méthode de méthode alchimique). Elle donne accès à l'énergie libre de liaison entre les deux parties modélisées grâce à deux trajectoires de dynamiques composées chacune d'un certain nombre d'états intermédiaires. Elle présente l'avantage d'inclure les effets entropiques et de solvation et est d'une grande précision¹⁵⁻¹⁷. Les calculs des différences d'énergie libre sont fondés sur des principes de mécanique statistique bien établis. Ils sont basés sur la conception d'un cycle thermodynamique dans lequel le ligand est progressivement "retiré" de la phase aqueuse et "inséré" dans le site de liaison de la macromolécule. La différence d'énergie libre entre les deux états physiques pourra être calculée en faisant la somme des différences d'énergie libre entre toutes les paires d'états intermédiaires alchimiques¹⁸.

C'est la méthode que nous avons choisie, dans la mesure où elle était décrite pour être précise en termes de calculs d'énergies libres. Le gain en précision a cependant pour contrepartie des coûts de calcul élevés.

Considérons la réaction équilibrée $P + L \rightleftharpoons PL$

À l'équilibre, la constante de liaison K peut s'écrire : $K = \frac{[PL]}{[P]x[L]}$

K est reliée à l'énergie libre de liaison par l'équation : $\Delta G^\circ = -k_B.T.\ln K$, où k_B est la constante de Boltzmann et T , la température.

La constante d'équilibre peut aussi s'exprimer par le rapport des probabilités pour que le système soit dans un état i ou un état j : $K = \frac{P_i}{P_j}$ (i pouvant représenter l'état libre : P ou L et j , l'état lié : PL)

La probabilité de trouver le système dans un état par rapport à un autre est déterminée par le rapport des fonctions de partition Q_i et Q_j , de sorte que la différence d'énergie libre pour un ensemble NVT s'écrit :

$$\Delta A_{i \rightarrow j} = -k_B.T. \ln \frac{Q_i}{Q_j} = -k_B.T. \ln \frac{\int_{\Gamma_i} e^{-\frac{U_i}{k_B T}} d\vec{q}}{\int_{\Gamma_j} e^{-\frac{U_j}{k_B T}} d\vec{q}}$$

où $\Delta A_{i \rightarrow j}$ est la différence d'énergie libre de Helmholtz entre l'état i et l'état j , U_i

et U_j sont les énergies potentielles du système, Γ_i et Γ_j sont les volumes de l'espace de phase.

Soit ΔU , le changement d'énergie potentielle associé à la transformation de i vers j : $U_i = U_j + \Delta U$

$$\text{L'équation devient : } \Delta A_{i \rightarrow j} = -k_B.T. \ln \frac{\int_{\Gamma_j} e^{-\frac{U_i}{k_B T}} d\vec{q} \times \int e^{-\frac{\Delta U}{k_B T}} d\vec{q}}{\int_{\Gamma_i} e^{-\frac{U_i}{k_B T}} d\vec{q}} = -k_B.T. \ln \left\langle e^{-\frac{\Delta U}{k_B T}} d\vec{q} \right\rangle$$

Les crochets indiquent une moyenne sur un ensemble conformationnel obtenu par simulation de dynamique moléculaire.

En raison de la compressibilité limitée de l'eau, à 1 atm, l'effet des changements de volume sur l'énergie libre de liaison est négligeable¹⁹. Cela signifie que la composante pV de l'énergie libre peut être ignorée sans effets majeurs sur les résultats. Dans ces conditions, l'énergie libre de Helmholtz est très proche de l'énergie libre de Gibbs :

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

$$\Delta G^{\circ}_{i \rightarrow j} = \Delta A^{\circ}_{i \rightarrow j} = -k_B \cdot T \cdot \ln \left\langle e^{-\frac{\Delta U}{k_B T}} d\vec{q} \right\rangle$$

Cette formulation, développée par Zwanzig²⁰ est à la base de la théorie des perturbations (connue sous le terme de *free energy perturbation* : FEP). Elle n'est cependant applicable que si les états i et j sont suffisamment proches. Dans les méthodes alchimiques de calcul de l'énergie libre, la transformation de l'état pour lequel L et P sont totalement libres (état 0) à l'état pour lequel L et P sont totalement liés (état 1) est effectué via une série de transformations non physiques (ou alchimiques) reliant ces deux états extrêmes²¹. On introduit pour cela un paramètre de couplage λ ²² qui est une variable décrivant une série d'états intermédiaires entre les deux états extrêmes $\lambda = 0$ et $\lambda = 1$. Elle permettra de découpler progressivement les interactions électrostatiques et de van der Waals retrouvées entre le ligand et le solvant ou la macromolécule. Une intégration numérique est alors nécessaire pour calculer la différence d'énergie libre entre $\lambda = 0$ et $\lambda = 1$.

Dans la méthode de l'intégration thermodynamique (TI), la différence d'énergie libre sera calculée par la relation suivante : $\Delta G_{0,1} = \int_{\lambda=0}^{\lambda=1} \frac{\partial U(\lambda, x)}{\partial \lambda} d\lambda$.

Pour une valeur de λ donnée, la moyenne de l'ensemble $\langle \partial U / \partial \lambda \rangle$ est obtenue à partir d'une trajectoire issue d'une simulation.

D'autres méthodes permettent de calculer la différence d'énergie entre les états intermédiaires, on peut notamment citer la *Weighted Histogram Analysis Method* (WHAM)²³, ou encore le ratio d'acceptation de Bennett (Bennett Acceptance Ratio : BAR)²⁴.

À la différence de la méthode TI, la méthode BAR nécessite de connaître la configuration de deux états λ adjacents pour estimer les différences d'énergie libre. Elle est cependant moins dépendante du choix des états intermédiaires, ce qui la rend plus robuste que les autres méthodes^{25,26}.

Le programme de dynamique moléculaire GROMACS²⁷⁻²⁹ intègre un module de calcul de l'énergie libre utilisant la méthode BAR

II. Conception d'un cycle thermodynamique permettant de calculer l'énergie libre absolue de liaison

Dans les méthodes de perturbation l'estimation fiable de la différence d'énergie libre entre l'état initial pour lequel L et P sont libres et final pour lequel ces derniers sont liés, nécessite de définir un chemin reliant ces deux états extrêmes, qui passera par un ensemble d'états intermédiaires. Le cycle thermodynamique ci-dessous qui relie les états liés et non liés pourra être utilisé (Figure 1).

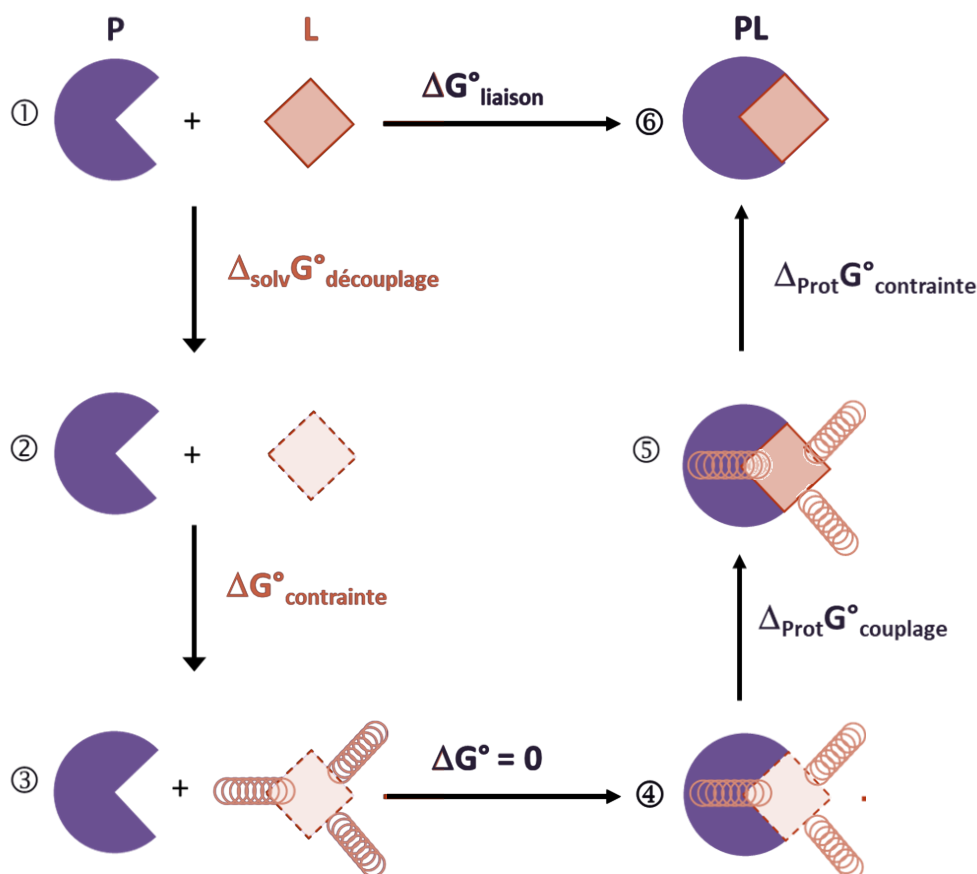


Figure 1 : Cycle thermodynamique utilisé pour calculer l'énergie libre absolue de liaison.

Le ligand (orange sombre) en interaction avec le solvant (①) est progressivement découplé et transformé en un soluté (orange pâle) sans interaction (②) avec une série de calculs durant laquelle les interactions électrostatiques et de van der Waals sont progressivement réduites à zéro, (terme $\Delta_{\text{solv}} G^{\circ} \text{ découplage}$). Le ligand « libre » est soumis ensuite à une contrainte (③) d'énergie égale à $\Delta G^{\circ} \text{ contrainte}$. Cet état énergétique est identique à celui de l'état ④ dans lequel le ligand est retenu à l'intérieur de la cavité sans toutefois interagir. Les interactions électrostatiques et de vdW sont ensuite rétablies (⑤), avec la mise en jeu de l'énergie libre $\Delta_{\text{Prot}} G^{\circ} \text{ couplage}$. Enfin, l'état final (⑥), pour lequel le ligand est dans un état non contraint et en interaction complète avec la macromolécule, est obtenu en annihilant progressivement les contraintes entre le ligand et la protéine (terme $\Delta_{\text{Prot}} G^{\circ} \text{ contrainte}$).

Ce cycle peut être subdivisé en N états λ , qui sont simulés indépendamment les uns des autres. Ces simulations indépendantes sont souvent appelées fenêtres. Dans notre cas, 41 fenêtres ont été utilisées pour le découplage du

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

ligand et $\Delta G_{\text{prot}}^{\circ}$ pour l'interaction du ligand avec le solvant.

Le cycle est caractérisé par six états : les deux états lié et non lié, qui ont une réalité physique dans la partie haute du cycle. L'énergie libre de liaison correspond à la flèche horizontale supérieure et représente l'association du ligand et de la macromolécule.

Les quatre autres états sont les intermédiaires alchimiques pour lesquels le ligand est découplé de l'environnement, c'est-à-dire qu'il n'interagit plus de façon progressive avec le solvant et avec la macromolécule. Lorsque les interactions intermoléculaires du ligand sont supprimées (les interactions intramoléculaires étant toujours présentes), on dit que ce dernier est découplé. Le découplage consiste à supprimer progressivement les forces résultant des interactions électrostatiques et de van der Waals avec l'environnement.

Dans l'état initial non lié (état ①), le ligand est libre en solution. Ce ligand en solution interagit totalement avec le milieu ; il est ensuite progressivement transformé en un soluté découplé (état ②), pour lequel les interactions électrostatiques et de vdW sont progressivement supprimées, en passant par plusieurs états intermédiaires non physiques. Le ligand qui n'a plus aucune interaction avec l'environnement, est ensuite contraint afin de limiter son espace de déplacement (état ③ : présence de ressorts de contrainte). L'état ③ est équivalent l'état ④ pour lequel le ligand découplé est contraint dans la cavité. Le ligand découplé et contraint dans la cavité de la macromolécule voit alors ses interactions électrostatiques et de vdW progressivement réactivées (état ⑤). Les contraintes entre le ligand et la macromolécule sont finalement supprimées, ce qui ferme le cycle et permet d'atteindre l'état final physique, c'est-à-dire celui correspondant à la liaison entre les deux parties (état ⑥).

Le cycle décrit cinq étapes :

- Etape ①→② : $\Delta G_{\text{solv}}^{\circ}$ découplage est l'énergie libre de découplage du ligand de la solution, l'amenant dans un état correspondant à la phase gazeuse.
- Etape ②→③ : ΔG° contrainte est l'énergie libre de contrainte appliquée au ligand de sorte qu'il reste localisé dans une même zone, alors qu'il n'interagit pas avec l'environnement.
- Etape ③→④ : L'énergie libre nécessaire pour positionner le ligand découplé et contraint dans le site de liaison de la cible, qui est égale à zéro
- Etape ④→⑤ : $\Delta G_{\text{prot}}^{\circ}$ couplage est l'énergie libre de couplage du ligand avec son environnement. Les interactions électrostatiques et de vdW sont réactivées, le ligand étant toujours dans un état contraint dans la poche de liaison de la molécule cible.
- Etape ⑤→⑥ : $\Delta G_{\text{prot}}^{\circ}$ contrainte représente l'énergie libre de la suppression des contraintes qui maintenaient le ligand en place.

L'énergie libre de liaison peut alors être calculée en faisant la somme des quatre étapes principales :

$$\Delta G^{\circ}_{\text{liaison}} = \Delta G_{\text{solv}}^{\circ} \text{ découplage} + \Delta G^{\circ} \text{ contrainte} + \Delta G_{\text{prot}}^{\circ} \text{ couplage} + \Delta G_{\text{prot}}^{\circ} \text{ contrainte}.$$

Il est à noter que dans notre cas, le ligand L est une porphyrine H_2 , (non métallée) ou $Au(III)$, (métallée par de l'or(III)) et la macromolécule est un G_4 . Le site de liaison de la porphyrine est une tétrade extérieure du G_4 .

II. 1. Les contraintes de position

L'utilisation de contraintes est importante dans le protocole décrit ci-dessus car elle empêche la porphyrine de quitter le voisinage de la tétrade extérieure de G alors qu'elle n'interagit plus avec l'environnement. Si la porphyrine n'était pas retenue lors du découplage, elle pourrait quitter la cavité de liaison et évoluer dans toute la boîte de simulation. L'utilisation de contraintes permet d'avoir un bon chevauchement de l'espace de phase entre les différentes fenêtres et une convergence plus rapide des calculs^{37,38}.

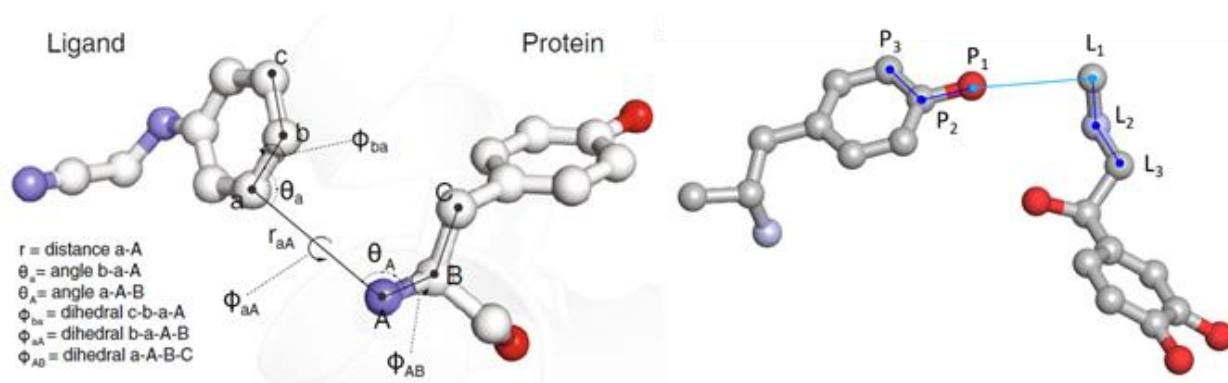


Figure 2 : Ensemble de contraintes proposées par Boresch et al.

On utilise en général l'ensemble de potentiels harmoniques proposées par Boresch et al³¹. Trois atomes (P1, P2, P3) sont choisis sur le G4 et trois autres (L1, L2, L3) sur la porphyrine (**Figure 2**).

L'ensemble de contraintes se compose d'une distance (P1-L1), de deux angles (L1-P1-P2 et P1-L1-L2) et de trois dièdres (L3-L2-L1-P1, L2-L1-P1-P2 et L1-P1-P2-P3) à appliquer entre trois atomes de la porphyrine et trois du G4.

Cet ensemble de potentiels permet de maintenir la porphyrine dans une position spécifique par rapport au site de liaison. L'énergie libre mise en jeu par ces contraintes est par ailleurs facilement accessible par une méthode analytique³¹. La détermination de $\Delta G^{\circ}_{\text{contrainte}}$ dans l'étape ②→③ ne nécessite donc pas de simulations de dynamique moléculaire.

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

II. 2. Mise en place des états intermédiaires

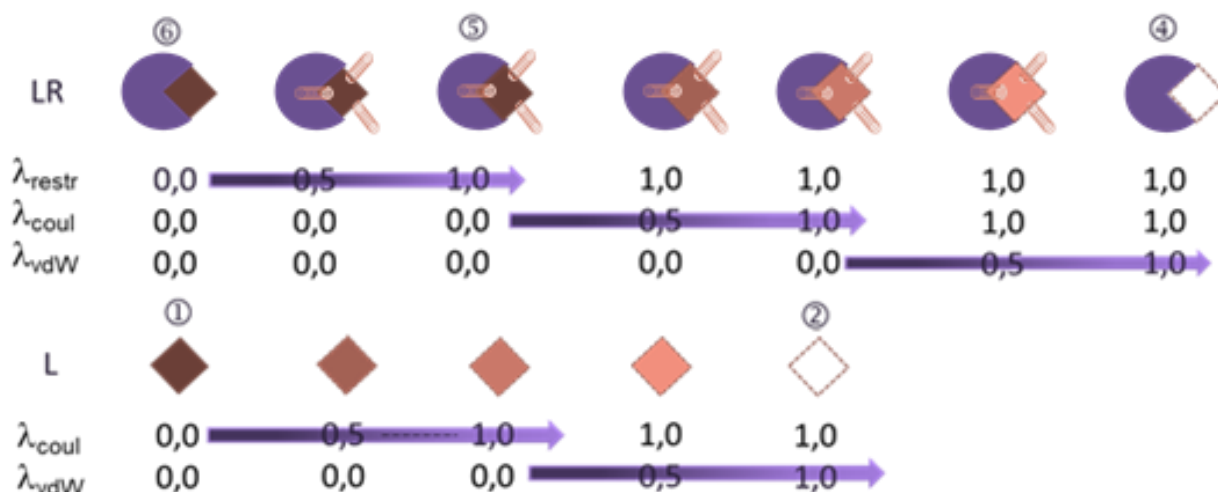


Figure 3 : Figure simplifiée de calcul de l'énergie libre par la méthode alchimique.

La **Figure 3**¹⁴ illustre le schéma de calcul utilisé. Elle montre que plusieurs états intermédiaires doivent être utilisés pour relier les états liés et non liés et obtenir une estimation précise de l'énergie libre de liaison. L'échantillonnage des différents états alchimiques le long du chemin réactionnel, nécessitera de choisir le nombre d'états intermédiaires à déterminer, leur répartition le long du chemin alchimique et la durée des simulations.

Pour une molécule étudiée, il faudra prévoir deux séries de calculs : une pour la porphyrine seule (partie inférieure de la **Figure 3**) et une pour le complexe porphyrine-G4 (partie supérieure de la **Figure 3**).

Le paramètre de couplage λ définit l'état thermodynamique du système le long du cycle thermodynamique. Il peut prendre toutes valeurs comprises entre 0 et 1. Il sera utilisé pour le découplage des interactions coulombiennes et de vdW, ainsi que celui des potentiels harmoniques retenant la porphyrine.

Dans le logiciel GROMACS, il nous faut définir trois ensembles distincts de paramètres de couplage : λ_{coul} , λ_{vdw} , λ_{restr} .

Les trois transformations seront conduites séparément : dans un premier ensemble de fenêtres, seules les charges sont progressivement annihilées, puis dans un deuxième ensemble, ce seront les interactions de vdW, et enfin les contraintes dans un troisième ensemble. Nous considérerons que l'état $\lambda = 0$ correspond à l'état pour lequel la porphyrine est non contrainte et entièrement couplée et que l'état $\lambda = 1$ correspond à l'état pour lequel la porphyrine est contrainte et entièrement découplée.

Chacun des états est contrôlés par les paramètres λ . La ligne supérieure représente le découplage et mise en contrainte de la porphyrine dans le complexe porphyrine-G4 solvato ; la ligne inférieure représente le découplage de la porphyrine isolée en solution. Les états thermodynamiques ①-⑥ correspondent aux états indiqués dans le cycle thermodynamique de la **Figure 1**. Une couleur sombre pour la porphyrine indique la présence d'interactions coulombiennes et de vdW avec l'environnement, tandis qu'une couleur claire leur absence. Les ressorts schématisent la présence de contraintes. Les valeurs de λ_{restr} , λ_{coul} , et λ_{vdw} définissent l'état thermodynamique de la simulation.

Dans la partie haute de la **Figure 3**, la porphyrine est progressivement découplée et annihilée de l'environnement du quadruplex, alors que dans la partie basse, elle est progressivement découplée et annihilée de l'environnement du solvant.

Chacune des colonnes de valeurs de λ correspond à une fenêtre thermodynamique. Les états ① et ⑥ (équivalents à ceux de la **Figure 3**) correspondent à de systèmes L et LR en interaction totale avec leur environnement et ne présentant aucune contrainte, alors que les états ② et ④ sont totalement découplés.

Une représentation du complexe porphyrine-G₄ est montrée sur la **Figure 4**. Le quadruplex utilisé pour les simulations est une structure d'un G₄ caractérisée par RMN (code PDB : 2NAY), cible potentielle qui se trouve dans la région *Long Terminal Repeat* (LTR) du VIH-1³².

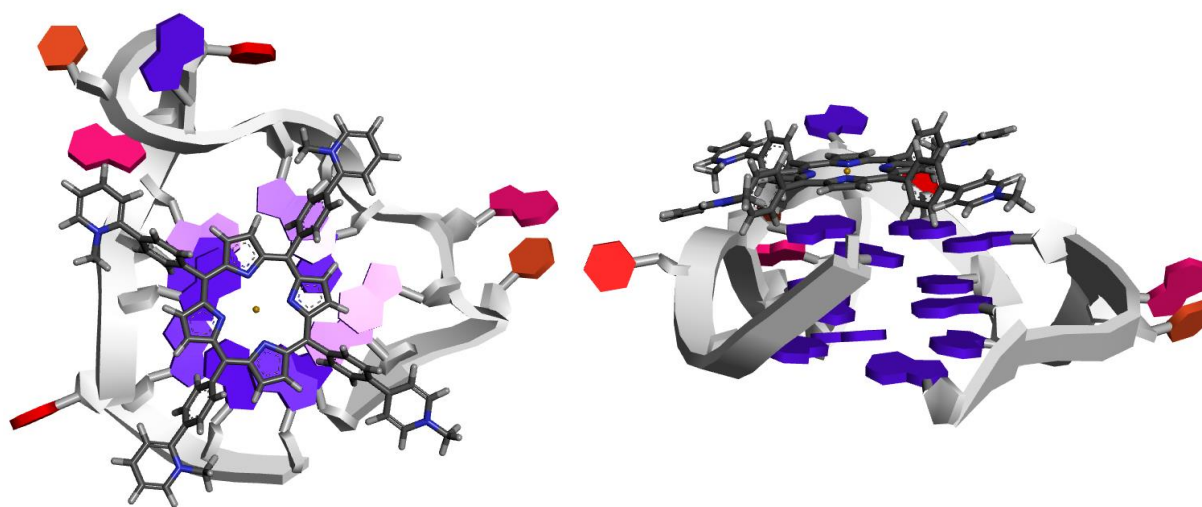


Figure 4 : Représentation de la porphyrine **Au(MA)₃MA₄** sur un G₄ du VIH-1. En violet les G, en rose les A, en orange les T et en rouge les C.

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

II. 3. Les porphyrines d'or(III)

II. 3. i. Validation de la méthode

Nous avons utilisé la méthode Alchemical Binding Free Energy (ABFE) afin de vérifier que les résultats obtenus via les calculs étaient compatibles avec les données expérimentales des molécules. Nous avons utilisé les structures des porphyrines testées en FRET dans le chapitre précédent pour les premières simulations effectuées. Les porphyrines simulées sont présentées sur le **Schéma 1**. Les $\Delta T_{1/2}$ mesurés (**Chapitre II Figure 11**) nous ont permis de classer ces molécules de la plus affine à la moins affine, ce classement s'étant révélé dépendant du nombre de charges et de leur position sur le cycle pyridine.

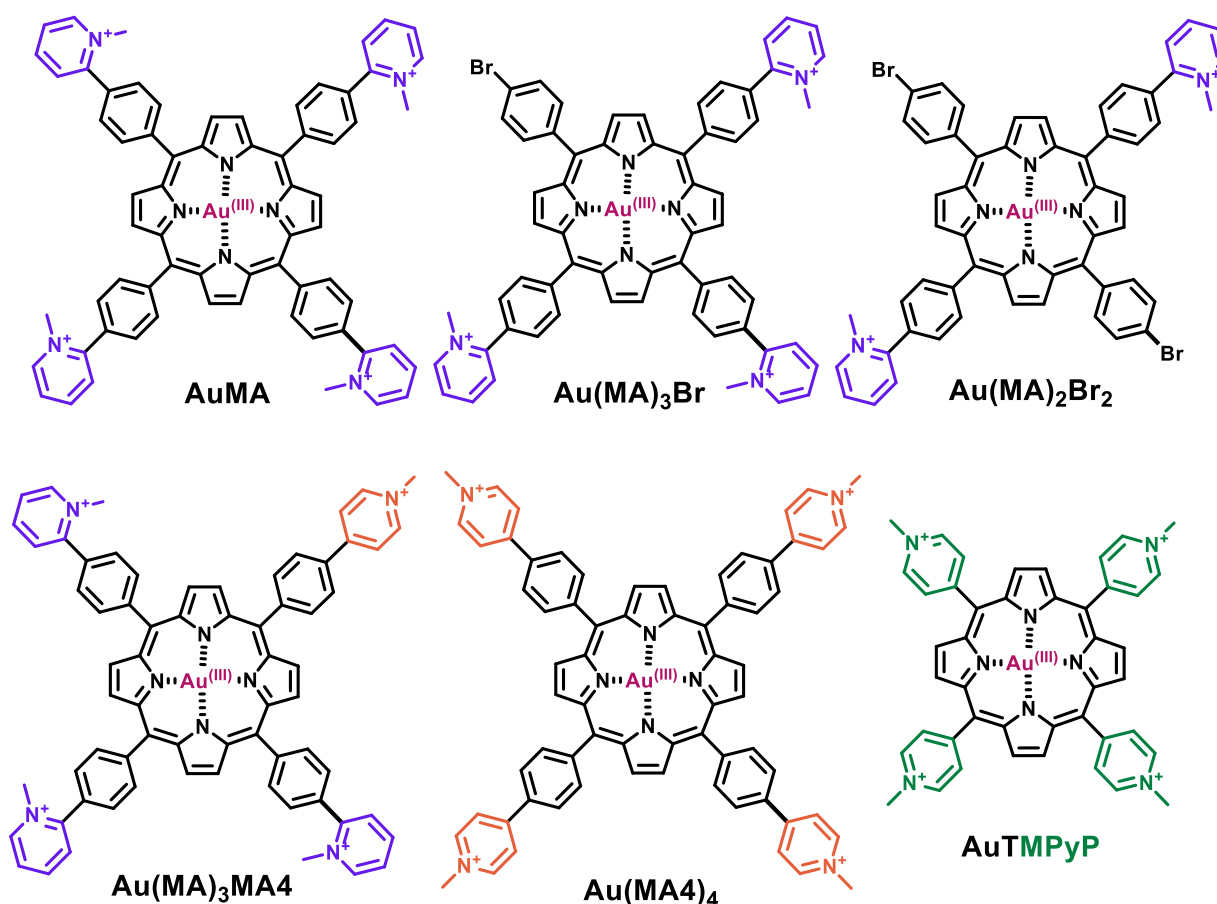


Schéma 1 : Structures des porphyrines testées en FRET et utilisées pour valider la méthode de calcul.

La porphyrine la plus affine est **Au-MA**. Puis viennent par ordre d'affinité décroissante **Au(MA)₃MA₄**, **Au(MA₄)₄**, **Au(MA)₃Br** et enfin la porphyrine **Au(MA)₂Br₂**. Il apparaît clairement que les porphyrines pentacationiques sont de bien meilleurs ligands de G₄s.

Parmi les porphyrines pentacationiques celle qui a les moins bonnes capacités de liaison, **Au(MA)₄**, est aussi la moins soluble. La moins bonne capacité de ce composé à stabiliser le G₄ en FRET peut s'expliquer par une concentration de porphyrine moins importante en solution du fait qu'elle a tendance à former des microagrégats.

II. 3. ii. Résultats

Les résultats de ces premiers calculs sont présentés dans le **Tableau 1**. On peut constater que la tendance observée expérimentalement est conservée. En effet, si l'on regarde les cinq premières entrées du tableau qui concernent les porphyrines testées au chapitre précédent, on remarque effectivement que les meilleures énergies d'interaction sont bien retrouvées avec les porphyrines pentacationique et que l'affinité baisse en même temps que la diminution de la charge. Ainsi, l'énergie libre de liaison calculée de la porphyrine **Au(MA)₃Br** (tetracationique) est moins favorable et dans le cas de la porphyrine **Au(MA)₂Br₂** (tricationique), elle l'est encore moins.

On remarque également que la porphyrine pentacationique **Au(MA₄)₄**, qui stabilisait moins bien le G-quadruplex que les deux autres porphyrines pentacationiques en FRET, se retrouve ici avec une énergie libre de liaison toute aussi forte. Cela va dans le sens de la proposition de microagrégations de cette porphyrine en solution, qui diminuent sa concentration effective, effet qui n'apparaît pas dans le calcul.

Enfin, la porphyrine **Au-TMPyP₄** (entrée 6) présente un ΔG° supérieur à celui de **AuMA** et cela correspond bien aux résultats de FRET précédemment publiés³³.

Tableau 1 : Résultats des calculs d'énergies des différentes porphyrines seules, en complexe avec le G₄ 2N₄Y, les contraintes appliquées et l'énergie de liaison. Les énergies sont données en kJ/mol.

Porphyrines	Nombre de +	ΔG°_L ⁽¹⁾	ΔG°_{PL} ⁽²⁾	ΔG°_{rest}	ΔG°_{bind} *
AuMA	5	1275,18	1427,11	29,72	-122,21
Au(MA)₂Br₂	3	540,71	605,77	29,59	-35,47
Au(MA)₃Br	4	977,28	1075,61	29,52	-68,81
Au(MA)₃MA₄	5	1248,87	1463,01	30,49	-183,65
Au(MA₄)₄	5	1224,13	1372,46	28,76	-119,57
AuTMPyP	5	1844,71	1949,96	29,744	-75,51

¹ variation de l'énergie libre du ligand

² variation de l'énergie du complexe G₄-porphyrine

* $\Delta G^\circ_{bind} = \Delta G^\circ_L + \Delta G^\circ_{rest} - \Delta G^\circ_{PL}$

Ces résultats indiquent que la méthode employée semble d'une fiabilité suffisante pour prévoir l'affinité de porphyrines pour lesquelles nous n'avons pas de données expérimentales.

L'objectif suivant est donc le design de porphyrines qui seront présumées être de meilleurs ligands de G₄s qu'**AuMA**. Ces composés sont présentés dans la partie suivante et se scindent en deux familles. La première regroupe trois dérivés fluorés de **H₂MA** destinés à étudier le remplacement de l'ion Au(III) au centre de la porphyrine par des atomes de fluor dont l'effet attendu serait de diminuer la densité électronique du coeur de la porphyrine. La seconde série a été modélisée à la suite des résultats obtenus sur la première série fluorée et ne comporte que deux molécules, cette fois-ci des analogues métallés d'**AuMA**.

En conclusion de cette partie, les porphyrines synthétisées précédemment et dont l'affinité apparente pour les G₄s a été évaluée en FRET ont fait l'objet d'une étude de modélisation et leur énergie de liaison avec le G₄ du VIH-1 (PDB id.

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

2N₄Y) ont été évaluées en faisant appel à une méthode alchimique. Les résultats de ces calculs concordent avec les données expérimentales qui nous ont permis de classer ces porphyrines de la plus affine à la moins affine.

Cette phase de test nous a permis de valider la méthode de calcul et d'aborder dans la partie suivante les calculs des énergies de liaison de porphyrines nouvelles qui ne sont pas disponibles.

III. La modélisation de nouvelles porphyrines vers la synthèse de meilleurs dérivés

III. 1. Modélisation de nouvelles porphyrines

III. 1. i. Les porphyrines fluorées

Le postulat de départ était de modéliser des dérivés de la porphyrine **H₂MA** portant de multiples groupements fluors afin d'étudier l'influence de ces groupements très électroattracteurs sur l'affinité pour les G₄s. Il s'agit de vérifier si la présence de ces groupements peut se substituer à un ion Au(III) pour augmenter les interactions de π -stacking avec la tétrade de G₄ en appauvrissant la densité électronique au cœur de la porphyrine. Les structures des porphyrines sont indiquées sur le **Schéma 2**.

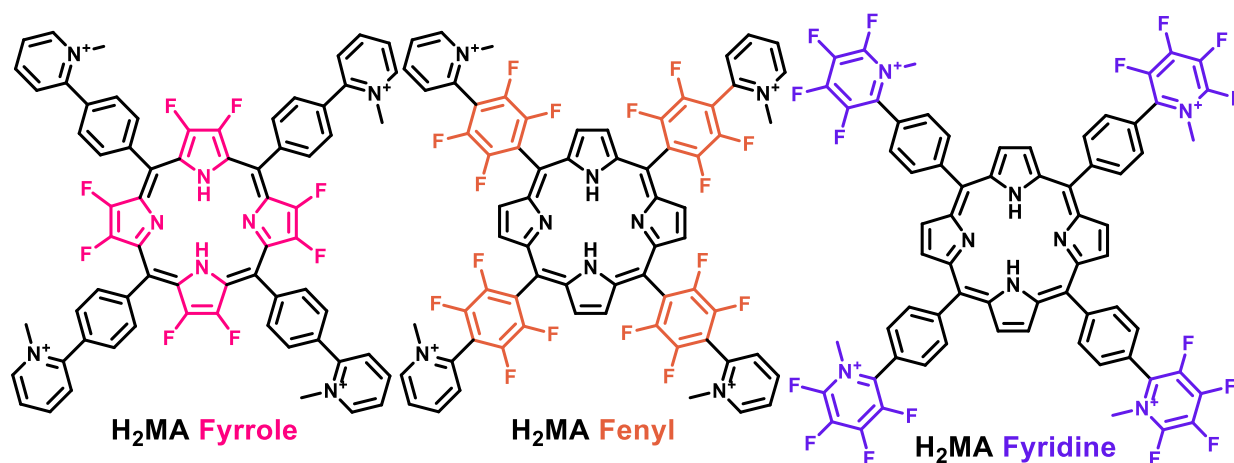


Schéma 2 : Structures des porphyrines H₂ fluorées.

La première porphyrine fluorée envisagée porte des atomes de fluor sur le cœur pyrrole, il s'agit de la *meso*-tetrakis[(4-(*N*-methylpyridinium-2-yl)phenyl)] β -octafluoroporphyrin (**Fyrrole**). Sa synthèse peut être envisagée en employant la synthèse classique d'Adler et Longo en remplaçant le pyrrole par du pyrrole 3,4-difluoré dont la synthèse est décrite à partir de l'analogue dibromé³⁴. Il a été également envisagé de modéliser la porphyrine dont les bras *meso* seraient porteurs d'atomes de fluors sur la partie médiane du bras, la porphyrine *meso*-tetrakis[(4-(*N*-methylpyridinium-2-yl)-2,3,5,6-tetrafluorophenyl)]porphyrin dont la synthèse a déjà été reportée³⁵ (**Fenyl**). Enfin, une porphyrine dont les groupes pyridinium seraient fluorés a également été envisagée bien que cette dernière représente un défi en termes de synthèse organique dans la mesure où les précurseurs de pyridines perfluorées fonctionnalisées ne sont pas très

abondants. Ce composé serait la *meso*-tetrakis[(4-(3,4,5,6-tetrafluoro-*N*-methylpyridinium-2-yl)phenyl]porphyrin appelée **Fyridine**.

Les valeurs d'énergie libre de liaison calculées sont reportées dans le **Tableau 2** et comparées avec les valeurs obtenues pour **AuMA** et **H₂MA** respectivement.

Tableau 2 : Résultats des calculs d'énergies des différentes porphyrines de fluor seules, en complexe avec le G₄ 2N₄Y, les contraintes appliquées et l'énergie de liaison. Les énergies sont données en kJ/mol.

Porphyrines	ΔG°_L ⁽¹⁾	ΔG°_{PL} ⁽²⁾	ΔG°_{rest}	ΔG°_{bind} *
Fyridine	1034,07	1252,71	28,98	-189,66
Fyrrole	950,87	1067,36	29,49	-86,99
Fenyl	1002	1108,27	28,35	-77,92
AuMA	1275,18	1427,27	29,75	-122,34
H₂MA	608,44	740,13	29,45	-102,24

¹ variation de l'énergie libre du ligand

² variation de l'énergie du complexe G₄-porphyrine

* $\Delta G^\circ_{bind} = \Delta G^\circ_L + \Delta G^\circ_{rest} - \Delta G^\circ_{PL}$

On observe que l'absence de l'ion Au(III) au cœur de la porphyrine ne peut être compensée dans le cas des porphyrines **Fyrrole** et **Fenyl** dont les valeurs des ΔG° calculées sont supérieures à celle d'**AuMA**. Elles s'avèrent avoir des valeurs de ΔG° du même ordre que celle de **H₂MA**. La présence de cycles perfluorés ne semble pas significativement jouer sur l'affinité de ces porphyrines. Par contre, il s'avère que la porphyrine **Fyridine** montre un ΔG° inférieur à **AuMA**, et ce malgré l'absence d'un cœur métallique.

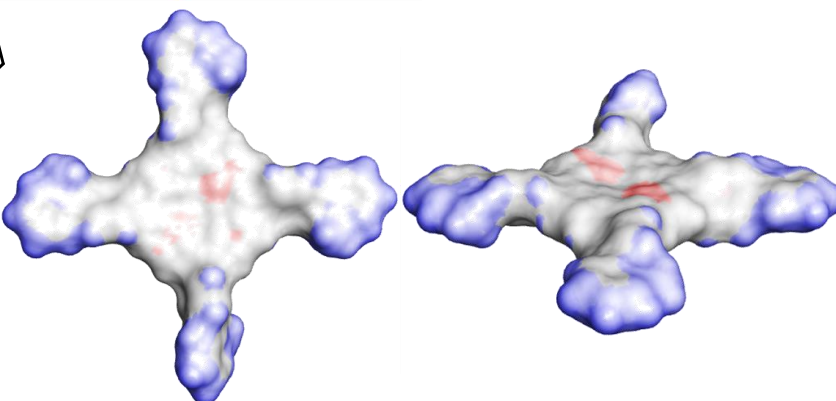
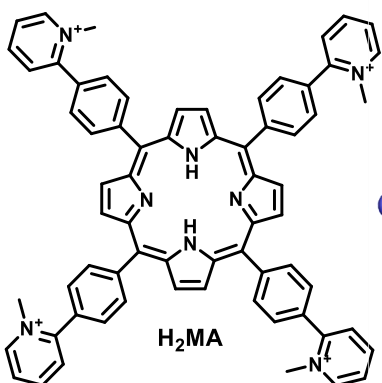
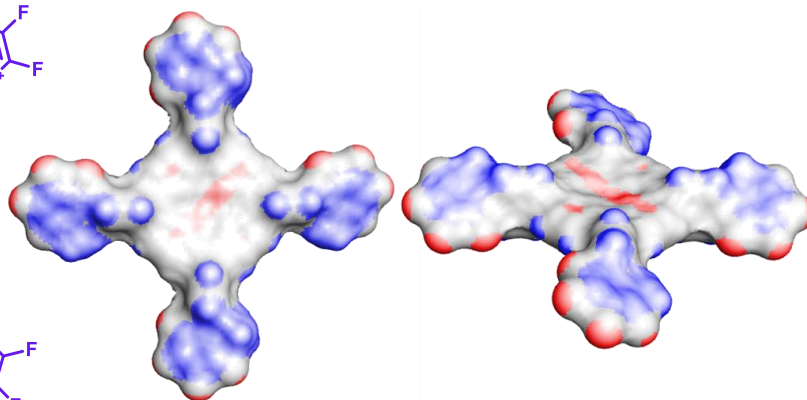
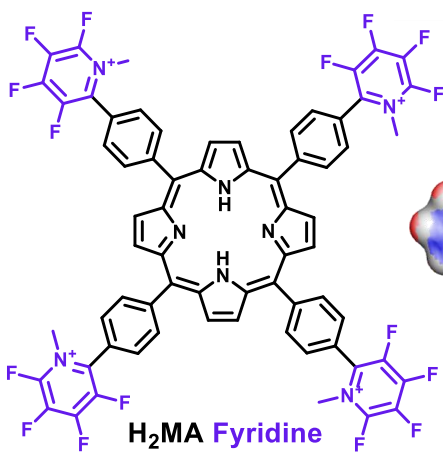
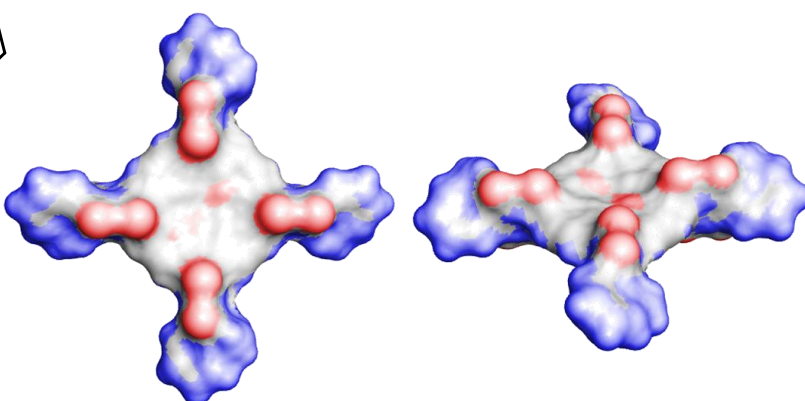
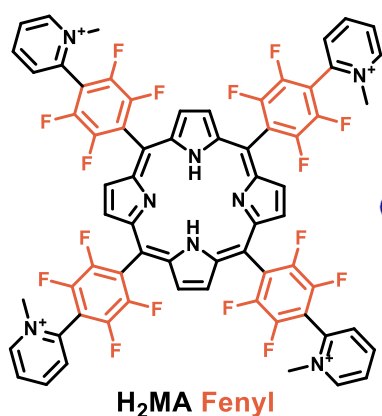
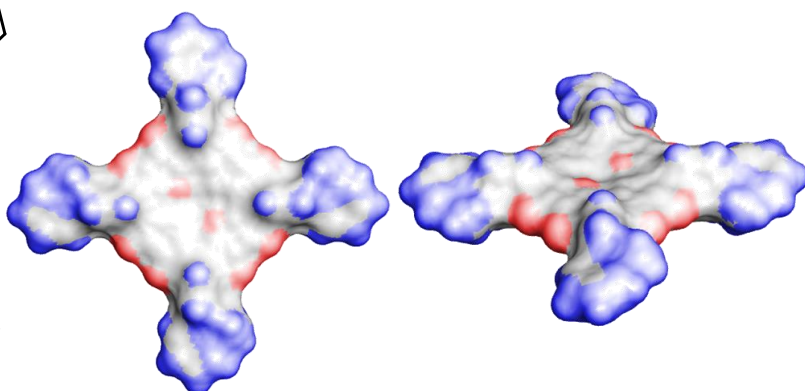
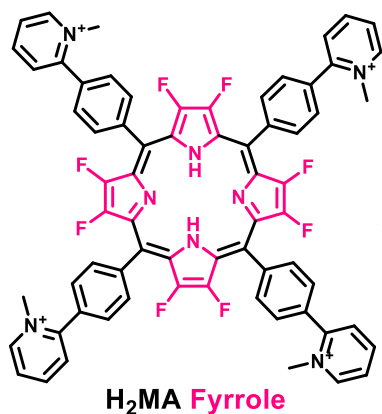
Nous avons également étudié la répartition des potentiels électrostatiques sur les différentes porphyrines (**Figure 5**). Les charges partielles de chaque molécule ont été calculées avec la méthode RESP (Restreint ElectroStatic Potentiel) ³⁶, implémentée dans la suite AMBER®, et elles ont été visualisées avec le logiciel Discovery Studio Vizualizer®, qui a été l'interface principale de visualisation de cette étude.

Nous nous attendions à ce que la présence de groupements électroattracteurs modifie les potentiels électrostatiques locaux d'une façon similaire à l'ion Au(III), qui apporte une charge positive supplémentaire au cœur de la porphyrine. Nous observons sur la **Figure 5** que cela ne semble pas être le cas. La présence de groupements électroattracteurs sur le cycle pyridinium modifie la répartition de la densité positive sur ce dernier. Il est possible que la modification de cette répartition renforce localement les interactions électrostatiques du cycle pyridinium avec les groupements phosphates périphériques du G₄.

Nous déduisons de ces résultats qu'un moyen d'augmenter l'énergie de liaison d'**AuMA** pour une structure de G₄ serait d'ajouter des groupements électroattracteurs, non pas sur le cœur tetrapyrrolique de la porphyrine, ni sur les phenyls, mais sur les groupements pyridiniums extérieurs. C'est ce qui a été envisagé dans la partie suivante. Il est à noter que dans cette dernière partie, les porphyrines comportent bien un atome d'Au(III) au cœur de la porphyrine.

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines



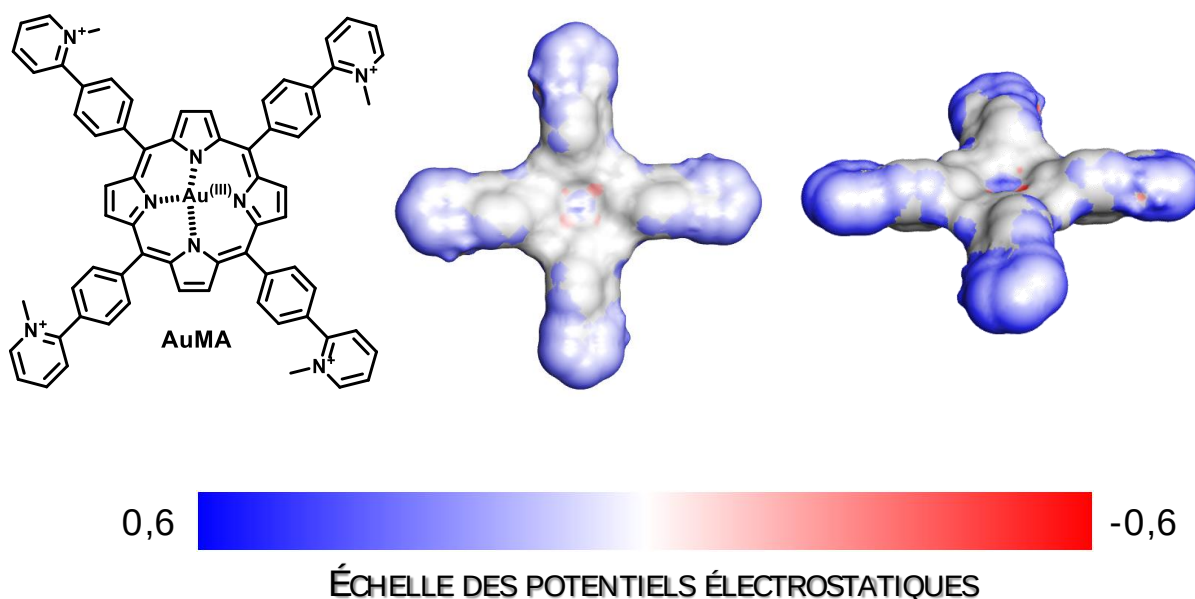


Figure 5 : Représentation de la distribution des potentiels électrostatiques sur les différentes porphyrines fluorées, ainsi que sur **AuMA** et **H₂MA** employées comme références.

En conclusion, les modélisations de dérivés fluorés de **H₂MA** nous ont permis de constater que la présence de groupements électroattracteurs sur le cycle pyridinium semblait être favorable à une diminution du ΔG° de liaison entre la porphyrine et le G₄. Ce constat a orienté le design des porphyrines qui seront présentées dans la partie suivante.

III. 1. ii. Des composés aux 2-pyridinium substitués

Nous avons choisi de réaliser les calculs d'énergie de liaison de porphyrines d'or portant un groupement électroattracteur sur le cycle pyridinium. Les groupements choisis sont un groupement nitro ou bien un atome de fluor, tous deux très électroattracteurs. De plus, les dérivés présentés sont potentiellement plus accessibles en termes de synthèse qu'une porphyrine comme la **Fyridine**.

La position du groupement sur le cycle peut être discutée. Dans ce cas-ci, il a été choisi dans un premier temps, de placer ce groupement en position 4, en position para de l'azote, de façon à renforcer la charge positive présente sur cet atome. Il serait tout à fait possible d'envisager de le placer en position 5 de sorte que l'effet attracteur soit plutôt dirigé vers la porphyrine. Par manque de temps, cela n'a pas été fait mais peut tout à fait être considéré en guise de perspectives. Les structures des porphyrines sont représentées sur le **Schéma 3**.

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

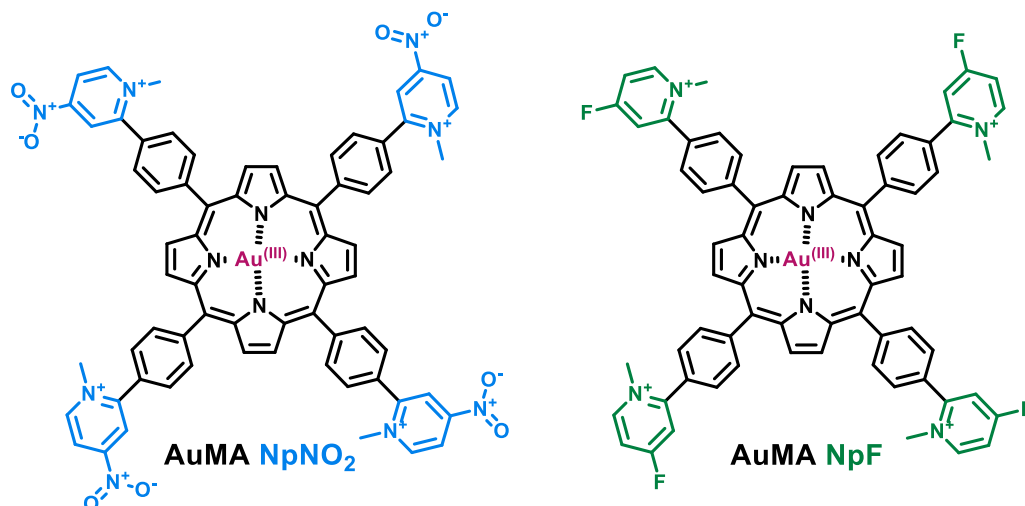


Schéma 3 : Structures de deux porphyrines substituées sur les noyaux pyridinium.

Tableau 3 : Résultats des calculs d'énergies des différentes porphyrines seules, en complexe avec le G₄ 2N₄Y, les contraintes appliquées et l'énergie de liaison. Les énergies sont données en kJ/mol.

Porphyrines	ΔG°_L ⁽¹⁾	ΔG°_{PL} ⁽²⁾	ΔG°_{rest}	ΔG°_{bind} *
AuNpNO ₂	1406,46	1584,88	29,43	-148,99
AuNpF	1351,94	1494,57	29,59	-113,04
AuMA	1275,18	1427,27	29,75	-122,34

¹ variation de l'énergie libre du ligand

² variation de l'énergie du complexe G₄-porphyrine

* $\Delta G^{\circ}_{bind} = \Delta G_L + \Delta G^{\circ}_{rest} - \Delta G^{\circ}_{PL}$

D'après les résultats regroupés dans le **Tableau 3**, un groupement nitro serait un meilleur groupement que l'atome de fluor seul. Une modification de la porphyrine **AuMA** dans ce sens devrait donc en théorie améliorer l'affinité de la porphyrine pour le quadruplex. Suite à ces résultats théoriques et afin de vérifier expérimentalement que ce composé est un bien meilleur ligand de G₄S, la synthèse du composé **AuMA NpNO₂** a été envisagée. Seule sa rétrosynthèse est proposée dans la partie suivante.

III. 2. Les essais de synthèses

Dans cette partie seront présentées les premières étapes de synthèses des porphyrines **Fyrrole** et **Fenyl**, ainsi qu'une rétrosynthèse proposée de la porphyrine **AuMA NpNO₂**.

III. 2. i. La porphyrine « **Fenyl** » **19**

La porphyrine **H₂MAFenyl** (**Schéma 2**) est décrite dans la littérature et sa synthèse a été reproduite bien que celle-ci se soit avérée plus difficile que prévu. La première étape consistait en la synthèse de la porphyrine symétrique *meso*-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin, **H₂TFPP**. Cette synthèse, également publiée³⁷, a été effectuée selon le protocole classique d'Adler et Longo en mettant en jeu l'aldéhyde correspondant et du pyrrole dans de l'acide propionique (**Schéma 4**).

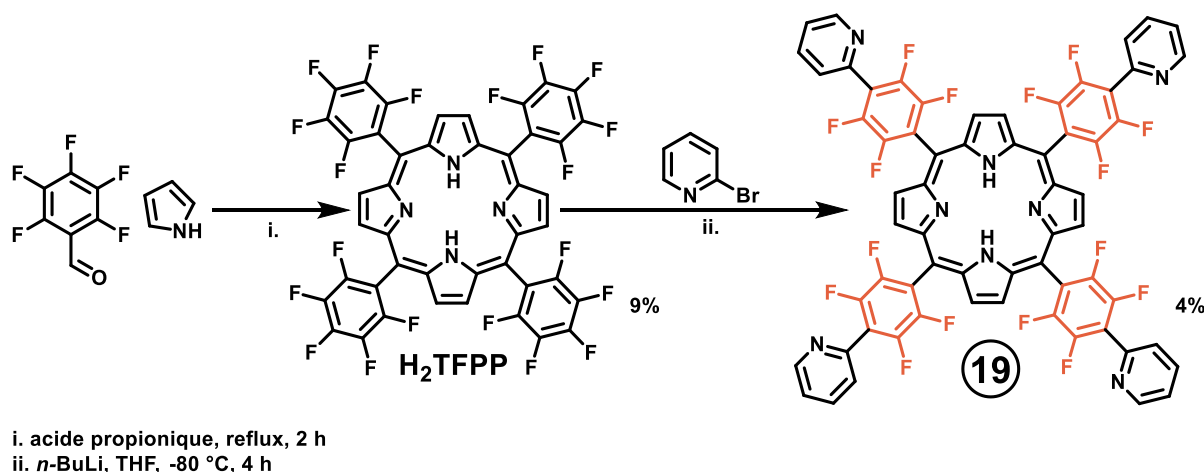


Schéma 4 : Synthèse de la porphyrine **H₂TFPP** puis de la porphyrine **19**.

La porphyrine **H₂TFPP** est obtenue après une purification grossière sur un plug de silice en éluant uniquement au dichlorométhane puis en faisant une séparation sur colonne d'alumine neutre en éluant cette fois avec de l'éther de pétrole et un gradient de dichlorométhane.

L'étape suivante consiste à substituer l'atome de fluor en position 4 par une 2-pyridine. Cela est possible en générant un intermédiaire réactionnel carbanion sur la 2-bromopyridine par échange halogène-métal réalisé avec une solution de *n*-butyllithium à très basse température. Cet intermédiaire 2-lithiopyridine s'additionne sur le groupement pentafluorophenyl par substitution nucléophile aromatique pour donner **19**.

Cependant, la première étape, qui consiste en la génération de l'intermédiaire 2-lithiopyridine à -80 °C a été difficile à réaliser. Il est nécessaire de contrôler rigoureusement la vitesse d'addition du *n*-BuLi. En effet le produit est très réactif et une addition trop rapide ou au contraire trop lente du *n*-BuLi conduit à sa dégradation. La formation de la 2-lithiopyridine peut être vérifiée par l'apparition d'une couleur jaune dans le milieu, les composés de départ étant incolores. Il faut veiller à ce que la couleur jaune se maintienne pendant l'ajout progressif du *n*-BuLi sans que le milieu

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

devienne marron. Après agitation pendant 3 h à -80 °C, la porphyrine **H₂TFPP** est canulée directement dans le milieu réactionnel et l'agitation se poursuit à -80 °C pendant 1 h. Préalablement à l'ajout, la porphyrine doit être solubilisée dans du THF anhydre et placée à -80 °C pendant 15 min afin de ne pas créer de choc thermique au moment de l'ajout. Au terme de la réaction, on obtient, après une purification sur colonne de silice, le composé attendu **19** mais avec un rendement extrêmement faible de l'ordre de 4% (**Schéma 4**).

Les conditions de réaction et la difficulté de l'échange halogène métal n'étant malheureusement pas totalement maîtrisées, la synthèse de la porphyrine **19** s'est avérée très délicate.

Cette porphyrine est destinée à être méthylée pour obtenir **H₂MAFenyl**, voire métallée, sous réserve d'accumuler suffisamment de matériel afin d'être testée en FRET pour évaluer son affinité pour les structures de G4s et la comparer aux données dont nous disposons. Dans la bibliographie, il avait été montré que cette porphyrine avait un potentiel en tant qu'inhibiteur de la prolifération cellulaire en interférant avec la reconnaissance ligand-récepteur de facteurs de croissance comme FGF (Fibroblast Growth Factor) ou VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)³⁵. Il est possible que l'activité *in vivo* de ce composé soit également liée à ses propriétés de ligand de G4s puisqu'il est connu que de telles séquences existent au sein du promoteur de VEGF³⁸.

III. 2. ii. La porphyrine « Fyrrole »

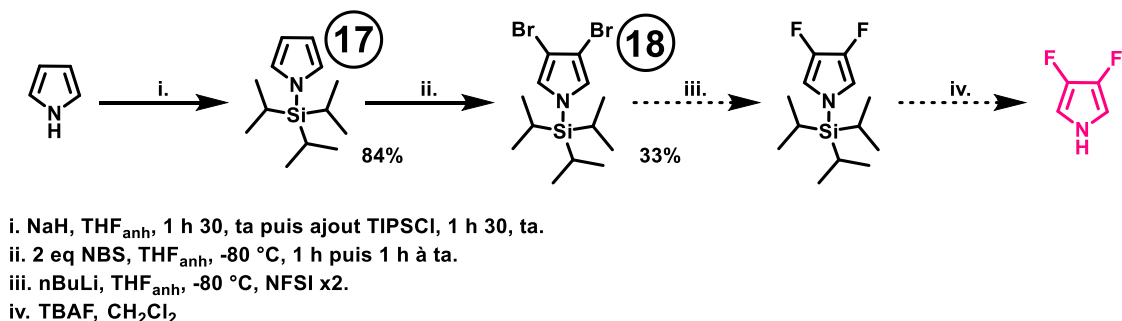


Schéma 5 : Synthèse du 3,4-dibromo-1-triisopropylsilylpyrrole. Les étapes n'ayant pas abouti, sont présentées avec des flèches pointillées.

Les premières étapes de la synthèse de la porphyrine **H₂MAFyrrole** (**Schéma 2**) sont décrites sur le **Schéma 5**. Les étapes n'ayant pas abouti sont marquées en pointillés.

Le point de départ de la synthèse de cette porphyrine est le pyrrole. Avant l'halogénéation du composé, il est nécessaire de passer par une première étape de fonctionnalisation du pyrrole. En ajoutant un groupement triisopropyl silyl (TIPS) sur l'azote, on introduit une gêne stérique au niveau des positions en α du cycle. De cette façon, on minimise l'halogénéation de ces positions lors de l'étape suivante. Le composé **17** est isolé sous la forme d'une huile rose qui est conservée sous argon et à -22 °C.

Cette huile est ensuite mise en jeu dans une étape de bromation³⁹ avec deux équivalents de *N*-bromosuccinimide (NBS) ajoutés simultanément à -80 °C. L'agitation est maintenue 1 h à cette température puis la réaction est laissée à

réchauffer jusqu'à température ambiante. Le produit attendu, **18**, est récupéré par extraction à l'éther du milieu réactionnel sous forme d'un mélange avec le sous-produit 3-bromo-1-triisopropylpyrrole. Ce dernier existe sous la forme d'une huile tandis que le composé **18** est un solide blanc. Ce solide peut être isolé de l'huile par recristallisations successives et un retrait manuel de l'huile par essorage des cristaux avec du papier filtre.

Contrairement à ce qui est indiqué dans la publication de référence³⁹, le composé **18** n'est pas stable dans le temps dans les conditions ambiantes. En effet, lorsqu'il est laissé à l'air libre sur la paillasse, on observe la formation d'une poudre noire insoluble en une nuit. Le composé **18** non dégradé peut être isolé de cette poudre par solubilisation puis filtration avant d'être à nouveau recristallisé. Il se conserve cependant très bien sous argon et au congélateur. Il se présente sous la forme de cristaux blancs dégageant une forte odeur, très désagréable et caractéristique.

L'étape suivante consiste en l'échange des atomes de brome par des atomes de fluor. Cette substitution se fait en deux temps. Il s'agit de réaliser dans un premier temps un échange halogène-métal entre un brome du cycle pyrrole et le lithium du *n*-BuLi afin de générer un carbanion. Le carbanion sera ensuite engagé dans une monofluoruration lors de l'ajout de *N*-fluorobenzenesulfonimide. Ce processus est répété deux fois et, à l'issue de la purification, il s'avère que nous obtenons un mélange qui, même s'il contient le produit attendu, ne peut être utilisé pour la suite de la synthèse. D'après la RMN du résidu récupéré, l'impureté est le 3-fluoro-1-triisopropylsilylpyrrole (environ 30%). Il ne manquait ensuite que l'étape de déprotection en présence de fluorure de tetrabutylammonium (TBAF) pour obtenir le 3,4-difluoro-1H-pyrrole.

C'est à nouveau la réaction impliquant la génération d'un carbanion par échange halogène-métal qui pose problème. La difficulté de ces réactions demande donc une mise au point rigoureuse afin de mieux maîtriser les conditions expérimentales.

III. 2. iii. La porphyrine « PGF »

Deux porphyrines cationiques d'or ont montré une activité antivirale remarquable sur le VIH-1 : la porphyrine **AuMA** et la porphyrine **AuPG**. L'introduction d'atomes de fluor sur le squelette de la porphyrine **H₂PG** (Schéma 6) a donc également été envisagée.

Dans cette optique nous avons tenté de synthétiser le dérivé porphyrine fluorée au niveau du phenyl, **H₂PGF** (Schéma 6). Classiquement, la **H₂PG** est obtenue à partir de la *meso*-tetrakis(4-aminophenyl)porphyrin^{40,41}. Le point de départ de la synthèse de l'analogue fluoré sera donc la *meso*-tetrakis(2,3,5,6-tetrafluoro-4-aminophenyl)porphyrin.

Pour réaliser la synthèse de ce composé, nous partons de la **H₂TFPP** synthétisée précédemment. La première stratégie consistait à engager la porphyrine dans des réactions de substitutions nucléophiles^{42,43}. La première réaction tentée a été l'introduction d'une fonction amine primaire en faisant réagir la porphyrine **H₂TFPP** avec une solution d'ammoniac afin de substituer le fluor en position 4 comme décrit pour d'autres noyaux aromatiques fluorés. La réaction n'a cependant rien donné.

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

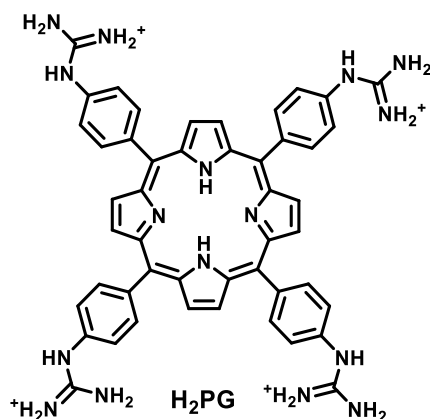


Schéma 6 : Structure de la porphyrine H_2PG .

La nouvelle stratégie consiste alors en l'introduction de fonctions azotures en position 4 des groupements fluorophenyl. La synthèse de la porphyrine **20** a été décrite précédemment⁴⁴. Cette réaction se fait relativement facilement avec un rendement de 87% et génère la porphyrine **20** (Schéma 7). Ces fonctions azotures peuvent être réduites de différentes manières afin de générer une fonction amine primaire qui pourra être fonctionnalisée de sorte à obtenir la fonction guanidinium.

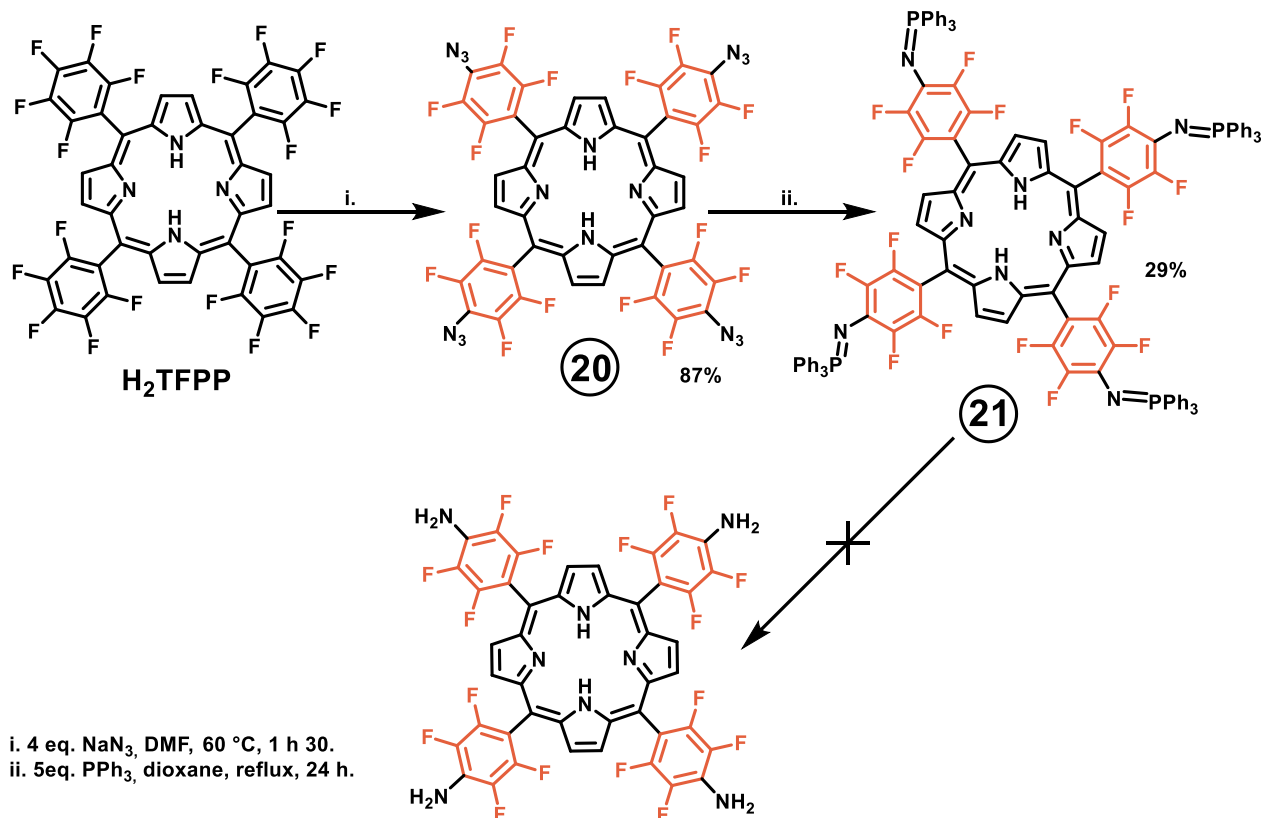


Schéma 7 : Tentative pour l'obtention du précurseur aminé pour la synthèse de la porphyrine H_2PGF .

Nous avons choisi comme protocole de réduction une réaction de Staudinger^{45,46}, pour son apparente simplicité à mettre en place. En effet, cette réaction se fait en deux étapes, la première étant la génération d'une imine triphenylphosphine et la seconde une hydrolyse de l'imine. La réaction de la porphyrine **20** avec la triphenylphosphine génère la porphyrine **21**. L'étape de réduction n'a pas pu être menée au bout car l'intermédiaire phosphazène **21** est totalement insoluble dans l'eau dont la présence, même en quantité minime, entraîne une précipitation immédiate du composé. L'hydrolyse de l'imine intermédiaire a été impossible à réaliser. Cette voie de réduction est alors abandonnée.

Pour préparer la porphyrine attendue, d'autres protocoles de réduction à partir de **20** auraient pu être testés, comme par exemple avec des sels d'étain ou du LiAlH_4 ⁴⁷.

III. 2. iv. La rétrosynthèse proposée de **AuMA NpNO₂**

Afin de synthétiser le composé **AuMA NpNO₂**, il est envisagé de débiter la synthèse à partir d'une porphyrine A_4 commerciale, *meso*-tetrakis(4-dihydroxyborylphenyl)porphyrin (**Schéma 8**).

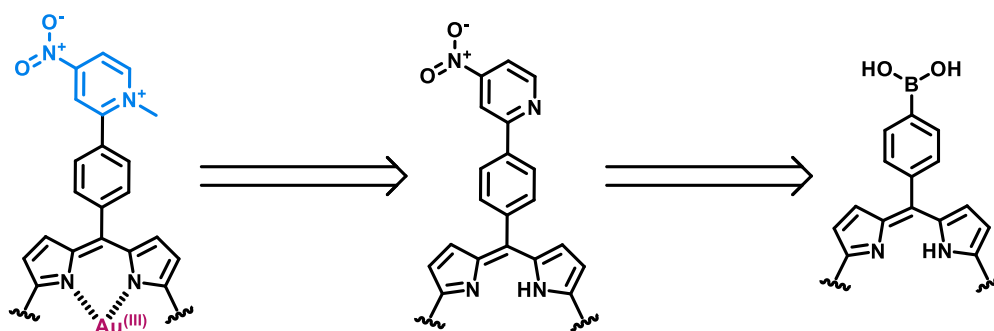


Schéma 8 : Rétrosynthèse proposée du composé **AuMA NpNO₂**.

Un couplage de Suzuki-Miyaura à partir de la 2-bromo-4-nitropyridine commerciale est proposé comme moyen d'introduire la fonction nitro sur le cycle pyridine. Les étapes classiques de méthylation et métallation se feraient à la suite de ce couplage et permettraient normalement d'accéder au composé attendu. La même stratégie serait applicable à partir de la 2-bromo-5-nitropyridine, également commerciale. Il est également possible de synthétiser l'aldéhyde correspondant à partir du 4-boronic-benzaldehyde puis de réaliser la porphyrine.

Ce composé semble accessible facilement après un nombre limité d'étapes et constituerait un bon point de départ à l'investigation de futures porphyrines anti VIH-1.

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

IV. Conclusion du chapitre

Les travaux présentés dans ce chapitre présentent la méthode ABFE appliquée à des porphyrines d'or(III) dans l'étude de leur interaction avec une structure de G_4 décrite. Nous avons validé la méthode théorique avec les résultats expérimentaux présentés au chapitre précédent, ce qui nous a permis de préparer de nouvelles porphyrines et de réaliser une étude théorique structure/affinité.

Cette étude a permis de mettre en évidence que des modifications structurales telles que l'ajout d'un groupement électroattracteur sur le cycle pyridinium de la porphyrine de référence **AuMA** semble augmenter son énergie de liaison avec la tétrade de G. Une telle porphyrine peut être attendue expérimentalement comme étant un meilleur ligand de G_4 . Si la synthèse du meilleur composé de l'étude, à savoir la porphyrine **Fyridine** semble difficilement réalisable, nous nous sommes alors concentrés sur la modélisation de porphyrines plus accessibles ne comportant qu'une seule fonction supplémentaire. La rétrosynthèse du meilleur composé de cette deuxième étude **AuMA NpNO₂** a été présentée.

Dans la continuité de ce travail, il est possible de réaliser la modélisation de nouvelles structures portant des modifications sur le cycle pyridinium. Il est possible de varier la position du groupement électroattracteur, de modifier sa nature ou son nombre par exemple, comme il est possible de vérifier l'effet d'une seconde charge positive présente sur le cycle.

La synthèse du composé **AuMA NpNO₂** constituerait un bon point de départ à cette étude par la confirmation expérimentale de son potentiel en tant que ligand de G_4 .

RÉFÉRENCES DU CHAPITRE 3

- (1) *In Silico Drug Discovery and Design: Theory, Methods, Challenges, and Applications*, 1st ed.; Cavasotto, C. N., Ed.; CRC Press, 2015. <https://doi.org/10.1201/b18799>.
- (2) Gohlke, H.; Klebe, G. Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors. *Angew Chem Int Ed* **2002**, *33*.
- (3) Cheng, T.; Li, X.; Li, Y.; Liu, Z.; Wang, R. Comparative Assessment of Scoring Functions on a Diverse Test Set. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49* (4), 1079–1093. <https://doi.org/10.1021/cig000053>.
- (4) Böhm, H.-J. Prediction of Binding Constants of Protein Ligands: A Fast Method for the Prioritization of Hits Obtained from de Novo Design or 3D Database Search Program. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, *12* (4), 309–309. <https://doi.org/10.1023/A:1007999920146>.
- (5) Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T. R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P. Empirical Scoring Functions: I. The Development of a Fast Empirical Scoring Function to Estimate the Binding Affinity of Ligands in Receptor Complexes. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1997**, *11* (5), 425–445. <https://doi.org/10.1023/A:1007996124545>.
- (6) Wang, R.; Liu, L.; Lai, L.; Tang, Y. SCORE: A New Empirical Method for Estimating the Binding Affinity of a Protein-Ligand Complex. *J. Mol. Model.* **1998**, *4* (12), 379–394. <https://doi.org/10.1007/s008940050096>.
- (7) Meng, E. C.; Shoichet, B. K.; Kuntz, I. D. Automated Docking with Grid-Based Energy Evaluation. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13* (4), 505–524. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130412>.
- (8) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17* (14), 24.
- (9) Genheden, S.; Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA Methods to Estimate Ligand-Binding Affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10* (5), 449–461. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1032936>.
- (10) Srinivasan, J.; Cheatham, T. E.; Cieplak, P.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Continuum Solvent Studies of the Stability of DNA, RNA, and Phosphoramidate-DNA Helices. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (37), 9401–9409.
- (11) Homeyer, N.; Gohlke, H. Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area Method. *Mol. Inform.* **2012**, *31* (2), 114–122. <https://doi.org/10.1002/minf.201100135>.
- (12) Rifai, E. A.; van Dijk, M.; Geerke, D. P. Recent Developments in Linear Interaction Energy Based Binding Free Energy Calculations. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 114. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00114>.
- (13) de Amorim, H. L.; Caceres, R.; Netz, P. Linear Interaction Energy (LIE) Method in Lead Discovery and Optimization. *Curr. Drug Targets* **2008**, *9* (12), 1100–1105. <https://doi.org/10.2174/138945008786949360>.

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

- (14) Aldeghi, M.; Bluck, J. P.; Biggin, P. C. Absolute Alchemical Free Energy Calculations for Ligand Binding: A Beginner's Guide. In *Computational Drug Discovery and Design*; Gore, M., Jagtap, U. B., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2018; Vol. 1762, pp 199–232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7756-7_11.
- (15) Chipot, C. Frontiers in Free-Energy Calculations of Biological Systems: WIREs Computational Molecular Science: Frontiers in Free-Energy Calculations. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2014**, *4* (1), 71–89. <https://doi.org/10.1002/wcms.1157>.
- (16) Mobley, D. L.; Dill, K. A. Binding of Small-Molecule Ligands to Proteins: “What You See” Is Not Always “What You Get.” *Structure* **2009**, *17* (4), 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.02.010>.
- (17) Aldeghi, M.; Bodkin, M. J.; Knapp, S.; Biggin, P. C. Statistical Analysis on the Performance of Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area versus Absolute Binding Free Energy Calculations: Bromodomains as a Case Study. *J. Chem. Inf. Model.* **2017**, *57* (9), 2203–2221. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00347>.
- (18) Shirts, M. R.; Mobley, D. L.; Chodera, J. D. Chapter 4 Alchemical Free Energy Calculations: Ready for Prime Time? In *Annual Reports in Computational Chemistry*; Elsevier, 2007; Vol. 3, pp 41–59. [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(07\)03004-6](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(07)03004-6).
- (19) *Computational Drug Discovery and Design*; Baron, R., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2012; Vol. 819. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-465-0>.
- (20) Zwanzig, R. W. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *J. Chem. Phys.* **1954**, *22* (8), 1420–1426. <https://doi.org/10.1063/1.1740409>.
- (21) Valleau, J. P.; Card, D. N. Monte Carlo Estimation of the Free Energy by Multistage Sampling. *J. Chem. Phys.* **1972**, *57* (12), 5457–5462. <https://doi.org/10.1063/1.1678245>.
- (22) Beveridge, D. L.; DiCapua, F. M. Free Energy Via Molecular Simulation: Applications to Chemical and Biomolecular Systems. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1989**, *18* (1), 431–492. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.18.060189.002243>.
- (23) Kumar, S.; Rosenberg, J. M.; Bouzida, D.; Swendsen, R. H.; Kollman, P. A. The Weighted Histogram Analysis Method for Free-Energy Calculations on Biomolecules. I. The Method. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13* (8), 1011–1021. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130812>.
- (24) Bennett, C. H. Efficient Estimation of Free Energy Differences from Monte Carlo Data. *J. Comput. Phys.* **1976**, *22* (2), 245–268. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(76\)90078-4](https://doi.org/10.1016/0021-9991(76)90078-4).
- (25) Paliwal, H.; Shirts, M. R. A Benchmark Test Set for Alchemical Free Energy Transformations and Its Use to Quantify Error in Common Free Energy Methods. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (12), 4115–4134. <https://doi.org/10.1021/ct2003995>.

- (26) de Ruiter, A.; Boresch, S.; Oostenbrink, C. Comparison of Thermodynamic Integration and Bennett Acceptance Ratio for Calculating Relative Protein-Ligand Binding Free Energies. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34* (12), 1024–1034. <https://doi.org/10.1002/jcc.23229>.
- (27) Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91* (1–3), 43–56. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E).
- (28) Lindahl, E.; Hess, B.; van der Spoel, D. GROMACS 3.0: A Package for Molecular Simulation and Trajectory Analysis. *J. Mol. Model.* **2001**, *7* (8), 306–317. <https://doi.org/10.1007/s008940100045>.
- (29) Abraham, M. J.; Murtola, T.; Schulz, R.; Páll, S.; Smith, J. C.; Hess, B.; Lindahl, E. GROMACS: High Performance Molecular Simulations through Multi-Level Parallelism from Laptops to Supercomputers. *SoftwareX* **2015**, *1–2*, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- (30) Mobley, D. L.; Chodera, J. D.; Dill, K. A. On the Use of Orientational Restraints and Symmetry Corrections in Alchemical Free Energy Calculations. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125* (8), 084902. <https://doi.org/10.1063/1.2221683>.
- (31) Boresch, S.; Tettinger, F.; Leitgeb, M.; Karplus, M. Absolute Binding Free Energies: A Quantitative Approach for Their Calculation. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (35), 9535–9551. <https://doi.org/10.1021/jp0217839>.
- (32) De Nicola, B.; Lech, C. J.; Heddi, B.; Regmi, S.; Frasson, I.; Perrone, R.; Richter, S. N.; Phan, A. T. Structure and Possible Function of a G-Quadruplex in the Long Terminal Repeat of the Proviral HIV-1 Genome. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (13), 6442–6451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw432>.
- (33) Pipier, A.; De Rache, A.; Modeste, C.; Amrane, S.; Mothes-Martin, E.; Stigliani, J.-L.; Calsou, P.; Mergny, J.-L.; Pratviel, G.; Gomez, D. G-Quadruplex Binding Optimization by Gold(III) Insertion into the Center of a Porphyrin. *Dalton Trans.* **2019**, *48* (18), 6091–6099. <https://doi.org/10.1039/C8DT04703K>.
- (34) Higashino, T.; Osuka, A. 2,3,17,18-Tetrahalohexaphyrins and the First Phlorin-Type Hexaphyrins. *Chem. - Asian J.* **2013**, *8* (9), 1994–2002. <https://doi.org/10.1002/asia.201300474>.
- (35) Aviezer, D.; Cotton, S.; David, M.; Segev, A.; Khaselev, N.; Galili, N.; Gross, Z.; Yaron, A. Porphyrin Analogues as Novel Antagonists of Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Binding That Inhibit Endothelial Cell Proliferation, Tumor Progression, and Metastasis. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2973–2980.
- (36) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Kollman, P. A. Application of RESP Charges to Calculate Conformational Energies, Hydrogen Bond Energies, and Free Energies of Solvation. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (21), 9620–9631. <https://doi.org/10.1021/ja00074a030>.
- (37) De Poorter, B.; Meunier, B. Metalloporphyrin-Catalysed Epoxidation of Terminal Aliphatic Olefins with Hypochlorite Salts or Potassium Hydrogen Persulphate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1985**, No. 11, 1735. <https://doi.org/10.1039/p29850001735>.

CHAPITRE 3

Modélisation et ouverture vers de nouvelles porphyrines

- (38) Sun, D.; Guo, K.; Shin, Y.-J. Evidence of the Formation of G-Quadruplex Structures in the Promoter Region of the Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (4), 1256–1265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq926>.
- (39) Bray, B. L.; Mathies, P. H.; Naef, R.; Solas, D. R.; Tidwell, T. T.; Artis, D. R.; Muchowski, J. M. N-(Triisopropylsilyl)Pyrrole. A Progenitor “Par Excellence” of 3-Substituted Pyrroles. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (26), 6317–6328. <https://doi.org/10.1021/j000313a019>.
- (40) Sabater, L.; Nicolau-Travers, M.-L.; De Rache, A.; Prado, E.; Dejeu, J.; Bombarde, O.; Lacroix, J.; Calsou, P.; Defrancq, E.; Mergny, J.-L.; Gomez, D.; Pratviel, G. The Nickel(II) Complex of Guanidinium Phenyl Porphyrin, a Specific G-Quadruplex Ligand, Targets Telomeres and Leads to POT1 Mislocalization in Culture Cells. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20* (4), 729–738. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1260-8>.
- (41) Perrier, A.; Mothes, E.; Bonduelle, C.; Pratviel, G. Synthesis of Asymmetric Guanidiniumphenyl-Aminophenyl Porphyrins. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **2016**, *20* (12), 1438–1443. <https://doi.org/10.1142/S1088424616501170>.
- (42) Kvičala, J.; Beneš, M.; Paleta, O.; Král, V. Regiospecific Nucleophilic Substitution in 2,3,4,5,6-Pentafluorobiphenyl as Model Compound for Supramolecular Systems. Theoretical Study of Transition States and Energy Profiles, Evidence for Tetrahedral SN₂ Mechanism. *J. Fluor. Chem.* **2010**, *131* (12), 1327–1337. <https://doi.org/10.1016/j.jfluchem.2010.09.003>.
- (43) Hori, T.; Osuka, A. Nucleophilic Substitution Reactions of Meso-5,10,15-Tris(Pentafluorophenyl)Corrole; Synthesis of ABC-Type Corroles and Corrole-Based Organogels. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010* (12), 2379–2386. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200901500>.
- (44) Heredia, D. A.; Martínez, S. R.; Durantini, A. M.; Pérez, M. E.; Mangione, M. I.; Durantini, J. E.; Gervaldo, M. A.; Otero, L. A.; Durantini, E. N. Antimicrobial Photodynamic Polymeric Films Bearing Biscarbazol Triphenylamine End-Capped Dendrimeric Zn(II) Porphyrin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (31), 27574–27587. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b09119>.
- (45) Lenstra, D. C.; Lenting, P. E.; Mecinović, J. Sustainable Organophosphorus-Catalysed Staudinger Reduction. *Green Chem.* **2018**, *20* (19), 4418–4422. <https://doi.org/10.1039/C8GC02136H>.
- (46) Lenstra, D. C.; Wolf, J. J.; Mecinović, J. Catalytic Staudinger Reduction at Room Temperature. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (10), 6536–6545. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b00831>.
- (47) Boyer, J. H. Reduction of Organic Azides to Primary Amines with Lithium Aluminum Hydride. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73* (12), 5865–5866. <https://doi.org/10.1021/ja01156a507>.

MATERIEL ET MÉTHODES

I. Matériels et produits

Les composés commercialement disponibles ont été achetés chez Sigma Aldrich et/ou Fluorochem. Les colonnes Sep Pak C18 5 g ont été achetées chez Waters. La biotine cadaverine employée lors du couplage final a été achetée chez Iris Biotech. La résine Dowex 1x8-200 (Cl form) a été achetée chez Sigma Aldrich. Les solvants employés lors des synthèses proviennent de chez Carlo Erba et ont été utilisés directement sans purification ou distillation supplémentaire sauf si indiqué. Les analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice (SiO₂), silica gel 60 F254 de chez Merck ou alumine neutre de chez Sigma Aldrich. Les spectres RMN ont été réalisés sur des spectromètres Bruker Avance 300, 400 ou NEO 600. Le pic résiduel du solvant de RMN est utilisé comme référence. Les spectres de masse ont été réalisés sur des spectromètres QTOF premier HAB262 (electrospray) ou Xevo G2 QTOF (haute résolution, electrospray) de chez Waters, **DSQ II (Thermo Fisher Scientific)** (DCI). Les analyses par chromatographie liquide haute pression (HPLC) ont été réalisées sur un appareil Lachrom Elite équipé d'un détecteur à barrette de diode. La colonne utilisée est une colonne nucleosil C18, 10 µm, 250 mm x 4,6 mm (Interchim, France).

II. Expériences de FRET

Les oligonucléotiques ont été achetés chez Eurogentec. Les expériences sont réalisées dans des plaques 96 puits avec l'oligonucléotide F21T (*FAM*-5'-d(GGG(TTAGGG)₃)-3'-*TAMRA*) (*FAM* λ_{ex} 490 nm λ_{em} 520 nm | *TAMRA* λ_{ex} 515 nm λ_{em} 588 nm). qui correspond à la séquence télomérique. Les oligonucléotides F-HIV-21-T (*FAM*-5'-d(TGGGCGGGACTGGGGAGTGGC)-3'-*TAMRA*), F-HIV-321-T (*FAM*-5'-d(TGGCCTGGGCGGGACTGGG)-3'-*TAMRA*) et F-HIV-32-T (*FAM*-5'-d(AGGGAGGCGTGGCCTGGGCGGG)-3'-*TAMRA*) qui correspondent à des séquences présentes dans la région U3 du « long terminal repeat » (LTR) de HIV-1 sont également employés. Les mesures et les courbes de dénaturation ont été réalisées sur un fluorimètre CFX96 real-time PCR (Bio-Rad). Après une stabilisation du milieu à une température de 20 °C, la température est augmentée progressivement de 0,5 °C en 0,5 °C toute les minutes, jusqu'à atteindre la température de 99 °C. Le volume total de chaque puit est de 25 µL suivant la composition ci-après : porphyrine à 0,4 µM, oligonucléotide à 0,2 µM dans du tampon cacodylate de lithium 10 mM pH 7.2, 90 mM LiCl, 10 mM KCl pour l'oligomère F21T et du tampon cacodylate de lithium 10 mM pH 7.2, 100 mM KCl pour les oligonucléotides F-HIV-21-T, F-HIV-321-T et F-HIV-32-T.

Pour les tests de compétition, de l'ADN duplex ds26, 5'-d(CAATCGGATCG AATTCGATCCGATTG), est ajouté au milieu à différentes concentrations (1, 4 et 10 µM) correspondant à 5, 20 ou 50 équivalents par rapport à l'oligonucléotide formant le G₄. On conserve la même concentration en ligands.

Chaque mesure est réalisée trois fois en utilisant trois puits par expérience à chaque fois. L'analyse des données a été effectuée avec les logiciels Prism® et Excel®.

III. Spectroscopie UV-Vis

Principe

Les molécules d'intérêt synthétisées lors de ces travaux (les porphyrines) absorbent dans l'UV et le visible. On peut directement corréler leur absorbance A à la concentration c de la solution étudiée ainsi qu'à la longueur parcourue dans le milieu l et enfin le coefficient d'extinction molaire ϵ via la loi de Beer-Lambert :

$$A = \log(I / I_0) = \epsilon \times c \times l$$

I représente l'intensité de la lumière transmise, I_0 l'intensité de la lumière incidente à une longueur d'onde donnée et ϵ le coefficient d'extinction molaire, caractéristique de chaque molécule. Chaque bande d'absorption générée sur un spectre UV-vis donne des informations structurales sur le composé étudié.

Partie expérimentale

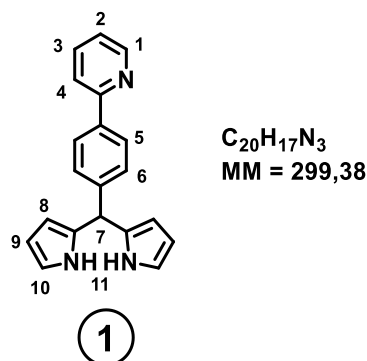
Les spectres UV-vis ont été réalisés sur un spectromètre Hewlett Packard 8452A à 25 °C dans des cuves de quartz d'un centimètre de trajet optique. Les spectres ont été mesurés sur une amplitude allant de 200 nm à 800 nm. La détermination du coefficient d'extinction molaire de chaque composé a été réalisée suivant trois mesures à trois concentrations, 0,5 μ M, 1 μ M et 2 μ M. Lors des suivis de métallation à l'or(III), une solution de HCl 1M ou 2M est utilisée pour acidifier le milieu et vérifier l'avancement de la réaction.

IV. Synthèse des composés

Remarques préliminaires :

- les masses molaires (MM) indiquées sur les schémas sont en g/mol ;
- les numéros des atomes sur les schémas correspondent aux attributions des signaux sur les spectres RMN ;
- à chaque composé est attribué un numéro ou une abréviation ;
- les noms des produits sont en anglais sauf pour certains réactifs courants pour lesquels le nom en français est utilisé.

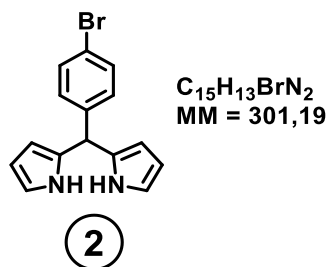
(4-(pyridin-2-yl)phenyl)dipyrromethane¹



On prépare un volume suffisant de pyrrole pour la réaction. Le volume souhaité est mis à sécher sur CaH_2 (entre 1 et 3 jours). Le pyrrole est ensuite collecté par distillation sous vide. L'excédent sera stocké sous argon et à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le pyrrole fraîchement distillé (6,5 mL, 93,6 mmol) est placé dans un ballon de Schlenk sec et sous argon contenant 0,865 g de 4-(2-pyridinyl)benzaldehyde (4,72 mmol). Le mélange est mis à buller sous argon à l'abri de la lumière pendant 10 min. On ajoute enfin 40 μL d'acide trifluoroacétique (TFA) (0,52 mmol). Le mélange est mis sous agitation à température ambiante, à l'abri de la lumière et sous argon pendant une nuit, voire deux (environ 27 h en moyenne). La réaction est suivie en CCM (sur SiO_2) avec comme système éluant $CH_2Cl_2/EtOAc$ (7/1) et la réaction est poursuivie jusqu'à disparition du produit de départ. Une fois la réaction complète, le pyrrole est distillé une nouvelle fois et le milieu sec est déposé sur une colonne de silice fine (43-60 μm) et purifié en utilisant un gradient d'acétate d'éthyle (0 $\rightarrow$ 15%). Le résidu obtenu est solubilisé dans un minimum d'EtOAc et précipité depuis de l'éther de pétrole (40-60). Le produit est récupéré sous forme d'une poudre très légèrement jaunâtre (607 mg, rendement 43%). CCM (SiO_2 , $CH_2Cl_2/EtOAc$, 7/1) R_f : 0,46. **RMN ^1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 8,97 (ddd, $J = 5, 2, 1\text{ Hz}$, 1H, **4**), 8,01 (bs, 2H, **11**), 7,93 (ddd, $J = 8, 2, 2\text{ Hz}$, 2H, **5**), 7,77–7,68 (m, 2H, **2** & **3**), 7,32 (ddd, $J = 8, 2, 2\text{ Hz}$, 2H, **6**), 7,23 (ddd, $J = 7, 5 ; 1,5\text{ Hz}$, 1H, **1**), 6,70 (ddd, $J = 2,5 ; 2,5 ; 1,5\text{ Hz}$, 2H, **10**), 6,18 (ddd, $J = 3,5 ; 2,5 ; 2,5\text{ Hz}$, 2H, **9**), 5,95 (dddd, $J = 3,5 ; 2,5 ; 1,5 ; 1\text{ Hz}$, 2H, **8**), 5,53 (bs, 1H, **7**). **SM-ES $^+$** m/z : 300,1 $[M+H]^+$.

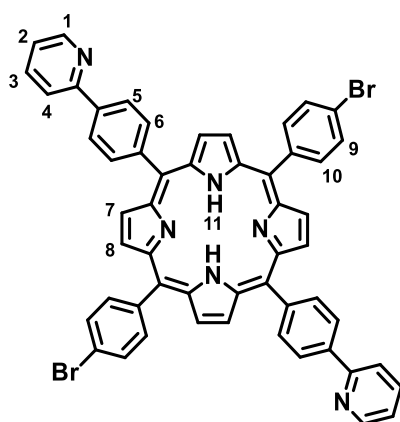
MATERIEL & METHODES

(4-bromophenyl)dipyrromethane



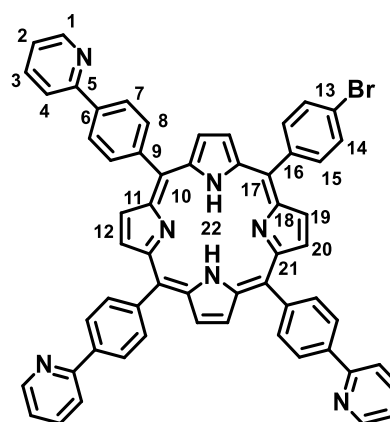
Dans un ballon de Schlenk préalablement séché, on place 1 g de 4-bromobenzaldehyde (5,4 mmol) sous flux d'argon. On introduit ensuite un excès de pyrrole fraîchement distillé (7,5 mL). Après un bullage de 10 minutes sous argon, on introduit 40 μ L de TFA (0,52 mmol) et on laisse agiter à l'abri de la lumière et à température ambiante. La réaction est suivie par CCM (sur SiO_2) avec le système éluant $CH_2Cl_2/EtOAc$ (5/5) et est arrêtée lorsque l'aldéhyde de départ est complètement consommé (environ 20 h). Le pyrrole est distillé et le résidu est déposé sur une colonne de silice fine (43-60 μ m) et purifié. Le système d'éluant utilisé est le suivant : $CH_2Cl_2/EtOAc/NEt_3$ (70/30/3). La première fraction est récupérée sous forme d'un produit légèrement rose. Le résidu obtenu est solubilisé dans un minimum d'EtOAc et précipité depuis de l'éther de pétrole (40-60). Le produit est obtenu après filtration, il est de couleur beige (300 mg, rendement 18%). CCM (SiO_2 , $CH_2Cl_2/EtOAc/NEt_3$, 85/15/1) R_f : 0,41. **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 7,92 (bs, 2H, **NH**), 7,44 (ddd, $J = 6,5 ; 2 ; 2$ Hz, 2H, **phe**), 7,09 (dddd, $J = 6,5 ; 2 ; 2 ; 0,6$ Hz, 2H, **phe**), 6,71 (ddd, $J = 2,7 ; 2,7 ; 1,5$ Hz, 2H), 6,16 (ddd, $J = 3,4 ; 2,7 ; 2,7$ Hz, 2H), 5,89 (dddd, $J = 3,4 ; 2,5 ; 1,6 ; 1$ Hz, 2H), 5,44 (bs, 1H). **SM** (DCI NH_3) m/z : 301,1 (50%) et 302,2 (50%) $[M+H]^+$.

5-(4-bromophenyl)-10,15,20-tris[4-(pyridin-2-yl)phenyl]porphyrin | 5,15-bis(4-bromophenyl)-10,20-bis[4-(pyridin-2-yl)phenyl]porphyrin²



$C_{54}H_{34}Br_2N_6$
MM = 926,72

3



$C_{59}H_{38}BrN_7$
MM = 924,91

4

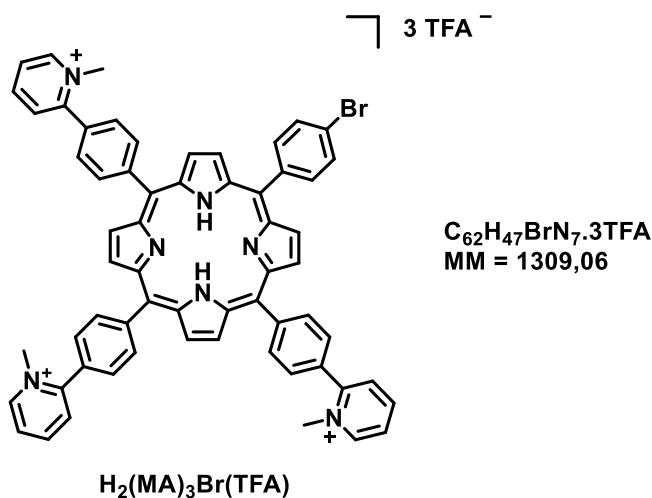
1 g de 4-(2-pyridinyl)dipyrrométhane **1** (3,3 mmol, 2 eq.), 304,6 mg de 4-bromobenzaldehyde (1,64 mmole, 1 eq.), et 308,5 mg de 4-(2-pyridinyl)benzaldehyde (1,68 mole, 1 eq.) sont dissous dans 50 mL d'acide propionique et chauffés à reflux pendant 3 h. L'acide propionique est distillé sous vide. Le résidu est purifié sur colonne de silice ($CH_2Cl_2/MeOH$) avec un gradient de MeOH (0% $\rightarrow$ 1%) qui permet d'isoler chaque produit. La première porphyrine obtenue est la porphyrine symétrique A_2B_2 en éluant avec 100% de dichlorométhane. En éluant avec 0,4% de MeOH, on obtient la seconde porphyrine A_3B . Les fractions sont évaporées. Les produits sont dissous dans un minimum de dichlorométhane puis précipités en utilisant de l'éther de pétrole (40-60) (rendement **3**, 120 mg, 8% ; rendement **4**, 240 mg, 16%).

4 : CCM (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$, 98/2), Rf : 0,65. **RMN 1H** (600 MHz, $CDCl_3$, 323 K) δ ppm : 8,95 – 8,94 (m, 6H, **12** & **20**), 8,87 – 8,85 (m, 5H, **1**), 8,84 (d, J = 4,6 Hz, 2H, **19**), 8,40 (d, J = 8 Hz, 6H, **7**), 8,33 (dd, J = 8 ; 3 Hz, 6H, **8**), 8,10 (dd, J = 8 ; 2 Hz, 2H, **15**), 8,04 – 8,02 (m, 3H, **4**), 7,90 – 7,87 (m, 5H, **14** & **3**), 7,37 – 7,34 (m, 3H, **2**), -2,65 (s, 2H, **22**). **RMN ^{13}C** (151 MHz, $CDCl_3$, 323 K) δ ppm : 157,6 (**5**), 150,2 (**1**), 143,1 (**9**), 141,3 (**16**), 139,2 (**6**), 137,1 (**3**), 136,0 (**15**), 135,2 (**8**), 131,5 (**11**, **12**, **18** - **21**), 130,1 (**14**), 125,5 (**7**), 122,5 (**2**), 121,0 (**4**), 120,2 (**10**, **17**), 118,7 (**13**). **SM-ES $^+$ m/z** : 924,2 (45%) $[M+H]^+$, 926,2 (50%) $[M+H]^+$, 462,6 (80%) $[M+2H]^{2+}$, 463,6 (100%) $[M+2H]^{2+}$. **UV-vis** ($CHCl_3$) λ nm (ϵ M $^{-1}$ cm $^{-1}$) : 422 (520 10 3) (Soret), 517 (18,3 10 3), 553 (9,9 10 3), 591 (4,7 10 3), 648 (4 10 3).

3 CCM (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$, 98/2), Rf : 0,83. **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 8,95 (d, J = 4,5 Hz, 4H, **8**), 8,88 – 8,84 (m, 6H, **7** & **1**), 8,40 (d, J = 8,2 Hz, 4H, **5**), 8,33 (d, J = 8,2 Hz, 4H, **6**), 8,09 (m, 4H, **9**), 8,07 – 8,05 (m, 2H, **4**), 7,95 – 7,89 (m, 6H, **10** & **3**), 7,40 – 7,37 (m, 2H, **2**), -2,78 (s, 2H, **11**). **SM-ES $^+$ m/z** : 925,1 (80%) $[M+H]^+$, 927,1 (100%) $[M+H]^+$. **UV-vis** ($CHCl_3$) λ nm (ϵ M $^{-1}$ cm $^{-1}$) : 421 (520 10 3) (Soret), 517 (20 10 3), 552 (10 10 3), 591 (6 10 3), 648 (5 10 3).

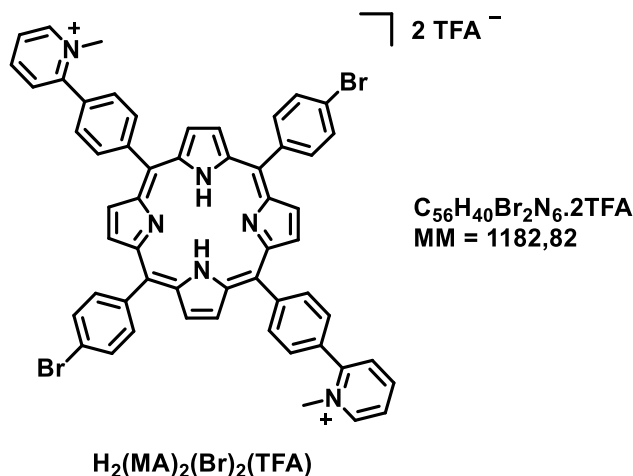
MATERIEL & METHODES

5-(4-bromophenyl)-10,15,20-tris[4-(N-methylpyridinium-2-yl)phenyl]porphyrin tristrifluoroacetate³



La porphyrine **4** précédemment isolée (70 mg, 0,075 mmol) est dissoute dans du DMF anhydre à hauteur de 4 mL. Un très large excès de iodométhane est ajouté (1,5 mL). Le milieu est mis à chauffer à 100 °C pendant environ 3 h à l'abri de la lumière. La réaction est suivie par CCM (sur SiO_2) avec deux systèmes d'éluant qui sont $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98/2) et $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}/\text{KNO}_3\text{sat.}$, 8/1/1. Le premier système permet de visualiser la porphyrine de départ (R_f : 0,65), le deuxième la porphyrine méthylée. Lorsque la réaction est terminée, le DMF et l'iodométhane sont évaporés par distillation sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans un minimum d'acétonitrile et précipité avec de l'éther diéthylique. Après centrifugation et séchage, le solide obtenu est dissous dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (95/5) et purifié sur une colonne Sep Pak C18 5 g. L'élution est faite avec un gradient d'acétonitrile (0 – 40%) et l'éluant contient 0,1% de TFA. La fraction rouge est collectée et évaporée. Le produit est solubilisé dans du méthanol et obtenu par précipitation dans l'éther diéthylique et séché sous vide. Le composé est obtenu sous forme d'une poudre violette (rendement 87 mg, 88%). CCM (SiO_2 , $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}/\text{KNO}_3\text{sat.}$, 6/1/1), R_f : 0,5. **RMN** ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm : 9,35 – 9,33 (m, 3H, **py**), 9,02 (s, 4H, **pyrrole**), 9,00 (d, J = 5 Hz, 2H, **pyrrole**), 8,96 (d, J = 5 Hz, 2H, **pyrrole**), 8,85 – 8,81 (m, 3H, **py**), 8,54 (d, J = 8 Hz, 2H, **phe**), 8,53 (d, J = 8 Hz, 4H, **phe**), 8,54 – 8,47 (m, 3H, **py**), 8,34 – 8,30 (m, 3H, **py**), 8,21 (d, J = 8 Hz, 2H, **Br-phe**), 8,18 (d, J = 8 Hz, 2H, **phe**), 8,18 (d, J = 8 Hz, 4H, **phe**), 8,07 (d, J = 8 Hz, 2H, **Br-phe**), 4,52 (s, 9H, **methyl**), -2,87 (s, 2H, **NH**). **SM-ES**⁺ m/z : 322,77 (80%) [M]³⁺, 323,44 (100%) [M]³⁺. **UV-vis** (H_2O) λ nm (ϵ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) : 415 ($370 \cdot 10^3$) (Soret), 516 ($13,8 \cdot 10^3$), 554 ($6,9 \cdot 10^3$), 580 ($5,4 \cdot 10^3$), 635 ($3,2 \cdot 10^3$). **UV-vis** (H_2O acidifiée) λ nm : 437 (Soret), 649.

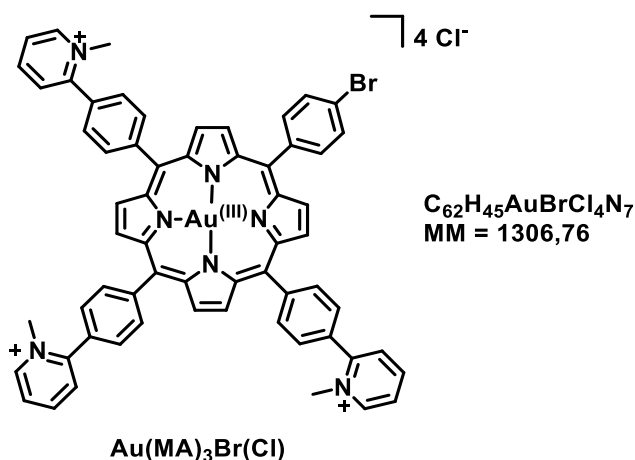
5,15-di(4-bromophenyl)-10,20-bis[4-(N-methylpyridinium-2-yl)phenyl]porphyrin bistrifluoroacetate³



La porphyrine **3** (75 mg, 0,081 mmol) est dissoute dans du DMF anhydre à hauteur de 4 mL. Un très large excès de iodométhane est ajouté (1,5 mL). Le milieu est mis à chauffer à 100 °C pendant environ 3 h à l'abri de la lumière. La réaction est suivie en CCM (SiO₂) avec deux systèmes d'éluant qui sont CH₂Cl₂/MeOH (98/2) et MeCN/H₂O/KNO₃sat. (6/1/1). Le premier système permet de visualiser la porphyrine de départ (Rf : 0,83), le deuxième la porphyrine méthylée. Lorsque la réaction est terminée, le DMF et l'iodométhane sont évaporés par distillation sous vide. Le résidu obtenu est dissous dans un minimum d'acétonitrile et précipité avec de l'éther diéthylique. Après centrifugation et séchage, le solide obtenu est dissous dans un mélange H₂O/MeCN (95/5) et purifié sur une colonne Sep Pak C18 5 g. L'élution est faite avec un gradient d'acétonitrile (0 – 40%) et l'éluant contient 0,1% de TFA. La fraction rouge est collectée et évaporée. Le produit est solubilisé dans de l'acétonitrile et obtenu par précipitation dans l'éther diéthylique et séché sous vide. On obtient 45 mg du composé sous la forme d'une poudre violette (rendement 47%). CCM (SiO₂, MeCN/H₂O/KNO₃sat., 6/1/1), Rf : 0,7. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm : 9,32 (dd, J = 6 ; 1,5 Hz, 2H, **py**), 8,98 (d, J = 4,8 Hz, 4H, **pyrrole**), 8,94 (d, J = 4,8 Hz, 4H, **pyrrole**), 8,82 (ddd, J = 8 ; 8 ; 1,5 Hz, 2H, **py**), 8,52 (d, J = 8,4 Hz, 4H, **phe**), 8,49 (d, J = 8 Hz, 2H, **py**), 8,31 (ddd, J = 8 ; 6 ; 1,2 Hz, 2H, **py**), 8,20 (d, J = 8,4 Hz, 4H, **phe**), 8,16 (d, J = 8,4 Hz, 4H, **phe**), 8,07 (d, J = 8,4 Hz, 4H, **phe**), 4,52 (s, 6H, **methyl**), -2,91 (s, 2H, NH). **SM-ES⁺** *m/z* : 477,1 (50%) [M]²⁺, 478,1 (100%) [M]²⁺. **UV-vis** (H₂O/MeCN, 50/50) λ nm (ε M⁻¹ cm⁻¹) : 416 (160 10³) (Soret), 513 (6,8 10³), 549 (3 10³), 588 (2 10³), 645 (1,8 10³). **UV-vis** (H₂O/MeCN acidifié) λ nm : 444 (Soret), 658.

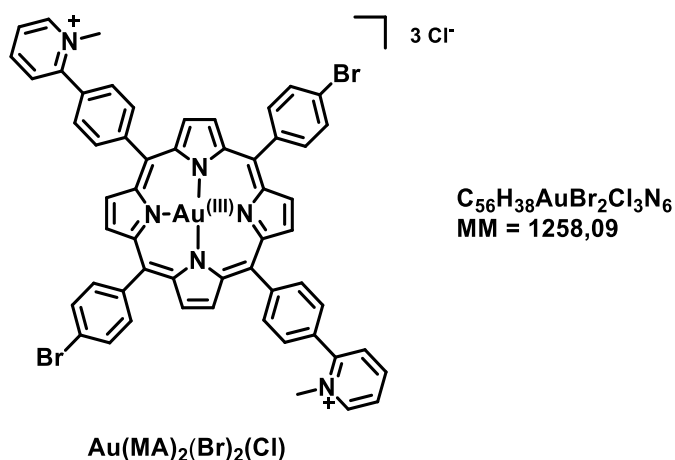
MATERIEL & METHODES

5-(4-bromophenyl)-10,15,20-tris[4-(N-methylpyridinium-2-yl)phenyl]porphyrinato gold(III) tetrachloride



Le composé **H₂(MA)₃Br(TFA)** (87 mg, 66,5 μ mol) est dissous dans 40 mL d'eau distillée. On y ajoute le sel d'or (III) **KAuCl₄** (66,3 mg, 175 μ mol, 2,5 eq.). La réaction est mise à reflux pendant 20 h et suivie en UV-vis. Le shift de la bande de Soret est observé dans l'eau entre 415 nm pour le composé de départ et 406 nm pour le composé métallé. La disparition du composé de départ (415 nm) est vérifiée par acidification de la solution UV-vis avec HCl (porphyrine acide 444 nm). Après évaporation du solvant, le résidu est dessalé sur une colonne Sep Pak C18 5 g. Le dessalage est effectué par élution avec H₂O/0,1% TFA. L'élution du produit est faite avec l'éluant acétonitrile/eau (40/60) contenant 0,1% de TFA. La fraction contenant le produit est collectée puis le solvant est évaporé. Le composé est resolubilisé dans de l'acétonitrile puis évaporé trois fois pour éliminer le TFA. Il est ensuite dissous dans un mélange 50/50 H₂O/MeCN puis passé sur une résine Dowex 1x8 (Cl⁻ form) échangeuse d'ions pendant 24 h. La solution est filtrée et la résine est rincée jusqu'à ce que le filtrat soit limpide. Le solvant est évaporé, le résidu est dissous dans un minimum de méthanol et le produit est obtenu par précipitation avec de l'éther diéthylique. Après centrifugation, on récupère le composé sous la forme de 65 mg d'une poudre rouge (rendement 75%). CCM (SiO₂, MeCN/H₂O/KNO₃sat., 6/1/1), R_f : 0,42. **RMN ¹H** (400 MHz, MeOD) δ ppm : 9,58 (s, 4H, **pyrrole**), 9,55 (d, J = 5,3 Hz, 2H, **pyrrole**), 9,48 (d, J = 5,3 Hz, 2H, **pyrrole**), 9,25 – 9,23 (m, 3H, **py**), 8,85 – 8,81 (m, 3H, **py**), 8,65 (d, J = 8 Hz, 2H, **phe** 15), 8,63 (d, J = 8 Hz, 4H, **phe** 10, 20), 8,49 – 8,47 (m, 3H, **py**), 8,29 – 8,24 (m, 11H, **py**, **phe**), 8,14 (d, J = 8,4 Hz, 2H, **phe**), 4,64 (s, 3H, **methyl**), 4,63 (s, 6H, **methyl**). **RMN ¹³C** (101 MHz, MeOD) δ ppm : 156,4 ; 147,7 ; 146,6 ; 142,6 ; 138,4 ; 137,8 ; 137,7 ; 137,6 ; 136,3 ; 135,5 ; 133,7 ; 133,1 ; 133,0 ; 131,6 ; 131,1 ; 129,3 ; 129,2 ; 128,1 ; 127,9 ; 124,7 ; 123,4 ; 122,9 ; 122,8. **RMN ¹⁹F** (376 MHz, DMSO-*d*₆) : pas de signal. **SMHR-ES⁺ m/z** : calc. pour C₆₂H₄₅AuBrN₇ 290,81460 (et 291,31450) ; observé 290,8140 (et 291,3140) [M]⁴⁺. **UV-vis** (H₂O) λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) : 406 (340 10³) (Soret), 520 (16 10³).

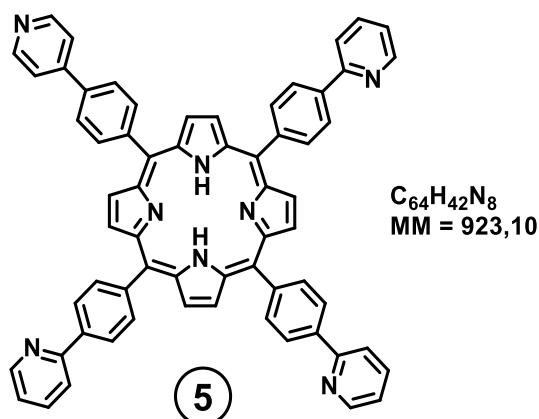
5,15-bis(4-bromophenyl)-10,20-bis[4-(N-methylpyridinium-2-yl)phenyl]porphyrinato gold(III) trichloride



La porphyrine **H₂(MA)₂(Br)₂(TFA)** (45 mg, 38 μ mol) est dissoute dans 10 mL d'un mélange 50/50 H₂O/EtOH. La base NaOH (76 μ mol, 2 eq.) ainsi que le sel d'or KAuCl₄ en solution dans 1 mL d'H₂O (87 mg, 228 μ mol, 6 eq.) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 24 h et suivi en UV-vis. Le shift de la bande de Soret est observé dans l'eau entre 417 nm pour le composé de départ et 406 nm pour le composé métallé. La disparition du composé de départ (417 nm) est vérifiée par acidification de la solution UV-vis avec HCl (porphyrine acide 444 nm). La métallation est réalisée à 90%. Après évaporation du solvant, le résidu est dessalé et séparé du composé non métallé sur une colonne Sep Pak C18 5 g. Le dessalage est effectué avec H₂O/0,1% TFA. L'élution du produit est faite avec un mélange éluant acétonitrile/eau 80/20. L'éluant contient 0,1% de TFA. La première fraction est collectée puis le solvant est évaporé. Le composé est resolubilisé dans l'acétonitrile puis évaporé trois fois pour éliminer le TFA. Le composé est dissous dans un mélange 50/50 H₂O/MeCN et est passé sur une résine Dowex 1x8 (Cl⁻ form) échangeuse d'ions pendant 24 h. La solution est filtrée et la résine est rincée jusqu'à ce que le filtrat soit limpide. Le solvant est évaporé, le résidu est dissous dans un minimum de MeCN et le produit obtenu par précipitation avec de l'éther diéthylique. Après centrifugation, on récupère 26 mg du composé sous la forme d'une poudre rouge (rendement 56%). CCM (SiO₂, MeCN/H₂O/KNO₃sat., 6/1/1), R_f : 0,65. **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm: 9,53 (d, J = 5,3 Hz, 4H, **pyrrole**), 9,47 (d, J = 5,3 Hz, 4H, **pyrrole**), 9,24 (d, J = 6 Hz, 2H, **py**), 8,83 (t, J = 7,8 Hz, 2H, **py**), 8,60 (d, J = 8 Hz, 4H, **phe**), 8,47 (d, J = 8 Hz, 2H, **py**), 8,29 – 8,22 (m, 10H, **py**, **Br-phe**, **phe**), 8,13 (d, J = 8 Hz, 4H, **Br-phe**), 4,62 (s, 6H, **methyl**). **RMN ¹³C** (101 MHz, MeOD) δ ppm: 156,4 ; 147,7 ; 146,6 ; 142,6 ; 138,4 ; 137,8 ; 137,6 ; 136,3 ; 135,5 ; 133,7 ; 133,1 ; 132,9 ; 131,7 ; 131,1 ; 129,2 ; 127,9 ; 124,7 ; 123,3 ; 122,8. **RMN ¹⁹F** (376 MHz, DMSO-*d*₆) : pas de signal. **SMHR-ES⁺ m/z** : calc. pour C₅₆H₃₈AuBr₂N₆ 383,03970 (et 383,70590 100%) ; observé 383,0396 (et 383,7059 100%) [M]³⁺. **UV-vis** (H₂O) λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) : 406 (260 10³) (Soret), 521 (13 10³).

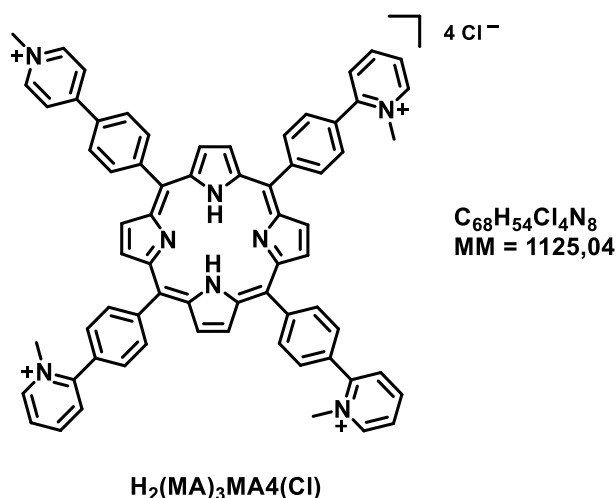
MATERIEL & METHODES

5,10,15-tris[4-(pyridin-2-yl)phenyl]-20-[4-(pyridin-4-yl)phenyl]porphyrin



40 mg de porphyrine **4** (43 μ mol), 5 mg de $Pd(PPh_3)_4$ (4 μ mol, 0,1 eq.), 50 mg de Cs_2CO_3 (153 μ mol, 3,5 eq.) et 40 mg d'acide pyridine-4-boronique (325 μ mol, 7,5 eq.) sont placés dans un Schlenk sec sous argon. A l'aide d'une seringue on ajoute 10 mL de dioxane anhydre et dégazé. Le milieu réactionnel est chauffé à 90 °C pendant la nuit. La réaction est suivie par CCM sur SiO_2 avec $CH_2Cl_2/MeOH$ (98/2) comme éluant. Après une nuit, la conversion est complète. Le brut réactionnel est engagé directement dans l'étape suivante de méthylation. CCM (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$, 98/2), Rf : 0,48. **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 8,97–8,96 (m, 6H, **pyrrole**), 8,92 (d, $J = 4,5$ Hz, 2H, **pyrrole**), 8,87–8,86 (m, 3H, **py2**), 8,81 (d, $J = 5$ Hz, 2H, **py4**), 8,42–8,34 (m, 13H, **phe2**, **phe4**, **py2**), 8,08–8,05 (m, 6H, **phe2**), 7,93 (ddd, $J = 8$; 7,5 ; 2 Hz, 3H, **py2**), 7,86–7,84 (m, 2H, **py4**), 7,40–7,36 (m, 3H, **py2**), -2.70 (s, 2H, **NH**).

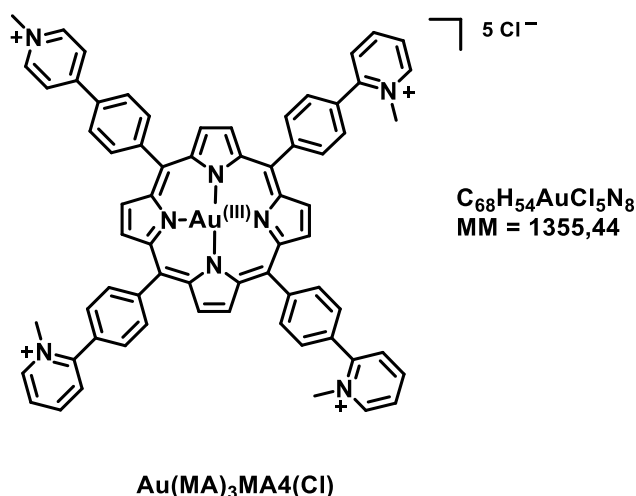
5,10,15-tris[4-(N-methylpyridinium-2-yl)phenyl]-20-[4-(N-methylpyridinium-4-yl)phenyl]porphyrin tetrachloride³



Le brut réactionnel précédent, après évaporation du solvant, est engagé dans une étape de méthylation. On ajoute 10 mL de DMF au résidu ainsi que 1,5 mL d'iodométhane. Le mélange est mis à chauffer à 100 °C pendant 1 h 30. La réaction est suivie en CCM sur SiO₂ en utilisant MeCN/H₂O/KNO₃sat (8/1/1) comme éluant. Lorsque la réaction est terminée, le DMF et l'iodométhane sont évaporés par distillation sous vide. Le résidu obtenu est purifié par colonne de silice en utilisant MeCN/H₂O/KNO₃sat. (8/1/1) comme éluant. La fraction rouge est collectée et dessalée par précipitation des sels de KNO₃ à l'éthanol. Le résidu grossièrement dessalé est ensuite solubilisé dans un minimum d'eau. Une solution concentrée de NH₄PF₆ est utilisée jusqu'à précipitation du composé d'intérêt. Après centrifugation et rinçages à l'eau, le résidu est solubilisé dans un minimum d'acétone. Une solution concentrée de chlorure de tetrabutylammonium est ensuite ajoutée jusqu'à précipitation⁴. Le composé précipite sous la forme de chlorure. Après centrifugation et rinçages à l'acétone, le composé est séché sous vide. On obtient 18 mg d'une poudre violette (rendement 37%). CCM (SiO₂, MeCN/H₂O/KNO₃sat., 6/1/1), R_f : 0,31. **RMN ¹H** (400 MHz, MeOD) δ ppm : 9,2 – 8,4 (broad signal, **pyrrole**), 9,22 (d, J = 6 Hz, 3H, **py2**), 9,08 (d, J = 7 Hz, 2H, **py4**), 8,82 (t, J = 7,5 Hz, 3H, **py2**), 8,76 (d, J = 7 Hz, 2H, **py4**), 8,59 – 8,56 (m, 8H, **phe2**, **phe4**), 8,53 (d, J = 6 Hz, 2H, **phe4**), 8,48 – 8,46 (m, 3H, **py2**), 8,28 – 8,24 (m, 3H, **py2**), 8,16 (d, J = 8 Hz, 2H, **phe2**), 8,15 (d, J = 8 Hz, 4H, **phe2**), 4,62 (s, 3H, **CH3-py2**), 4,61 (s, 6H, **CH3-py2**), 4,53 (s, 3H, **CH3-py4**). **RMN ¹⁹F** (376 MHz, MeOD) : pas de signal. **SMHR-ES⁺ m/z** : calc. pour C₆₈H₅₄N₈ 245,6112 ; observé 245,6120 [M]⁴⁺. **UV-vis** (H₂O) λ nm (ε m⁻¹ cm⁻¹) : 416 (390 10³) (Soret), 517 (16 10³), 554 (8,7 10³), 581 (6,6 10³), 635 (4,1 10³). **UV-vis** (H₂O acidifiée) λ nm : 440 (Soret), 649.

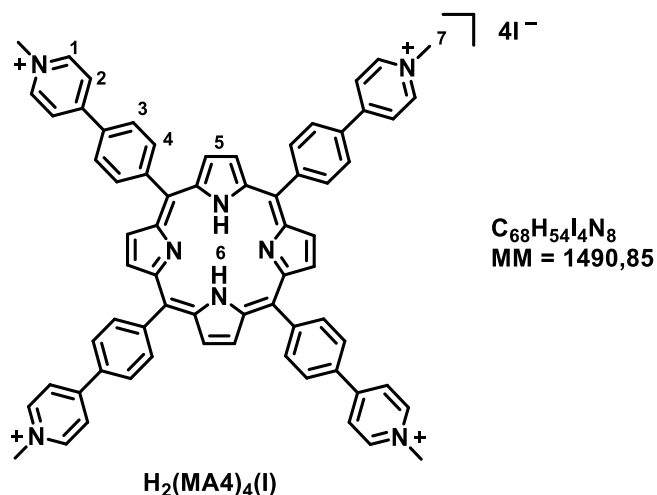
MATERIEL & METHODES

5,10,15-tris[4-(N-methylpyridinium-2-yl)phenyl]-20-[4-(N-methylpyridinium-4-yl)phenyl]porphyrinato gold(III) pentachloride



La porphyrine **H₂(MA₃)MA₄(Cl)** (30 mg, 26 μ mol) est dissoute dans un mélange 50/50 H₂O/EtOH. On ajoute 0,15 mL d'une solution 1M de NaOH (150 μ mol, 6 eq.) ainsi que le sel d'or KAuCl₄ (25 mg, 66 μ mol, 2,5 eq.). Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant plusieurs heures et suivi en UV-vis. Le shift de la bande de Soret est observé dans l'eau entre 421 nm pour le composé de départ et 406 nm pour le composé métallé. La disparition du composé de départ (421 nm) est vérifiée par acidification de la solution UV-vis avec HCl (porphyrine acide 440 nm). La métallation est complète. Après évaporation du solvant, le résidu est dessalé sur une colonne Sep Pak C18 5 g. Le dessalage est effectué par élution avec H₂O 0,1% TFA. L'élution du produit est faite avec un mélange éluant acétonitrile/eau (70/30) contenant 0,1% de TFA. La fraction d'intérêt est collectée puis le solvant est évaporé. Le composé est resolubilisé dans de l'eau et la solution est évaporée pour éliminer le TFA. Le composé est ensuite solubilisé dans un minimum d'eau. Une solution concentrée de NH₄PF₆ est ajoutée jusqu'à précipitation du composé. Après centrifugation et rinçages à l'eau, le précipité est solubilisé dans un minimum d'acétone. Une solution concentrée de chlorure de tetrabutylammonium est ensuite ajoutée jusqu'à précipitation⁴. Le composé précipite sous la forme de chlorure. Après centrifugation et rinçages à l'acétone, le composé est séché sous vide. On récupère 6 mg du produit sous forme d'une poudre rouge (rendement 17%). CCM (SiO₂, MeCN/H₂O/KNO₃sat., 6/1/1), R_f : 0,14. **RMN ¹H** (400 MHz, MeOD) δ ppm : 9,59 (s, 4H, pyrrole), 9,57 (d, J = 5 Hz, 2H, pyrrole), 9,52 (d, J = 5 Hz, 2H, pyrrole), 9,24 (d, J = 6 Hz, 3H, pyr2), 9,12 (d, J = 6,5 Hz, 2H, py4), 8,85 – 8,82 (m, 3H, py2), 8,79 (d, J = 6,5 Hz, 2H, py4), 8,66 – 8,61 (m, 10H, phe2, phe4), 8,49 – 8,47 (m, 3H, py2), 8,30 – 8,24 (m, 9H, phe2, py2), 4,64 (s, 3H, CH₃-py2), 4,63 (s, 6H, CH₃-py2), 4,55 (s, 3H, CH₃-py4). **RMN ¹³C** (101 MHz, MeOD) δ ppm : 156,4 ; 156,3 ; 147,7 ; 146,5 ; 143,1 ; 142,5 ; 137,8 ; 137,7 ; 137,7 ; 137,7 ; 136,0 ; 135,9 ; 135,5 ; 133,7 ; 133,2 ; 133,0 ; 131,1 ; 129,3 ; 128,1 ; 127,9 ; 127,3 ; 125,9 ; 123,2 ; 123,0. **RMN ¹⁹F** (376 MHz, MeOD) : pas de signal. **SMHR-ES⁺** m/z : calc. pour C₆₈H₅₂AuN₈ 235,4796 ; observé 235,4794 [M]⁵⁺. **UV-vis** (H₂O) λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) : 407 (330 10³) (Soret), 521 (15 10³).

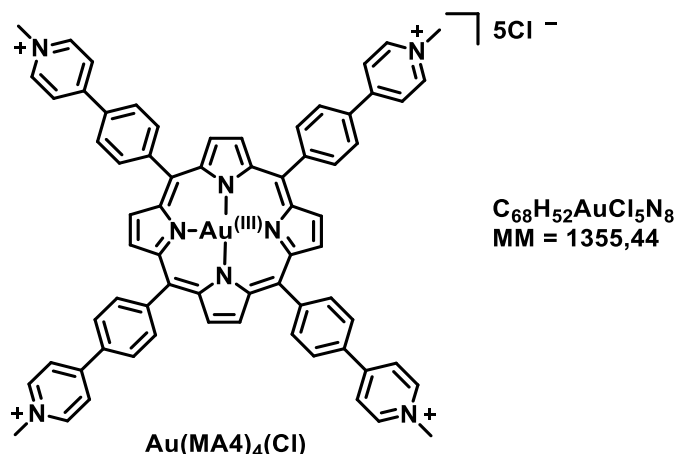
*meso-tetrakis[4-(N-methylpyridinium-4-yl)phenyl]porphyrin tetraiodide*⁵



1,50 g de 4-(4-pyridine)benzaldéhyde (8,2 mmol) sont dissous dans 40 mL d'acide propionique. Puis 0,58 mL de pyrrole distillé (8,3 mmol) est ajouté. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 1 h 30 à l'abri de la lumière. L'acide propionique est ensuite distillé et le résidu obtenu est mis en suspension dans du DMF et filtré. Le résidu est rincé au DMF puis à l'éther et séché sous vide. Le solide obtenu est une poudre violette très sombre (263 mg, rendement 14%). Ce composé insoluble ne pouvant être caractérisé en l'état est utilisé tel quel dans la réaction suivante. On récupère une partie du composé obtenu (166 mg, 0,18mmol) et on le met en suspension dans 3 mL de DMF. On ajoute un large excès d'iodométhane (3 mL) et on chauffe le milieu réactionnel pendant 3 h à 100 °C. La réaction est suivie en CCM sur SiO_2 avec deux systèmes d'éluant qui sont $CH_2Cl_2/MeOH$ (9/8/2) et $MeCN/H_2O/KNO_3$ sat. (8/1/1). Le premier système permet de visualiser la porphyrine de départ, le deuxième la porphyrine méthylée. Lorsque la réaction est terminée, le DMF et l'iodométhane sont éliminés par distillation sous vide. La réaction est complète et le produit ainsi obtenu est utilisé tel quel sans purification supplémentaire. CCM (SiO_2 , $MeCN/H_2O/KNO_3$ sat., 8/1/1), Rf : 0,48. **RMN 1H** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm: 9,23 (d, 8H, J = 7 Hz, **1**), 8,97 (s, 8H, **5**), 8,88 (d, 8H, J = 7 Hz, **2**), 8,59 (d, 8H, J = 8,5 Hz, **3** ou **4**), 8,53 (d, 8H, J = 8,5 Hz, **4** ou **3**), 4,47 (s, 12H, **7**), -2,84 (s, 2H, **6**). **SM-ES $^+$** m/z : 245,6 (80%) $[M]^{4+}$, 322,5 (100%) $[M-CH_3]^{3+}$. **UV-vis** (H_2O) λ nm (ϵ M $^{-1}$ cm $^{-1}$) : 420 (Soret), 523, 559, 590, 650.

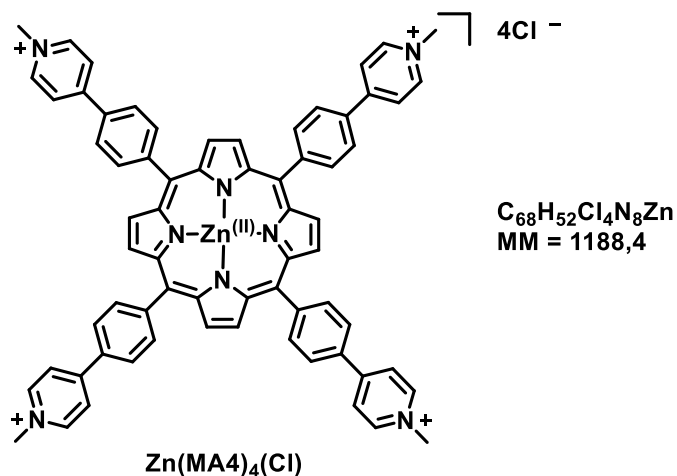
MATERIEL & METHODES

meso-tetrakis[4-(N-methylpyridinium-4-yl)phenyl]porphyrinato gold(III) pentachloride



La porphyrine **H₂(MA₄)₄(I)** (105 mg, 70 μmol) est dissoute dans 5 mL d'un mélange 50/50 H₂O/EtOH. Le sel d'or KAuCl₄ (107 mg, 283 μmol , 4 eq.) est dissous dans 5 mL du même mélange et incorporé à la solution de porphyrine. Le milieu réactionnel est porté à reflux pendant la nuit et la réaction est suivie en CCM sur SiO₂ avec MeCN/H₂O/KNO₃sat. (8/1/1) comme éluant. La métallation est complète. Après évaporation de l'éthanol, la solution aqueuse est passée sur une colonne Sep Pak C18 5 g pour un dessalage avec H₂O 0,1% TFA. L'élution du produit est faite avec mélange éluant acétonitrile/eau 30/70, l'éluant contenant 0,1% de TFA. La fraction contenant le composé est récupérée et évaporée. Le composé est repris dans un mélange 50/50 H₂O/EtOH et est passé sur une résine Dowex 1x8 (Cl⁻ form) échangeuse d'ions pendant 24 h. La solution est filtrée et la résine est rincée jusqu'à ce que le filtrat soit limpide. Le solvant est évaporé, le résidu est dissous dans un minimum de MeOH et obtenu par précipitation avec de l'éther diéthylique. Après centrifugation, on récupère 25 mg du composé sous la forme d'une poudre rouge (rendement 20%). CCM (SiO₂, MeCN/H₂O/KNO₃sat., 8/1/1), R_f : 0,17. **RMN ¹H** (400 MHz, MeOD) δ ppm : 9,50 (s, 8H, **pyrrole**), 9,11 (d, 8H, $J = 7$ Hz, **pyr**), 8,78 (d, 8H, $J = 7$ Hz, **pyr**), 8,63 – 8,59 (m, 16H, **phe**), 4,55 (s, 12H, **methyl**). **RMN ¹³C** (101 MHz, MeOD) δ ppm : 156,3; 146,5; 143,1; 137,6; 136,1; 135,9; 133,0; 128,0; 125,9; 123,1. **RMN ¹⁹F** (376 MHz, MeOD) pas de signal. **SMHR-ES⁺** m/z : calc. pour C₆₈H₅₂AuN₈ 235,4796 ; observé 235,4793 [M]⁵⁺. **UV-vis** (H₂O) λ nm (ϵ M⁻¹ cm⁻¹) : 410 (204 10³) (Soret), 523 (11 10³).

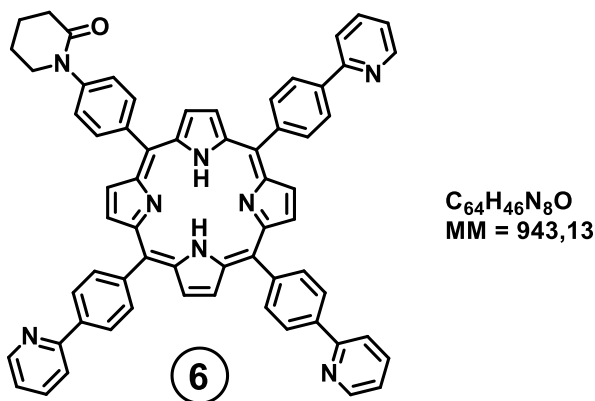
meso-tetrakis[4-(N-methylpyridinium-4-yl)phenyl]porphyrinato zinc(II) tetrachloride



On met en suspension 20 mg de la porphyrine **H₂(MA₄)₄(I)** (13,4 μ mol) dans 10 mL d'un mélange 50/50 H₂O/EtOH. On ajoute 23 mg de chlorure de zinc (13 eq.) et le milieu est ensuite porté à reflux pendant un week-end. Après vérification en UV-vis de la disparition complète des quatre bandes Q du composé de départ (523, 559, 590 et 650) au profit de deux nouvelles bandes à 565 et 607 nm, l'éthanol est évaporé. Une solution concentrée de NH₄PF₆ est ajoutée jusqu'à précipitation du composé. Après centrifugation et rinçages à l'eau, le résidu est solubilisé dans un minimum d'acétone. Une solution concentrée de chlorure de tetrabutylammonium est ensuite ajoutée jusqu'à précipitation⁴. Le composé précipite sous la forme de chlorure. On récupère 12 mg d'une poudre verte (rendement 75%). **RMN ¹H** (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm : 9,19 (d, J = 6,7 Hz, 8H, **py**), 8,89 (s, 8H, **pyrrole**), 8,86 (d, J = 6,7 Hz, 8H, **py**), 8,56 – 8,53 (m, 8H, **phe**), 8,46 (d, J = 8 Hz, 8H, **phe**), 4,45 (s, 12H, **methyl**). **SM-ES⁺ m/z** : 261,1 [M]⁴⁺. **UV-vis** (H₂O) λ nm : 430 (Soret), 565, 607.

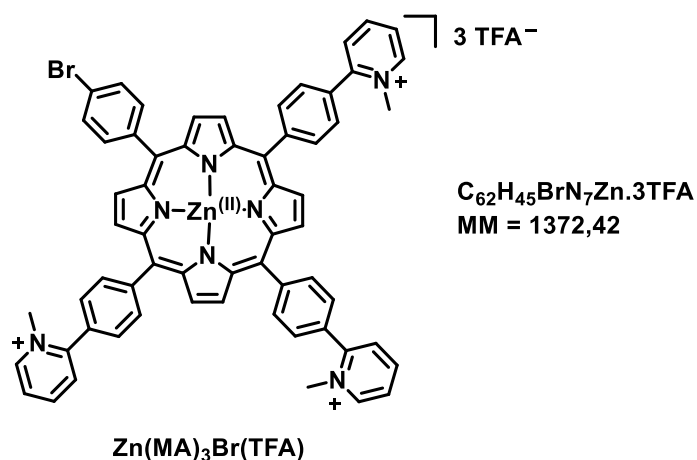
MATERIEL & METHODES

5-[4(2-piperidinon)1-yl)phenyl]-10,15,20-tris[4-(pyridin-2-yl)phenyl]porphyrin⁶



Dans un ballon sec placé sous argon puis chargé par un précurseur de palladium $Pd(OAc)_2$ (0,0025 mmol, 0,57 mg), un ligand phosphine Xantphos (0,005 mmol, 3 mg), la porphyrine **4** (0,045 mmoles, 42 mg) et la base NaOtBu (0,2 mmol, 20 mg) sont ajoutés. On ajoute 10 mL de toluène et l'acide 5-aminovalérique (0,2 mmol, 24 mg) au milieu réactionnel. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 48 h et la réaction est suivie par CCM sur SiO_2 avec le système éluant $CH_2Cl_2/MeOH$ (98/2). Le produit d'intérêt est purifié sur colonne de silice $CH_2Cl_2/MeOH$ avec un gradient progressif de MeOH. Il est élué avec 1% de méthanol. Après évaporation du solvant, le composé est repris dans un minimum de CH_2Cl_2 et précipité à l'éther de pétrole. On récupère par centrifugation 17,4 mg d'une poudre violet sombre (rendement 40%). CCM (SiO_2 , $CH_2Cl_2/MeOH$ (98/2), Rf : 0,46). RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 8,95 – 8,94 (m, 8H, **pyrrole**), 8,87 – 8,86 (m, 3H, **py**), 8,40 (d, J = 8 Hz, 6H, **phe**), 8,35 (d, J = 8 Hz, 6H, **phe**), 8,25 (d, J = 8 Hz, 2H, H **aminophe**), 8,06 (d, J = 8 Hz, 3H, **py**), 7,94 – 7,90 (m, 3H, **py**), 7,69 (d, J = 8 Hz, 2H, **aminophe**), 7,39 – 7,36 (m, 3H, **py**), 4,01 (t, J = 6 Hz, 2H), 2,74 (t, J = 6,5 Hz, 2H), 2,17 – 2,08 (m, 4H), -2,72 (s, 2H). SM (DCI NH_3) m/z : 943,4 $[M+H]^+$.

5-(4-bromophenyl)-10,15,20-tris[4-(N-methylpyridinium-2-yl)phenyl]porphyrinato zinc(II)
trifluoroacetate

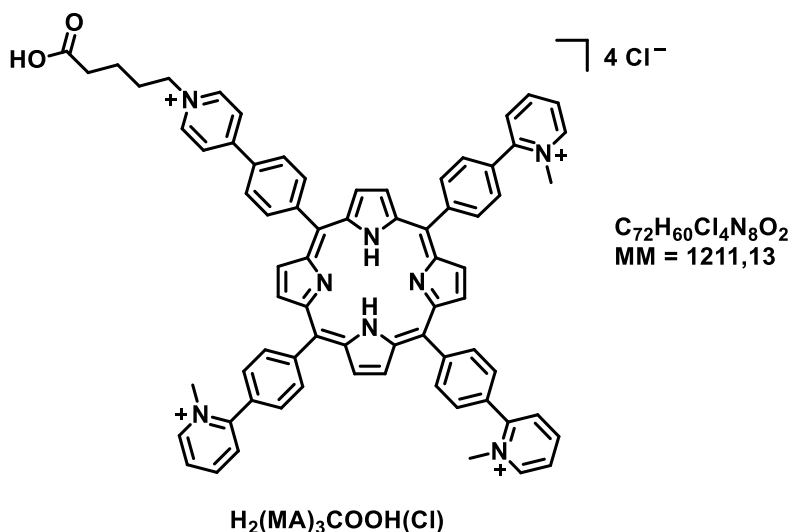


128 mg (138 μ mol) de la porphyrine **4** sont dissous dans 20 mL de DMF. On y ajoute du Cs_2CO_3 (168 mg, 516 μ mol, 3 eq) et du ZnCl_2 (155 mg, 1,14 mmol, 8 eq.) et on chauffe à reflux. La réaction est suivie en UV-vis dans CH_2Cl_2 en observant la disparition des quatre bandes Q du composé de départ (517, 552, 591 et 648) au profit des deux bandes Q du composé final (555 et 598). La complétion de la réaction est également vérifiée en RMN par la disparition du signal des protons du cœur de la porphyrine (-2,74 ppm dans CDCl_3). La réaction est donc stoppée au bout de 1 h 30. Le DMF est évaporé à la rampe et le milieu réactionnel, solubilisé dans du dichlorométhane, est passé sur Celite® pour éliminer les sels. **UV-vis** (CH_2Cl_2) λ nm : 426 (Soret), 555, 598. **SM-ES⁺** m/z : 986,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 493,6 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$.

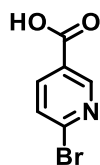
Après évaporation du solvant, le résidu est à nouveau solubilisé dans 5 mL de DMF. On y ajoute 2 mL d'iodométhane et le milieu est porté à 100 °C pendant 6 h. La réaction est suivie en CCM sur SiO_2 avec deux systèmes d'éluant qui sont $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98/2) et $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}/\text{KNO}_3\text{sat.}$ (8/1/1). Le premier système permet de visualiser la porphyrine de départ (R_f : 0,65), le deuxième la porphyrine méthylée. Lorsque la réaction est terminée, le DMF et l'iodométhane sont retirés par distillation sous vide. Le résidu est purifié par colonne de silice fine (43-60 μ m) en utilisant un mélange $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}/\text{KNO}_3\text{sat.}$ (8/1/1) comme éluant. La première fraction est collectée et concentrée. Un premier dessalage grossier est réalisé par précipitation du KNO_3 avec de l'éthanol. Le processus est répété jusqu'à ce que la quantité de sels précipités ait fortement diminuée. Un dessalage sur colonne Sep Pak 5g C18 est ensuite réalisé. Le produit est déposé sur la colonne puis longuement rincé à l'eau avec 0,1% TFA avant d'être élué avec un mélange $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (5/5) contenant 0,1 % de TFA. On récupère 100 mg du composé final sous forme de sel de TFA (rendement 52%). **CCM** (SiO_2 , $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}/\text{KNO}_3\text{sat.}$, 8/1/1), R_f : 0,48. **RMN ¹H** (400 MHz, MeOD) δ ppm : 9,19 – 9,17 (m, 3H, **py**), 8,98 (s, 4H, **pyrrole**), 8,95 (d, J = 4,7 Hz, 2H, **pyrrole**), 8,92 (d, J = 4,7 Hz, 2H, **pyrrole**), 8,78 (t, J = 7,8 Hz, 3H, **py**), 8,54 – 8,50 (m, 6H, **phe**), 8,45 – 8,43 (m, 3H, **py**), 8,23 – 8,20 (m, 3H, **py**), 8,12 (d, J = 8 Hz, 2H, **phe**), 8,09 – 8,05 (m, 6H, **phe**), 7,95 (d, J = 8 Hz, 2H, **phe**), 4,59 (s, 3H, **methyl**), 4,58 (s, 6H, **methyl**). **SM-ES⁺** m/z : 343,1 $[\text{M}]^{3+}$.

MATERIEL & METHODES

5-[4-(*N*-carboxybutylpyridinium-4-yl)phenyl]-10,15,20-tris[4-(*N*-methylpyridinium-2-yl)phenyl]porphyrin tetrachloride⁷



50 mg de **Zn(MA)₃Br(TFA)** (36 μ mol), 1 mg de **Pd^(III)(OAc)₂** (4,54 μ mol), 13 mg de 3,3',3''-phosphanetriyltris(benzenesulfonic acid) trisodium salt, (TPPTS) (22,8 μ mol), 20 mg de **K₂CO₃** (145 μ mol, 4 eq), 30 mg d'acide boronique **16** (120 μ mol, 3 eq) sont placés dans un Schlenk séché au préalable puis placés sous argon. On ajoute séparément 10 mL d'eau et 10 mL de MeCN que l'on a dégazé par bullage d'argon pendant 30 min. Le milieu réactionnel est chauffé à 80 °C pendant une nuit. La réaction est suivie en CCM sur SiO₂ en utilisant le système éluant MeCN/H₂O/KNO₃sat. (8/1/1). Lorsque la réaction est terminée, le solvant est évaporé et le résidu est purifié sur une colonne de silice fine (43-60 μ m). La deuxième fraction est collectée puis concentrée. Le dessalage est réalisé par ajout d'EtOH sur la fraction concentrée et filtration des cristaux de sel. La porphyrine est dissoute dans mélange 50/50 de EtOH et de HCl 1M (2 x 20 mL). La démétallation est suivie en UV-vis jusqu'à disparition de la bande de Soret du composé Zn(II) (425 nm dans H₂O) et apparition de la bande de Soret du composé non métallé dans l'eau acidifiée à 447 nm. Quand la réaction est complète, l'éthanol est évaporé et la phase aqueuse concentrée. Une solution concentrée de sel de NH₄PF₆ (260 mg dans 1 mL d'eau) est ajoutée pour précipiter la porphyrine. Le résidu est solubilisé dans un mélange 50/50 d'eau et d'éthanol et passé sur une résine Dowex 1x8-200 (Cl⁻) pendant 24 h pour obtenir le composé final sous forme de sel de chlorure. La résine est ensuite rincée à l'éthanol jusqu'à ce que le filtrat soit limpide. Le milieu est évaporé à sec et on obtient 30 mg du produit sous forme d'une poudre sombre (rendement 65%). NB : on note une hydrolyse totale de l'ester sur le composé. CCM (SiO₂, MeCN/H₂O/KNO₃sat., 8/1/1), R_f : 0,27. **RMN ¹H** (400 MHz, MeOD) δ ppm : 9,22 (d, J = 6,5 Hz, 3H, **py2**), 9,17 (d, J = 7 Hz, 2H, **py4**), 9,2 – 8,9 (bs, **pyrrole**), 8,84 – 8,77 (m, 5H, **py2**, **py4**), 8,59 – 8,53 (m, 10H, **phe2**, **phe4**), 8,47 (d, J = 6 Hz, 3H, **py2**), 8,27 – 8,24 (m, 3H, **py2**), 8,15 (dd, J = 8, 3 Hz, 6H, **phe2**), 4,77 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 4,62 (s, 3H, **methyl**), 4,61 (s, 6H, **methyl**), 2,44 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,22 – 2,16 (m, 2H), 1,79 – 1,76 (m, 2H). **SM-ES⁺** *m/z* : 267,1 (30%) [M]⁴⁺, 322,5 (100%) [M-(C₅H₉O₂)]³⁺, 355,8 (50%) [M-H]³⁺. **UV-vis** (H₂O) λ nm : 419 (Soret), 513, 548, 588, 648. **UV-vis** (H₂O acidifiée) λ nm : 447 (Soret), 659.

*6-bromonicotinic acid*⁸

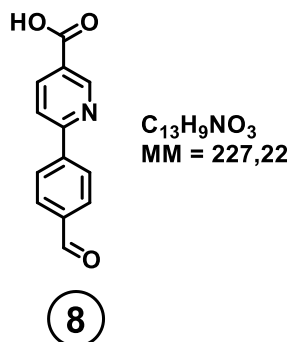
$\text{C}_6\text{H}_4\text{BrNO}_2$
MM = 202,01

7

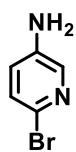
5 g de 5-méthyl-2-bromopyridine (29 mmol) sont placés dans un erlenmeyer bien sec dans un bain de glace. On ajoute goutte à goutte suivant un rythme lent 50 mL de H_2SO_4 concentré. Le mélange visqueux est agité pendant l'ajout ainsi que durant 30 min après la fin de l'ajout de l'acide. Toujours à 0 °C, on ajoute sur un intervalle de 30 min, 25,6 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (87 mmol, 3 eq). L'agitation est maintenue durant la nuit. Le lendemain, la mixture verte est versée dans 200 mL d'eau glacée. Un mélange de cristaux blancs et d'un solide amorphe se forme. L'ensemble est isolé par filtration et rinçage à l'eau glacée. Le composé est ensuite recristallisé dans l'eau pour obtenir des cristaux uniformes. On récupère 2,5 g d'un composé pur et cristallin (rendement 42%). **RMN ^1H** (400 MHz, DMSO-d_6) δ ppm : 8,84 (d, $J = 2,5$ Hz, 2H), 8,16 (dd, $J = 8,3, 2,5$ Hz, 2H), 7,80 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H).

MATERIEL & METHODES

6-(4-formylphenyl)-3-pyridinecarboxylic acid⁹



On place dans un bicol sous argon 2,25 g du composé 6-bromonicotinic acid (7) (11,1 mmol) avec 600 mg de $Pd(PPh_3)_4$ (0,52 mmol). On canule dans le bicol 50 mL de diméthoxyéthane fraîchement dégazé puis, après 15 min d'agitation, 40 mL d'une solution à 2M de Na_2CO_3 dans laquelle on a fait buller de l'argon pendant 30 min. On ajoute ensuite sous flux d'argon 2,18 g d'acide 4-formylboronique (14,5 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant la nuit. Il est ensuite passé sur Celite®. On ajoute à la phase récupérée, une quantité suffisante d'une solution 2M d'HCl pour obtenir un pH voisin de 3. Le composé attendu précipite et est récupéré par centrifugation sous forme de 1,75 g de poudre blanche (rendement 69%). **RMN 1H** (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm : 10,08 (s, 1H, **CHO**), 9,16 (d, $J = 2$ Hz, 1H, **py**), 8,39 – 8,34 (m, 3H, **phe, py**), 8,21 (d, $J = 8$ Hz, 1H, **py**), 8,05 – 8,03 (m, 2H, **phe**).

*5-amino-2-bromopyridine*¹⁰

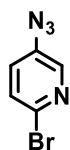
$C_5H_5BrN_2$
MM = 173,01

9

On place dans 260 mL d'acétonitrile 2 g de 3-aminopyridine (21,2 mmol). On ajoute 3,8 g de N-bromosuccinimide (NBS) recristallisé (21,3 mmol). La réaction est mise sous agitation pendant 24 h à l'abri de la lumière. Le solvant est évaporé et le résidu est purifié sur flash chromatographie en utilisant un mélange Et₂O/hexane comme système d'éluant. Le composé attendu est ensuite élué avec un ratio Et₂O/hexane de 4/1. Après évaporation du solvant, on récupère 1,3 g du composé final (rendement 35%). **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm : 7,85 (dd, J = 3 ; 0,6 Hz, 1H), 7,22 (dd, J = 8,5 ; 0,6 Hz, 1H), 6,87 (dd, J = 8,5 ; 3 Hz, 1H). **SM** (DCI NH₃) m/z : 172,9 [M+H]⁺.

MATERIEL & METHODES

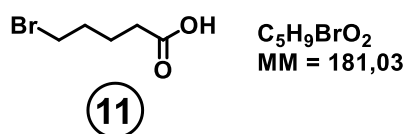
5-azido-2-bromopyridine¹¹



$C_5H_2BrN_4$
MM = 199,01

10

On dissout 500 mg du composé 5-amino-2-bromopyridine (2,9 mmol) dans 12 mL d'acétonitrile. On ajoute 0,45 mL d'azidotriméthylsilane (3,4 mmol, 1,2 eq). On place le milieu à 0 °C puis on ajoute lentement 0,35 mL de nitrite de tert-butyle (2,9 mmol). L'agitation est maintenue pendant 2 h à température ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu est passé sur colonne de silice fine (43-60 μ m) et élué avec du CH_2Cl_2 . On récupère 484 mg d'un solide vert sombre (rendement 83%). **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 8,13 (dd, $J = 2,9$; 0,7 Hz, 1H), 7,46 (dd, $J = 8,5$; 0,7 Hz, 1H), 7,22 (dd, $J = 8,5$; 2,9 Hz, 1H).

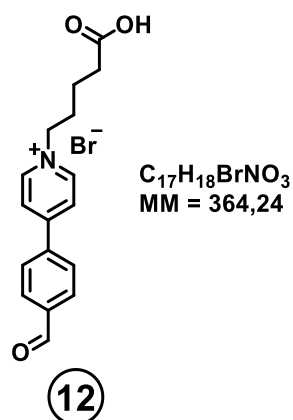
*5-bromopentanoic acid*¹²

120 mL d'acide formique sont mélangés avec 40 mL d'eau oxygénée à 30%. On ajoute lentement 10 mL de cyclopentanone (0,112 mol) sur 1 h 30. Le milieu est ensuite laissé sous agitation pendant 24 h à température ambiante puis extrait cinq fois au chloroforme. La phase organique est lavée trois fois avec une solution saturée de NaCl, séchée puis évaporée. On récupère 2 g d'un produit huileux qui est un mélange de produit attendu (l'acide 5-hydroxypentanoïque) et de sa forme lactone. Ce mélange est introduit directement dans l'étape de bromation.

Dans 8 mL de HBr 47% placés à 0 °C on ajoute goutte à goutte 4 mL de H₂SO₄ 96%. Puis on incorpore ce mélange goutte à goutte à l'huile obtenue précédemment. Le mélange est porté à reflux à 115 °C pendant 8 h. Le même volume en eau est ajouté et une extraction à l'éther est réalisée trois fois. La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaCl puis séchée et évaporée. On obtient 2 g d'un solide jaune que l'on recristallise avec de l'éther de pétrole (rendement 10%). **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm : 11,09 (bs, OH), 3,41 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,40 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 1,95 – 1,88 (m, 2H), 1,83 – 1,75 (m, 2H).

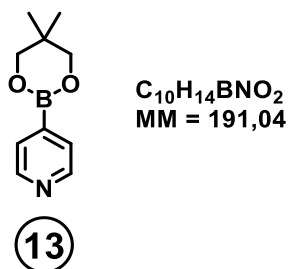
MATERIEL & METHODES

4-(4-pyridinium-1-pentanoic acid)benzaldehyde



1 g de **11** (5,5 mmol) et 500 mg de 4-(4-pyridyl)benzaldéhyde (2,7 mmol) sont placés dans un ballon. Environ 20 mL de toluène sont ajoutés et le mélange est porté à reflux pendant 4 jours. La réaction est suivie par CCM sur SiO_2 en utilisant le système éluant MeCN/ H_2O/KNO_3 sat., 8/1/1. Une fois la réaction terminée, le solvant est évaporé. On reprend le milieu dans du dichlorométhane et on réalise une extraction à l'eau du composé. La phase aqueuse est évaporée et le résidu est repris dans de l'éther de pétrole chaud. Le précipité est filtré et séché sous vide. On récupère 400 mg d'un composé solide jaune (rendement 40%). CCM (SiO_2 , MeCN/ H_2O/KNO_3 sat., 8/1/1), R_f : 0,3. **RMN 1H** (300 MHz, MeOD) δ ppm : 8,99 (d, J = 7 Hz, 2H), 8,43 (d, J = 7 Hz, 2H), 8,04 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,71 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 4,66 (t, J = 7,4 Hz, 2H), 2,42 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,16 – 2,05 (m, 2H), 1,75 – 1,65 (m, 2H). **SM-ES $^+$** m/z : 284,3 $[M]^+$.

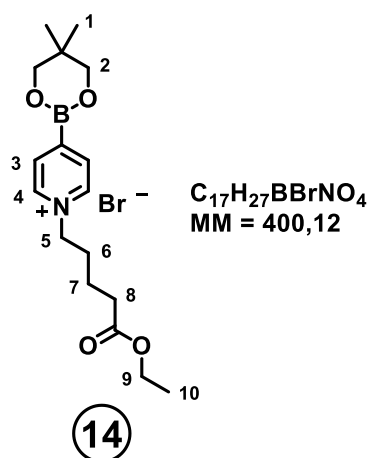
4-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-2-yl)pyridin¹³



2 g d'acide boronique 4-pyridine (16,3 mmol, 1 eq) et 1,7 g de neopentyl glycol (16,3 mmol, 1 eq) sont mis à reflux dans 250 mL de toluène. Le reflux dure toute la nuit. Lorsqu'on le coupe le lendemain, alors que la température diminue, un précipité se forme. Ce précipité est collecté par filtration puis rincé avec de l'éther diéthylique. On récupère 2,5 g d'acide boronique protégé sous la forme d'un solide blanc (rendement 80%). **RMN ¹H** (300 MHz, CDCl₃) δ ppm : 8,60 (dd, J = 4,2 ; 1,6 Hz, 2H), 7,61 (dd, J = 4,2 ; 1,6 Hz, 2H), 3,77 (s, 4H), 1,02 (s, 6H).

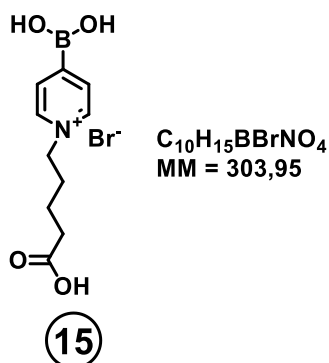
MATERIEL & METHODES

ethyl 5-[4-(5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaborinan-1-yl)pyridinium-1-yl]pentanoate ester bromide¹³



500 mg de l'acide boronique 4-pyridine protégé **13** (2,62 mmol, 1 eq) sont mis à reflux avec 1,64 g de bromovalérate d'éthyle (7,84 mmol, 3 eq) dans 50 mL d'acétonitrile pendant 3 jours. Le milieu réactionnel est lavé avec de l'éther de pétrole trois fois puis évaporé. On récupère 753 mg d'une huile jaune (rendement 72%). **RMN ¹H** (400 MHz, MeOD) δ ppm : 9,40 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, **3**), 8,25 (d, $J = 6$ Hz, 2H, **4**), 5,06 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H, **5**), 4,06 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH₂, **9**), 3,80 (s, 4H, **2**), 2,37 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H, **8**), 2,14 – 2.06 (m, 2H, **6**), 1,73 – 1,65 (m, 2H, **7**), 1,21 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H, **10**), 1,01 (s, 6H, **1**).

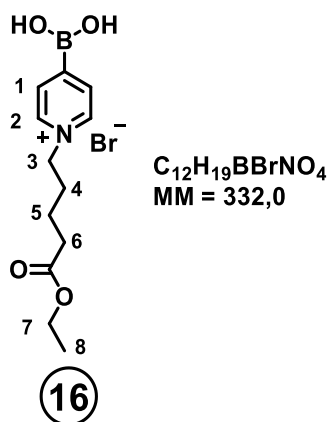
5-(4-boronopyridinium-1-yl)pentanoic acid bromide¹³



753 mg du composé **14** (1,89 mmol) sont solubilisés dans un mélange 50/50 d'eau et d'acétone (50 mL). Le milieu réactionnel est porté à 60°C pendant 4 jours. L'acétone est évaporée et la phase aqueuse est lavée 5 fois avec de l'éther diéthylique. L'eau est ensuite évaporée, conduisant à une huile jaune qui est reprise dans l'acétone. Un précipité se forme au fur et à mesure et est isolé par centrifugation et rincé à l'acétone. On collecte 460 mg d'acide boronique fonctionnalisé et déprotégé sous la forme d'une poudre jaune (rendement 80%). **RMN ¹H** (400 MHz, MeOD) δ ppm : 8,93 (dd, $J = 5 ; 2$ Hz, 2H), 8,28 (dd, $J = 5 ; 2$ Hz, 2H), 4,66 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H), 2,40 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,11 – 2,03 (m, 2H), 1,70 – 1,62 (m, 2H). **RMN ¹³C** (101 MHz, MeOD) δ ppm : 176,6 ; 144,2 ; 133,3 ; 62,4 ; 33,8 ; 31,7 ; 22,4. **SM-ES⁺** m/z : 224,11 $[M]^+$. **Mp** 153-154 °C.

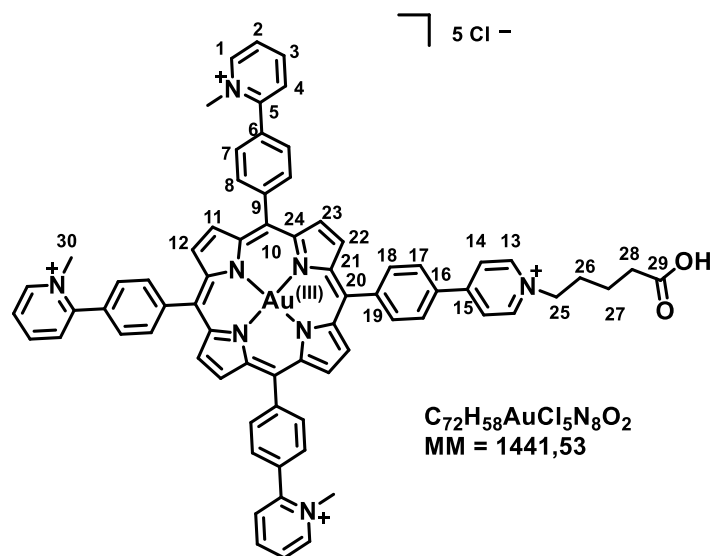
MATERIEL & METHODES

ethyl 5-(4-boronopyridinium-1-yl)pentanoate ester bromide¹³



En partant du composé fonctionnalisé et protégé **14**, la déprotection se fait dans un mélange 50/50 d'eau et d'acétone (20 mL). Le milieu réactionnel est porté à 60 °C pendant une nuit. L'acétone est évaporée et la phase aqueuse lavée 2 fois avec de l'éther diéthylique et 2 fois avec du toluène. L'eau est ensuite évaporée, conduisant à une huile jaune. Le produit n'est plus que partiellement estérifié (75% ester). **RMN ¹H** (400 MHz, MeOD) δ ppm : 8,90 (d, J = 7 Hz, 2H, **2**), 8,26 (d, J = 7 Hz, 2H, **1**), 4,64 (t, J = 7,5 Hz, 2H, **3**), 4,11 (q, J = 7 Hz, 1,5H, **7**), 2,45 – 2,38 (m, 2H, **6**), 2,11 – 2,04 (m, 2H, **4** ou **5**), 1,73 – 1,62 (m, 2H, **4** ou **5**), 1,23 (t, J = 7 Hz, 2H, **8**).

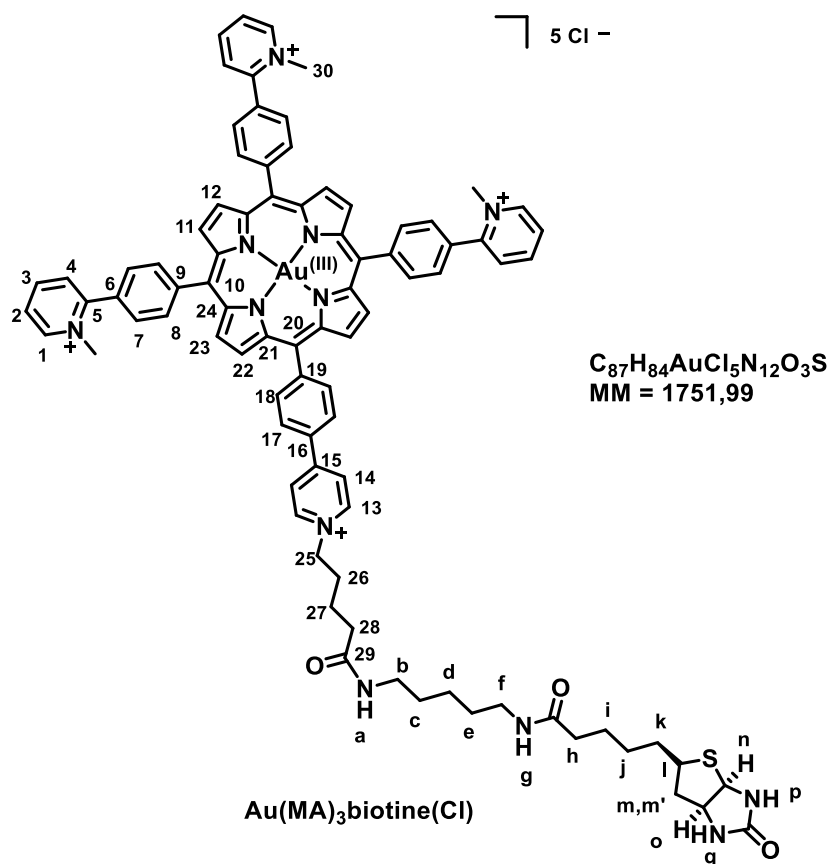
5-[4-(*N*-carboxybutylpyridinium-4-yl)phenyl]-10,15,20-tris[4-(*N*-methylpyridinium-2-yl)phenyl]porphyrinato gold(III) tetrachloride⁷



Au(MA)₃COOH(Cl)

65 mg de la porphyrine **Au(MA)₃Br(Cl)** (0,05 mmol), 35 mg de l'acide boronique **15** (0,12 mmol, 2,4 eq), 21 mg de K₂CO₃ (0,15 mmol, 3 eq), 4 mg de Pd(OAc)₂ (0,018 mmol, 0,36 eq) et 20 mg de 3,3',3''-phosphanetriyltris(benzenesulfonic acid) trisodium salt, (TPPTS) (0,035 mmol, 0,7 eq) sont placés dans un Schlenk sous argon. De l'acétonitrile et de l'eau sont dégazés séparément par bullage d'argon pendant une heure. On prélève 5 mL de chaque et on les mélange dans le Schlenk. Le mélange réactionnel est placé sous agitation et chauffage à 70 °C. La réaction est suivie en CCM sur SiO₂ en utilisant MeCN/H₂O/KNO₃sat. (6/1/1) comme éluant. Le produit de départ est totalement converti en produit attendu au bout de 24 h. L'acétonitrile est évaporé et la phase aqueuse restante est concentrée. Le composé désiré est obtenu par précipitation par ajout d'une solution concentrée d'hexafluorophosphate d'ammonium. Le produit est rincé à l'eau puis solubilisé dans de l'acétone. On le récupère par précipitation sous forme de sel de chlorure avec du chlorure de tetrabutyl ammonium⁴. Le solide est récupéré par centrifugation et rincé à l'acétone. Le composé final est obtenu sous la forme de 40 mg de poudre rouge (rendement 55%). CCM (SiO₂, MeCN/H₂O/KNO₃sat., 6/1/1), R_f : 0,15. **RMN ¹H** (400 MHz, MeOD) δ ppm : 9,59 (s, 4H, **12**), 9,58 (d, J = 5 Hz, 2H, **23**), 9,52 (d, J = 5 Hz, 2H, **22**), 9,25 – 9,23 (m, 3H, **1**), 9,21 (d, J = 7 Hz, 2H, **13**), 8,85 – 8,80 (m, 5H, **3** & **14**), 8,65 – 8,62 (m, 10H, **8**, **17**, **18**), 8,50 – 8,48 (m, 3H, **4**), 8,29 – 8,24 (m, 9H, **7**, **2**), 4,79 (t, J = 7 Hz, 2H, **25**), 4,64 (s, 3H, **30**), 4,63 (s, 6H, **30**), 2,44 (t, J = 7 Hz, 2H, **28**), 2,23 – 2,16 (m, 2H, **26**), 1,82 – 1,75 (m, 2H, **27**). **RMN ¹³C** (101 MHz, MeOD) δ ppm : 178,1 (**29**), 157,3 (**15**), 157,1 (**6**), 148,4 (**1**), 147,2 (**3**), 146,3 (**13**), 143,8 (**19**), 143,2 (**9**), 138,4 (**11**, **24**), 138,3 (**21**), 136,7 (**18**), 136,6 (**16**), 136,1 (**8**), 134,4 (**6**), 133,8 (**12**, **23**), 133,6 (**22**), 131,8 (**4**), 129,9 (**7**), 128,8 (**17**), 128,5 (**2**), 126,9 (**14**), 123,8 (**20**), 123,7 (**10**), 62,2 (**25**), 48,4 (**30**), 35,1 (**28**), 31,9 (**26**), 22,9 (**27**). **SMHR-ES⁺ m/z** : calc. pour C₇₂H₅₈AuN₈O₂ 252,6870 ; observé 252.6866 [M]⁵⁺. **UV-vis** (H₂O) λ nm (ε M⁻¹ cm⁻¹) : 406 (320 10³) (Soret), 522 (16 10³).

Porphyrine « AuMA-biotine »¹⁴



21 mg de **Au(MA)₃COOH** (14,5 μmol) sont dissous dans 8 mL de DMF anhydre et placés sous argon et soniqués pour faciliter la solubilisation. Sont ajoutés 24,3 mg de carbonyldiimidazole (15 mmol, 10 eq) dissous dans 4 mL de DMF anhydre. Après 15 min à 30 °C, 24,2 mg d'hydroxybenzotriazole (HOBT) (158 μmol , 11 eq) dissous au préalable dans 4 mL de DMF anhydre sont ajoutés. La réaction est laissée à 30 °C pendant 3 h. Le suivi de la réaction est effectué par CCM sur SiO_2 , MeCN/ H_2O / $\text{KNO}_3\text{sat.}$, 6/1/1 et montre une disparition complète du produit de départ. Le carbonyldiimidazole n'ayant pas réagi est inactivé par l'ajout de 100 μL d'eau. Après 15 min, 33,2 mg de biotine cadaverine (75 μmol , 5 eq) préalablement dissoute dans 0,2 mL H_2O est ajoutée. Le milieu réactionnel est incubé à 60 °C pendant 1 h. La réaction est alors analysée par HPLC et montre un couplage à 90%. Les conditions d'analyse sont les suivantes : le débit est de 1 mL/min, le solvant A est H_2O 0,1% TFA et le solvant B est MeCN 0,1% TFA, le gradient monte de 30 à 40% de B en 30 min. Deux méthodes de purification sont alors possibles en fin de réaction.

1^e méthode de purification par chromatographie flash : le solvant du milieu réactionnel est évaporé sous vide. Le résidu sec est repris dans 4 mL H_2O et purifié par chromatographie flash, sur un appareil Interchim, par portions de 1 mL sur une colonne puriflash C18 monolith 30 μ , 25 g (Interchim). L'élution se fait à 20 mL/min avec un gradient : MeCN/ H_2O 15/85 0,1% TFA pendant 20 min, MeCN/ H_2O 20/80 0,1% TFA pendant 40 min, MeCN/ H_2O 25/75 0,1% TFA pendant 15 min, MeCN/ H_2O 30/70 0,1% TFA pendant 15 min. La détection est à 408 nm. Le produit est collecté dans les fractions contenant 35% MeCN. Les fractions sont lyophilisées, le produit est solubilisé dans H_2O (0,3 mL) et passé sur une résine Dowex 1x8 (Cl^- form, 0,5 g) échangeuse d'ions pendant 24 h. La solution est filtrée et la résine est rincée par 0,2 mL

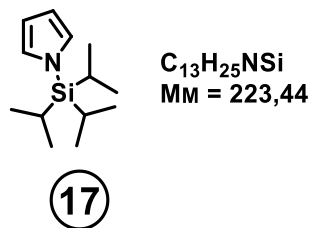
H₂O. Le solvant est évaporé. Le produit est repris par 0,1 mL de MeOH et précipité par ajout d'éther diéthylique (1 mL). Le précipité est séché sous vide. On récupère 7,5 mg de produit sous forme de poudre rouge (rendement 30%).

2^e méthode de purification par HPLC semi-préparative : le solvant du milieu réactionnel est évaporé sous vide. Le résidu sec est repris dans 4 mL H₂O et purifié par HPLC semi-préparative (Autopurification Waters 2767 équipé d'un détecteur Photodiode Array 2998 et d'une pompe Waters 2545) sur une colonne C18 (Atlantis dC18 OBD 5μ 150 mm × 19 mm). H₂O 0,05% TFA et acétonitrile 0,05% TFA sont respectivement utilisés comme solvants A et B avec un débit de 20 mL/min. La détection se fait à 408 nm. Le gradient d'élution consiste en : 1 min à 15 % B, 5 min à 28% B, gradient sur 5 min de 28% à 29% B, gradient sur 5 min de 29% à 30% B, gradient sur 1 min de 30% à 100% B, 2 min à 100% B, retour aux conditions initiales 15% B en 1 min. Les fractions contenant le produit sont lyophilisées, le produit est solubilisé dans H₂O (0,3 mL) et passé sur une résine Dowex 1x8 (Cl⁻ form, 0,5 g) échangeuse d'ions pendant 24 h. La solution est filtrée et la résine rincée à l'eau. Le solvant est évaporé. Le produit est repris par 0,1 mL de MeOH et précipité par ajout d'éther diéthylique (1 mL). Le précipité est séché sous vide.

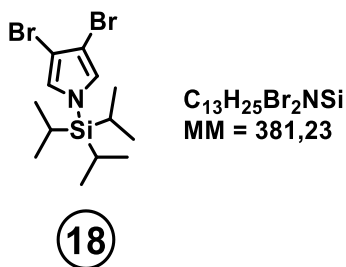
RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm : 9,53 – 9,52 (m, 6H, **12**, **23**), 9,47 (d, *J* = 5 Hz, 2H, **22**), 9,35 – 9,32 (m, 5H, **1**, **13**), 8,93 (d, *J* = 6 Hz, 2H, **14**), 8,87 – 8,83 (m, 3H, **3**), 8,71 (d, *J* = 8 Hz, 2H, **17** ou **18**), 8,60 – 8,56 (m, 8H, **17** ou **18**, **8**), 8,47 (d, *J* = 8 Hz, 3H, **4**), 8,37 – 8,33 (m, 3H, **2**), 8,27 (d, *J* = 8 Hz, 2H, **7**), 8,26 (d, *J* = 8 Hz, 4H, **7**), 7,87 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, **a** ou **g**), 7,77 (t, *J* = 5,5 Hz, 1H, **a** ou **g**), 6,37 (s, 1H, **p** ou **q**), 6,32 (s, 1H, **p** ou **q**), 4,74 (t, *J* = 5,5 Hz, 2H, **25**), 4,53 (s, 9H, **30**), 4,28 – 4,25 (m, 1H, **n** ou **o**), 4,10 – 4,07 (m, 1H, **n** ou **o**), 3,07 – 3,02 (m, 6H, m, **b**, **f**), 2,78 (dd, *J* = 12 Hz, 5 Hz, 1H, **m'**), 2,20 (t, *J* = 7 Hz, 2H, **28** ou **h**), 2,07 – 2,01 (m, 4H, **26**, **28** ou **h**), 1,61 – 1,24 (m, 14H, **12**, **i**, **j**, **k**, **c**, **d**, **e**). **SMHR-ES⁺ *m/z*** : calc. pour C₈₇H₈₄AuN₁₂O₃S 314,9241 ; observé 314,9237 [M]⁵⁺. **UV-vis** (H₂O) λ nm (ε M⁻¹ cm⁻¹) : 409 (250 10³) (Soret), 522 (14 10³).

MATERIEL & METHODES

N-triisopropylsilylpyrrole¹⁵



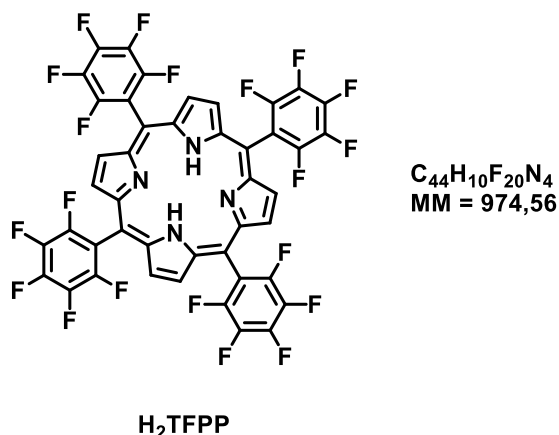
Dans 250 mL de THF anhydre, 7,65 g de NaH (60% dispersion dans l'huile de paraffine, 191,2 mmol, 1,3 eq) sont progressivement mis en suspension sous flux continu d'argon. On ajoute ensuite tout aussi progressivement 10 mL de pyrrole (144,5 mmol) fraîchement distillé. Le mélange est agité à température ambiante pendant 1 h 30. Lentement, on introduit 31 mL de chlorure de triisopropylsilyle (TIPSCl) (144,8 mmol) toujours sous flux d'argon. L'agitation est maintenue durant 1 h 30 supplémentaire. De l'eau froide est ajoutée progressivement jusqu'à cessation du dégagement gazeux et le mélange est transvasé dans une ampoule à décanter. Le produit est extrait à l'éther diéthylique par trois fois. La phase organique résultante est lavée par trois fois avec une solution saturée de NaCl. Elle est ensuite séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le produit attendu est récupéré sous la forme de 30 mL d'une huile rosé-jaune qui sera conservée au congélateur et sous argon (rendement 84%). **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm : 6,81 (t, J = 2 Hz, 2H), 6,33 (t, J = 2 Hz, 2H), 1,47 (hept, J = 7,5 Hz, 3H), 1,12 (d, J = 7,5 Hz, 18H). **SM** (DCI NH₃) *m/z* : 224 [M+H]⁺.

*3,4-dibromo-1-triisopropylsilylpyrrole*¹⁶

Dans 100 mL de THF anhydre à -78 °C on introduit 15 mL du composé **17** (60,7 mmol). On ajoute spatule par spatule 22 g de N-bromosuccinimide (NBS) recristallisé (123,6 mmol, 2 eq). L'agitation est maintenue 1 h à cette température puis la réaction est laissée à réchauffer jusqu'à température ambiante. On ajoute 50 mL d'une solution saturée en $NaHCO_3$ et le mélange est transféré dans une ampoule à décanter pour y être extrait par trois fois à l'éther diéthylique. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis évaporée. Le résidu est solubilisé dans un minimum de pentane à ébullition puis la solution est laissée à évaporer sous la sorbonne. Les cristaux qui se forment sont collectés manuellement, éponnés au papier filtre puis remis à cristalliser. Ce processus, répété cinq fois, nous permet d'obtenir 7,7 g de composé pur sous la forme de cristaux blancs qui seront conservés au congélateur et sous argon (rendement 33%). **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 6.72 (s, 2H), 1.41 (hept, $J = 7,5$ Hz, 3H), 1.09 (d, $J = 7,5$ Hz, 18H). **SM** (DCI NH_3) m/z : 379 $[M+H]^+$.

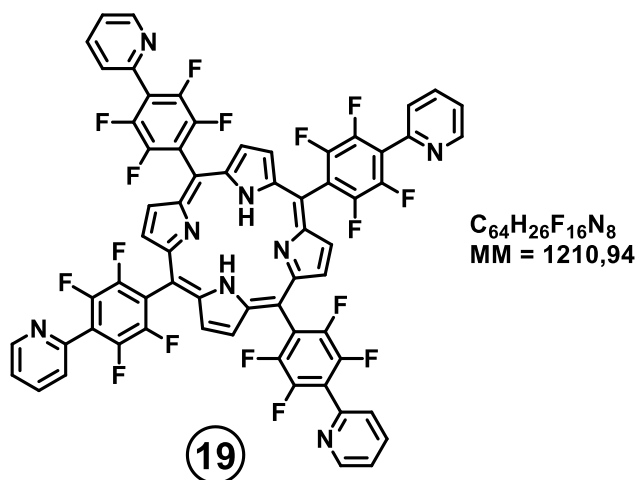
MATERIEL & METHODES

*meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin*¹⁷



Dans un ballon de 250 mL, 5 g (25,5 mmol) de 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldéhyde, 1,78 mL (25,3 mmol) de pyrrole sont mis à réagir dans 125 mL d'acide propionique. La solution est portée à reflux pendant 2 h. L'acide propionique est ensuite éliminé par distillation sous vide. Le résidu obtenu est élué sur un plug de silice avec du dichlorométhane puis le filtrat est collecté et concentré. Le composé est purifié sur colonne d'alumine neutre en utilisant un gradient d'éther de pétrole/CH₂Cl₂ (95/5 → 80/20) comme éluant. Les fractions contenant le produit sont récupérées. Après évaporation, 532 mg du composé sont obtenus sous la forme d'un solide violet (rendement 9%). CCM (alumine neutre, éther de pétrole/CH₂Cl₂, 70/30), R_f : 0,78. **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm : 8,95 (s, 8H, **pyrrole**), -2,88 (s, 2H, **NH**). **SM-ES⁺** *m/z* : 975 [M+H]⁺, 488 [M+2H]²⁺.

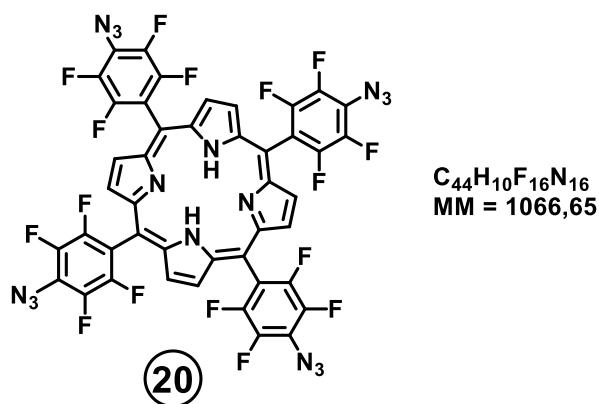
*meso-tetrakis[(4-(2-pyridyl)-2,3,5,6-tetrafluorophenyl]porphyrin*¹⁸



100 μ L de 2-bromopyridine (1 mmol) sont séchés sous vide dans un Schlenk bien sec pendant 15 min. On ajoute 4 mL de THF anhydre. Le Schlenk est placé dans un bain d'acétone dont la température est régulée à -85 °C. Un ajout lent de n-buthyllithium est effectué (1,8 M, 0,4 mL, 0,72 mmol). Le milieu est laissé une heure sous agitation. On canule ensuite une solution de porphyrine **H₂TFPP** (50 mg, 0,05 mmol) dans 3 mL de THF anhydre, placée au préalable à la même température, dans le milieu réactionnel. L'agitation est maintenue durant 3 h supplémentaires. Une fois la réaction terminée, le milieu est extrait à l'éther diéthylique après ajout d'une solution saturée de NaHCO₃. Après séchage sur MgSO₄ et évaporation du solvant, le résidu est purifié sur une colonne de silice fine (43-60 μ m) en utilisant CH₂Cl₂/EtOAc comme système éluant avec un gradient d'EtOAc. Le composé d'intérêt est élué avec 50% d'EtOAc. Après évaporation des fractions, le composé est solubilisé dans un minimum d'EtOAc et précipité avec de l'éthanol. Après centrifugation et séchage, on obtient 2,5 mg d'une poudre marron sombre (rendement 4%). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm : 9,09 (s, 8H), 8,99 (ddd, J = 5 ; 2 ; 1 Hz, 4H), 8,07 (ddd, J = 7,5 ; 7,5 ; 2 Hz, 4H), 7,93 (d, J = 7,5 Hz, 4H), 7,57 (ddd, J = 7,5 ; 5 ; 1 Hz, 4H), -2,80 (s, 2H). **SM-ES⁺** m/z : 404,4 (100%) [M+H]³⁺, 606,1 (50%) [M+H]²⁺.

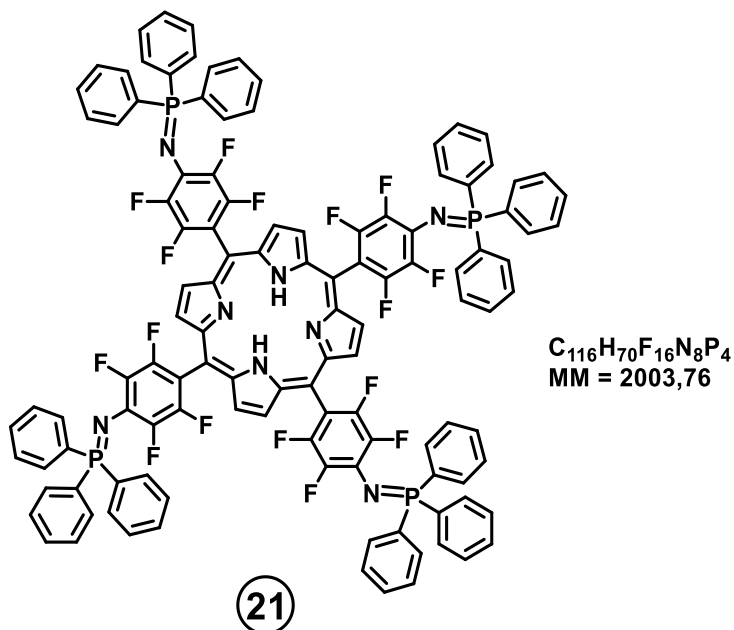
MATERIEL & METHODES

meso-tetrakis(2,3,5,6-tetrafluoro-4-azidophenyl)porphyrin^{19,20}



Dans un ballon bicol de 50 mL sont introduits sous argon, 270 mg (0,28 mmol) de **H₂TFPP** et 78 mg (1,2 mmol) d'azoture de sodium ainsi que 8,1 mL de DMF. Le tout est laissé réagir pendant 1 h 30 à 60 °C sous agitation. On ajoute 100 mL de dichlorométhane dans le milieu puis on transfère la solution dans une ampoule à décanter. On ajoute 3 fois 50 mL d'eau pour laver la phase organique et retirer le DMF. La phase organique est ensuite séchée avec MgSO₄. Le solvant est évaporé, la purification se fait par chromatographie sur une colonne de silice (diamètre 8 cm hauteur 15 cm) avec un gradient d'élution éther de pétrole/CH₂Cl₂ de 8/2 à 6/4. Le produit d'intérêt est élué en premier. Les fractions pures sont évaporées et 257 mg (0,24 mmol) du produit pur sous la forme d'une poudre violette sont récupérés (rendement 87%). CCM (SiO₂, éther de pétrole/CH₂Cl₂, 7/3), R_f : 0,46. **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ ppm : 8,95 (s, 8H, **pyrrole**), -2,89 (s, 2H, **NH**). **SM** (MALDI LD⁺) *m/z* : 1066,3 [M]⁺.

meso-tetrakis[(4-(triphenylphosphazényl)-2,3,5,6-tetrafluorophenyl)]porphyrin^{21,22}



Dans un ballon on place 100 mg (0,09 mmol) de **20**, 130 mg (0,5 mmol) de triphénylphosphine puis on ajoute 20 mL de dioxane. Le milieu est chauffé à reflux pendant 24 h. Puis 7 mL d'eau sont ajoutés et la réaction est laissée 15 min de plus à reflux sous agitation avant de laisser refroidir le milieu à température ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par colonne de silice en utilisant CH_2Cl_2 comme éluant. Le composé d'intérêt correspond à la seconde fraction. Après évaporation du solvant, on récupère 54 mg (0,027 mmol) de composé pur (rendement 29%). CCM (SiO_2 , CH_2Cl_2) Rf : 0,3. **RMN 1H** (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : 8,88 (s, 8H), 7,98 – 7,92 (m, 24H), 7,65 – 7,57 (m, 36H), -2,86 (s, 2H). **RMN ^{19}F** (376 MHz, $CDCl_3$) δ ppm : -143,01 (d, $^3J_{FF} = 10,6$ Hz, 8F), -153,17 (d, $^3J_{FF} = 10,6$ Hz, 8F). **SM-ES $^+$ m/z** : 2003,5 $[M+H]^+$, 1002,2 $[M+2H]^{2+}$, 668,5 $[M+3H]^{3+}$.

V. Modélisation Moléculaire

Principe

L'ensemble des simulations alchimiques ont été effectuées sur la séquence d'ADN quadruplex correspondant à une région riche en Guanines, retrouvée dans la partie terminale du promoteur (LTR IV) dans le génome proviral du VIH-1²³. La structure de cette séquence G₄ a été caractérisée par RMN et est accessible sous le code 2N4Y sur le serveur de la Protein Data Bank²⁴.

Le logiciel Discovery Studio Visualizer® (DSV) a été utilisé comme interface de visualisation et pour manipuler ou modifier les molécules. Les différentes porphyrines étudiées ont été construites avec le logiciel Chemdraw® et optimisées avant l'étape de docking à l'aide du logiciel Avogadro® (v1.2)²⁵, avec le champ de force « Universal Force Field » (UFF).

Docking

Afin d'identifier l'orientation optimale entre le G₄ et les porphyrines de notre étude, chacune d'entre elles a été soumise à un calcul préalable de docking. C'est la conformation ayant donné le meilleur score énergétique qui a ensuite servi de point de départ pour la détermination de l'énergie libre par la méthode ABFE. L'interface graphique AutoDockTools®²⁶ a été utilisée pour préparer l'ensemble des fichiers nécessaires aux calculs de docking. Les calculs de docking ont été réalisés à l'aide du logiciel Autodock vina®²⁷. L'espace exploré par les ligands correspond à un cube de 25 Å de côté, centré sur la tétrade de guanines G₃-G₇-G₁₄-G₁₈.

Paramétrage du quadruplex et des porphyrines

Le paramétrage et les topologies des porphyrines ont été effectués à l'aide des modules Antechamber, Leap et Parmchk de la suite de programmes AmberTools 16ⁱ en utilisant le champ de force GAFF²⁸. Les charges ont été calculées en utilisant le schéma de Merz-Singh-Kollman (MK)²⁹, dans lequel les charges atomiques sont ajustées pour reproduire les potentiels électrostatiques moléculaire (méthode RESP) en un certain nombre de points autour de la molécule. L'utilitaire MCPB.py³⁰, a été utilisé pour accéder aux paramètres de l'atome d'or retrouvé dans certaines porphyrines. Cet utilitaire fait appel à une série de calculs de mécanique quantique, au cours desquels la géométrie de la molécule est optimisée, les charges sont calculées par la méthode RESP et les termes du champ de force en relation avec le centre métallique sont par un calcul des fréquences vibrationnelles. Nous avons effectué ces calculs avec le programme Gaussian Gogⁱⁱ. La fonctionnelle de densité B3LYP a été utilisée avec l'ensemble de bases gaussiennes 6-31G*³¹. Dans

ⁱ D.A. Case, R.M. Betz, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, T.J. Giese, H. Gohlke, A.W. Goetz, N. Homeyer, S. Izadi, P. Janowski, J. Kaus, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, P. Li, C. Lin, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, D. Mermelstein, K.M. Merz, G. Monard, H. Nguyen, H.T. Nguyen, I. Omelyan, A. Onufriev, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, C.L. Simmerling, W.M. Botello-Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu, L. Xiao and P.A. Kollman (2016), AMBER 2016, University of California, San Francisco

ⁱⁱ Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016

le cas de l'atome d'or, les bases DEF2TZVP³² ont été employées.

La structure RMN de la séquence d'ADN quadruplex du génome proviral du VIH-1 a été utilisée comme structure de départ pour les simulations de dynamique moléculaire (MD) à l'aide du programme de dynamique moléculaire GROMACS 2020³³.

L'ensemble des paramètres topologiques et géométriques ont dans un deuxième temps été convertis en un format compatible avec Gromacs, à l'aide de l'utilitaire écrit en python : Acpye.py³⁴. Le quadruplex a été paramétré avec le champ de force AMBER-ggSB³⁵.

Les systèmes Porphyrine-Quadruplex ont été solvatés avec le modèle d'eau SPC (~ 20000 molécules d'eau) dans une boîte dodécaédrique, en utilisant les conditions aux limites périodiques (PBC), avec une distance moyenne de 2,5 nm entre le soluté et les bords de la boîte de simulation. Les systèmes ont été neutralisés par l'ajout d'ions K⁺.

Simulations de dynamique moléculaire et calculs alchimiques

Pour chaque système porphyrine-quadruplex étudié, 41 fenêtres de calculs alchimiques ont été paramétrées selon l'enchaînement :

- Activation des contraintes harmoniques :

0 0.01 0.025 0.05 0.075 0.1 0.2 0.35 0.5 0.75 1

- découplage des interactions coulombiennes :

0 0.1 0.25 0.4 0.55 0.65 0.725 0.8 0.875 0.95 1

- découplage des interactions de vdW :

0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.475 0.55 0.6 0.65 0.675 0.7 0.725 0.75 0.775
 0.8 0.825 0.85 0.875 0.9 0.95 1.

Pour chacune de ces fenêtres la procédure suivante a été suivie :

- Les complexes solvatés ont d'abord été soumis à une minimisation de l'énergie avec une combinaison des algorithmes de la plus forte pente (steepest descent) et du gradient conjugué.

- Les systèmes ont ensuite été équilibrés avec, dans un premier temps une simulation d'une durée de 300 ps dans un ensemble NVT (nombre de particules, volume et température constants) et dans un deuxième temps, une simulation d'une durée de 400 ps dans un ensemble NPT (nombre de particules, pression et température constants). Le solvant et le soluté ont été couplés séparément à des bains à la température de 300 K. L'approche de Parrinello-Rahman³⁶ a été utilisée pour maintenir la pression à 1 bar, avec un temps de relaxation de 1,0 ps et une compressibilité isotherme de $4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$. Au cours de l'étape d'équilibrage, les atomes lourds du soluté ont été contraints avec des forces harmoniques de $1000 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$.

MATERIEL & METHODES

- L'étape d'équilibrage a été suivie d'une simulation sans contraintes d'une durée de 2 ns. Les simulations ont été effectuées en utilisant un pas de temps d'intégration de 2 fs.

La méthode de Particle-Mesh Ewald (PME)³⁷ a été appliquée pour modéliser les interactions électrostatiques à longue distance en utilisant une distance de coupure de 12 Å. Les liaisons des atomes d'hydrogènes ont été contraintes en utilisant l'algorithme de LINCS³⁸.

La position et l'orientation relatives du ligand par rapport à la protéine ont été restreintes au moyen d'une distance, de deux angles et de trois potentiels harmoniques dièdres avec une constante de force de 1000 kcal mol⁻¹.nm⁻² pour la distance et de 10 kcal mol⁻¹.deg⁻² pour les angles. La contribution de cet ensemble de contraintes à l'énergie libre a été calculée analytiquement selon la procédure décrite par Boresch et al³⁹.

- Un protocole similaire a été suivi pour accéder à l'énergie libre de désolvatation des porphyrines seules en solution. 42 fenêtres de calculs alchimiques ont été paramétrées selon l'enchaînement :

- découplage des interactions coulombiennes :

0.0 0.05 0.1 0.15 0.20 0.25 0.3 0.35 0.4 0.45 0.5 0.55 0.6 0.65 0.7 0.75 0.8 0.85 0.9 0.95 1.0

- découplage des interactions de vdW :

0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.475 0.55 0.6 0.65 0.675 0.70 0.725 0.75 0.775 0.8 0.825 0.85 0.875 0.9 0.95 0.975 1.0

REFERENCES DE LA PARTIE MATERIEL & METHODES

- (1) Malatesti, N.; Smith, K.; Savoie, H.; Greenman, J.; Boyle, R. Synthesis and in Vitro Investigation of Cationic 5,15-Diphenyl Porphyrin-Monoclonal Antibody Conjugates as Targeted Photodynamic Sensitisers. *Int. J. Oncol.* **2006**, *28*, 1561–1569. <https://doi.org/10.3892/ijco.28.6.1561>.
- (2) Lindsey, J. S. Synthetic Routes to *Meso* -Patterned Porphyrins. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43* (2), 300–311. <https://doi.org/10.1021/ar900212t>.
- (3) Romera, C.; Sabater, L.; Garofalo, A.; M. Dixon, I.; Pratviel, G. Interaction of Cationic Nickel and Manganese Porphyrins with the Minor Groove of DNA. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (18), 8558–8567. <https://doi.org/10.1021/ic101178n>.
- (4) Batinic-Haberle, I.; Benov, L.; Spasojevic, I.; Fridovich, I. The Ortho Effect Makes Manganese(III)Meso-Tetrakis(N-Methylpyridinium-2-Yl)Porphyrin a Powerful and Potentially Useful Superoxide Dismutase Mimic. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (38), 24521–24528. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24521>.
- (5) Jin, S.; Zhao, P.; Xu, L.; Zheng, M.; Lu, J.; Zhao, P.; Su, Q.; Chen, H.; Tang, D.; Chen, J.; Lin, J. Synthesis, G-Quadruplexes DNA Binding, and Photocytotoxicity of Novel Cationic Expanded Porphyrins. *Bioorg Chem* **2015**, *60*, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.05.001>.
- (6) Gao, G. Y.; Chen, Y.; Zhang, X. P. General and Efficient Synthesis of Arylamino- and Alkylamino-Substituted Diphenylporphyrins and Tetraphenylporphyrins via Palladium-Catalyzed Multiple Amination Reactions. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (16), 6215–6221. <https://doi.org/10.1021/jo034576t>.
- (7) Tremblay-Morin, J.-P.; Ali, H.; van Lier, J. E. Palladium Catalyzed Coupling Reactions of Cationic Porphyrins with Organoboranes (Suzuki) and Alkenes (Heck). *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (18), 3043–3046. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.03.018>.
- (8) Roy, S.; Khatua, H.; Das, S. K.; Chattopadhyay, B. Iron(II)-Based Metalloradical Activation: Switch from Traditional Click Chemistry to Denitrogenative Annulation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58* (33), 11439–11443. <https://doi.org/10.1002/anie.201904702>.
- (9) Meier, P.; Legraverant, S.; Müller, S.; Schaub, J. Synthesis of Formylphenylpyridinecarboxylic Acids Using Suzuki-Miyaura Coupling Reactions. *Synthesis* **2003**, No. 04, 0551–0554. <https://doi.org/10.1055/s-2003-37663>.
- (10) Cañibano, V.; Rodríguez, J. F.; Santos, M.; Sanz-Tejedor, M. A.; Carreño, M. C.; González, G.; García-Ruano, J. L. Mild Regioselective Halogenation of Activated Pyridines with N-Bromosuccinimide. *Synthesis* **2001**, *14*, 2175–2179. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18070>.
- (11) Smith, C. D.; Greaney, M. F. Zinc Mediated Azide–Alkyne Ligation to 1,5- and 1,4,5-Substituted 1,2,3-Triazoles. *Org. Lett.* **2013**, *15* (18), 4826–4829. <https://doi.org/10.1021/ol402225d>.
- (12) Sankaranarayanan, S.; Chattopadhyay, S. Asymmetric Synthesis of a Cytotoxic Amide of Telesto Riisei. *Tetrahedron Asymmetry* **1998**, *9* (8), 1345–1350. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(98\)00091-3](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(98)00091-3).

- (13) Gao, L.; Wang, T.; Jia, K.; Wu, X.; Yao, C.; Shao, W.; Zhang, D.; Hu, X.-Y.; Wang, L. Glucose-Responsive Supramolecular Vesicles Based on Water-Soluble Pillar[5]Arene and Pyridylboronic Acid Derivatives for Controlled Insulin Delivery. *Chem. - Eur. J.* **2017**, *23* (27), 6605–6614. <https://doi.org/10.1002/chem.201700345>.
- (14) Casas, C.; Saint-Jalmes, B.; Loup, C.; Lacey, C. J.; Meunier, B. Synthesis of Cationic Metalloporphyrin Precursors Related to the Design of DNA Cleavers. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (10), 2913–2917. <https://doi.org/10.1021/j000062a045>.
- (15) Mallick, A.; Oh, J.; Kim, D.; Ishida, M.; Furuta, H.; Rath, H. Induced Correspondence of a Local π -Aromatic Sextet in Heteroannulenes: Synthesis and Characterization. *Chem. - Eur. J.* **2016**, *22* (16), 5504–5508. <https://doi.org/10.1002/chem.201600380>.
- (16) Bray, B. L.; Mathies, P. H.; Naef, R.; Solas, D. R.; Tidwell, T. T.; Artis, D. R.; Muchowski, J. M. N-(Triisopropylsilyl)Pyrrole. A Progenitor “Par Excellence” of 3-Substituted Pyrroles. *J. Org. Chem.* **1990**, *55* (26), 6317–6328. <https://doi.org/10.1021/j000313a019>.
- (17) De Poorter, B.; Meunier, B. Metalloporphyrin-Catalysed Epoxidation of Terminal Aliphatic Olefins with Hypochlorite Salts or Potassium Hydrogen Persulphate. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1985**, No. 11, 1735. <https://doi.org/10.1039/p29850001735>.
- (18) Aviezer, D.; Cotton, S.; David, M.; Segev, A.; Khaselev, N.; Galili, N.; Gross, Z.; Yayon, A. Porphyrin Analogues as Novel Antagonists of Fibroblast Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Binding That Inhibit Endothelial Cell Proliferation, Tumor Progression, and Metastasis. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2973–2980.
- (19) Golf, H. R. A.; Reissig, H.-U.; Wiehe, A. Regioselective Nucleophilic Aromatic Substitution Reaction of *Meso*-Pentafluorophenyl-Substituted Porphyrinoids with Alcohols: Nucleophilic Aromatic Substitution of Porphyrinoids. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *7*, 1548–1568. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201403503>.
- (20) Heredia, D. A.; Martínez, S. R.; Durantini, A. M.; Pérez, M. E.; Mangione, M. I.; Durantini, J. E.; Gervaldó, M. A.; Otero, L. A.; Durantini, E. N. Antimicrobial Photodynamic Polymeric Films Bearing Biscarbazol Triphenylamine End-Capped Dendrimeric Zn(II) Porphyrin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (31), 27574–27587. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b09119>.
- (21) Lenstra, D. C.; Lenting, P. E.; Mecinović, J. Sustainable Organophosphorus-Catalysed Staudinger Reduction. *Green Chem.* **2018**, *20* (19), 4418–4422. <https://doi.org/10.1039/C8GC02136H>.
- (22) Lenstra, D. C.; Wolf, J. J.; Mecinović, J. Catalytic Staudinger Reduction at Room Temperature. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (10), 6536–6545. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b00831>.
- (23) De Nicola, B.; Lech, C. J.; Heddi, B.; Regmi, S.; Frasson, I.; Perrone, R.; Richter, S. N.; Phan, A. T. Structure and Possible Function of a G-Quadruplex in the Long Terminal Repeat of the Proviral HIV-1 Genome. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (13), 6442–6451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw432>.

- (24) Berman, H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- (25) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform. *J. Cheminformatics* **2012**, *4* (1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- (26) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- (27) Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2009**, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- (28) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (9), 1157–1174. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>.
- (29) Singh, U. C.; Kollman, P. A. An Approach to Computing Electrostatic Charges for Molecules. *J. Comput. Chem.* **1984**, *5* (2), 129–145. <https://doi.org/10.1002/jcc.540050204>.
- (30) Li, P.; Merz, K. M. MCPB.Py: A Python Based Metal Center Parameter Builder. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56* (4), 599–604. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00674>.
- (31) Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **1971**, *54* (2), 724–728. <https://doi.org/10.1063/1.1674902>.
- (32) Weigend, F.; Ahlrichs, R. Balanced Basis Sets of Split Valence, Triple Zeta Valence and Quadruple Zeta Valence Quality for H to Rn: Design and Assessment of Accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7* (18), 3297. <https://doi.org/10.1039/b508541a>.
- (33) Berendsen, H. J. C.; van der Spoel, D.; van Drunen, R. GROMACS: A Message-Passing Parallel Molecular Dynamics Implementation. *Comput. Phys. Commun.* **1995**, *91* (1–3), 43–56. [https://doi.org/10.1016/0010-4655\(95\)00042-E](https://doi.org/10.1016/0010-4655(95)00042-E).
- (34) Sousa da Silva, A. W.; Vranken, W. F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser InterfacE. *BMC Res. Notes* **2012**, *5* (1), 367. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367>.
- (35) Hornak, V.; Abel, R.; Okur, A.; Strockbine, B.; Roitberg, A.; Simmerling, C. Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2006**, *65* (3), 712–725. <https://doi.org/10.1002/prot.21123>.
- (36) Parrinello, M.; Rahman, A. Crystal Structure and Pair Potentials: A Molecular-Dynamics Study. *Phys. Rev. Lett.* **1980**, *45* (14), 1196–1199. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.45.1196>.

MATERIEL & METHODES

- (37) Darden, T.; Perera, L.; Li, L.; Pedersen, L. New Tricks for Modelers from the Crystallography Toolkit: The Particle Mesh Ewald Algorithm and Its Use in Nucleic Acid Simulations. *Structure* **1999**, *7* (3), R55–R60. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80033-1](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80033-1).
- (38) Hess, B.; Bekker, H.; Berendsen, H. J. C. LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. *J. Comput. Chem.* *18* (12), 10.
- (39) Boresch, S.; Tettinger, F.; Leitgeb, M.; Karplus, M. Absolute Binding Free Energies: A Quantitative Approach for Their Calculation. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (35), 9535–9551. <https://doi.org/10.1021/jp0217839>.

CONCLUSION

Le contexte de ces travaux est inclus dans l'étude du rôle des G4s chez les virus. Il a été montré à plusieurs reprises que ces structures avaient un rôle important de régulation chez ces pathogènes et que les ligands de G4s venaient perturber cette régulation, conduisant à l'arrêt du cycle viral. La recherche dans le domaine des G4s viraux est prometteuse dans la mesure où ces structures constituent des cibles originales non sujettes à des mutations résistantes. Il s'agit d'une part de trouver de nouveaux ligands de ces structures et d'autre part de démontrer leur importance au sein des virus et d'élucider leur rôle dans le cycle viral. Nous nous sommes concentrés sur l'étude des G4s du virus du VIH-1.

Le groupe travaille d'une part sur l'élaboration de porphyrines cationiques d'or(III), qui se sont révélées d'excellents ligands de G4s, et d'autre part sur l'étude de leur mécanisme d'action. Il s'est avéré que ces porphyrines étaient capables d'interrompre le cycle viral du VIH-1. Leur potentiel inhibiteur a été directement corrélé à leur affinité pour les structures de G4s.

Elles ont donc servi de support à l'élaboration d'un dérivé destiné à des études de *pull down* qui permettraient d'isoler la séquence du G4 clé impliquée dans l'inhibition de la réplication du VIH-1 par les porphyrines. Cela serait la preuve qu'il existe bien un G4 impliqué dans ce processus et que ce G4 constitue une cible potentielle pour le développement de nouveaux antiviraux. Ce composé devait comporter une partie porphyrine susceptible de se lier *in vivo* au G4 potentiellement impliqué dans le cycle de réplication. L'autre partie devait comporter un tag permettant l'isolement dudit G4 par colonne d'affinité à des fins de séquençage.

Une nouvelle série de porphyrines d'or(III) a été préparée afin de réaliser une étude de relations structure/affinité envers les G4s. Cette étude a mis en évidence l'importance du nombre de charges positives, ainsi que leur position, sur l'affinité des porphyrines pour les G4s. Elle a été réalisée en ayant recours à la méthode de FRET-melting et les porphyrines testées ont donc été classées en fonction de la température de demi-dénaturation du complexe G4-porphyrine. Il a été conclu que plus la porphyrine portait de charges positives, meilleure était son affinité pour les G4s.

La porphyrine choisie pour réaliser l'accrochage du tag a été sélectionnée à l'issue de cette étude structure/affinité. Cette porphyrine a été conçue sur le modèle d'**AuMA** en modifiant un des bras *meso* afin de permettre l'accrochage du tag biotine. Ce composé est actuellement en phase de test.

En parallèle de ces synthèses, des études de modélisation moléculaire ont été menées. Elles ont d'abord consisté en une validation de la méthode théorique choisie grâce aux résultats expérimentaux. La méthode de calcul est une méthode alchimique qui a été vérifiée en réalisant les calculs d'énergie libre de liaison des porphyrines d'or(III) de la série de molécules testées en FRET. La méthode a pu être validée. De nouvelles porphyrines ont ensuite été évaluées afin de déterminer quelles modifications structurales pourraient être apportées à la porphyrine **AuMA** pour obtenir un meilleur ligand de G4s.

Les premières porphyrines modélisées ont été des porphyrines portant des atomes de fluor à différentes positions de la porphyrine (le cycle pyrrole, le cycle phenyl ou le cycle pyridinium). Le postulat de départ était de vérifier si la présence de groupement électroattracteurs tels que des atomes de fluor pouvaient remplacer la présence de l'atome

CONCLUSION GENERALE

d'or(III) au cœur de la porphyrine. Les résultats des calculs ont montré que l'ajout de groupements électroattracteurs sur les cycles pyridiniums de la porphyrine pouvait augmenter son énergie libre de liaison avec le G₄.

Parmi les dérivés comportant un groupement électroattracteur sur le pyridinium un composé prometteur montre une énergie libre de liaison pour le G₄ plus importante qu'**AuMA**.

RESUME EN FRANÇAIS

Les séquences d'acides nucléiques riches en guanines peuvent former des structures non canoniques d'ADN ou d'ARN par repliements à 4 brins appelées G-quadruplex (G₄). Ces structures particulières interviennent comme régulateurs dans les processus fondamentaux du vivant (transcription, traduction, etc.). De par leur structure originale les G₄s peuvent être ciblés par des petites molécules, ou ligands, de façon à interférer avec leur fonction biologique. Les G₄s ont notamment fait l'objet d'une attention particulière comme cible pharmacologique pour le traitement du cancer ou des infections virales. Il est à noter que dans le génome du virus VIH-1 les séquences de G₄s se trouvent particulièrement bien conservées et constituent donc des cibles privilégiées.

Les porphyrines sont connues pour être d'excellents ligands de G₄. Certains dérivés de porphyrines portant plusieurs charges cationiques et présentant un cœur métallé par de l'or(III) possèdent une activité antivirale remarquable contre le virus VIH-1 qui de plus, se corrèle avec leur capacité à se lier *in vitro* à des G₄s présents dans le génome du VIH-1. Le travail de thèse a consisté dans une première partie à préparer un dérivé biotinylé de la porphyrine la plus active sur le VIH-1 pour mieux comprendre son mécanisme d'action biologique et identifier les G₄s cibles responsables de l'inhibition de la réplication virale par cette molécule. L'élaboration de ce dérivé biotinylé, a donné lieu à la synthèse d'une librairie de molécules qui ont fait l'objet d'une étude de relation structure/activité pour le ciblage des G₄s. Le composé biotinylé ainsi optimisé a permis d'isoler de l'ARN du VIH-1 à partir de cellules infectées *in vitro*. Ce résultat démontre l'efficacité du composé porphyrine-biotine à séquestrer des ARNs viraux structurés en G-quadruplex et confirme donc l'existence de G₄s essentiels à la réplication dans le génome de VIH-1.

Dans une deuxième partie, la modélisation moléculaire est mise à profit afin, d'une part de compléter les études de relation structure/activité effectuées sur les porphyrines déjà synthétisées et d'autre part d'orienter la synthèse vers de nouvelles porphyrines dont l'affinité pour les G₄s viraux et en conséquence, l'activité antivirale seraient meilleures. Nous avons pour cela effectué des calculs d'énergie libre d'interaction en appliquant la méthode de transformation alchimique, qui est basée sur un ensemble de simulations de dynamique moléculaire. La méthode a été dans un premier temps validée par la détermination des énergies libres d'interaction entre les porphyrines expérimentales et un G-quadruplex de VIH-1 dont la structure est décrite. Elle a ensuite été mise œuvre sur une librairie originale de porphyrines fluorées et/ou nitrées. Ces résultats théoriques nous permettent de proposer de nouveaux dérivés de porphyrines potentiellement plus affins pour les G₄s par comparaison avec la meilleure porphyrine antivirale prise comme référence.

Mots clés : G-quadruplex, ADN, ARN, porphyrine, HIV-1, alchemical free energy

Guanine-rich DNA and RNA sequences are capable of folding into non-canonic, four-stranded G-quadruplex structures referred to as G₄. They are involved in the fundamental processes of life (transcription, translation, etc.). Due to their original structure they may be targeted by small molecules, or ligands, in order to tune their biological function. Indeed, G-quadruplex structures have received particular attention as potential pharmacological targets for the treatment of cancer or viral infections. It is worth noting that the G₄ sequences of HIV-1 virus genome are highly conserved regions and thus correspond to attractive target.

Porphyrins are known as excellent G₄ ligands. Some porphyrin derivatives bearing several cationic charges and a central gold(III) metal ion show a noticeable antiviral activity against HIV-1 virus. Besides, their activity correlates with their affinity for viral G₄s *in vitro*. The work was devoted, in a first part, to the preparation of a porphyrin-biotin conjugate of the most active porphyrin against HIV-1 in order to better understand its mechanism of action and to identify the targeted viral G₄s responsible for the inhibition of viral replication by the porphyrin. The design/synthesis of such a biotinylated conjugate implied the preparation of a library of porphyrin derivatives that were subjected to a structure/activity study for their capacity of recognition of viral G₄s. The resulting best porphyrin-biotin conjugate allowed the pull-down of HIV-1 RNA from infected cells *in vitro*. This result demonstrates the efficiency of the porphyrin-biotin conjugate to trap viral G₄-folded RNA and confirms the importance of such structures in HIV-1 replication cycle.

In the second part of the thesis, molecular modeling was used on the one hand, to explore the structure/activity relationship of already available porphyrin derivatives, and on the other hand, to propose new porphyrins endowed with higher affinity for G₄s and as a consequence, better antiviral activity. We performed interaction free energy calculations with the Alchemical Binding Free Energy method based on successive molecular dynamic simulations. In a first step, we validated the method with existing porphyrins and a HIV-1 virus G₄ sequence of known structure. Then, the method was applied to original fluoro- and nitro-porphyrin derivatives. The data allow us to propose some new porphyrins with potential higher affinity for G₄ with respect to the best antiviral porphyrin taken as a reference compound.

Key words: G-quadruplex, DNA, RNA, porphyrin, HIV-1, alchemical free energy