



UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : 470 - Chimie de Paris-Sud

Laboratoire Francis PERRIN

*DISCIPLINE CHIMIE PHYSIQUE*

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 11/09/2013

par

Ying HUA

Structures auto-assemblées de guanines étudiées  
par spectroscopie optique résolue en temps

Directrice de thèse :

Dimitra MARKOVITSI

DR1 au CNRS

Co-directrice de thèse :

Pascale CHANGENET-BARRET

CR1 au CNRS

Composition du jury :

Présidente du jury :

Isabelle LAMPRE

Professeur

Rapporteurs :

Isabelle LERAY

DR2 au CNRS

Philippe LAINÉ

DR2 au CNRS

Examineur :

Jean-Yves SALPIN

DR2 au CNRS



Ce travail de thèse a été effectué dans le Laboratoire Francis Perrin (LFP), et a été financé par le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives (CEA).

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à Madame Isabelle Leray, Directrice de recherche CNRS au Laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (PPSM), et à Monsieur Philippe Lainé, Directeur de recherche CNRS au Laboratoire Interfaces, Traitements, Organisation et Dynamique des Systèmes (ITODYS), qui ont bien voulu accepter les charges de rapporteurs de ma thèse. Je les remercie pour le temps qu'ils ont bien voulu y consacrer et les commentaires qu'ils m'ont adressés. J'adresse également mes remerciements à Madame Isabelle Lampre, Professeur à l'Université Paris-Sud, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être la présidente de mon jury de thèse. Mes remerciements vont également à Monsieur Jean-Yves Salpin, Directeur de recherche CNRS au Laboratoire Analyse et Modélisation pour la Biologie et l'Environnement (LAMBE), pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de participer au jury.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Dimitra Markovitsi de m'avoir accueilli au sein du LFP et d'avoir dirigé mon travail. Elle a su me transmettre les bases des raisonnements indispensables pour le travail de recherche scientifique ainsi que l'esprit de synthèse nécessaire. Ce fut un privilège de travailler avec elle car, bien plus qu'une responsable de thèse, elle m'a communiqué son enthousiasme pour la recherche ainsi que sa persévérance. Je remercie également Pascale Changenet-Barret, ma co-directrice de thèse, pour ces longues heures de discussions scientifiques ainsi que pour m'avoir fait profiter de son savoir, de ses compétences et de son enthousiasme pour la science.

Je n'oublie pas non plus Thomas Gustavsson. Sans son développement technique, la partie des résultats des expériences «up-conversion» n'aurait pas existé. J'ai gardé dans mon cœur son soutien, son disponibilité et son aide. Je remercie vivement Roberto Improta pour son aide dans la partie théorique, qui permet de mieux comprendre les résultats expérimentaux.

Egalement, je remercie Akos Banyasz, Johanna Brazard, Ignacio Vaya et Marion Perron pour leur soutien et les nombreux échanges que nous avons eu, aussi bien du point de vue professionnel que personnel.

Et, un dernier mot pour mes amis, les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenue.

# TABLE DES MATIERES

<b>CHAPITRE I : ETAT DE L'ART ET OBJECTIFS .....</b>	<b>1</b>
1 G-QUADRUPLEXES.....	1
2 ETATS EXCITÉS DE L'ADN .....	4
2.1 Etats excités des constituants monomériques de l'ADN en solution aqueuse.....	5
2.2 Etats excités des simples brins et double hélices d'ADN.....	7
2.3 Etats excités $\pi\pi^*$ délocalisés .....	8
2.4 Etats excités à transfert de charge.....	10
2.5 Excimères et exciplexes .....	10
3 PROPRIÉTÉS PHOTOPHYSIQUES DES STRUCTURES G-QUADRUPLEXES DE L'ADN	13
4 OBJECTIFS .....	16
RÉFÉRENCES.....	18
<b>CHAPITRE II : MÉTHODOLOGIE.....</b>	<b>25</b>
1 PRODUITS .....	25
1.1 Solutions tampons .....	25
1.2 Oligonucléotides.....	25
2 SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION STATIONNAIRE .....	26
2.1 Dispositif .....	26
2.2 Coefficient d'absorption molaire de G-quadruplexes.....	26
2.3 Calculs des spectres d'absorption du mélange stœchiométrique de mononucléotides .....	28
3 SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE STATIONNAIRE .....	29
3.1 Dispositif .....	29
3.2 Acquisition et traitement des données .....	30
3.3 Rendement quantique de fluorescence .....	32
3.4 Calculs des spectres de fluorescence stationnaire du mélange stœchiométrique de	

mononucléotides .....	33
<b>4 SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE RÉVOLUE EN TEMPS.....</b>	<b>34</b>
4.1 Comptage de photons uniques corrélés en temps.....	34
4.1.1 Principe.....	34
4.1.2 Dispositif .....	35
4.2 Génération de somme de fréquences (« up-conversion ») .....	36
4.2.1 Principe.....	36
4.2.2 Dispositif .....	37
4.3 Anisotropie de fluorescence .....	39
4.3.1 Anisotropie de fluorescence en régime stationnaire .....	39
4.3.2 Anisotropie de fluorescence résolue en temps.....	40
4.3.3 Calculs des déclins de fluorescence et de l'anisotropie de fluorescence pour le mélange stœchiométrique de mononucléotides .....	41
4.4 Traitement des données et construction des histogrammes .....	42
RÉFÉRENCES.....	44

### **CHAPITRE III : PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES**

#### **STRUCTURES G-QUADRUPLEXES .....45**

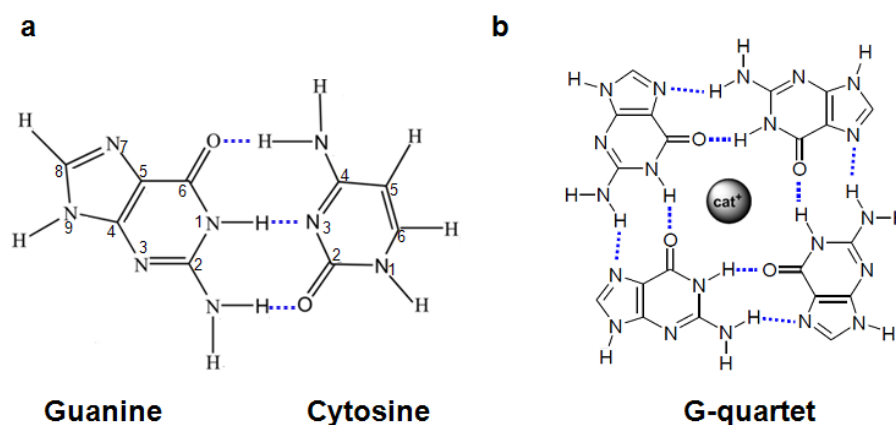
<b>1 LES QUADRUPLEXES TÉTRAMOLÉCULAIRES.....</b>	<b>45</b>
1.1 Temps de formation des G-quadruplexes tétramoléculaires.....	45
1.2 Protocole de formation des G-quadruplexes tétramoléculaires : l'hybridation ....	47
1.3 Caractérisation des G-quadruplexes tétramoléculaires : mesure des courbes de fusion	48
1.4 Caractérisation des G-quadruplexes tétramoléculaires : mesure des spectres de fluorescence stationnaire.....	50
1.5 Pourcentage de simples-brins à l'équilibre.....	50
<b>2 LES G-QUADRUPLEXES INTRAMOLÉCULAIRES TÉLOMÉRIQUES .....</b>	<b>52</b>
2.1 Préparation des G-quadruplexes télomériques .....	53
2.2 Caractérisation des G-quadruplexes télomériques : les courbes de fusion.....	54
2.3 Pourcentage de simples-brins à l'équilibre.....	54
RÉFÉRENCES.....	56

<b>CHAPITRE IV : EFFET DE TAILLE SUR LA FLUORESCENCE DES</b>	
<b>G-QUADRUPLEXES D(TGNT)<sub>4</sub> .....</b>	<b>58</b>
RÉFÉRENCES.....	65
<b>CHAPITRE V : EFFET DE LA NATURE DU CATION SUR LES</b>	
<b>PROPRIÉTÉS OPTIQUES DES G-QUADRUPLEXES D(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> .....</b>	<b>66</b>
RÉFÉRENCES.....	73
<b>CHAPITRE VI : ETUDE SPECTROSCOPIQUE DES G-QUADRUPLEXES</b>	
<b>TÉLOMÉRIQUES : D(GGG(TTAGGG)<sub>3</sub>) .....</b>	<b>75</b>
1. COMPARAISON DE TEL21 ET D(TG <sub>4</sub> T) <sub>4</sub> EN PRÉSENCE D'IONS Na <sup>+</sup> .....	75
1.1 Résultats .....	75
1.2 Discussion .....	78
2. COMPARAISON DES PROPRIÉTÉS PHOTOPHYSIQUES DE TEL21/Na <sup>+</sup> ET TEL21/K <sup>+</sup> .....	81
2.1 Résultats .....	81
2.2 Discussion .....	85
RÉFÉRENCES.....	88
<b>CHAPITRE VII : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>89</b>

# Chapitre I : Etat de l'art et objectifs

## 1 G-quadruplexes

Les guanines (G) sont des bases de l'ADN. Au sein des doubles hélices, elles s'apparient avec les cytosines (C) par des liaisons hydrogène de type Watson-Crick (Figure I-1a). En présence d'une forte concentration de cations (typiquement  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ), il est connu qu'*in vitro*, les guanines en solution peuvent également s'associer entre elles par des liaisons hydrogène de type Hoogsteen pour former une structure G-quadruplexe.<sup>1</sup> Les quartets de guanine (G-quartets) constituent les briques élémentaires des G-quadruplexes (Figure I-1b). Il s'agit d'une structure planaire constituée d'un assemblage de quatre guanines, chacune étant à la fois donneur et accepteur de liaison hydrogène. Les G-quadruplexes se caractérisent par la présence d'un cation entre les G-quartets qui stabilise leur structure en compensant les charges négatives des groupements carbonyles en position 6 des guanines.

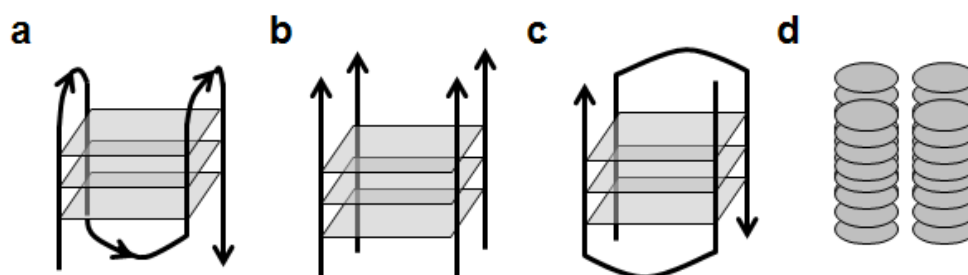


**Figure I-1.** Liaisons hydrogène : (a) de type Watson-Crick d'une paire de bases guanine-cytosine, (b) de type Hoogsteen dans un G-quartet.

Les G-quadruplexes se forment généralement par le repliement d'un simple brin d'ADN ou d'ARN riche en guanine, ou par l'association de deux ou quatre brins d'ADN (*cf.* Figure I-2a-c).<sup>2-3</sup> Très récemment, la formation de structures G-quadruplexes à partir de l'association de trois brins a été aussi mise en évidence.<sup>4</sup> Les guanosines monomériques en solution peuvent également s'assembler en structures

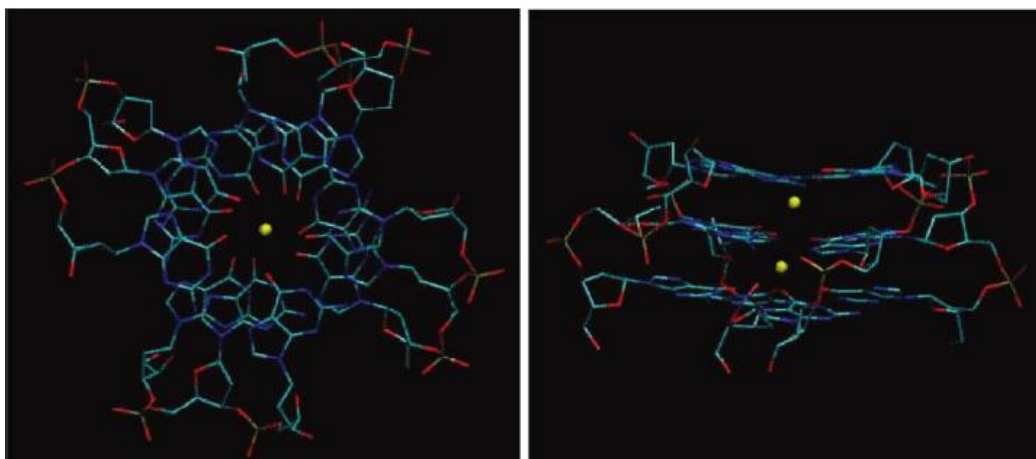


G-quadruplexes en présence d'une forte concentration de cations et former des phases colonnaires (Figure I-2d).<sup>5</sup>



*Figure I-2. Représentation schématique de structures G-quadruplexes formées (a) par le repliement d'un brin d'ADN, (b) par l'association de quatre brins, (c) par l'association de deux brins et (d) par l'empilement de guanosines monomériques en phase colonnaire.*

Même si les briques élémentaires des structures quadruplexes sont les G-quartets, leur agencement est très variable et est à l'origine d'un grand polymorphisme. La morphologie des G-quadruplexes est sensible à la séquence de l'ADN ainsi qu'à différents facteurs environnementaux, tels que la nature et la concentration des cations présents et la phase (liquide vs. cristalline).<sup>6</sup> Par exemple, il est bien établi que les G-quadruplexes formés avec du potassium ( $K^+$ ) sont plus stables que ceux formés avec du sodium ( $Na^+$ ) (Figure I-3). En revanche, la formation de G-quadruplexes est peu favorable en présence de lithium ( $Li^+$ ).<sup>6-8</sup> La formation des G-quadruplexes résulte de la compétition entre les interactions électrostatiques des cations avec l'ADN et le processus de déshydratation des cations. C'est la différence énergétique entre ces deux processus qui détermine la stabilité des G-quadruplexes. Il a été mis en évidence que la sélectivité particulière des quadruplexes vis-à-vis du potassium en comparaison du sodium provient essentiellement de l'énergie de déshydratation plus faible des cations  $K^+$ , l'énergie d'interaction électrostatique de la structure quadruplexe avec ces deux cations étant quant à elle identique.<sup>9-10</sup> En présence de  $Li^+$ , la formation des quadruplexes n'a pas lieu car l'énergie libérée par l'attraction électrostatique n'est pas suffisante pour compenser l'énergie de déshydratation de ces cations de petite taille qui est très élevée. Notons, que la nature des cations influence également la cinétique de formation des G-quadruplexes.<sup>2</sup> Les quadruplexes constitués de quatre brins se forment plus rapidement en présence de  $K^+$  qu'en présence de  $Na^+$ .<sup>8</sup>



**Figure I-3.** Simulation d'une structure G-quadruplexe formée par quatre brins GGG en présence de cations  $\text{Na}^+$  représentés en jaune : vue du dessus (à gauche) et vue de côté (à droite).<sup>11</sup>

Les études des G-quadruplexes se sont beaucoup développées, après l'identification de séquences riches en guanine dans de nombreuses régions (>40%) du génome humain capables d'adopter des structures G-quadruplexes *in vitro*.<sup>12</sup> Il y a maintenant un ensemble d'observations expérimentales qui atteste de l'existence des structures G-quadruplexes *in vivo*.<sup>13-14</sup> Parmi les séquences d'ADN humain riche en guanine, les télomères, localisés à l'extrémité des chromosomes, constituent des cibles potentielles pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses.<sup>13, 15</sup> Il est bien établi notamment, que l'interaction de petites molécules organiques ou inorganiques (ligands) avec l'ADN télomérique, sous sa conformation G-quadruplexe, permet de stabiliser thermodynamiquement l'édifice supramoléculaire. Cette interaction est capable d'inhiber les fonctions de la télomérase responsable de la maintenance des télomères et de la prolifération des cellules tumorales.<sup>16</sup> Aussi, la conception de ligands capables d'interagir spécifiquement avec l'ADN G-quadruplexe représente une stratégie prometteuse pour l'élaboration de nouveaux traitements anti-cancéreux et fait l'objet d'un intérêt particulier depuis ces dix dernières années.<sup>17-18</sup>

Enfin, en plus de leur intérêt biologique, les nano-structures auto-assemblées de type G-quadruplexes sont considérées comme étant prometteuses pour des applications dans le domaine de l'électronique moléculaire et l'optoélectronique.<sup>19</sup> Ces aspects ont été discutés au sein de l'Action COST MP0804 (2009-2012) intitulée « Self-assembled guanosine structures for molecular electronic devices » à laquelle j'ai participé.

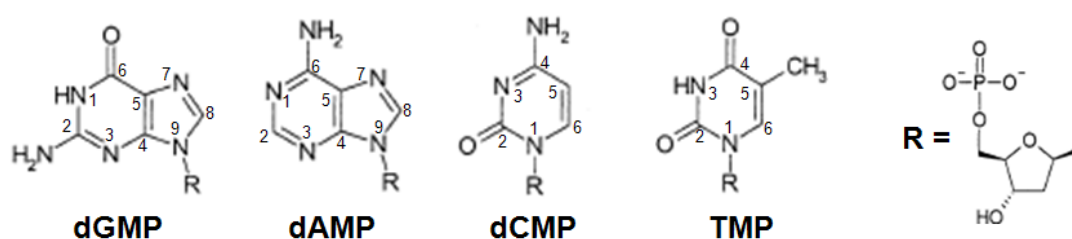
## 2 Etats excités de l'ADN

Depuis le début de 21<sup>ème</sup> siècle, les états excités de l'ADN et de ses composants font l'objet d'un grand nombre d'articles (pour revues *cf.* ref. 20-22). L'une des principales motivations de ces études, est de comprendre les processus primaires à l'origine de la formation des dommages de l'ADN induits par l'absorption d'un photon UV et susceptibles de conduire à l'apparition des mutations cancérigènes. Afin d'approcher les états excités de l'ADN, un certain nombre d'études expérimentales a été réalisé sur les bases de l'ADN isolées en phase gazeuse, afin d'observer leur propriétés photophysiques intrinsèques et de les comparer directement aux prédictions des calculs de chimie quantique.<sup>23</sup> En solution, de nombreux travaux expérimentaux ont été réalisés sur des systèmes de complexité croissante, allant des bases monomériques de l'ADN jusqu'à l'ADN naturel.<sup>20-22</sup> Ces travaux mettent en évidence l'influence de l'environnement sur la dynamique des états excités des constituants de l'ADN. Par exemple, les effets d'empilement (« base stacking ») et d'appariement des bases (« base pairing ») dans les doubles hélices d'ADN ou encore les liaisons hydrogène entre les bases d'ADN et le solvant sont des paramètres susceptibles de modifier les surfaces de potentiel des états excités et leur dynamique.<sup>20-23</sup>

Les études en solution de l'ADN multimères et ses composants monomériques mettent en œuvre principalement deux techniques de spectroscopie résolue en temps femtoseconde, qui sont l'absorption transitoire<sup>20, 24-30</sup> et la fluorescence résolue en temps par conversion de fréquence (up-conversion)<sup>21-22, 31-32</sup> ou « Kerr gate ».<sup>27-29</sup> Le groupe BME (Biomolécules Excitées), dans lequel j'ai effectué ma thèse, utilise principalement la fluorescence par conversion de fréquence et le comptage de photons uniques pour sonder les états excités de l'ADN, sur une gamme temporelle s'étalant d'une centaine de femtosecondes à une centaine de nanosecondes.<sup>21, 33-35</sup> Les mesures de fluorescence résolue en temps requièrent, en général, des fluences d'excitation beaucoup moins élevées que l'absorption transitoire et par conséquent génèrent moins de dommages dans les échantillons d'ADN.

## 2.1 Etats excités des constituants monomériques de l'ADN en solution aqueuse

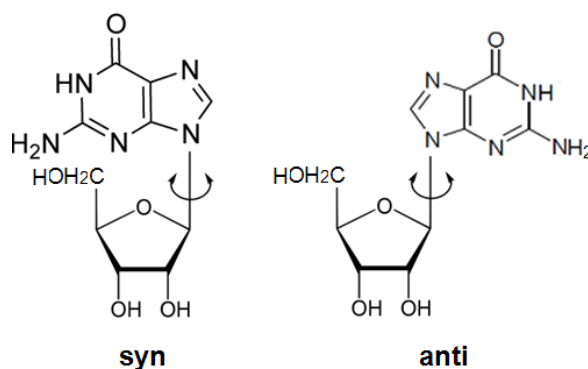
Les mononucléotides sont les chromophores monomériques de l'ADN (cf. Figure I-4). Ils se composent de trois parties : une base (guanine, adénine, cytosine ou thymine), un groupement sucre constitué d'un cycle à 5 atomes (4 atomes de carbone et 1 atome d'oxygène) et un groupement phosphate ( $\text{PO}_4^-$ ). Le sucre peut adopter différentes conformations. Dans les structures G-quadruplexes, les sucres des guanosines adoptent généralement une conformation  $\text{C2}'\text{-endo}$ . On observe également deux orientations possibles *syn* et *anti* de la base par rapport au sucre, selon l'axe défini par la liaison glycosidique. Dans la conformation *syn*, la base azotée et le sucre pointent du même côté tandis que dans la conformation *anti* la bases et le sucre ont des directions opposées (Figure I-5).



**Figure I-4.** Composants monomériques de l'ADN : les mononucléotides (*dGMP* : 2'déoxyguanosine 5'monophosphate ; *dAMP* : 2'déoxyadenosine 5'monophosphate ; *dCMP* : 2'déoxycytidine 5'monophosphate ; *TMP* : thymidine 5'monophosphate)

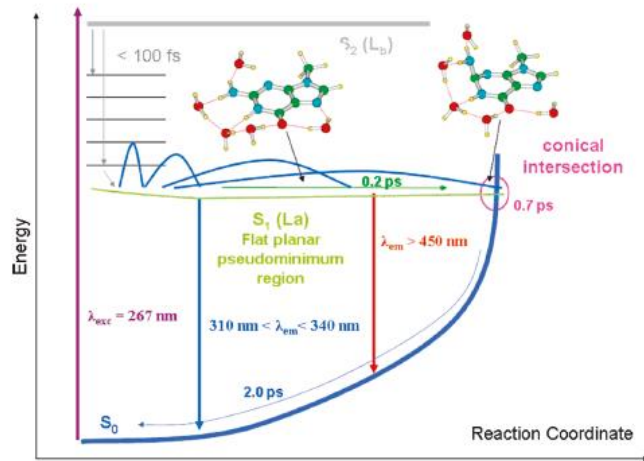
En solution, la durée de vie moyenne des états excités  $\pi\pi^*$  des nucléotides est très courte ( $<1$  ps) et leur rendement quantique de fluorescence extrêmement faible (de l'ordre de  $10^{-4}$ ).<sup>32, 36-43</sup> L'absorption et l'émission des photons des constituants monomériques de l'ADN impliquent des transitions  $^1\pi\pi^*$  dont les forces d'oscillateur sont élevées. Leur désactivation ultrarapide est attribuée à l'existence de voies de relaxation non-radiative très efficaces impliquant une intersection conique couplant l'état excité émissif  $^1\pi\pi^*$  à l'état fondamental ( $\text{S}_0$ ). La présence de cette intersection conique est associée à un mouvement intrachromophore à l'état excité.<sup>22-23, 25</sup> Dans le cas des purines, comme *dGMP* et *dAMP*, il s'agit d'un mouvement de basculement hors du plan aromatique du groupe  $\text{NH}_2$  en position 2, tandis que dans les pyrimidines

comme dTMP et dCMP, il s'agit d'un mouvement de basculement hors du plan du substituant en position C5.



*Figure I-5. Guanosine en conformation syn et anti.*

Dans le cas de pyrimidines, les études expérimentales et théoriques mettent en évidence l'existence d'une deuxième voie de désactivation non-radiative de la population excitée impliquant le couplage de l'état émissif  $^1\pi\pi^*$  à un état excité non-émissif de type  $n\pi^*$ .<sup>44-45</sup> Cette voie supplémentaire de désactivation n'est pas observée dans le cas des purines en solution.<sup>20, 40, 46</sup> Parmi elles, dGMP qui est la principale composante des structures G-quadruplexes a fait l'objet de deux études récentes, par absorption transitoire et fluorescence femtosecondes.<sup>40, 46</sup> Contrairement à ce qui est observé pour les autres mononucléotides, les déclin de fluorescence de dGMP dépendent fortement de la longueur d'onde d'émission. Cette dépendance a été attribuée à une surface de potentiel très plate de l'état excité émissif, le long de la coordonnée de réaction (*i.e.* le mouvement du groupe  $\text{NH}_2$  en position 2). La figure I-6 ci-dessous représente le modèle proposé pour la désactivation des états excités de dGMP dans l'eau, d'après les références 40, 46. Après l'absorption d'un photon, la population excitée diffuse en s'étalant progressivement sur la surface de potentiel de l'état excité, avant d'atteindre l'intersection conique provoquant ainsi un élargissement du spectre de fluorescence au cours du temps.<sup>46</sup> La conversion interne ultrarapide de l'état excité vers l'état fondamental a lieu *via* le franchissement de l'intersection conique. L'état fondamental ainsi généré (« état chaud ») possède un excès d'énergie vibrationnelle qui se dissipe vers le solvant en 2 ps.<sup>40</sup>



**Figure I-6.** Modèle proposé pour la désactivation des états excités de dGMP dans l'eau, d'après les références 22, 40

## 2.2 Etats excités des simples brins et double hélices d'ADN

La conversion interne ultra-rapide  $S_1$ - $S_0$  des constituants monomériques de l'ADN est souvent avancée comme l'un des principaux mécanismes de protection contre les radiations UV de l'ADN. Toutefois, de nombreuses études expérimentales montrent que le comportement des états excités des multimères d'ADN diffère des monomères libres en solution<sup>20-21, 31</sup> et ont des durées de vie de fluorescence beaucoup plus longues s'étalant sur plusieurs échelles de temps, des femtosecondes aux nanosecondes.<sup>21, 33-35,</sup>

47

En premier lieu, l'allongement de la durée de vie de fluorescence de l'ADN multimère pourrait s'expliquer simplement par la proximité des bases empêchant leur mouvement de déformation à l'origine de leur conversion interne ultrarapide. Cependant, malgré leurs durées de vie de fluorescence beaucoup plus longues, les multimères d'ADN ne sont pas beaucoup plus fluorescents que les monomères qui le constituent, leurs rendements quantiques de fluorescence étant du même ordre de grandeur ( $10^{-4}$ ).<sup>\*</sup> Aussi, c'est la contribution d'états excités de nature différente des

\* La durée de vie de fluorescence des molécules est proportionnelle à leur rendement quantique de fluorescence :

$$\tau_{\text{Fluo}} = \tau_{\text{rad}} \times \Phi_{\text{Fluo}}$$

avec  $\tau_{\text{Fluo}}$  la durée de vie de fluorescence,  $\tau_{\text{Rad}}$  la durée de vie radiative et  $\phi_{\text{Fluo}}$  le rendement quantique de fluorescence.

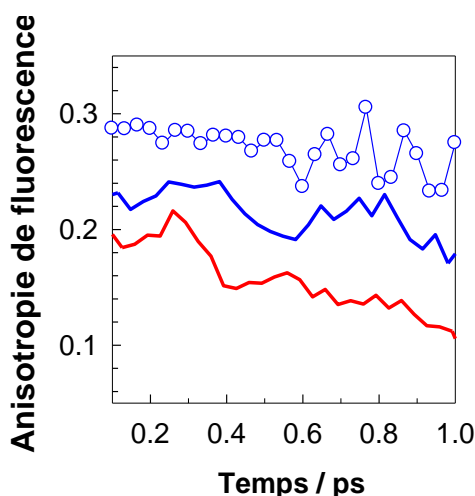
monomères, avec des forces d'oscillateurs beaucoup plus faibles (transitions peu permises), qui est généralement avancée pour expliquer le comportement de l'ADN multimère. La nature et la formation de ces états à longue durée de vie n'est cependant pas consensuelle et fait l'objet de nombreuses discussions dans la littérature (pour revues *cf.* ref. 20-21, 33). Ci-dessous, nous donnons un bref aperçu des différentes interprétations récemment proposées.

### 2.3 Etats excités $\pi\pi^*$ délocalisés

Dans l'ADN multimère, la proximité des bases peut induire des couplages électroniques. Plusieurs études théoriques ont montré que les interactions dipolaires et le recouvrement orbitalaire des bases dans l'ADN double-brin peuvent être à l'origine d'une délocalisation de l'excitation sur plusieurs bases (excitons).<sup>33, 48-50</sup> Notamment, les calculs qui prennent en compte les interactions dipolaires entre les bases ont montré que, dans les structures doubles brins de séquences  $(dGdC)_n \cdot (dGdC)_n$ ,  $(dA)_n \cdot (dT)_n$  ou  $(dAdT)_n \cdot (dAdT)_n$ , la force d'oscillateur n'est portée que par quelques états, ceux les plus hauts en énergie, tandis que les autres ont des forces d'oscillateurs quasi-nulle associées à des durées de vie radiative très longues.<sup>49-51</sup> Il est important de souligner que chaque état excitonique possède ses propres caractéristiques (énergie, polarisation). Leurs durées de vie peuvent en principe s'étaler sur une large gamme temporelle.

Par ailleurs, il est connu que l'existence d'états délocalisés peut induire des transferts ultrarapides de l'énergie d'excitation.<sup>52</sup> Ces transferts ont été mis en évidence, dans l'ADN simple et double brin, par des mesures d'anisotropie de fluorescence à l'échelle femtoseconde.<sup>21, 53-56</sup> Ces transferts d'énergie ultrarapides (<100 fs), qui n'ont pas lieu dans les monomères libres, sont dus à la conversion interne très rapide entre les états excitoniques. Ils sont à l'origine d'une diminution de l'anisotropie de fluorescence de l'ADN multimère en comparaison de celle d'un mélange stœchiométrique de monomères (*cf.* Figure I-7). Notons qu'un transfert

d'énergie entre les bases de l'ADN selon un mécanisme de Förster est très improbable du fait du très faible recouvrement de leurs spectres de fluorescence et d'absorption.



**Figure I-7.** Anisotropie de fluorescence de  $(dA)_{20}$  à 310 nm (trait bleu) et 330 nm (trait rouge) et dAMP à 330 nm (points bleus) après excitation à 267 nm.<sup>56</sup>

Le couplage électronique des bases de l'ADN à l'origine de la délocalisation de l'énergie d'excitation dépend fortement de la géométrie du système.<sup>49</sup> Non seulement la structure de l'ADN, mais aussi leurs fluctuations dynamiques, sont des paramètres susceptibles d'affecter les propriétés des états excitoniques. Par exemple, les calculs de dynamique moléculaire réalisés sur les séquences doubles-brins  $(dA)_{12} \cdot (dT)_{12}$  et  $(dAdT)_6 \cdot (dAdT)_6$  ont mis en évidence des fluctuations thermiques assez significatives, à température ambiante, à l'échelle d'une dizaine de picosecondes, comme le mouvement de rotation de  $\pm 10^\circ$  entre deux paires bases consécutives autour de l'axe hélicoïdal.<sup>49</sup> Du fait de la grande diversité de structures de l'ADN et de leur flexibilité spécifique, le transfert de l'énergie d'excitation au sein des multimères s'avère donc difficilement prévisible.<sup>31</sup> Aussi, l'étendue spatiale et la persistance des états excitoniques de l'ADN sont l'objet d'une controverse.<sup>33, 57-59</sup> Par exemple, l'allongement de la vie des états excités des simples brins d'adénines  $(dA)_n$  et des doubles hélices  $(dAdT)_n \cdot (dAdT)_n$ , a été attribuée à l'émission d'états délocalisés sur plusieurs paires de bases par les groupes de Markovitsi et Fiebig.<sup>26, 33, 56</sup> Au contraire, une relocalisation rapide de l'énergie d'excitation sur deux bases, en 1 ps, a récemment été proposée par le groupe de Kohler pour les simple-brins  $d(A)_n$  ( $n=2-18$ ).<sup>59</sup> Par



ailleurs, le groupe de Phillips invoque une relocalisation de l'énergie d'excitation encore plus rapide (en moins de 50 fs), dans la séquence double-brin (dAdT)<sub>10</sub>•(dAdT)<sub>10</sub> et attribue l'absorption des états excités  $\pi\pi^*$  à des états localisés sur une base de l'ADN.<sup>28</sup>

## 2.4 Etats excités à transfert de charge

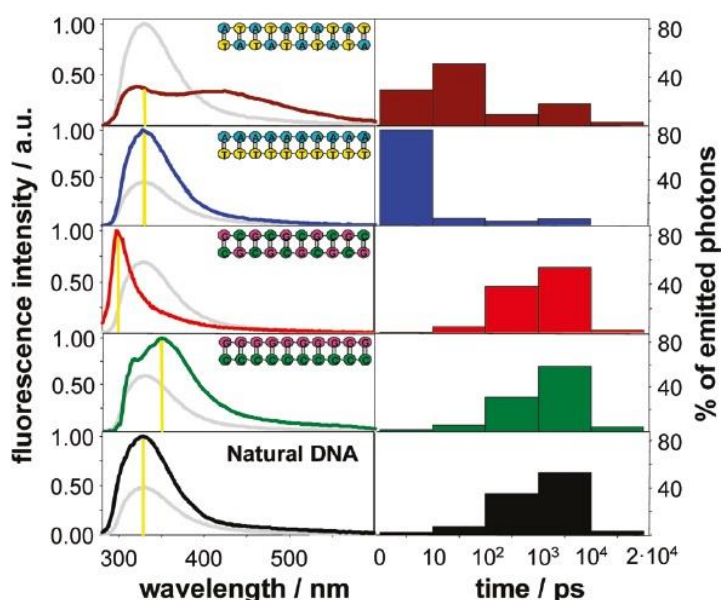
Les modèles théoriques qui ne prennent en compte que les interactions électrostatiques (dipôle-dipôle) ne permettent pas de reproduire l'hypochromisme des spectres d'absorption de l'ADN multimère qui est observé expérimentalement.<sup>49, 51, 60</sup> Les interactions de résonance ou de transfert de charge contribuent aussi à la délocalisation de l'énergie d'excitation et peuvent également modifier la force d'oscillateur des états excités.<sup>61-62</sup> En parallèle de la formation d'excimères ou d'exciplexes, la formation d'états excités à caractère de transfert de charge est un processus souvent invoqué pour expliquer l'allongement de la durée de vie des multimères d'ADN. Ces états se caractérisent par de faibles forces d'oscillateur et des durées de vie radiatives très longues.

L'interprétation d'un certain nombre de travaux expérimentaux récents avance l'hypothèse d'un piégeage très rapide des états excitoniques  $\pi\pi^*$  par des états excités à caractère de transfert de charge proches énergétiquement.<sup>47, 55-56, 58, 63</sup> Plusieurs études théoriques mettent également en évidence la possibilité d'un transfert efficace et rapide des états excitoniques vers des états à caractère de transfert de charge dans différentes séquences d'ADN.<sup>64-65</sup>

## 2.5 Excimères et exciplexes

Nous avons vu précédemment que la diversité des structures de l'ADN et leur flexibilité particulière sont des paramètres susceptibles d'influencer le comportement collectif des multimères d'ADN.<sup>31, 33</sup> La figure I-8 montre un exemple de la diversité des spectres de fluorescence et des pourcentages de photons émis par décade de temps observée dans différentes séquences d'ADN double brin. On peut voir notamment que

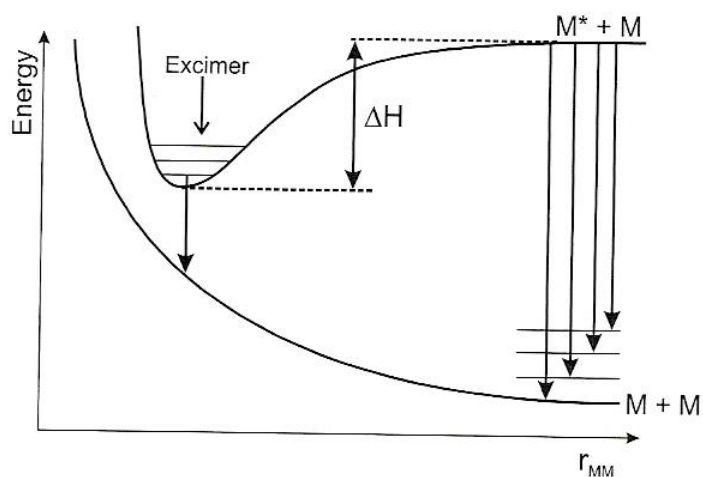
le spectre de fluorescence stationnaire des duplexes poly(dAdT)•poly(dAdT) présente clairement deux bandes de fluorescence, l'une centrée autour de 310 nm, et l'autre autour de 430 nm. La bande bleue est associée à l'émission des états  $\pi\pi^*$ , tandis que la bande la plus rouge est attribuée à la formation d'exciplexes entre deux bases d'un même brin consécutive au piégeage des états  $\pi\pi^*$  émissifs (localisés ou délocalisés).<sup>28, 66</sup> La formation d'excimères a également été proposée dans le cas des simples brins d'adénine dont les spectres de fluorescence stationnaire présentent un épaulement vers 420 nm.<sup>56</sup>



**Figure I-8.** Spectres de fluorescence stationnaire (à gauche) et distribution des photons émis par décade de temps des doubles hélices modèles au maximum de leur fluorescence : poly(dAdT)•poly(dAdT), poly(dA)•poly(dT), poly(dGdC)•poly(dGdC), poly(dG)•poly(dC) et l'ADN naturel purifié de thymus de veau d'après. Pour comparaison, le spectre de fluorescence de TMP dans l'eau est représenté en gris ( $\phi_f = 1.54 \cdot 10^{-4}$ ).<sup>21</sup> L'aire des spectres de fluorescence est proportionnelle aux rendements quantiques de fluorescence. Le trait jaune indique la longueur d'onde de fluorescence des hélices modèles.

Les termes d'excimères/excipleux dans l'ADN ont été introduits dès les années 1960 pour expliquer la fluorescence rouge de l'ADN naturel à basse température.<sup>67</sup> Depuis, ils sont très souvent utilisés pour décrire les états excités de longue durée de vie de l'ADN.<sup>68</sup> Dans l'ADN les notions d'excimères ou d'excipleux diffèrent cependant de leur définition originelle [cf. Référence 68]. Formellement, les excimères (« **excited**

**dimers** ») et les exciplexes (« **excited complexes** ») sont des complexes à l'état excité entre deux molécules distinctes, l'une à l'état fondamental et l'autre à l'état excité (Figure I-9). Ils se caractérisent par l'émission d'une fluorescence bien plus rouge que celle des monomères qui les constituent. Ils se forment essentiellement par collision à partir d'états singlets excités. Leur formation est en principe limitée par la diffusion. Plus particulièrement, la formation d'exciplexes résulte d'interactions de type transfert de charge. Ils peuvent se désactiver de manière non-radiative pour former une paire d'ions à l'état fondamental.<sup>69</sup>



**Figure I-9.** Courbes d'énergie potentielle d'un excimère.<sup>69</sup>

La formation d'excimères/exciplexes dans l'ADN résulte de l'interaction des bases d'un même brin. Bien que, dans l'ADN, l'amplitude des mouvements des bases soit restreinte, l'observation d'une bande de fluorescence rouge, dans la région spectrale autour de 400-450 nm, a été corrélée au désordre conformationnel des séquences.<sup>66</sup> Notons, cependant que la formation d'exciplexes dans l'ADN naturel est aujourd'hui remise en cause par des mesures de fluorescence récentes à température ambiante qui montrent l'absence de la fluorescence rouge initialement observée à basse température.<sup>21</sup> Bien que l'ADN naturel ait une durée de vie de fluorescence bien plus longue que celle des monomères qui le constitue, l'allure du spectre de fluorescence stationnaire de l'ADN naturel reste comparable à celui des monomères (*cf.* Figure I-8).<sup>47</sup>

### 3 Propriétés photophysiques des structures G-quadruplexes de l'ADN

Alors que les propriétés structurales et la formation des structures G-quadruplexes de l'ADN ont fait l'objet d'un grand nombre de publications (pour revues *cf.* ref. 3, 70-71), leurs propriétés photophysiques ont été discutées seulement dans une douzaine articles. Typiquement, les techniques utilisées pour l'étude des propriétés photophysiques des G-quadruplexes sont la spectroscopie d'absorption et de fluorescence stationnaire ainsi que le dichroïsme circulaire (CD).<sup>72-73</sup> On note aussi quelques études par spectroscopie de fluorescence résolue en temps<sup>11, 74-77</sup> et une étude par spectroscopie d'absorption transitoire par la méthode pompe UV-sonde infrarouge (TRIR) avec une résolution temporelle sub-picoseconde.<sup>78</sup>

La spectroscopie d'absorption stationnaire est couramment utilisée pour suivre le processus de formation des structures G-quadruplexes de l'ADN. La formation des quadruplexes se traduit par un hypochromisme du spectre d'absorption autour de 260 nm et un hyperchromisme autour de 295 nm.<sup>72</sup> Si l'hypochromisme autour de 260 nm est aussi observé dans le cas de la formation des duplexes de l'ADN, l'hyperchromisme autour de 295 nm est, en revanche, caractéristique de la formation des structures G-quadruplexes. Comme dans l'ADN duplexe, ces changements spectraux ont été rationalisés au moyen de calculs combinant la dynamique moléculaire et la théorie excitonique (interactions dipolaires) sur une structure G-quadruplexe constituée de trois tétrades de guanines.<sup>11</sup> Ces calculs ont mis en évidence que l'absorption des photons par les quadruplexes est délocalisée sur plusieurs bases avec un degré de délocalisation moyen significativement plus élevé que dans les doubles hélices (~57% *vs.* ~37%).

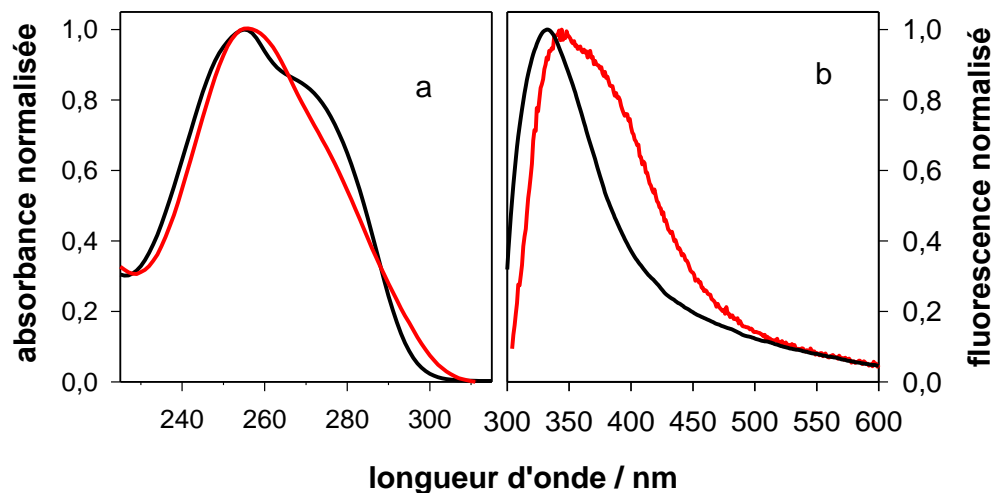
La spectroscopie CD stationnaire est également largement utilisée pour la caractérisation de la structure tridimensionnelle des G-quadruplexes.<sup>73</sup> Notons toutefois que, dans la plupart des études, l'interprétation des spectres CD est purement empirique et se fait par comparaison avec les spectres CD de structures

G-quadruplexes préalablement identifiées. Il a été observé que l'allure des spectres CD dépend sensiblement de la topologie des G-quadruplexes.<sup>79</sup> Récemment, ces modifications spectrales ont été rationalisées en termes de couplage électrostatique des moments dipolaires électroniques associés aux différents chromophores constituant l'édifice moléculaire (théorie excitonique). Ce couplage, qui dépend sensiblement de la position relative des différentes bases, détermine l'intensité et la position des bandes CD.<sup>73, 79-80</sup>

Les propriétés de fluorescence intrinsèque de l'ADN multimère peuvent être aussi utilisées pour sonder la formation des structures G-quadruplexes. Typiquement, leur formation se traduit par une augmentation de l'intensité et une déformation du spectre de fluorescence stationnaire des bases de l'ADN.<sup>77, 81</sup> Par ailleurs, les propriétés de fluorescence de guanines modifiées incorporées dans des séquences télomériques humaines sont également utilisées pour sonder la formation de structures G-quadruplexes par le groupe de Luedtke.<sup>82-84</sup>

Avant le commencement de ma thèse, l'étude des propriétés de fluorescence des structures G-quadruplexes à l'aide d'une combinaison de spectroscopies de fluorescence stationnaire et résolue en temps a fait l'objet de trois articles du groupe BME et de la thèse de F.A. Miannay.<sup>11, 74-75, 85</sup> Ces études mettent en évidence que l'effet coopératif des bases dans les structures G-quadruplexes formées par l'association de quatre brins de séquence d(GGG) ou d(TG<sub>4</sub>T) induit (Figure I-10) :

- une augmentation significative du rendement quantique de fluorescence.
- un allongement de la durée de vie de fluorescence.
- une diminution de l'anisotropie de fluorescence sur une échelle de temps sub-picoseconde, en comparaison du mélange stœchiométrique des bases en solution. Comme dans l'ADN duplexe, cette diminution de l'anisotropie a été attribuée à un transfert d'énergie ultra-rapide entre les bases des structures G-quadruplexes.<sup>75</sup>



**Figure I-10.** (a) Spectre d'absorption normalisés et (b) spectre de fluorescence normalisé de G-quadruplexe  $d(TG_4T)_4$  en présence de  $Na^+$  (rouge) et du mélange stœchiométrique des bases (noir).

Un rallongement de la durée de vie des états excités des G-quadruplexes formés par le repliement d'un simple brin d'ADN par rapport au dGMP a été également observé au moyen d'une expérience de TRIR avec une résolution sub-picoseconde, pour la séquence télomérique  $dAGGG(TTAGGG)_3$  et poly(dG) en présence de  $K^+$ .<sup>78</sup> De même, le groupe d'Huppert rapporte un rallongement significatif de la durée de vie de fluorescence à basse température de nano-fils de guanines (G4-wires) constitués de plusieurs centaines de tétrades de guanines, en comparaison de celle de dGMP (2'déoxyguanosine 5'monophosphate), au moyen d'une étude de comptage de photons uniques corrélés en temps.<sup>76</sup> A température ambiante, le groupe BME a mis en évidence que l'effet collectif des bases de guanine est beaucoup plus important dans ces nano-fils que dans les structures quadruplexes 4-brins de séquence  $d(TG_4T)$ .<sup>11</sup>

## 4 Objectifs

Les études des propriétés photophysiques des G-quadruplexes menées jusqu'à présent ne donnent qu'une vision parcellaire des mécanismes de relaxation de leurs états excités. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons donc choisi d'approfondir l'étude de certains effets.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la durée de vie de fluorescence de nano-fils moléculaires constitués d'un millier de quartets est bien plus longue que celle de  $d(TG_4T)_4$  comprenant seulement quatre quartets.<sup>11</sup> L'origine de cette différence n'est toutefois pas nécessairement la taille du système.<sup>76</sup> En effet, les nano-fils sont formés par le repliement d'un seul brin de poly(dG) alors que les structures  $d(TG_4T)_4$  sont formées par quatre brins parallèles.<sup>11, 75, 86</sup> De ce fait, l'orientation des quartets qui est déterminée par les conformations des groupements glycosidiques, n'est pas la même pour les deux systèmes.<sup>76, 87</sup> Une telle différence structurale peut induire des modifications dans le couplage électronique entre les guanines situées dans des plans différents.<sup>33, 48-50</sup> Par conséquent, les propriétés des états collectifs impliquant des guanines dans des plans différents peuvent changer. Afin d'étudier l'effet de taille en s'affranchissant de l'effet de la conformation, nous avons choisi de comparer les propriétés de fluorescence de structures quadruplexes parallèles comprenant trois, quatre ou cinq quartets. Celles-ci sont formées par l'association de quatre simples brins de séquence  $d(TG_nT)$  ( $n=3, 4, 5$ ) et ont été étudiées en présence de  $K^+$ .

Le deuxième point sur lequel nous nous sommes focalisés, qui n'avait pas été abordé dans les études antérieures du groupe, est l'effet du cation situé dans la cavité des G-quadruplexes. Nous avons donc comparé les propriétés photophysiques des structures G-quadruplexes  $d(TG_4T)_4$  en présence de  $K^+$  et de  $Na^+$ , notées  $d(TG_4T)_4/K^+$  et  $d(TG_4T)_4/Na^+$ , respectivement. Le système  $d(TG_4T)_4/Na^+$ , ayant déjà fait l'objet d'une étude dans la gamme femto-picoseconde,<sup>75, 85</sup> nous avons complété leur étude en sondant leur fluorescence sur une gamme temporelle plus longue jusqu'à 10 ns.

Enfin, nous avons mené la première étude spectroscopique résolue en temps sur des quadruplexes formés à partir d'une séquence télomérique humaine,

d(GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG), que nous appelons « Tel21 ». Celle-ci a été examinée aussi bien en présence de  $K^+$  qu'en présence de  $Na^+$ .

Pour mener à bien notre travail nous avons utilisé la spectroscopie d'absorption et de fluorescence en régime stationnaire, et deux techniques de fluorescence résolue en temps qui sont (i) la génération de somme de fréquences (« up-conversion ») et (ii) le comptage de photons uniques corrélés en temps. La première, permet de détecter la fluorescence associée à des transitions permises, avec une résolution temporelle de 300 fs. La deuxième permet de détecter aussi bien les photons par des transitions fortement permises que faiblement permises, avec une résolution de quelques dizaines de picosecondes. Nous avons mesuré les déclinés de fluorescence, qui nous donnent des informations sur la dynamique des états excités. Nous avons également mesuré l'évolution au cours du temps du facteur d'anisotropie de fluorescence, qui nous renseigne sur la polarisation des transitions électroniques.



## REFERENCES

1. Parkinson, G. N., Fundamentals of Quadruplex Structures. In *Quadruplex Nucleic Acids*, Neidle, S.; Balasubramanian, S., Eds. The Royal Society of Chemistry: **2006**; 1-30.
2. Mergny, J.-L.; Gros, J.; De Cian, A.; Bourdoncle, A.; Rosu, F.; Sacca, B.; Guittat, L.; Amrane, S.; Mills, M.; Alberti, P.; Takasugi, M.; Lacroix, L., Energetics, Kinetics and Dynamics of Quadruplex Folding. In *Quadruplex Nucleic Acids*, Neidle, S.; Balasubramanian, S., Eds. The Royal Society of Chemistry: **2006**; 31-80.
3. Dai, J.; Carver, M.; Yang, D., Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie* **2008**, *90*, 1172-1183.
4. Zhou, J.; Bourdoncle, A.; Rosu, F.; Gabelica, V.; Mergny, J. L., Tri-G-Quadruplex: Controlled Assembly of a G-Quadruplex Structure from Three G-Rich Strands. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11002-11005.
5. Mariani, P.; Spinozzi, F.; Federiconi, F.; Amenitsch, H.; Spindler, L.; Drevensek-Olenik, I., Small angle X-ray scattering analysis of deoxyguanosine 5'-monophosphate self-assembling in solution: nucleation and growth of G-quadruplexes. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 7934-7944.
6. Hud, N. V.; Plavec, J., The Role of Cations in Determining Quadruplex Structure and Stability. In *Quadruplex Nucleic Acids*, Neidle, S.; Balasubramanian, S., Eds. The Royal Society of Chemistry: **2006**; 100-130.
7. Lane, A. N.; Chaires, J. B.; Gray, R. D.; Trent, J. O., Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5482-5515.
8. Mergny, J. L.; De Cian, A.; Ghelab, A.; Sacca, B.; Lacroix, L., Kinetics of tetramolecular quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 81-94.
9. Hud, N. V.; Smith, F. W.; Anet, F. A. L.; Feigon, J., The selectivity for K<sup>+</sup> versus Na<sup>+</sup> in DNA quadruplexes is dominated by relative free energies of hydration: A thermodynamic analysis by H-1 NMR. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15383-15390.
10. Gu, J. D.; Leszczynski, J., Origin of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> selectivity of the guanine tetraplexes in water: The theoretical rationale. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 529-532.
11. Changenet-Barret, P.; Emanuele, E.; Gustavsson, T.; Improta, R.; Kotlyar, A. B.; Markovitsi, D.; Vaya, I.; Zakrzewska, K.; Zikich, D., Optical properties of guanine nanowires: experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 14339-14346.
12. Qin, Y.; Hurley, L. H., Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions. *Biochimie* **2008**, *90*, 1149-1171.

13. Biffi, G.; Tannahill, D.; McCafferty, J.; Balasubramanian, S., Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. *Nat. Chem.* **2013**.
14. Siddiqui-Jain, A.; Hurley, L. H., DNA STRUCTURE Visualizing the quadruplex. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 153-155.
15. De Cian, A.; Lacroix, L.; Douarre, C.; Temime-Smaali, N.; Trentesaux, C.; Riou, J. F.; Mergny, J. L., Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie* **2008**, *90*, 131-155.
16. De Cian, A.; Cristofari, G.; Reichenbach, P.; De Lemos, E.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P.; Shin-Ya, K.; Lacroix, L.; Lingner, J.; Mergny, J. L., Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 17347-17352.
17. Mergny, J. L.; Mailliet, P.; Lavelle, F.; Riou, J. F.; Laoui, A.; Helene, C., The development of telomerase inhibitors: the G-quartet approach. *Anti-Cancer Drug Des.* **1999**, *14*, 327-339.
18. Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P., A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627-636.
19. Davis, J. T., G-quartets 40 years later: From 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 668-698.
20. Kohler, B., Nonradiative decay mechanisms in DNA model systems. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2047-2053.
21. Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Vayá, I., Fluorescence of DNA Duplexes: From Model Helices to Natural DNA. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 3271-3276.
22. Gustavsson, T.; Improta, R.; Markovitsi, D., DNA/RNA: Building Blocks of Life Under UV Irradiation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2025-2030.
23. Kleinermanns, K.; Nachtigallová, D.; de Vries, M., Excited state dynamics of DNA bases. *Int. Rev. Phys. Chem.* **2013**, *32*, 308-342.
24. Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Kohler, B., Molecular spectroscopy: Complexity of excited-state dynamics in DNA - Reply *Nature* **2006**, *441*, E8.
25. Middleton, C. T.; de La Harpe, K.; Su, C.; Law, U. K.; Crespo-Hernández, C. E.; Kohler, B., DNA excited-state dynamics: from single bases to the double helix. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **2009**, *60*, 217-239.
26. Buchvarov, I.; Wang, Q.; Raytchev, M.; Trifonov, A.; Fiebig, T., Electronic energy delocalization and dissipation in single- and double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4794-4797.
27. Kwok, W. M.; Ma, C.; Phillips, D. L., A doorway state leads to photostability or triplet photodamage in thymine DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5131-5139.

28. Kwok, W. M.; Ma, C. S.; Phillips, D. L., "Bright" and "Dark" excited states of an alternating AT oligomer characterized by femtosecond broadband spectroscopy. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 11527-11534.
29. Kwok, W.-M.; Ma, C.; Phillips, D. L., Femtosecond time- and wavelength-resolved fluorescence and absorption study of the excited states of adenosine and an adenine oligomer. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11894-11905.
30. Doorley, G. W.; McGovern, D. A.; George, M. W.; Towrie, M.; Parker, A. W.; Kelly, J. M.; Quinn, S. J., Picosecond transient infrared study of the ultrafast deactivation processes of electronically excited B-DNA and Z-DNA forms of [poly(dG-dC)]<sub>2</sub>. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 123-127.
31. Schwalb, N. K.; Temps, F., Base sequence and higher-order structure induce the complex excited-state dynamics in DNA. *Science* **2008**, *322*, 243-245.
32. Peon, J.; Zewail, A. H., DNA/RNA nucleotides and nucleosides: direct measurement of excited-state lifetimes by femtosecond fluorescence up-conversion. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, *348*, 255-262.
33. Markovitsi, D.; Talbot, F.; Gustavsson, T.; Onidas, D.; Lazzarotto, E.; Marguet, S., Complexity of excited state dynamics in DNA. *Nature* **2006**, *441*, E7.
34. Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Banyasz, A., DNA Fluorescence. In *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology* Griesbeck, A.; Ghetti, F.; Oelgemoeller, M., Eds. Taylor and Francis: Boca Raton, **2010**; in press.
35. Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Talbot, F., Excited states and energy transfer among DNA bases in double helices. *Photochem. & Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 717-724.
36. Onidas, D.; Markovitsi, D.; Marguet, S.; Sharonov, A.; Gustavsson, T., Fluorescence properties of DNA nucleosides and nucleotides: a refined steady-state and femtosecond investigation. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11367-11374.
37. Pecourt, J.-M. L.; Peon, J.; Kohler, B., Ultrafast internal conversion of electronically excited RNA and DNA nucleosides in water. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9348-9349.
38. Gustavsson, T.; Sharonov, A.; Markovitsi, D., Thymine, thymidine and thymidine 5'-monophosphate studied by femtosecond fluorescence upconversion spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *351*, 195-200.
39. Pancur, T.; Schwalb, N. K.; Renth, F.; Temps, F., Femtosecond fluorescence up-conversion spectroscopy of adenine and adenosine: experimental evidence for the ps\* state? *Chem. Phys.* **2005**, *313*, 199-212.
40. Karunakaran, V.; Kleinermanns, K.; Improtta, R.; Kovalenko, S. A., Photoinduced dynamics of guanosine monophosphate in water from broad-band transient absorption spectroscopy and quantum-chemical calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5839-5850.

41. Sharonov, A.; Gustavsson, T.; Carré, V.; Renault, E.; Markovitsi, D., Cytosine excited state dynamics studied by femtosecond absorption and fluorescence spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *380*, 173-180.
42. Blancafort, L.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B.; Robb, M. A., Singlet excited-state dynamics of 5-fluorocytosine and cytosine: an experimental and computational study. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 4431-4436.
43. Gustavsson, T.; Banyasz, A.; Lazzarotto, E.; Markovitsi, D.; Scalmani, G.; Frisch, M. J.; Barone, V.; Improta, R., Singlet excited state behavior of uracil and thymine in aqueous solution: a combined experimental and computational study of 11 uracil derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 607-619.
44. Asturiol, D.; Lasorne, B.; Robb, M. A.; Blancafort, L., Photophysics of the  $\pi,\pi^*$  and  $n,\pi^*$  States of Thymine: MS-CASPT2 Minimum-Energy Paths and CASSCF on-the-Fly Dynamics. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 10211-10218.
45. Hare, P. M.; Crespo-Hernández, C.; Kohler, B., Internal conversion to electronic ground state occurs via two distinct pathways for pyrimidine bases in aqueous solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 435-440.
46. Miannay, F. A.; Gustavsson, T.; Banyasz, A.; Markovitsi, D., Excited state dynamics of deoxy-guanosine monophosphate dGMP measured by steady-state and femtosecond fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 3256-3263.
47. Vayá, I.; Gustavsson, T.; Miannay, F. A.; Douki, T.; Markovitsi, D., Fluorescence of natural DNA: from the femtosecond to the nanosecond time-scales. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11834-11835.
48. Lange, A. W.; Herbert, J. M., Both intra- and interstrand charge-transfer excited states in aqueous B-DNA are present at energies comparable to, or just above, the  $^1\text{pp}^*$  excitonic bright states. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3913-3922.
49. Bouvier, B.; Dognon, J. P.; Lavery, R.; Markovitsi, D.; Millié, P.; Onidas, D.; Zakrzewska, K., Influence of conformational dynamics on the exciton states of DNA oligomers. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 13512-13522.
50. Emanuele, E.; Zakrzewska, K.; Markovitsi, D.; Lavery, R.; Millie, P., Exciton states of dynamic DNA double helices: alternating dCdG sequences. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16109-16118.
51. Bouvier, B.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D.; Millié, P., Dipolar coupling between electronic transitions of the DNA bases and its relevance to exciton states in double helices. *Chem. Phys.* **2002**, *275*, 75-92.
52. Van Amerongen, H.; Valkunas, L.; Van Grondelle, R., *Photosynthetic excitons*. World Scientific: **2000**.
53. Markovitsi, D.; Onidas, D.; Gustavsson, T.; Talbot, F.; Lazzarotto, E., Collective behavior of

- Franck-Condon excited states and energy transfer in DNA double helices. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17130-17131.
54. Miannay, F. A.; Banyasz, A.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D., Ultrafast excited state deactivation and energy transfer in guanine-cytosine DNA double helices *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14574-14575.
  55. Vayá, I.; Gustavsson, T.; Douki, T.; Berlin, Y.; Markovitsi, D., Electronic Excitation Energy Transfer between Nucleobases of Natural DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11366–11368.
  56. Banyasz, A.; Gustavsson, T.; Onidas, D.; Changenet-Barret, P.; Markovitsi, D.; Improta, R., Multi-Pathway Excited State Relaxation of Adenine Oligomers in Aqueous Solution: A Joint Theoretical and Experimental Study. *Chem. Eur. J.* **2013**, 10.1002/chem.201202741.
  57. Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Kohler, B., Base stacking controls excited state dynamics in A-T DNA. *Nature* **2005**, *436*, 1141-1144.
  58. Takaya, T.; Su, C.; de La Harpe, K.; Crespo-Hernandez, C. E.; Kohler, B., UV excitation of single DNA and RNA strands produces high yields of exciplex states between two stacked bases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 10285-10290.
  59. Su, C.; Middleton, C. T.; Kohler, B., Base-Stacking Disorder and Excited-State Dynamics in Single-Stranded Adenine Homo-oligonucleotides. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 10266-10274.
  60. Santoro, F.; Barone, V.; Improta, R., Excited States Decay of the A-T DNA: A PCM/TD-DFT Study in Aqueous Solution of the (9-Methyl-adenine)(2)center dot(1-methyl-thymine)(2) Stacked Tetramer. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15232-15245.
  61. Scholes, G. D., Energy transfer and spectroscopic characterization of multichromophoric assemblies. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18731-18739.
  62. Starikov, E. B., Importance of charge transfer excitations in DNA electron spectrum: a ZINDO semiempirical quantum-chemical study. *Modern Phys. Lett. B* **2004**, *18*, 825-831.
  63. Vayá, I.; Miannay, F. A.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D., High energy long-lived excited states in DNA double strands. *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 987-989.
  64. Improta, R.; Santoro, F.; Barone, V.; Lami, A., Vibronic Model for the Quantum Dynamical Study of the Competition between Bright and Charge-Transfer Excited States in Single-Strand Polynucleotides: The Adenine Dimer Case. *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 15346-15354.
  65. Improta, R.; Barone, V., Interplay between "Neutral" and "Charge-Transfer" Excimers Rules the Excited State Decay in Adenine-Rich Polynucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12016-12019
  66. Onidas, D.; Gustavsson, T.; Lazzarotto, E.; Markovitsi, D., Fluorescence of the DNA double helices (dAdT)<sub>n</sub>. (dAdT)<sub>n</sub> studied by femtosecond spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*,

5143-5148.

67. Eisinger, J.; Gueron, M.; Shulman, R. G.; Yamane, T., Excimer fluorescence of dinucleotides polynucleotides and DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1966**, *55*, 1015-&. pages
68. Crespo-Hernández, C. E.; Cohen, B.; Hare, P. M.; Kohler, B. C. R., Ultrafast excited state dynamics in nucleic acids. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1977-2019.
69. Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH: **2001**.
70. Neidle, S., The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes. *Current Opinion in Structural Biology* **2009**, *19*, 239-250.
71. Burge, S.; Parkinson, G. N.; Hazel, P.; Todd, A. K.; Neidle, S., Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402-5415.
72. Mergny, J. L.; Phan, A. T.; Lacroix, L., Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.* **1998**, *435*, 74-78.
73. Randazzo, A.; Spada, G. P.; da Silva, M. W., Circular dichroism of quadruplex structures. *Top. Curr. Chem.* **2013**, *330*, 67-86.
74. Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Sharonov, A., Cooperative effects in the photophysical properties of self-associated triguanosine diphosphates. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *79*, 526-530.
75. Miannay, F. A.; Banyasz, A.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D., Excited states and energy transfer in G-quadruplexes. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 11760-11765.
76. Gepshtein, R.; Huppert, D.; Lubitz, I.; Amdursky, N.; Kotlyar, A. B., Radiationless transitions of G4 wires and dGMP. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 12249-12258.
77. Dao, N. T.; Haselsberger, R.; Michel-Beyerle, M. E.; Phan, A. T., Following G-quadruplex formation by its intrinsic fluorescence. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 3969-3977.
78. McGovern, D. A.; Quinn, S.; Doorley, G. W.; Whelan, A. M.; Ronayne, K. L.; Towrie, M.; Parker, A. W.; Kelly, J. M., Picosecond infrared probing of the vibrational spectra of transients formed upon UV excitation of stacked G-tetrad structures. *Chem. Comm.* **2007**, 5158-5160.
79. Karsisiotis, A. I.; Hessari, N. M.; Novellino, E.; Spada, G. P.; Randazzo, A.; da Silva, M. W., Topological Characterization of Nucleic Acid G-Quadruplexes by UV Absorption and Circular Dichroism. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10645-10648.
80. Masiero, S.; Trotta, R.; Pieraccini, S.; De Tito, S.; Perone, R.; Randazzo, A.; Spada, G. P., A non-empirical chromophoric interpretation of CD spectra of DNA G-quadruplex structures. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2683-2692.
81. Mendez, M. A.; Szalai, V. A., Fluorescence of Unmodified Oligonucleotides: A Tool to Probe

- G-Quadruplex DNA Structure. *Biopolymers* **2009**, *91*, 841-850.
82. Dumas, A.; Luedtke, N. W., Cation-Mediated Energy Transfer in G-Quadruplexes Revealed by an Internal Fluorescent Probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 18004-18007.
  83. Dumas, A.; Luedtke, N. W., Fluorescence Properties of 8-(2-Pyridyl)guanine "2PyG" as Compared to 2-Aminopurine in DNA. *Chembiochem* **2011**, *12*, 2044-2051.
  84. Vummidi, B. R.; Alzeer, J.; Luedtke, N. W., Fluorescent Probes for G-Quadruplex Structures. *Chembiochem* **2013**, *14*, 540-558.
  85. Miannay, F. A. *Interaction of UV radiation with guanine rich DNA sequences studied by optical spectroscopy* Université Paris Sud N°9709, Orsay, **2009**.
  86. Kotlyar, A. B.; Borovok, N.; Molotsky, T.; Cohen, H.; Shapir, E.; Porath, D., Long, monomolecular guanine-based nanowires. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1901-1905.
  87. Aboul-ela, F.; Murchie, A. I. H.; Lilley, D. M. J., NMR study of parallel-stranded tetraplex formation by dTG<sub>4</sub>T. *Nature* **1992**, *360*, 280-282.

# Chapitre II : Méthodologie

## 1 Produits

### 1.1 Solutions tampons

Pour les expériences de spectroscopie, nous avons utilisé des solutions tampons qui n'absorbent pas dans le domaine de longueurs d'onde compris entre 200 nm et 350 nm et qui n'ont pas de propriétés de fluorescence notables pour des longueurs d'onde d'excitation comprises entre 250 et 300 nm. Typiquement, nous avons utilisé des solutions de tampon phosphate préparées à partir du mélange de l'acide et de la base associée (0,03 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,03 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,48 M NaCl) ou (0,03 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,03 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,48 M KCl). Nous avons également utilisé des solutions tampon Tris-HCl (0,01 M Tris ; 0,57 M KCl). Dans tous les cas, les solutions ont été préparées dans de l'eau ultra-pure délivrée par un système MILLIPORE Milli-Q.

### 1.2 Oligonucléotides

Les oligonucléotides que nous avons utilisés ont été synthétisés et purifiés par la société Eurogentec (Liège, Belgique) et nous ont été fournis sous forme lyophilisée. Pendant ma thèse, j'ai étudié les quatre séquences suivantes :

Séquences 5'→3'	Noms
d( <b>TGGGT</b> )	d(TG <sub>3</sub> T)
d( <b>TGGGGT</b> )	d(TG <sub>4</sub> T)
d( <b>TGGGGGT</b> )	d(TG <sub>5</sub> T)
d( <b>GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG</b> )	Tel21



## 2 Spectroscopie d'absorption stationnaire

### 2.1 Dispositif

Nous avons enregistré les spectres d'absorption à l'aide d'un spectrophotomètre double faisceau (Lambda 900 Perkin-Elmer), équipé d'une lampe au deutérium pour les mesures dans le domaine UV, et d'une lampe halogène pour le visible. Les spectres d'absorption ont été mesurés avec une résolution spectrale de 1 nm.

La mesure des spectres d'absorption repose sur la loi de Beer-Lambert qui permet de relier l'intensité de la lumière transmise par un échantillon aux propriétés du milieu traversé et l'intensité lumineuse incidente. Pour de faibles intensités lumineuses, on a la relation suivante :

$$I = I_0 \exp(-\varepsilon_\lambda l C) \quad (\text{II-1})$$

où  $I_0$  désigne l'intensité de la lumière incidente et  $I$  l'intensité de la lumière transmise par le milieu.  $\varepsilon_\lambda$  est le coefficient d'absorption molaire ( $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) à une longueur d'onde donnée,  $l$  la longueur du trajet optique en cm et  $C$  la concentration de l'échantillon ( $\text{mol.l}^{-1}$ ).

L'absorbance  $A$  (ou densité optique  $DO$ ) de l'échantillon s'exprime de la manière suivante :

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon_\lambda l C \quad (\text{II-2})$$

### 2.2 Coefficient d'absorption molaire de G-quadruplexes

Les coefficients d'absorption molaire des oligonucléotides ne peuvent pas être déterminés de manière classique car ils sont fortement hygroscopiques, ce qui fausse leur pesée. Par contre, le coefficient d'absorption molaire des simples-brins peut être estimé de manière théorique, par la méthode de calcul du plus proche voisin (<http://biophysics.idtdna.com/UVSpectrum.html>).<sup>1</sup> La méthode prend en compte les

interactions entre les bases adjacentes. Le spectre d'absorption est obtenu en sommant les spectres d'absorption des sous-unités constituant une séquence. Par exemple pour un simple brin de séquence d(TG<sub>3</sub>T), il s'agit de la somme des spectres d'absorption de dT terminal, d(TG), d(GG), d(GT) et dT terminal, respectivement. Soulignons que le programme calcule les spectres d'absorption des formes simples-brins dissociées à température ambiante. Les oligonucléotides que nous avons étudiés s'associent à température ambiante, nous avons donc déterminé le spectre des formes dissociées simples-brins à 96°C et approximé leur coefficient d'absorption molaire à celui du spectre calculé à température ambiante.

Pour les G-quadruplexes qui se dissocient en simple-brin à des températures inférieures à 100°C, nous avons déterminé leur coefficient d'absorption molaire en mesurant les spectres d'absorption des solutions de quadruplexes à température ambiante et à 96°C. Ces spectres correspondent respectivement aux formes associées et dissociées de l'ADN. Nous avons ensuite déterminé le coefficient d'absorption molaire des structures G-quadruplexes par comparaison à celui des simples-brins, de la manière suivante :

$$\varepsilon_Q = \frac{A_{Tamb}}{A_{96}} \times \varepsilon_S \quad (\text{II-3})$$

où  $\varepsilon_Q$  et  $\varepsilon_S$  sont les coefficients d'absorption molaire par base des structures G-quadruplexes et des simples-brins d'ADN, respectivement.  $A_{Tamb}$  et  $A_{96}$  sont les absorbances des solutions de quadruplexes à température ambiante et 96 °C, respectivement.

Pour G-quadruplexes qui ne peuvent pas être dissociés à des températures inférieures à 100°C, comme d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> en présence d'ions K<sup>+</sup>, leur coefficient d'absorption molaire a été déterminé de la manière suivante. Tout d'abord, nous avons déterminé le coefficient d'absorption molaire des G-quadruplexes d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> en présence d'ions Na<sup>+</sup>, selon la méthode précédemment décrite. Puis, nous avons ajouté des ions K<sup>+</sup> dans la solution de quadruplexes d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup>. Après un certain temps, les ions Na<sup>+</sup> sont remplacés par les ions K<sup>+</sup> dans les structures quadruplexes.<sup>2-3</sup> Le rapport

des absorbances mesurées avant et après l'addition de  $K^+$  est donc proportionnel au rapport des coefficients d'absorption molaire des quadruplexes  $d(TG_4T)_4/Na^+$  et  $d(TG_4T)_4/K^+$ .

$$\varepsilon_{K^+} = \frac{A_{K^+}}{A_{Na^+}} \times \varepsilon_{Na^+} \quad (II-4)$$

où  $\varepsilon_{K^+}$  et  $\varepsilon_{Na^+}$  sont les coefficients d'absorption molaire par base des structures G-quadruplexes en présence de  $K^+$  et  $Na^+$  respectivement.  $A_{Na^+}$  et  $A_{K^+}$  sont les absorbances des solutions de quadruplexes mesurées avant et après l'addition de  $K^+$ .

### 2.3 Calculs des spectres d'absorption du mélange stœchiométrique de mononucléotides

Afin d'évaluer les effets collectifs des bases dans les structures quadruplexes, nous avons comparé leur spectre d'absorption à celui du mélange stœchiométrique de bases. Le calcul des spectres d'absorption du mélange stœchiométrique tient compte de la contribution de chacun des mononucléotides qui constitue la structure quadruplexe. Leur contribution est liée à leur coefficient d'absorption molaire pondéré par le nombre de mononucléotide dans le mélange.

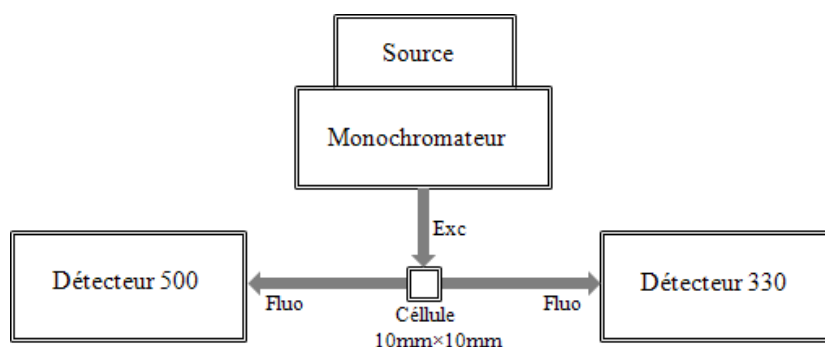
$$\varepsilon_{mél/base} = \frac{\sum_i n_i \times \varepsilon_i}{\sum_i n_i} \quad (II-5)$$

où  $n_i$  est le nombre de mononucléotides  $i$  dans le quadruplexe,  $\varepsilon_i$  le coefficient d'absorption molaire du mononucléotide  $i$ . Les spectres d'absorption des mononucléotides utilisés dans ce calcul sont ceux obtenus par D. Onidas.<sup>4</sup>

### 3 Spectroscopie de fluorescence stationnaire

#### 3.1 Dispositif

Les spectres de fluorescence stationnaire ont été enregistrés à l'aide d'un spectrofluorimètre SPEX Fluorolog-3 (Jobin Yvon). La source excitatrice est une lampe au Xenon d'une puissance de 450 Watts. Le fluorimètre est équipé de trois monochromateurs double-réseaux, un pour l'excitation blazé à 280 nm, et deux pour l'émission. Ces deux monochromateurs qui sont situés de part et d'autre de la source d'excitation permettent d'enregistrer de manière simultanée les spectres de fluorescence d'un échantillon dans une direction perpendiculaire à l'excitation sur les plages spectrales 250-400 nm et 400-700 nm. Pour la plage spectrale UV, la détection des spectres est faite à l'aide d'un double réseau blazé à 330 nm couplé à un photomultiplicateur. Tandis que pour la plage spectrale visible, un double réseau blazé à 500 nm couplé à un deuxième photomultiplicateur est utilisé. La Figure II-1 donne une représentation schématique du fluorimètre utilisé.



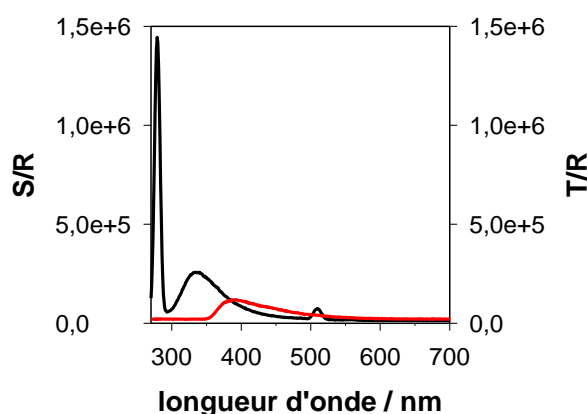
**Figure II-1.** Représentation schématique du fluorimètre SPEX Fluorolog-3 utilisé. Les détecteurs 500 et 330 comportent chacun un double réseau blazé à 500 et 330 nm, respectivement couplé à un photomultilicateur (Hamamatsu R928).

Afin de s'affranchir des fluctuations de l'intensité de la lampe d'excitation, une fraction de la lumière excitatrice est envoyée sur une photodiode (signal R). Dans tous les cas, les spectres de fluorescence ont été corrigés des fluctuations de l'intensité de l'excitation en divisant le signal des détecteurs 330 et 500 par R.

Les spectres de fluorescence ont été mesurés dans des cellules en quartz de 10mm×10mm pour des échantillons faiblement concentrés (dont l'absorbance est toujours inférieure à 0,15) afin d'éviter les effets de filtre interne et de réabsorption de la fluorescence. Par contre, la mesure des spectres de fluorescence de solutions de quadruplexes concentrées ont été réalisées dans des cellules de 10mm×2mm (parcours optique du faisceau d'excitation : 2 mm). Dans ce cas, la position de la cellule est ajustée à l'aide de deux translations sur la porte-cellule de manière à minimiser les effets de filtre interne et de réabsorption.

### 3.2 Acquisition et traitement des données

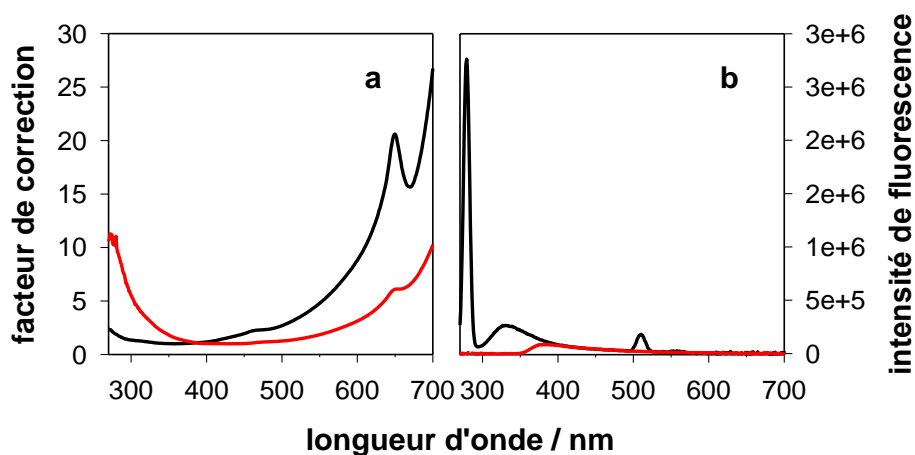
Les G-quadruplexes étudiés sont caractérisés par des rendements quantiques de fluorescence extrêmement faibles de l'ordre de 1/1000. Aussi, l'acquisition et le traitement des spectres de fluorescence nécessitent un protocole bien spécifique. Prenons l'exemple d'une solution aqueuse de quadruplexes d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> en présence de KCl. Typiquement, la solution, dans une cellule de 10mm×10mm, a été excitée à 255 nm. Les spectres de fluorescence ont été mesurés simultanément à l'aide des deux détecteurs sur la plage spectrale 250-700nm, avec une bande passante de 5 nm. Ils sont représentés sur la Figure II-2.



**Figure II-2.** Spectres de fluorescence de (TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> en présence de KCl obtenus pour  $\lambda_{exc}=255$  nm. Les spectres S (noire) et T (rouge) représentent les spectres mesurés avec les détecteurs 330 et 500 respectivement. Le pic intense à 290nm correspond à la bande Raman de l'eau et le pic à 510 nm au deuxième ordre de l'excitation à 255 nm.

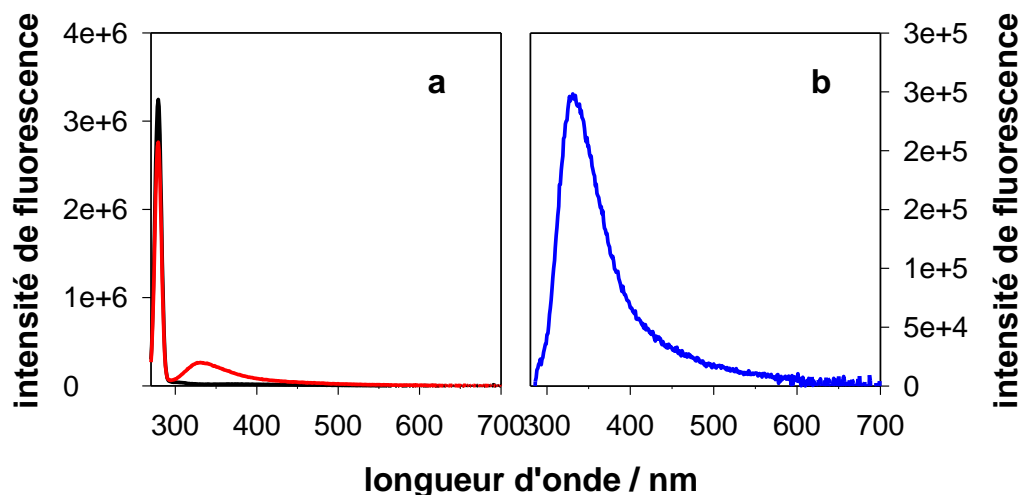
La courbe S correspond au spectre mesuré par le détecteur 330 et la courbe T à celui mesurée par le détecteur 500 avec un filtre WG385 permettant d'éliminer la contribution du premier et deuxième ordre des photons émis en dessous de 385 nm. Le traitement des spectres de fluorescence ainsi obtenus se fait ensuite en trois étapes :

- les spectres sont d'abord corrigés de la réponse spectrale de chacun des détecteurs. Ceci nécessite auparavant la soustraction du bruit de fond associé à chaque détecteur. Les fichiers de correction correspondant à chaque détecteur obtenus à l'aide de lampes standards sont fournis par le constructeur (cf. Figure II-3).



**Figure II-3.** (a) Courbes de correction de chacun des détecteurs : détecteur 330 (noir) et détecteur 500 (rouge). (b) Spectres de fluorescence enregistrés S (noir) et T (rouge) après correction de la réponse spectrale associée à chacun des détecteurs. Le pic intense à 290nm correspond à la bande Raman de l'eau et le pic à 510 nm au deuxième harmonique de l'excitation à 255 nm.

- La deuxième étape consiste à joindre les deux spectres de fluorescence en prenant la partie bleue de S et la partie rouge de T.
- Enfin, le signal du solvant enregistré dans les mêmes conditions que celui de l'échantillon puis corrigé de la réponse spectrale des détecteurs est soustrait de manière à éliminer la contribution du pic Raman à 290 nm (cf. Figure II-4).



**Figure II-4.** (a) Spectres de fluorescence de  $d(TG_4T)_4$  en présence de KCl (rouge) et du solvant seul (noir) pour  $\lambda_{exc} = 255\text{nm}$ . (b) Spectre de fluorescence de  $d(TG_4T)_4$  dans l'eau en présence de KCl après soustraction de la contribution du solvant.

### 3.3 Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence ( $\Phi_F$ ) est défini comme la fraction du nombre des photons émis sur le nombre des photons absorbés.

La méthode utilisée pour déterminer le rendement quantique de fluorescence consiste à comparer le spectre de fluorescence du composé étudié à celui d'une référence dont le rendement quantique de fluorescence est connu. Le rendement quantique de fluorescence d'un composé X,  $\Phi_X$ , est déterminé de la manière suivante :

$$\Phi_X(\lambda_{exc}) = \frac{n_X^2}{n_{ref}^2} \frac{\int_0^\infty I_X(\lambda_{exc}, \lambda_F) d\lambda_F}{\int_0^\infty I_{ref}(\lambda_{exc}, \lambda_F) d\lambda_F} \times \frac{1 - 10^{-A_{ref}(\lambda_{exc})}}{1 - 10^{-A_X(\lambda_{exc})}} \times \Phi_{ref}(\lambda_{exc}) \quad (\text{II-6})$$

où  $n$  est l'indice de réfraction du milieu.  $I_X$  et  $I_{ref}$  sont les intensités de fluorescence du composé X et de la référence et,  $A_X$  et  $A_{ref}$  les absorbances du composé X et de la référence à la longueur d'onde d'excitation.  $\Phi_{ref}$  est le rendement quantique de fluorescence de la référence à la longueur d'onde d'excitation.

Nous avons choisi le TMP (thymidine 5'-monophosphate) comme référence car son rendement quantique ( $1,5 \cdot 10^{-4}$ ) est proche de celui des quadruplexes et son spectre de fluorescence se situe dans la même zone spectrale.<sup>4</sup> Les mesures des rendements quantiques de fluorescence ont été réalisées sans dégazage préalable des solutions.

### 3.4 Calculs des spectres de fluorescence stationnaire du mélange stœchiométrique de mononucléotides

Afin d'évaluer les effets coopératifs des bases dans les structures quadruplexes, pour chaque séquence étudiée, nous avons comparé le spectre de fluorescence des quadruplexes à celui du mélange stœchiométrique de mononucléotides. Le spectre de fluorescence stationnaire du mélange est une combinaison des spectres de fluorescence de tous les mononucléotides constituant la structure quadruplexe. La contribution de chaque mononucléotide dépend de sa capacité à absorber les photons et de son rendement quantique de fluorescence. Pour un mononucléotide  $i$ , la fraction de photons absorbés s'exprime de la manière suivante :

$$x_i = \frac{n_i \times \varepsilon_i}{\sum_i n_i \times \varepsilon_i} \quad (\text{II-7})$$

L'absorption d'un mononucléotide  $i$  correspond à :

$$I_i^{Abs} \propto (1 - 10^{-x_i \times A_{mél}}) \quad (\text{II-8})$$

où  $A_{mél}$  est l'absorbance du mélange et  $n_i$  le nombre de mononucléotide  $i$  dans la structure quadruplexe. L'intensité du spectre de fluorescence stationnaire du mélange de mononucléotides  $F_{mél}(\lambda)$  s'écrit de la manière suivante :

$$F_{mél}(\lambda) \propto \sum_i (1 - 10^{-x_i \times A_{mél}}) \times \Phi_i \times \frac{F_i(\lambda)}{\int F_i(\lambda) \times d\lambda} \quad (\text{II-9})$$

où  $F_i(\lambda)$  est le spectre de fluorescence normalisé de la base  $i$  et  $\Phi_i$  son rendement quantique de fluorescence. Lorsque l'absorbance est inférieure à 0,05, on peut faire l'approximation suivante :

$$I_i^{Abs} \propto x_i \times A_{mél} \quad (\text{II-10})$$

et le spectre de fluorescence stationnaire du mélange de mononucléotides devient :

$$F_{mél}^{lexc}(\lambda) \propto \sum_i x_i \times \Phi_i \times \frac{F_i(\lambda)}{\int F_i(\lambda) \times d\lambda} \quad (\text{II-11})$$

Pour nos calculs des spectres de fluorescence du mélange stœchiométrique de mononucléotides, nous avons utilisé les spectres d'absorption et de fluorescence ainsi que les rendements quantiques des mononucléotides d'ADN mesurés par D. Onidas.<sup>4</sup>



## 4 Spectroscopie de fluorescence résolue en temps

Afin de caractériser les propriétés photophysiques des G-quadruplexes, nous avons utilisé deux techniques de fluorescence résolue en temps: la génération de somme de fréquences (en anglais, « up-conversion ») et le comptage de photons uniques corrélés en temps (TCSPC). La combinaison de ces deux techniques, nous permet de sonder les déclinés de fluorescence sur une gamme temporelle s'étalant de quelques centaines de femtosecondes à une centaine de nanosecondes.

Les expériences de comptage de photons uniques et d'« up-conversion » utilisent la même source laser, un oscillateur Titane : Saphir (Mira 900, Coherent) pompé par un laser YAG continu (VERDI, Coherent 10W). L'oscillateur délivre des impulsions à 800 nm, d'une durée de 120 fs et d'une puissance d'environ 2 W, avec un taux de répétition de 76 MHz. Les échantillons étudiés ont été excités à 267 nm, ce qui correspond au troisième harmonique de l'oscillateur Titane : Saphir.

### 4.1 Comptage de photons uniques corrélés en temps

#### 4.1.1 Principe

L'échantillon est excité par des impulsions laser de faible énergie (pJ - nJ) et les photons émis par l'échantillon sont collectés dans une direction perpendiculaire à l'excitation à l'aide d'un monochromateur et d'une galette de micro-canaux. Le principe de l'expérience, qui est représenté sur la Figure II-5, consiste à mesurer le temps  $\Delta t$  entre l'excitation laser et l'émission du photon unique par l'échantillon.

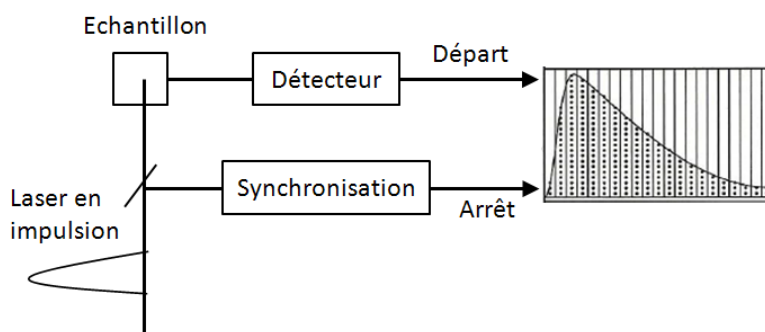
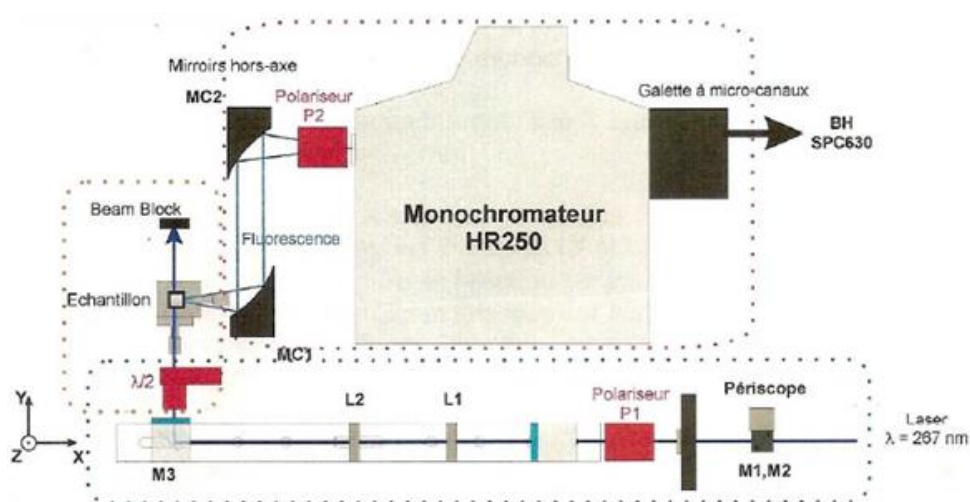


Figure II-5. Principe du comptage de photons uniques corrélés en temps.

La probabilité de détecter un photon unique émis au temps  $\Delta t$  est proportionnelle à l'intensité de la fluorescence à ce temps. Pour obtenir un déclin de fluorescence, il faut donc effectuer un grand nombre de mesures.

#### 4.1.2 Dispositif

Le montage de comptage de photons que nous avons utilisé est représenté schématiquement sur la Figure II-6.



**Figure II-6.** Schéma du montage pour le comptage de photons uniques corrélés en temps utilisé.

Les impulsions à 800 nm délivrées par l'oscillateur Titane : Saphir passent d'abord par un sélecteur d'impulsions afin de réduire leur cadence à 4,75 MHz puis sont triplées en fréquence. Les impulsions laser à 267 nm d'une puissance de 0,4 mW ainsi obtenues sont focalisées sur l'échantillon. La fluorescence émise par l'échantillon est ensuite collectée et focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur HR250 à l'aide de deux miroirs paraboliques. La fluorescence filtrée par le monochromateur (fente 1 nm) est détectée par une galette de micro-canaux Hamamatsu R1564-U11. Le signal généré par la galette est envoyé à la carte de comptage de photons Becker-Hickl SPC-630, avec le signal provenant d'une photodiode détectant l'arrivée des impulsions laser excitatrices, afin de mesurer les déclins de fluorescence avec une résolution temporelle ultime d'environ 50 ps.

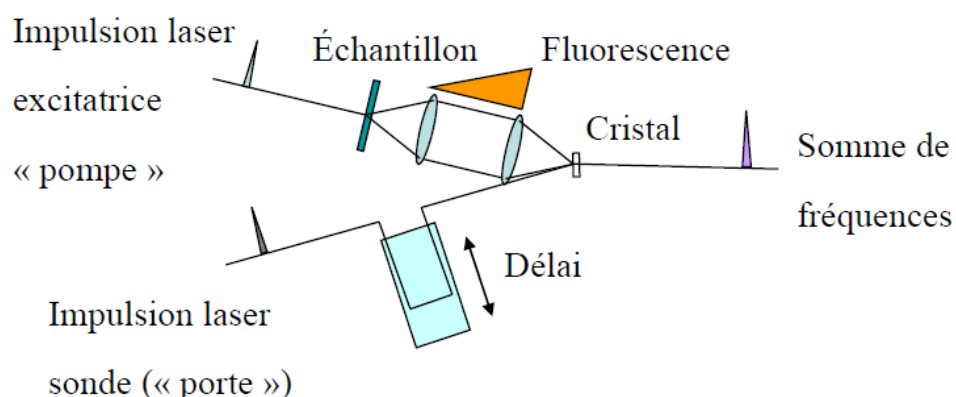
Les monochromateurs présentent généralement une efficacité de transmission différente selon la polarisation de la lumière. Afin de s'en affranchir, un polarisateur fixe P2 en position verticale est placé devant le monochromateur, de manière à ne détecter que la polarisation verticale de la fluorescence de l'échantillon. La polarisation de l'excitation est, elle, contrôlée à l'aide d'un polarisateur fixe P1 et une lame demi-onde insérée dans une unité de rotation pilotée par ordinateur placés avant l'échantillon.

Typiquement, les mesures des déclin de fluorescence par comptage de photons uniques ont été effectuées à 20°C, dans des cuves en quartz de trajet optique 10mm, munies d'un agitateur magnétique. L'absorbance des échantillons à la longueur d'onde d'excitation, 267 nm, a été fixée à moins de 0,5/cm, afin de limiter les effets de filtre interne.

## 4.2 Génération de somme de fréquences (« up-conversion »)

### 4.2.1 Principe

Brièvement, le principe des mesures de la fluorescence par génération de somme de fréquences que nous utilisons est schématisé sur la Figure II-7, ci-dessous.



**Figure II-7.** Représentation schématique du principe de génération de somme de fréquences.

Il s'agit d'une technique pompe-sonde. Typiquement, une première impulsion laser « pompe » sert à exciter l'échantillon et générer la fluorescence. Une deuxième impulsion laser (impulsion « porte ») permet de sonder l'évolution temporelle de la fluorescence dans un cristal non-linéaire. La somme de fréquence n'a lieu dans le

cristal que lorsque la fluorescence et l'impulsion porte coïncident temporellement et spatialement. On peut donc mesurer tout le déclin de fluorescence en retardant progressivement l'arrivée de l'impulsion porte dans le cristal par un retard optique (allongement du trajet optique).

La génération de la somme de fréquences repose sur deux lois de la physique qui sont la conservation de l'énergie et la conservation de la quantité de mouvement (accord de phase) :

$$v_S = v_F + v_P \quad (\text{II-12})$$

$$\vec{k}_S = \vec{k}_F + \vec{k}_P \quad (\text{II-13})$$

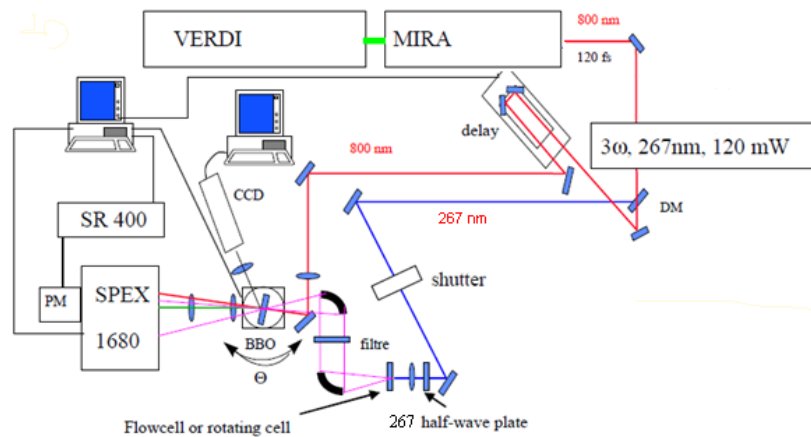
avec  $v_S$ ,  $v_F$  et  $v_P$  les fréquences de l'impulsion « somme », de la fluorescence et de l'impulsion « porte », respectivement.  $\vec{k}_S$ ,  $\vec{k}_F$  et  $\vec{k}_P$  sont les vecteur d'onde de l'impulsion « somme », de la fluorescence et de l'impulsion « porte ». En mode colinéaire, la condition d'accord de phase se réduit à l'expression suivante :

$$\frac{n_S}{\lambda_S} = \frac{n_F}{\lambda_F} + \frac{n_P}{\lambda_P} \quad (\text{II-14})$$

avec  $n_S$ ,  $n_F$  et  $n_P$  les indices de réfraction du cristal non-linéaire aux longueurs d'onde de l'impulsion « somme », de la fluorescence et de l'impulsion « porte », respectivement  $\lambda_S$ ,  $\lambda_F$  et  $\lambda_P$ . Les conditions d'accord de phase et de conservation d'énergie ne peuvent être remplies que dans un milieu anisotrope, dans lequel l'indice de réfraction dépend de la polarisation de l'onde lumineuse et de sa direction de propagation. Afin de satisfaire la condition d'accord de phase, les faisceaux de la fluorescence et de l'impulsion « porte » doivent former un angle précis  $\theta$  avec l'axe optique du cristal non-linéaire. Il s'agit de l'angle d'accord de phase.

#### 4.2.2 Dispositif

Le dispositif de fluorescence « up-conversion » que nous avons utilisé est schématisé sur la Figure II-8, à la page suivante.



**Figure II-8.** Schéma représentatif du montage d'« up-conversion ».

Les impulsions pompe sont fournies par la génération du troisième harmonique des impulsions à 800 nm délivrées par l'oscillateur Titane : Saphir. Les impulsions fondamentales résiduelles à 800 nm en sortie du tripleur de fréquence servent d'impulsions « porte » et sont envoyées dans une ligne à retard pilotée par ordinateur permettant d'ajuster le retard optique du faisceau « porte » et du faisceau « pompe ». La polarisation du faisceau « porte » est ajustée en position verticale à l'aide d'une lame demi-onde avant d'être focalisé dans le cristal non-linéaire (BBO Type I, épaisseur 0.5 mm). Les impulsions « pompe » à 267 nm en sortie du tripleur de fréquence sont focalisées dans l'échantillon à l'aide d'une lentille de focale 30 mm. La polarisation du faisceau d'excitation est ajustée à l'aide d'une lame-demi-onde placée dans une unité de rotation pilotée par ordinateur. La fluorescence émise par l'échantillon est collectée et focalisée dans le cristal non-linéaire à l'aide de deux miroirs paraboliques (Janos,  $f = 100$  mm), dans une géométrie quasi-colinéaire avec le faisceau « porte ». Un filtre Schott WG305 ou WG320 d'épaisseur 1 mm est placé sur le trajet de la fluorescence, entre les deux miroirs paraboliques, afin d'éliminer le résiduel du faisceau d'excitation transmis par l'échantillon. En sortie du cristal non-linéaire, la somme de fréquences générée est focalisée sur la fente d'entrée (largeur 1 nm) d'un monochromateur double-réseau (SPEX 1680) puis détectée par un photomultiplicateur (Hamamatsu R1527P) connecté à un compteur de photons (Standford SR400). L'angle d'accord de

phase entre le faisceau « porte » et le faisceau de fluorescence est ajusté à l'aide d'une unité de rotation pilotée par ordinateur sur laquelle est placé le cristal non-linéaire.

Typiquement, nous avons utilisé une cuve à circulation en quartz, de trajet optique 1mm, pour les mesures de fluorescence par « up-conversion ». Afin d'éviter la photodégradation des échantillons d'ADN pendant les expériences, nous avons circulé environ 25 ml de solution dont l'absorbance est comprise entre 0,8 et 1 par mm à la longueur d'onde d'excitation.

### 4.3 Anisotropie de fluorescence

#### 4.3.1 Anisotropie de fluorescence en régime stationnaire

Lorsque les molécules sont irradiées par une lumière polarisée linéairement, leur probabilité d'absorption dépend de l'orientation de leur moment de transition d'absorption par rapport à la direction de la polarisation de la lumière excitatrice. Seules les molécules dont l'orientation de leur moment transition d'absorption est proche de la direction de la polarisation de la lumière excitatrice vont absorber les photons. La probabilité d'absorption des molécules est proportionnelle à  $|\vec{\mu}\vec{e}|^2$  où  $\vec{\mu}$  désigne le moment de transition d'absorption de la molécule et  $\vec{e}$  le vecteur unitaire de la direction du champ électrique de la lumière incidente. L'absorption d'une lumière polarisée crée donc une distribution d'orientation anisotrope de molécules à l'état excité. De ce fait, la fluorescence émise par les molécules est également polarisée. Tout changement de direction du moment de transition d'émission, pendant la durée de vie de l'état excité, conduit à une dépolarisation de la fluorescence.

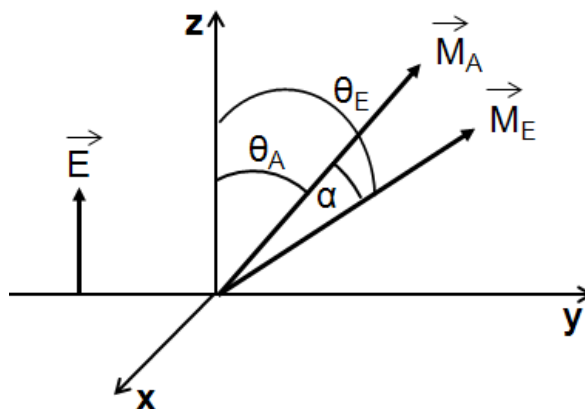
La polarisation de la fluorescence peut être évaluée à l'aide du facteur d'anisotropie  $r$  :

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (\text{II-15})$$

où  $I_{\parallel}$  et  $I_{\perp}$  représentent les intensités de fluorescence dont la direction de la polarisation est parallèle ou perpendiculaire à celle de la lumière excitatrice. Pour une lumière excitatrice non-polarisée,  $I_{\parallel} = I_{\perp}$  et  $r = 0$ . L'intensité de fluorescence totale

émise par une molécule excitée par une onde lumineuse polarisée linéairement correspond à :

$$I_{tot} = I_{\parallel} + 2I_{\perp} \quad (\text{II-16})$$



**Figure II-9.** Systèmes de coordonnées pour la caractérisation de l'orientation des moments de transition d'absorption et d'émission d'une molécule.  $\vec{M}_A$  et  $\vec{M}_E$  représentent les moments de transition d'absorption et d'émission.  $\theta_A$  et  $\theta_E$  sont les angles entre l'axe z et les moments de transition d'absorption et d'émission.

L'anisotropie de fluorescence peut également s'exprimer en fonction de la distribution angulaire des moments de transition d'émission des molécules excitées :

$$r = \frac{3\overline{\cos^2\theta_E} - 1}{2} = \frac{3\overline{\cos^2\alpha} - 1}{5} \quad (\text{II-17})$$

La valeur de  $r$  varie entre -0,2 et 0,4. La valeur maximale correspond au cas où les moments de transition d'absorption et d'émission sont parallèles ( $\alpha = 0^\circ$ ). Tandis que la valeur minimale correspond au cas où les moments de transition d'absorption et d'émission sont perpendiculaires. L'anisotropie de fluorescence est égale à 0 dans le cas où  $\alpha = 54,7^\circ$ . On appelle cet angle, l'angle magique.

#### 4.3.2 Anisotropie de fluorescence résolue en temps

De nombreux processus peuvent entraîner une dépolarisation de la fluorescence pendant la durée de vie de l'état excité d'une molécule, comme un moment de transition d'émission différent de celui de l'absorption, la diffusion rotationnelle de la molécule ou le transfert d'énergie vers d'autres molécules.

Le temps caractéristique de la diffusion rotationnelle d'une molécule sphérique en solution est donné par la relation de Stokes-Einstein :

$$\tau_{rot} = \frac{\eta V}{kT} \quad (\text{II-18})$$

où  $\tau_{rot}$  est le temps de la diffusion rotationnelle de la molécule,  $V$  son volume,  $\eta$  la viscosité du solvant,  $T$  la température,  $k$  la constante de Boltzmann. En prenant le cas du quadruplexe  $d(\text{TG}_4\text{T})_4$  dans une solution de NaCl (0,37 M), le volume de la molécule peut être calculé à partir de la diamètre hydrodynamique donnée par la référence 5 ( $d = 33,1 \text{ \AA}$ ). La viscosité du solvant à 20°C étant de  $1,002 \cdot 10^{-3} \text{ Pa.s}$ , nous avons obtenu une estimation du temps de la diffusion rotationnelle de 4,7 ns. Pour les autres systèmes de G-quadruplexes dont le nombre de tétrades varie peu, nous avons supposé que leur temps de diffusion rotationnelle reste du même ordre de grandeur que celui de  $d(\text{TG}_4\text{T})_4/\text{Na}^+$ . Par conséquent, sur une échelle du temps sub-nanoseconde, il n'y a pas, en principe, de dépolarisation de la fluorescence induite par la diffusion rotationnelle des quadruplexes.

Typiquement, pour les mesures de fluorescence résolue en temps, nous avons enregistré les déclin de fluorescence polarisée parallèlement et perpendiculairement par rapport à la polarisation de l'excitation. Ces mesures permettent de calculer le facteur d'anisotropie de fluorescence selon l'équation II-15 et l'intensité de fluorescence totale selon l'équation II-16. Nous avons également mesuré certains déclin de fluorescence à l'angle magique. L'intensité de fluorescence à cet angle est directement proportionnelle à l'intensité de fluorescence totale.

### **4.3.3 Calculs des déclin de fluorescence et de l'anisotropie de fluorescence pour le mélange stœchiométrique de mononucléotides**

Pour le calcul des déclin de fluorescence du mélange stœchiométrique de mononucléotides, on doit tenir compte : du nombre de photons absorbés par chacun des mononucléotides à la longueur d'onde d'excitation et de la force d'oscillateur de la transition qui émet, soit :



$$I_{mél}(\lambda, t) = \sum_i \left(1 - 10^{-x_i \times A_{mél}}\right) \times \phi_i \times \frac{F_i(\lambda)}{\int F_i(\lambda) \times d\lambda} \times \frac{I_i(\lambda, t)}{\int I_i(\lambda, t) \times dt} \quad (\text{II-19})$$

avec  $A_{mél}$  la densité optique du mélange,  $\phi_i$  le rendement quantique de fluorescence du mononucléotide  $i$ ,  $F_i(\lambda)$  son spectre de fluorescence,  $I_i(\lambda, t)$  son déclin de fluorescence.

L'anisotropie de fluorescence du mélange de mononucléotides à un  $t$  temps donné et une longueur d'onde  $\lambda$  donnée,  $r(\lambda, t)$ , correspond à la somme des anisotropies de chacun des mononucléotides pondérée par la contribution relative de leur intensité de fluorescence au temps  $t$ .

$$r_{mél}(\lambda_s, t) = \frac{\sum_i (1 - 10^{-x_i \times A_{mél}}) \times \phi_i \times \frac{F_i(\lambda_s)}{\int F_i(\lambda) \times d\lambda} \times \frac{I_i(\lambda_s, t)}{\int I_i(\lambda_s, t) \times dt} \times r_i(\lambda_s, t)}{\sum_i (1 - 10^{-x_i \times A_{mél}}) \times \phi_i \times \frac{F_i(\lambda_s)}{\int F_i(\lambda) \times d\lambda} \times \frac{I_i(\lambda_s, t)}{\int I_i(\lambda_s, t) \times dt}} \quad (\text{II-20})$$

avec  $r_i(\lambda, t)$ , le facteur d'anisotropie associé au mononucléotide  $i$ , à un temps  $t$  donné et une longueur d'onde  $\lambda$  donnée.

#### 4.4 Traitement des données et construction des histogrammes

Les déclins de fluorescence mesurés par « up-conversion » ou comptage de photons uniques sont déformés par la fonction d'appareil. Les signaux mesurés  $I(t)$  correspondent au produit de convolution de la fonction d'appareil  $R(t)$  et des déclins de fluorescence  $G(t)$  :

$$I(t) = G(t) \otimes R(t) \quad (\text{II-21})$$

Pour l'ajustement paramétrique des déclins de fluorescence mesurés, la fonction  $G(t)$  est décrite par une somme d'exponentielles :

$$G(t) = \sum_{i=1}^n a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (\text{II-22})$$

où  $\tau_i$  et  $a_i$  désignent les durées de vie et les facteurs préexponentiels, respectivement. La durée de vie moyenne de fluorescence est calculée de la manière suivante :

$$\langle \tau \rangle = \sum_{i=1}^n a_i \tau_i \quad (\text{II-23})$$

Pour les mesures d'« up-conversion », la fonction d'appareil  $R(t)$  est approximée à une fonction gaussienne dont la largeur temporelle constitue un paramètre d'ajustement. Typiquement, la fonction d'appareil de notre expérience a une largeur d'environ 330 fs. Dans le cas du comptage de photons uniques, la fonction d'appareil a été obtenue en enregistrant la diffusion Raman de l'eau à 295 nm pour une excitation à 267 nm. Pour une gamme temporelle de mesure de 10 ns, la résolution de l'expérience de comptage de photons uniques est de 60 ps, tandis que pour une gamme temporelle de mesure de 3 ns, la résolution temporelle est de 45 ps.

Nous avons utilisé les paramètres des ajustements (durées de vie et facteurs préexponentiels) des déclins mesurés par comptage de photons uniques pour construire des histogrammes représentant le pourcentage des photons émis par décade de temps, à une longueur d'onde donnée.

## RÉFÉRENCES

1. Owczarzy, R.; Tataurov, A. V.; Wu, Y.; Manthey, J. A.; McQuisten, K. A.; Almabrazi, H. G.; Pedersen, K. F.; Lin, Y.; Garretson, J.; McEntaggart, N. O.; Sailor, C. A.; Dawson, R. B.; Peek, A. S., IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, W163-W169.
2. Gu, J.; Leczczyński, J., Origin of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> selectivity of the guanine tetraplexes in water: The theoretical rationale *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 529-532.
3. Hud, V.; Smith, F.; Anet, F. A. L.; Feigon, J., The Selectivity for K<sup>+</sup> versus Na<sup>+</sup> in DNA Quadruplexes Is Dominated by Relative Free Energies of Hydration: A Thermodynamic Analysis by <sup>1</sup>H NMR. *Biochemistry* **1996**, *35*, 15383-15390.
4. Onidas, D.; Markovitsi, D.; Marguet, S.; Sharonov, A.; Gustavsson, T., Fluorescence properties of DNA nucleosides and nucleotides: a refined steady-state and femtosecond investigation. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11367-11374.
5. Sket, P.; Plavec, J., Tetramolecular DNA Quadruplexes in Solution: Insights into Structural Diversity and Cation Movement. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12724-12732.

# Chapitre III : Préparation et caractérisation des structures G-quadruplexes

Les G-quadruplexes que nous avons choisi d'étudier sont formés soit par l'association de quatre simples brins d'ADN parallèles ou soit par le repliement d'un simple-brin d'ADN. Il est bien connu que la formation des G-quadruplexes issue de l'association de quatre brins d'ADN (les quadruplexes tétramoléculaires) est un processus très lent qui peut varier de quelques secondes à plusieurs jours.<sup>1</sup> En revanche, la formation des G-quadruplexes intramoléculaires par le repliement d'un simple brin d'ADN est beaucoup plus rapide et a lieu sur une échelle de temps milliseconde.<sup>2-3</sup>

## 1 Les quadruplexes tétramoléculaires

Les structures G-quadruplexes présentent quatre sillons de taille variable. C'est l'orientation *syn* ou *anti* des guanines dans un G-quartet détermine la taille du sillon entre deux guanines voisines. Les G-quadruplexes tétramoléculaires que nous avons étudiés sont formés à partir de séquences d'ADN très courtes, du type d(TG<sub>n</sub>T) avec n=3,4 ou 5. Dans ces structures, les quatre brins d'ADN sont parallèles, toutes les guanines sont orientées en *anti*, et les quatre sillons sont identiques.<sup>4</sup> La présence de thymine aux extrémités des séquences permet d'éviter, d'une part, la formation de structures dans lesquelles les brins sont décalés et, d'autre part, d'éviter l'association des structures quadruplexes entre elles à forte concentration.

### 1.1 Temps de formation des G-quadruplexes tétramoléculaires

La formation des quadruplexes tétramoléculaires est très lente et varie fortement avec la concentration d'ADN. Le temps nécessaire à la formation des structures G-quadruplexes tétramoléculaires peut être calculé en utilisant l'équation cinétique ci-dessous :

$$\frac{d[M]}{dt} = -k_{on}[M]^n \quad \text{(III-1)}$$

où  $n$  représente l'ordre de la réaction,  $[M]$  la concentration d'ADN en simple brin (en  $\text{mol.l}^{-1}$ ) et  $k_{on}$  la constante de vitesse d'association (en  $\text{mol}^{-3}.\text{l}^3.\text{s}^{-1}$ ). En prenant à  $t = 0$ ,  $[M] = \alpha[M_0]$ , nous obtenons la relation suivante :

$$\tau_{ass} = \frac{1-\alpha^{n-1}}{(n-1)\alpha^{n-1}[M_0]^{n-1}k_{on}} \quad (\text{III-2})$$

où  $[M_0]$  représente la concentration initiale d'ADN en simple brin (en  $\text{mol.l}^{-1}$ ),  $\alpha$  la fraction de simples-brins libres en solution et  $\tau_{ass}$  le temps de formation des quadruplexes (en s). Il a été montré récemment que l'ordre de la réaction peut varier entre 3 et 4, selon les conditions expérimentales (concentration en simples-brins, nature du cation et température).<sup>1, 5</sup> Pour nos calculs, nous avons fixé  $n$  à 4. Nous avons calculé le temps de formation des quadruplexes pour les différentes séquences étudiées, avec les valeurs suivantes :  $[M_0]=10^{-3}$  M et  $\alpha=0,01$ . Les valeurs de  $k_{on}$  mesurées à 4°C dans des solutions de 0,11 M de  $\text{Na}^+$  ont été extraites de la référence 1. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la Table III-1 ci-dessous.

*Table III-1. Estimation des temps de formation des G-quadruplexes tétramoléculaires en présence de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$*

Séquence	$[M_0]$ ( $\text{mol.l}^{-1}$ )	$\alpha$	$\text{Na}^+$ (c=0,11 $\text{mol.l}^{-1}$ )		$\text{K}^+$ (c=0,11 $\text{mol.l}^{-1}$ )	
			$k_{on}$ ( $\text{mol}^{-3}.\text{l}^3.\text{s}^{-1}$ )	$\tau_{ass}$	$k_{on}$ ( $\text{mol}^{-3}.\text{l}^3.\text{s}^{-1}$ )	$\tau_{ass}$
<b>d(TG<sub>3</sub>T)</b>	$10^{-3}$	0,01	$5,2 \cdot 10^7$	74 jours	$156 \cdot 10^7$	5 jours
<b>d(TG<sub>4</sub>T)</b>	$10^{-3}$	0,01	$3,8 \cdot 10^8$	10 jours	$114 \cdot 10^8$	8 heures
<b>d(TG<sub>5</sub>T)</b>	$10^{-3}$	0,01	$6,1 \cdot 10^9$	15 heures	$183 \cdot 10^9$	30 min

Les résultats de la Table III-1 montrent que la cinétique d'association des structures G-quadruplexes tétramoléculaires, pour la même concentration en oligonucléotides, dépend fortement de la nature des cations dans la solution ( $\text{K}^+ > \text{Na}^+$ ) et de la séquence des oligonucléotides. Par ailleurs, il a été montré que la vitesse

d'association varie également en fonction de la concentration de cations présents dans la solution. L'augmentation de la concentration en cation induit une augmentation de la vitesse de formation.<sup>1</sup> Soulignons à ce sujet, que nous avons travaillé avec des concentrations de cations ( $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ ) environ cinq fois plus élevées que celles de la Table III-1 (0,57 M vs. 0.11 M), ce qui correspond à une augmentation d'environ un ordre de grandeur de la constante de vitesse d'association.<sup>1</sup> Dans ces conditions, nous pouvons donc nous attendre à des temps de formation d'environ un ordre de grandeur plus courts que ceux de la Table III-1.

## **1.2 Protocole de formation des G-quadruplexes tétramoléculaires : l'hybridation**

La préparation des structures G-quadruplexes se fait selon une procédure d'hybridation similaire à celle généralement utilisée pour la formation des doubles hélices d'ADN. Les oligonucléotides sont d'abord dissouts dans la solution tampon contenant du sodium ( $\text{Na}^+$ ) ou potassium ( $\text{K}^+$ ), à température ambiante. La concentration de simple brin utilisée est d'environ 1 mM. La solution est ensuite chauffée à 96 °C dans un bain sec pendant 5 min, afin de dissocier les brins d'ADN. La solution est ensuite refroidie lentement jusqu'à 20°C, avec un gradient de température de 0,5 °C/min, puis stockée à 4°C pendant un temps variant de quelques jours à plusieurs semaines selon la séquence, pour favoriser thermodynamiquement la formation des structures G-quadruplexes tétramoléculaires parallèles. La formation de ces structures a lieu préférentiellement à basse température, l'énergie d'activation de la réaction étant négative.<sup>1</sup>

Dans certains cas, cependant, le chauffage de la solution d'oligonucléotides à 96 °C ne permet pas de dissocier complètement les brins d'ADN. Aussi, d'éventuelles structures G-quadruplexes présentant des défauts d'appariement (*i.e.* un décalage des brins) susceptibles de se former lors de la dissolution des oligonucléotides à température ambiante ne peuvent pas être éliminées par la procédure d'hybridation décrite précédemment. C'est le cas des quadruplexes formés à partir de la séquence

d(TG<sub>5</sub>T),<sup>5</sup> pour lesquels nous avons été obligés d'effectuer un prétraitement des solutions, avant la procédure d'hybridation, permettant de dissocier les brins d'ADN.<sup>1,6</sup> Ce prétraitement consiste à rompre les liaisons hydrogène des structures associées. Pour cela, après la dissolution des oligonucléotides dans la solution tampon, nous avons ajouté quelques gouttes de KOH 1 M afin d'ajuster le pH à 12. Le pH est ensuite neutralisé avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl 1 M) juste avant la procédure d'hybridation.

Comme pour la séquence d(TG<sub>5</sub>T), les structures G-quadruplexes formées à partir des séquences d(TG<sub>4</sub>T) en présence de K<sup>+</sup> ne peuvent pas être dissociées à 96°C.<sup>1,5</sup> Cependant, contrairement aux séquences d(TG<sub>5</sub>T), les études par RNM menées par groupe de J. L. Leroy montrent qu'au-dessus de 42°C les structures d(TG<sub>4</sub>T) présentant des défauts d'appariement sont totalement dissociées.<sup>5</sup> Ces structures sont donc éliminées pendant la procédure d'hybridation. Les solutions de séquences d(TG<sub>4</sub>T) en présence de K<sup>+</sup> ne nécessitent donc pas de prétraitement avant la procédure d'hybridation.

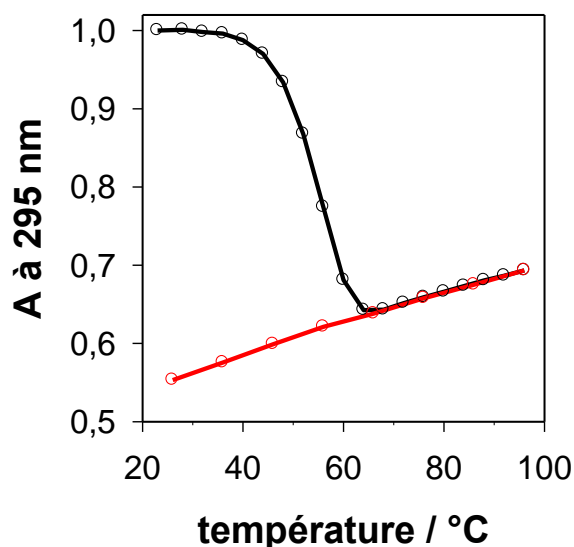
### **1.3 Caractérisation des G-quadruplexes tétramoléculaires : mesure des courbes de fusion**

Nous avons vu au chapitre I que la formation des structures G-quadruplexes s'accompagne d'un hyperchromisme du spectre d'absorption autour de 295 nm.<sup>7</sup> Pour caractériser la formation des quadruplexes, nous avons donc mesuré l'évolution de l'absorbance de l'échantillon à 295 nm en fonction de la température. Pour cela, nous avons enregistré les spectres d'absorption des quadruplexes tétramoléculaires tous les 4°C, avec un gradient de 0.44°C/min, pour la gamme de températures croissantes entre 24°C et 96 °C, puis tous les 10 °C, avec un gradient de 0.55°C/min, pour la gamme de températures décroissantes entre 96 °C et 26 °C.

La Figure III-1 représente l'évolution obtenue pour les séquences d(TG<sub>3</sub>T) en présence de K<sup>+</sup>. La courbe obtenue s'appelle une courbe de fusion. Elle présente une transition à une température donnée (température de fusion) qui traduit le passage de la

forme associée de l'ADN à basse température, à la forme dissociée à haute température. Nous constatons ici que l'absorbance des séquences d(TG<sub>3</sub>T) à 295 nm diminue de ~35% et atteint une valeur minimum à 64°C lorsque la température croît. Lors de la décroissance de la température, l'absorbance diminue linéairement jusqu'à 26°C. L'allure de ces deux courbes est caractéristique de la formation de structures G-quadruplexes et sont en accord avec la référence 7. Nous pouvons voir que les courbes de montée et de descente en température de la figure III-1 ne sont pas superposables. Ce phénomène est lié à des cinétiques de dénaturation et/ou de renaturation très lentes, par rapport au gradient de température que nous avons utilisé. La réassociation des brins d'ADN en une structure G-quadruplexe tétramoléculaire n'a pas lieu pendant nos mesures. Par conséquent la transition que nous observons ici sur la Figure III-1 ne reflète pas l'équilibre thermodynamique.

Il est bien établi que la température de transition entre les formes associées et dissociées des séquences d(TG<sub>3</sub>T), en présence de Na<sup>+</sup>, est proche de la température ambiante.<sup>1, 5</sup> Ces séquences qui, à température ambiante, sont pour moitié sous leur forme dissociée n'ont donc pas été étudiées dans le cadre de ma thèse.



**Figure III-1.** Courbe de fusion des séquences d(TG<sub>3</sub>T) en présence de K<sup>+</sup>, en noir pour les températures croissantes et en rouge pour les températures décroissantes.



## 1.4 Caractérisation des G-quadruplexes tétramoléculaires : mesure des spectres de fluorescence stationnaire

Pour les G-quadruplexes  $d(TG_4T)_4/K^+$  et  $d(TG_5T)_4/K^+$ , dont la température de fusion est supérieure à 100 °C, nous ne pouvons pas mesurer de courbe de fusion. La formation des G-quadruplexes a, dans ce cas, été caractérisée par la mesure de leur spectre de fluorescence stationnaire après différents temps d'incubation des solutions à 4 °C après leur hybridation. Lorsque nous n'observons pas de variation dans le spectre de fluorescence, nous considérons qu'il n'y a plus d'évolution de structure.

## 1.5 Pourcentage de simples-brins à l'équilibre

Avant de commencer l'étude photophysique des quadruplexes, il est important d'avoir une estimation du pourcentage d'ADN simple-brin présent en solution à l'équilibre thermodynamique après leur préparation. Pour cela, nous avons utilisé l'équation (III-3) :

$$K_{diss} = \frac{4\alpha_{eq}^4[M_0]^3}{(1-\alpha_{eq})} \quad (III-3)$$

où  $K_{diss}$  est la constante de dissociation des quadruplexes,  $\alpha_{eq}$  la fraction d'ADN simple brin à l'équilibre thermodynamique et  $[M_0]$  (en mol.l<sup>-1</sup>) la concentration d'ADN simple-brin initiale. Pour nos calculs, nous avons pris les constantes de dissociations données par la référence 5. Les résultats obtenus sont rassemblés dans la Table III.2 à la page suivante. Notons que nous ne disposons pas des valeurs de  $K_{diss}$  pour  $d(TG_5T)_4$  dans  $K^+$ , néanmoins il est connu que la constante de dissociation des quadruplexes en présence de  $K^+$  est plus petite qu'en présence de  $Na^+$ . La fraction de formes simples-brins est donc plus petite en présence de  $K^+$  vs.  $Na^+$ .

D'après les valeurs de la Table III-2, on se rend compte qu'à l'équilibre thermodynamique, une partie des séquences  $d(TG_3T)$  reste sous la forme de simple-brin et ce même à basse température lorsque les solutions sont incubées à 4°C lors de la préparation des quadruplexes. Pour les autres séquences,  $d(TG_4T)$  et  $d(TG_5T)$ , à basse température, pour des concentrations millimolaire d'oligonucléotides, l'ADN

est principalement sous forme de quadruplexes.

**Table III-2. Fraction d'ADN simple-brin présente dans des solutions de G-quadruplexes tétramoléculaires à l'équilibre thermodynamique.**

Séquences	Cation	$[M_0]$ (mol.l <sup>-1</sup> )	T (°C)	$K_{diss}$	$\alpha_{eq}$
<b>d(TG<sub>3</sub>T)</b>	K <sup>+</sup>	10 <sup>-3</sup>	0	1,49 10 <sup>-12</sup>	0,13
			42	6,91 10 <sup>-9</sup>	0,79
<b>d(TG<sub>4</sub>T)</b>	Na <sup>+</sup>	10 <sup>-3</sup>	0	~4 10 <sup>-21</sup>	<<0.01
			42	1,72 10 <sup>-10</sup>	0,4
<b>d(TG<sub>4</sub>T)</b>	K <sup>+</sup>	10 <sup>-3</sup>	0	~4 10 <sup>-24</sup>	<<0.01
			42	1,09 10 <sup>-17</sup>	<0.02
<b>d(TG<sub>5</sub>T)</b>	Na <sup>+</sup>	10 <sup>-3</sup>	42	1,19 10 <sup>-19</sup>	<0.01

La fraction d'ADN simple-brin présente dans les solutions dépend fortement de la concentration en oligonucléotides et de la température de la solution. Pour les mesures de spectroscopie de fluorescence stationnaire et résolue en temps, nous sommes amenés à diluer les solutions de quadruplexes. A faible concentration, les structures G-quadruplexes tétramoléculaire peuvent de dissocier. Toutefois, la Table III-3 montre que cette dissociation est très lente à température ambiante.

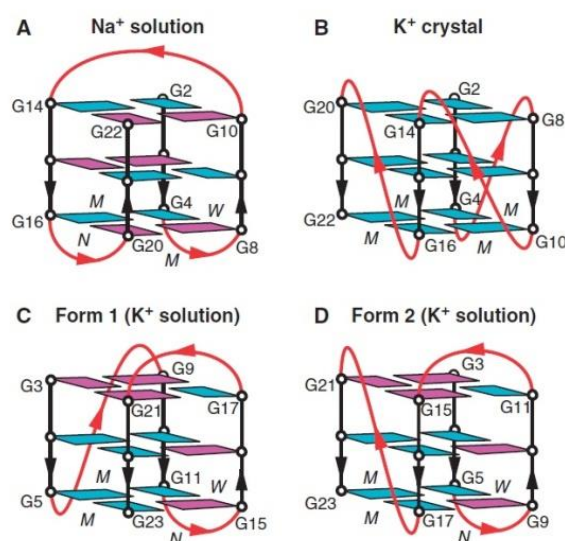
**Table III-3. Temps de dissociation des solutions de G-quadruplexes tétramoléculaires à l'équilibre thermodynamique à température ambiante.**

Séquences	Cations	$\tau_{diss}$ à T <sub>amb</sub>
<b>d(TG<sub>3</sub>T)</b>	K <sup>+</sup>	35 jours
<b>d(TG<sub>4</sub>T)</b>	Na <sup>+</sup>	70 jours
<b>d(TG<sub>4</sub>T)</b>	K <sup>+</sup>	stables
<b>d(TG<sub>5</sub>T)</b>	Na <sup>+</sup>	38 jours

Nous avons donc conservé, sur le long terme, des solutions de quadruplexes tétramoléculaires de concentrations millimolaire en oligonucléotides à basse température (-20°C). La préparation des solutions diluées pour les études en spectroscopie a été effectuée juste avant les mesures, de manière à ce que les structures G-quadruplexes ne se dissocient pas et la fraction d'ADN simple-brin reste la même que pour les solutions de concentration millimolaire d'oligonucléotides.

## 2 Les G-quadruplexes intramoléculaires télomériques

Les extrémités des chromosomes chez les organismes eucaryotes possèdent des structures particulières capables de les stabiliser que l'on nomme les télomères. Ce sont des séquences non-codantes de l'ADN riches en guanines. Chez l'humain le motif télomérique est constitué de la séquence d(TTAGGG). Les structures G-quadruplexes formées à partir du repliement d'un simple brin d'ADN contenant une succession du motif télomérique sont très polymorphes. Leur structure dépend fortement de la nature du cation présent dans la structure, de la nature des bases localisées aux extrémités de la séquence, de la phase (liquide vs. cristalline) et de la concentration d'oligonucléotides.<sup>8</sup> Quatre d'entre elles sont représentées sur la Figure III-2.



**Figure III-2.** Représentation schématique des séquences télomériques humaines à partir de la référence 8 : (A)  $d(\text{AGGG}(\text{TTAGGG})_3)$  en solution en présence de  $\text{Na}^+$ , (B)  $d(\text{AGGG}(\text{TTAGGG})_3)$  sous forme cristalline en présence de  $\text{K}^+$ , (C)  $d(\text{TAGGG}(\text{TTAGGG})_3)$  en solution en présence de  $\text{K}^+$  et (D)  $d(\text{TAGGG}(\text{TTAGGG})_3\text{TT})$  en solution en présence de  $\text{K}^+$ . Les boucles sont représentées en rouge et les guanines en conformation anti et syn sont coloriées en bleu et magenta, respectivement.

En solution en présence de  $\text{Na}^+$ , les structures télomériques humaines ont en général une seule conformation en forme de panier (cf. Figure III-2 (A)). En revanche, en présence de  $\text{K}^+$ , ces mêmes séquences peuvent présenter deux différentes topologies que l'on nomme Hybride 1 et Hybride 2 et dont le pourcentage dépend de

la nature des résidus terminaux.

Dans les solutions en présence de  $\text{Na}^+$ , la séquence télomérique Tel21 que j'ai étudiée adopte une structure G-quadruplexe en forme de panier antiparallèle, dans laquelle deux brins sont orientés de la même façon (Figure III-2 (A)).<sup>8-9</sup> Chaque tétrade contient deux guanines avec une conformation *syn* et deux autres avec une conformation *anti*. En présence de  $\text{K}^+$ , la séquence Tel21 présente deux conformations quadruplexes en équilibre en solution, les formes Hybride 1 et Hybride 2.<sup>10-12</sup> Dans ces structures, trois des quatre brins présentent la même orientation, une G-tétrade possède trois guanines en conformation *syn* et une guanine en conformation *anti*, tandis qu'inversement les deux autres tétrades contiennent une guanine en conformation *syn* et trois en conformations *anti*.

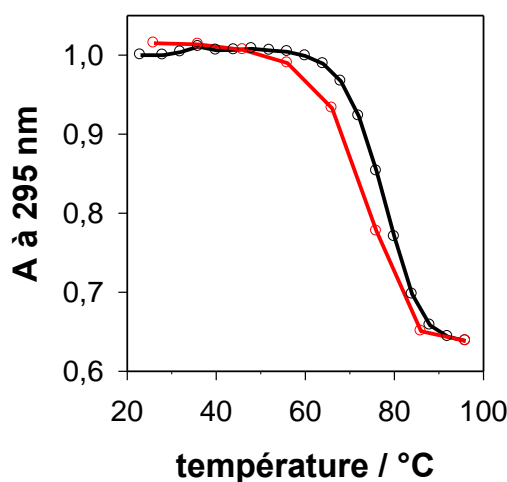
## 2.1 Préparation des G-quadruplexes télomériques

La formation des quadruplexes à partir du repliement d'un simple-brin d'ADN est indépendante de la concentration en oligonucléotides. Pour la préparation des structures G-quadruplexes à partir de la séquence Tel21, nous avons utilisé des solutions de concentration 0,25 mM d'oligonucléotides. Comme pour les quadruplexes tétramoléculaires, nous avons effectué une hybridation en chauffant les solutions à 96°C pendant 5 min, puis en les refroidissant lentement à 20°C, avec un gradient de 0,5°C/min. A la différence des quadruplexes tétramoléculaires, la formation des quadruplexes simples-brins est très rapide. L'énergie d'activation de la réaction est positive, les quadruplexes intramoléculaires se forment donc directement au cours de la procédure d'hybridation.<sup>3</sup>

La température de fusion des quadruplexes de séquence Tel21 étant inférieure à 95 °C,<sup>13</sup> la procédure d'hybridation permet de dissocier complètement les structures quadruplexes et permet d'éliminer la présence d'éventuelles structures présentant des défauts d'appariement.

## 2.2 Caractérisation des G-quadruplexes télomériques : les courbes de fusion

La Figure III-3 représente les courbes de fusion des structures G-quadruplexes intramoléculaires formées à partir de la séquence Tel21, en présence de  $K^+$ . Contrairement aux quadruplexes tétramoléculaires, les courbes d'évolution de l'absorbance à 295 nm en fonction des températures croissantes et décroissantes sont superposables, ce qui indique que les valeurs d'absorbance enregistrées à chaque température correspondent à des états à l'équilibre thermodynamique.



**Figure III-3.** Courbes de fusion des G-quadruplexes formés à partir de la séquence Tel21, en présence de  $K^+$  : en noir pour des températures croissantes, en rouge pour des températures décroissantes.

## 2.3 Pourcentage de simples-brins à l'équilibre

La constante d'association des structures G-quadruplexe formées à partir de la séquence Tel21 a été calculée à partir des paramètres thermodynamiques donnés par la référence 14 avec les équations (III-4) et (III-5).

$$\ln K_{asso} = -\frac{\Delta G^\circ}{RT} \quad (\text{III-4})$$

$$K_{asso} = \frac{1-\alpha_{eq}}{\alpha_{eq}} \quad (\text{III-5})$$

avec  $K_{asso}$  est la constante d'association,  $\Delta G^\circ$  l'enthalpie libre de la réaction (en kcal.mol<sup>-1</sup>) et  $\alpha_{eq}$  la fraction d'ADN sous forme de simples-brins.

*Table III-4. Fraction d'ADN simple-brin présente à l'équilibre thermodynamique dans des solutions de G-quadruplexes intramoléculaires formés à partir de la séquence Tel21.*

<b>Na<sup>+</sup></b>			<b>K<sup>+</sup></b>		
$\Delta G^\circ$ à 310 K (kcal. M <sup>-1</sup> )	$K_{eq}$	$\alpha_{eq}$	$\Delta G^\circ$ à 310 K (kcal. M <sup>-1</sup> )	$K_{eq}$	$\alpha_{eq}$
-3,7	404,9	0,002	-5,0	3337,7	0,0003

Quel que soit la nature du cation présent dans les solutions de Tel21, la fraction d'ADN simple-brin est négligeable et ce même jusqu'à une température de 37 °C.

## RÉFÉRENCES

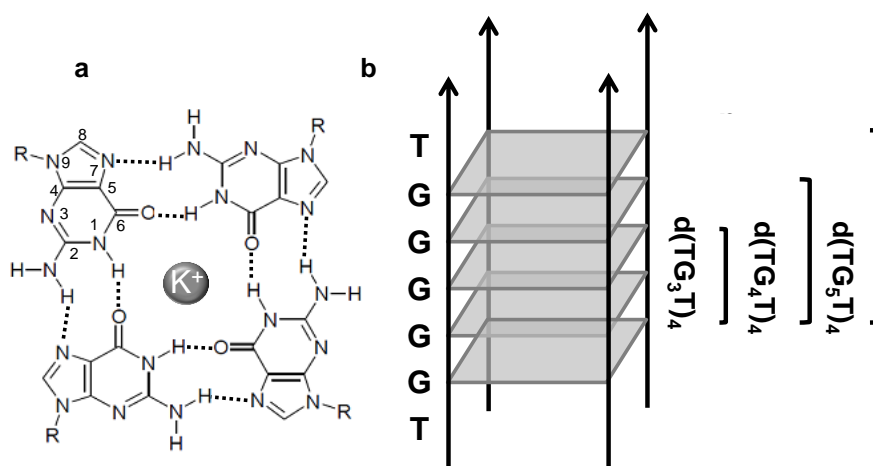
1. Mergny, J. L.; De Cian, A.; Ghelab, A.; Sacca, B.; Lacroix, L., Kinetics of tetramolecular quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 81-94.
2. Gray, R. D.; Chaires, J. B., Kinetics and mechanism of K(+)- and Na(+)-induced folding of models of human telomeric DNA into G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4191-4203.
3. Zhang, A. Y. Q.; Balasubramanian, S., The Kinetics and Folding Pathways of Intramolecular G-Quadruplex Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19297-19308.
4. Phillips, K.; Dauter, Z.; Murchie, A. I. H.; Lilley, D. M. J.; Luisi, B., The crystal structure of a parallel-stranded guanine tetraplex at 0.95 angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 171-182.
5. Bardin, C.; Leroy, J. L., The formation pathway of tetramolecular G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 477-488.
6. Lyonnais, S.; Hounsou, C.; Teulade-Fichou, M. P.; Jeusset, J.; Le Cam, E.; Mirambeau, G., 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*, 5276-5283.
7. Mergny, J. L.; Phan, A. T.; Lacroix, L., Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.* **1998**, *435*, 74-78.
8. Phan, A.-T.; Kuryavyi, V.; Luu, K. N.; Patel, D. J., Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in K<sup>+</sup> solution. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6517-6525.
9. Manet, I.; Manoli, F.; Zambelli, B.; Andreano, G.; Masi, A.; Cellai, L.; Ottani, S.; Marconi, G.; Monti, S., Complexes of the antitumoral drugs Doxorubicin and Sabarubicin with telomeric G-quadruplex in basket conformation: ground and excited state properties. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2011**, *10*, 1326-1337.
10. Dai, J. X.; Punchihewa, C.; Ambrus, A.; Chen, D.; Jones, R. A.; Yang, D. Z., Structure of the intramolecular human telomeric G-quadruplex in potassium solution: a novel adenine triple formation. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2440-2450.
11. Dai, J. X.; Carver, M.; Punchihewa, C.; Jones, R. A.; Yang, D. Z., Structure of the Hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K<sup>+</sup> solution: insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4927-4940.
12. Veglasky, V.; Tluczkova, K.; Bauer, L., The first derivative of a function of circular dichroism spectra: biophysical study of human telomeric G-quadruplex. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40*, 29-37.

13. Lane, A. N.; Chaires, J. B.; Gray, R. D.; Trent, J. O., Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5482-5515.
14. Tran, P. L. T.; Mergny, J. L.; Alberti, P., Stability of telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 3282-3294.



## Chapitre IV : Effet de taille sur la fluorescence des G-quadruplexes d(TG<sub>n</sub>T)<sub>4</sub>

Dans ce premier volet d'études, nous nous sommes intéressés à l'effet de la taille des quadruplexes sur leurs propriétés spectroscopiques. Pour cela, nous avons étudié des structures G-quadruplexes formées à partir de quatre simples brins parallèles d(TG<sub>n</sub>T)<sub>4</sub> comportant chacun, un résidu thymine à position 3' et un autre à position 5'. Rappelons que la présence des thymines en position terminale permet d'éviter les interactions entre les différents G-quadruplexes, en solution à forte concentration, qui donnent lieu à la formation de structures d'ordre supérieur. Nous avons étudié trois systèmes, en présence de cations K<sup>+</sup>: d(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>, d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> et d(TG<sub>5</sub>T)<sub>4</sub>. Ils sont constitués, respectivement, de trois, quatre et cinq quartets de guanines.

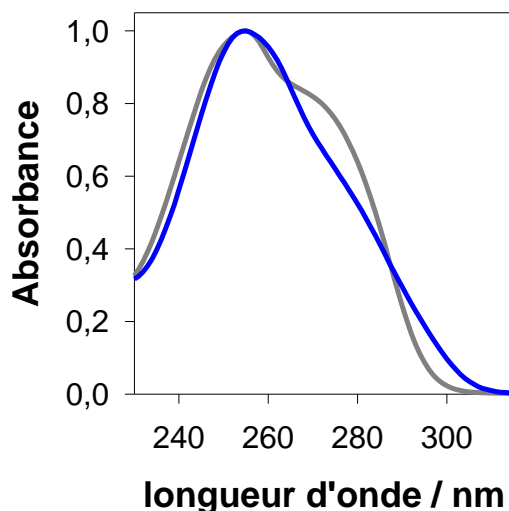


**Figure IV-1.** Représentation schématique (a) d'une tétrade de guanine en présence de K<sup>+</sup> et (b) des G-quadruplexes d(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>, d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> et d(TG<sub>5</sub>T)<sub>4</sub> constitués de trois, quatre et cinq quartets, respectivement.

Afin de mettre en évidence l'effet induit par l'addition des quartets complémentaires, en plus des observations directes, nous avons déterminé la déviation  $P^d$  d'une propriété donnée en comparant le comportement des structures G-quadruplexes à celui des monomères libres en solution:

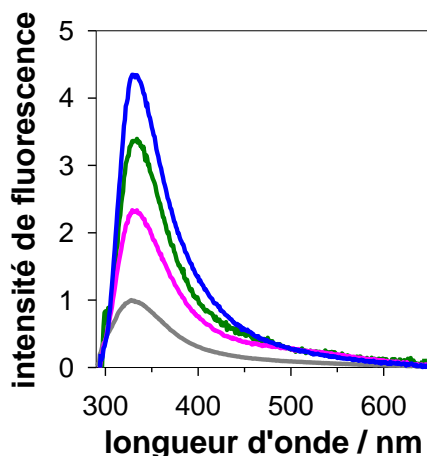
$$P^d = (P_Q - P_M)/P_M \quad (\text{IV-1})$$

Les indices  $Q$  et  $M$  désignent, respectivement, le quadruplexe et le mélange stœchiométrique de monomères correspondant.



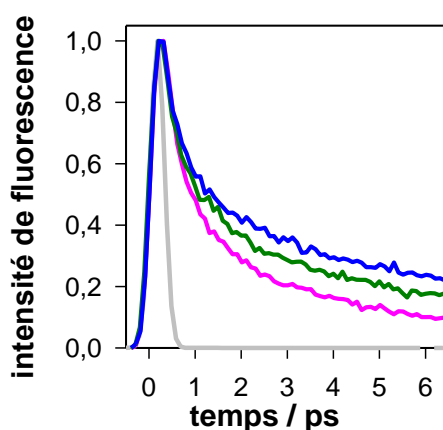
**Figure IV-2.** Spectres d'absorption normalisés de G-quadruplexes  $d(TG_5T)_4$  en présence de  $K^+$  (bleu) et du mélange stœchiométrique de monomères (gris).

Tout d'abord, nous avons comparé les spectres d'absorption normalisés des quadruplexes  $d(TG_5T)_4$  et du mélange stœchiométrique de monomères (cf. Figure IV-2). Les différences que nous observons sont typiques des structures quadruplexes déjà décrites dans la littérature.<sup>1-3</sup> Les changements les plus importants sont (i) un hypochromisme autour de 278 nm et (ii) un hyperchromisme autour de 295 nm. Ces effets ont été expliqués par l'existence d'états excitoniques au sein de la structure quadruplexe.<sup>3</sup> De façon simplifiée, nous pouvons dire que certains de ces états, ceux impliquant typiquement des guanines d'un même brin, s'apparentent à des états d'agrégats H, tandis que d'autres, ceux impliquant des guanines dans un même quartet, s'apparentent à des états d'agrégats J. D'une manière générale, le spectre d'absorption des agrégats H est déplacé vers le bleu par rapport à celui des monomères, tandis que celui des agrégats J vers le rouge.<sup>4-5</sup> Le premier effet se traduit, sur la Figure IV-2, par le déplacement de l'épaule à 278 nm vers des longueurs d'ondes rouges, et le second par l'hyperchromisme à 295 nm.



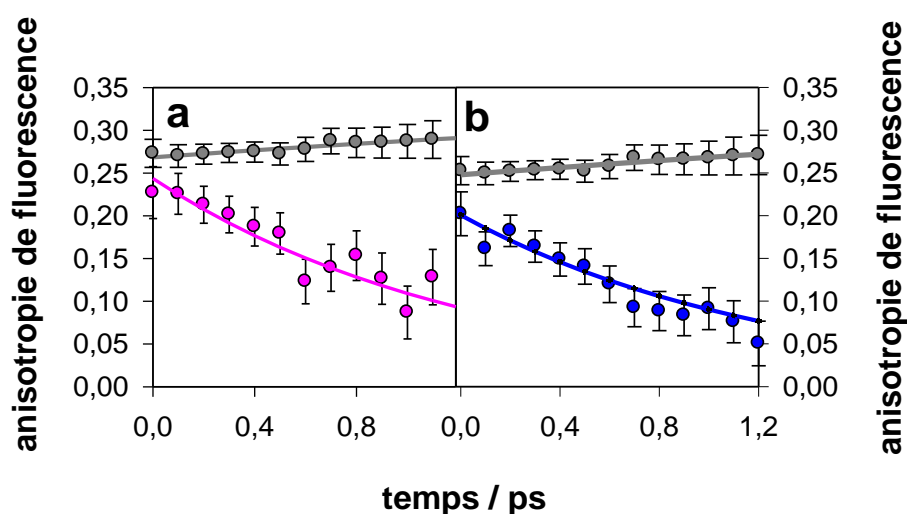
**Figure IV-3.** Spectres de fluorescence de G-quadruplexes  $d(TG_3T)_4$  (rose),  $d(TG_4T)_4$  (vert),  $d(TG_5T)_4$  (bleu) en présence de  $K^+$  et du mélange stœchiométrique de monomères correspondant à  $d(TG_5T)_4$  (gris). Les intensités de fluorescence sont représentatives des rendements quantiques de fluorescence.

Nous avons comparé les spectres de fluorescence des différents quadruplexes, obtenus en excitant à 267nm. Nous observons que les spectres de fluorescence de tous les quadruplexes présentent un maximum à la même longueur d'onde ( $\lambda_{\max} = 327 \pm 2$  nm) que ceux des mélanges stœchiométriques de mononucléotides correspondants. Ceci montre que l'émission provient principalement des états  $\pi\pi^*$  des bases.<sup>6</sup> Toutefois, nous avons observé que le rendement quantique des G-quadruplexes est supérieur à celui des monomères ( $10^{-4}$ ) et augmente sensiblement avec la taille de système :  $3,2 \cdot 10^{-4}$  pour  $d(TG_3T)_4$ ,  $4,0 \cdot 10^{-4}$  pour  $d(TG_4T)_4$  et  $5,1 \cdot 10^{-4}$  pour  $d(TG_5T)_4$ .



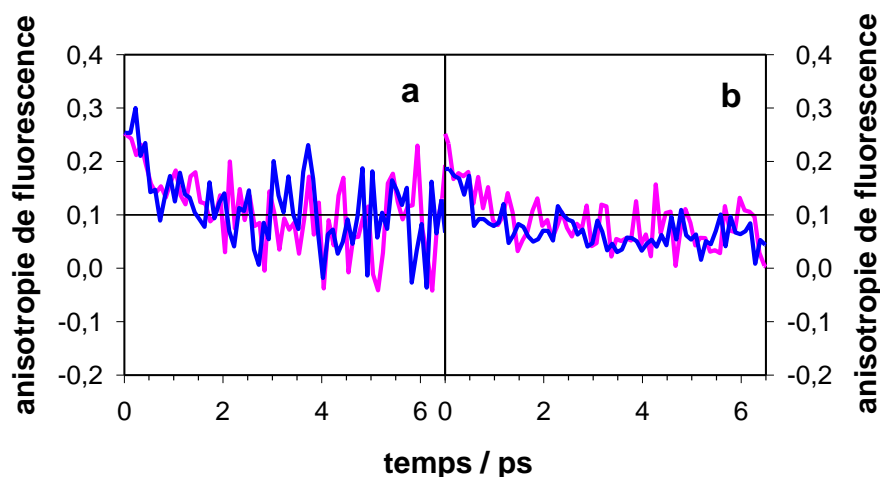
**Figure IV-4.** Déclins de fluorescence normalisés des G-quadruplexes  $d(TG_3T)_4$  (rose),  $d(TG_4T)_4$  (vert),  $d(TG_5T)_4$  (bleu), en présence de  $K^+$ , enregistrés à 330 nm par fluorescence « up-conversion ». La courbe en gris représente la fonction d'appareil.

Les déclins de fluorescence mesurés par la technique de fluorescence « up-conversion » sont représentés sur la Figure IV-4. Ils varient en fonction de la taille du système. Lorsque le nombre de quartets augmente, la durée de vie de fluorescence devient plus longue. Par ailleurs, les déclins de fluorescence des quadruplexes sont non-exponentiels. On note que le temps nécessaire pour que leur amplitude diminue par un facteur 5, est, respectivement, de 3,1 ps pour  $d(\text{TG}_3\text{T})_4$ , 5,0 ps pour  $d(\text{TG}_4\text{T})_4$  et 7,5 ps pour  $d(\text{TG}_5\text{T})_4$ .



**Figure IV-5.** Anisotropies de fluorescence des quadruplexes (a)  $d(\text{TG}_3\text{T})_4$  et (b)  $d(\text{TG}_5\text{T})_4$ , enregistrées à 330nm, par fluorescence « up-conversion ». Les cercles en gris correspondent aux anisotropies des mélanges stœchiométriques de monomères correspondants à (a)  $d(\text{TG}_3\text{T})_4$  et (b)  $d(\text{TG}_5\text{T})_4$ .

Comme illustré sur la Figure IV-5, nous avons trouvé que l'anisotropie de fluorescence de chacun des quadruplexes est plus basse que celle du mélange de monomères correspondant. Non seulement la valeur initiale de l'anisotropie des quadruplexes est plus faible que celle du mélange de monomères, mais aussi elle diminue au cours du temps à l'échelle de la picoseconde. De plus, nous observons que la déviation de l'anisotropie des quadruplexes par rapport au comportement des monomères augmente avec la taille du système. A un temps de 0,5 ps, où l'anisotropie enregistrée n'est plus influencée par la fonction d'appareil (ca. 330 fs),  $r^d$  vaut -0,43 pour  $d(\text{TG}_3\text{T})_4$ , -0,47 pour  $d(\text{TG}_4\text{T})_4$  et -0,50 pour  $d(\text{TG}_5\text{T})_4$ .



**Figure IV-6.** Anisotropies de fluorescence des quadruplexes  $d(TG_3T)_4$  (rose) et  $d(TG_5T)_4$  (bleu) enregistrées par fluorescence "Up-conversion" à (a) 310 nm et à (b) 450 nm.

Nous avons comparé l'anisotropie des quadruplexes à l'échelle de quelques picosecondes (Figure IV-6). Les anisotropies de  $d(TG_3T)_4$  et  $d(TG_5T)_4$  apparaissent identiques, si on tient compte du rapport signal par bruit. A 310 nm, les anisotropies atteignent un plateau, dont la valeur est de  $0,08 \pm 0,01$  et  $0,09 \pm 0,01$  pour  $d(TG_3T)_4$  et  $d(TG_5T)_4$ , respectivement.

Le comportement de l'anisotropie (Figure IV-5 et IV-6) des quadruplexes, comme dans l'ADN double-brin, tend à montrer qu'un transfert d'énergie ultrarapide a lieu au sein des quadruplexes. En effet, sur l'échelle sub-picoseconde, la diminution de l'anisotropie ne peut pas être due à la diffusion rotationnelle de la structure qui est nanoseconde (voir Chapitre II).<sup>7</sup> Par contre, l'existence d'états excitoniques peuplés par l'excitation à 267 nm, peut expliquer la diminution de l'anisotropie. Dans ce cas, il peut se produire une diffusion intrabande de l'énergie (*i.e.* une conversion interne entre états excitoniques) et/ou une localisation de l'excitation.<sup>8-9</sup> Dans les deux cas, les moments de transition d'absorption et d'émission sont différents. Notons que qu'une valeur d'anisotropie de 0.1 correspond à une dépolarisation de la fluorescence dans un plan,<sup>10</sup> ce qui signifie que les moments de transition d'absorption et d'émission sont distribués de façon aléatoire dans un plan perpendiculaire à un axe. Les transitions  $\pi\pi^*$  des guanines sont polarisées dans le plan aromatique qui coïncide avec le plan d'un quartet. Les états excitoniques, qui sont des combinaisons linéaires des états excités des

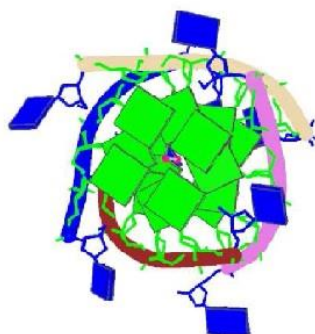
monomères, sont également polarisés dans le plan des quartets. Par conséquent, aussi bien la diffusion intrabande qu'une localisation des états excitoniques peuvent conduire à une dépolarisation de la fluorescence dans le plan des quartets, si le processus est aléatoire.

*Tableau IV-1. Déviation d'une propriété donnée en comparant le G-quadruplexe avec le mélange stœchiométrique de monomères correspondant : (A) Absorbance, ( $\Delta\nu$ ) largeur du spectre de fluorescence à mi-hauteur, ( $\Phi$ ) rendement quantique de fluorescence, ( $r(0,5)$ ) anisotropie de fluorescence enregistrée par fluorescence "up-conversion" à 0,5 ps.*

$P^d$	d(TG <sub>3</sub> T) <sub>4</sub>	d(TG <sub>4</sub> T) <sub>4</sub>	d(TG <sub>5</sub> T) <sub>4</sub>	G-wires <sup>3</sup>
$A^d$ à 278 nm	-0.14	-0.17	-0.19	
$\Delta\nu^d$ [cm <sup>-1</sup> ]	-0.06	-0.18	-0.21	-0.44
$\Phi^d$	1.3	1.9	2.8	6.1
$r^d(0,5)$ à 330 nm	-0.41	-0.47	-0.50	-

Nous avons rassemblé, dans le Tableau IV-1, les déviations  $P^d$  observées pour les différentes propriétés spectroscopiques des quadruplexes. Dans tous les cas, nous observons une augmentation de  $P^d$  lorsque la taille du quadruplexe augmente. Ceci indique qu'en augmentant la taille, le caractère excitonique des états Franck-Condon est renforcé, ce qui expliquerait le transfert d'énergie plus efficace à l'échelle de temps sub-picoseconde. Néanmoins, la question se pose de savoir si les états émissifs sont également délocalisés sur plusieurs guanines. Nous devons garder à l'esprit que les thymines situées aux extrémités des quadruplexes participent également à l'émission, mais que leur durée de vie ne devrait pas dépasser 1-2 ps si elles conservent un comportement monomérique.<sup>11</sup> Concernant les états excités localisés sur les guanines individuelles, il existe deux études dans la littérature qui rationalisent la relaxation de leur état excité.<sup>6, 12</sup> Des expériences de spectroscopie femtoseconde associées à des calculs de chimie quantique ont montré que la désactivation ultrarapide de dGMP libre en solution est due à un mouvement hors du plan de faible amplitude du groupement amino en position 2.<sup>6, 13</sup> Au sein des quadruplexes (Figure IV-1), ce groupement participe aux liaisons hydrogène qui relient les guanines entre elles. Il est donc probable qu'en empêchant le mouvement du groupement amino des guanines, les processus

non-radiatifs soient ralentis, ce qui rallongerait la durée de vie de l'état excité localisé sur une seule guanine dans les structures quadruplexes, par rapport celle de dGMP libre en solution. Ce phénomène devrait être toutefois indépendant de la taille de la structure quadruplexe dans laquelle les quartets de guanines adoptent une configuration "décalée" (cf. Figure IV-7) qui, en principe, ne gêne pas le mouvement des groupements amino. De plus, il est noté dans la littérature, que dans des verres organiques à basses températures, où les mouvements sont bloqués, la durée de vie de fluorescence du dGMP est toujours plus courte que celle de G-quadruplexes.<sup>12</sup> Suivant ces raisonnements, nous pouvons conclure que l'émission de fluorescence peut être due aussi bien à des états localisés qu'à des états délocalisés, et que la contribution de ces derniers augmente avec la taille de quadruplexes. L'ensemble de ces résultats font l'objet d'une publication dans "Physical Chemistry Chemical Physics" donnée en annexe du manuscrit.



**Figure IV-7.** Structure cristallographique des quadruplexes  $d(TG_4T)_4$  en présence de  $Na^+$ , d'après les données de PDB, 2O4F.

## RÉFÉRENCES

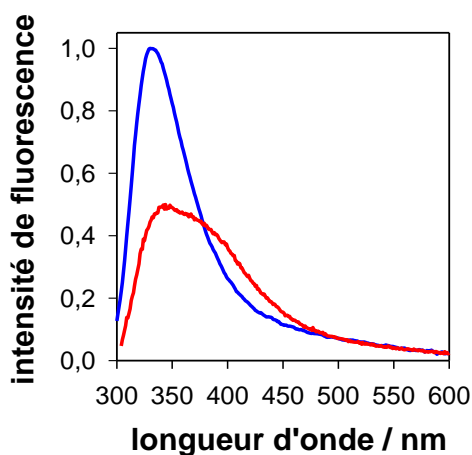
1. Mergny, J.-L.; Phan, A.-T.; Lacroix, L., Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.* **1998**, *435*, 74-78.
2. Miannay, F. A.; Banyasz, A.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D., Excited states and energy transfer in G-quadruplexes. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 11760-11765.
3. Changenet-Barret, P.; Emanuele, E.; Gustavsson, T.; Improta, R.; Kotlyar, A. B.; Markovitsi, D.; Vaya, I.; Zakrzewska, K.; Zikich, D., Optical properties of guanine nanowires: experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 14339-14346.
4. Kasha, M.; Rawls, H. R.; El-Bayoumi, M. A., The exciton model in molecular spectroscopy. *Pure & Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371-392.
5. Spano, F. C., The Spectral Signatures of Frenkel Polarons in H- and J-Aggregates. *Accounts Chem. Res.* **2010**, *43*, 429-439.
6. Gustavsson, T.; Improta, R.; Markovitsi, D., DNA/RNA: Building Blocks of Life Under UV Irradiation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2025-2030.
7. Hua, Y.; Changenet-Barret, P.; Improta, R.; Vaya, I.; Gustavsson, T.; Kotlyar, A.; Zikich, D.; Sket, P.; Plavec, J.; Markovitsi, D., Cation effect on the electronic excited states of guanine nanostructures studied by time-resolved fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 14682-14689.
8. Sundstrom, V., Femtobiology. In *Annual Review Of Physical Chemistry*, **2008**; Vol. 59, 53-77.
9. Scholes, G. D.; Fleming, G. R.; Olaya-Castro, A.; van Grondelle, R., Lessons from nature about solar light harvesting. *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 763-774.
10. Albrecht, A. C., Polarizations and assignments of transitions - method of photoselection. *J. Mol. Spectroscopy* **1961**, *6*, 84
11. Onidas, D.; Gustavsson, T.; Lazzarotto, E.; Markovitsi, D., Fluorescence of the DNA double helix (dA)<sub>20</sub>.(dT)<sub>20</sub> studied by femtosecond spectroscopy – effect of the duplex size on the properties of the excited states. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 9644-9650.
12. Gepshtein, R.; Huppert, D.; Lubitz, I.; Amdursky, N.; Kotlyar, A. B., Radiationless transitions of G4 wires and dGMP. *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 12249-12258.
13. Karunakaran, V.; Kleinermanns, K.; Improta, R.; Kovalenko, S. A., Photoinduced dynamics of guanosine monophosphate in water from broad-band transient absorption spectroscopy and quantum-chemical calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5839-5850.



## Chapitre V : Effet de la nature du cation sur les propriétés optiques des G-quadruplexes d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>

Dans ce deuxième volet d'études, nous avons examiné dans quelle mesure la nature des cations localisés dans la cavité interne des G-quadruplexes influence leurs propriétés de fluorescence. Cette étude a été menée pour des structures quadruplexes parallèles, formées à partir quatre brins d(TG<sub>4</sub>T), en présence de deux types de cations, K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup>. Le comportement des quadruplexes en présence de K<sup>+</sup> (d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/K<sup>+</sup>) a déjà été décrit au chapitre précédent.<sup>1</sup> Nous comparons ici leurs propriétés à celles des quadruplexes de même séquence en présence de Na<sup>+</sup> (d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup>).<sup>2</sup>

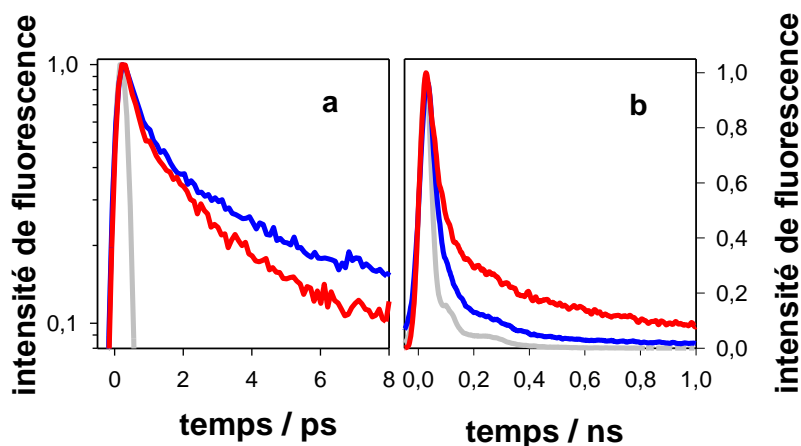
De manière intéressante, des expériences RMN effectuées par le groupe de Plavec en Sloveie ont montré que, les distances entre les différents types de protons appartenant à des guanines différentes sont identiques dans les deux systèmes, d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup> et d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/K<sup>+</sup>. Ceci indique que l'arrangement des chromophores monomériques dans les structures quadruplexes à l'état fondamental reste la même en présence de K<sup>+</sup> ou de Na<sup>+</sup>. En accord avec ces résultats, nous avons observé que les spectres d'absorption de d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup> et d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/K<sup>+</sup> sont identiques, aussi bien au niveau de leur forme que de leur coefficient d'absorption molaire. Cela suggère que l'absorption des photons implique les mêmes états Franck-Condon. Par contre, nous observons que les spectres de fluorescence sont bien différents (*cf.* Figure V-1).



**Figure V-1.** Spectre de fluorescence des G-quadruplexes d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/K<sup>+</sup> (bleu) et d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup> (rouge). Les intensités de fluorescence sont représentatives des rendements quantiques de fluorescence.

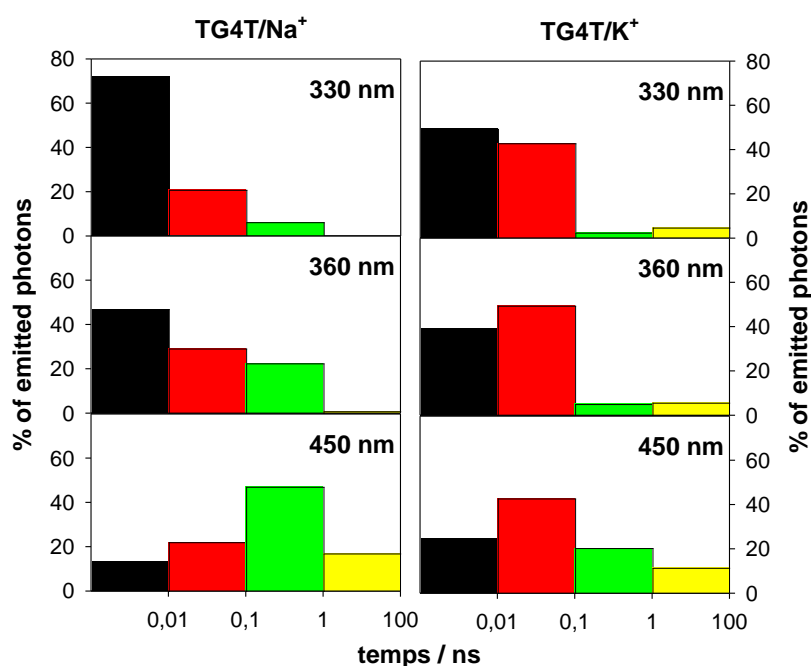
La bande qui correspond à l'émission  $\pi\pi^*$  des bases (autour de 330 nm),<sup>3-4</sup> qui domine le spectre de  $d(TG_4T)_4/K^+$ , est aussi présente avec  $Na^+$ , mais son intensité diminue de moitié et un épaulement apparaît vers des longueurs d'onde rouges (autour de 420 nm). Notons, que la présence d'une bande de fluorescence autour de 400-420 nm a également été observée dans d'autres séquences d'ADN, a été attribuée à l'émission d'états à caractère de transfert de charge.<sup>5-6</sup> Nous supposons ici que la bande de fluorescence rouge de  $d(TG_4T)_4/Na^+$  pourrait également provenir des états à caractère de transfert de charge.

Nous avons observé que les déclinés de fluorescence de  $d(TG_4T)_4/Na^+$ , enregistrés par fluorescence « up-conversion », à des longueurs d'ondes d'émission allant de 310 à 450 nm, sont plus rapides que ceux de  $d(TG_4T)_4/K^+$ . Rappelons, que cette technique permet de sonder des transitions fortes ( $\pi\pi^*$ ). Par contre, avec la technique du comptage de photons uniques corrélés en temps, qui détecte l'ensemble des photons (transitions fortes et faibles), nous observons l'effet inverse: les déclinés de fluorescence de  $d(TG_4T)_4/Na^+$  dans le régime pico-nanoseconde sont plus longs que ceux en présence de  $K^+$ . La Figure V-2 compare (a) les déclinés enregistrés à 330 nm par fluorescence "up-conversion" et (b) ceux enregistrés à 420 nm par comptage de photons uniques, pour  $d(TG_4T)_4$  en présence de  $Na^+$  et  $K^+$ . Il apparaît clairement qu'en présence de  $Na^+$ , la désactivation des états  $\pi\pi^*$  est accélérée à l'échelle picoseconde et que le nombre de photons émis à l'échelle sub-nanoseconde augmente.



**Figure V-2.** Déclinés de fluorescence des G-quadruplexes  $d(TG_4T)_4/K^+$  (bleu) et  $d(TG_4T)_4/Na^+$  (rouge) enregistrés (a) à 330 nm par fluorescence « up-conversion » et (b) à 420 nm par comptage de photons uniques.

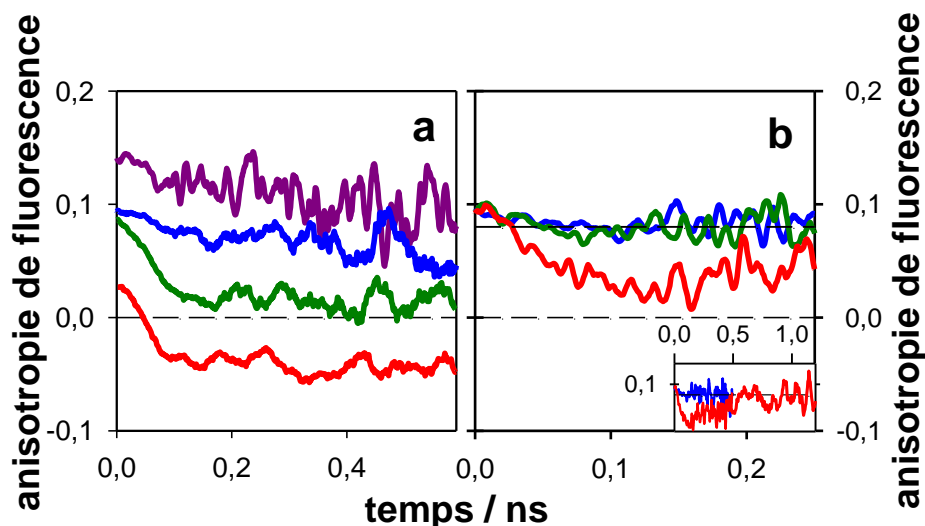
Les déclin de fluorescence ne peuvent pas être décrits par des fonctions mono-exponentielles, comme pour tous les systèmes d'ADN. Ces déclin multi-exponentiels ont été attribués à l'existence de mouvements conformationnels capables d'affecter le couplage électronique entre les chromophores et, par conséquent, les propriétés des états collectifs (excitons  $\pi\pi^*$  ou états à caractère de transfert de charge).<sup>7-15</sup> Afin d'obtenir une description quantitative des déclin de fluorescence et de nous affranchir de la fonction de l'appareil, nous avons effectué des ajustements paramétriques des déclin obtenus par comptage de photons uniques, avec des fonctions multi-exponentiels. Nous avons ensuite utilisés les paramètres de ces ajustements (durées de vie et facteurs préexponentiels) pour construire les histogrammes représentés sur la Figure V-3, ci-dessous.



**Figure V-3.** Histogrammes construits à partir des paramètres des ajustements paramétriques des déclin de fluorescence des quadruplexes  $d(TG_4T)_4$  enregistrés par comptage de photons uniques.

Ces histogrammes représentent le pourcentage des photons émis par décade de temps, à une longueur d'onde donnée. Nous observons que, pour les deux systèmes, le pourcentage de photons émis avant 10 ps diminue lorsque la longueur d'onde d'émission augmente. Pour  $d(TG_4T)_4/Na^+$  à 450 nm, la majorité des photons est émise pendant l'intervalle de temps entre 0,1 et 1 ns, ce qui n'est pas le cas pour  $d(TG_4T)_4/K^+$ .

Afin d'obtenir plus de renseignements sur la nature des transitions associées aux deux bandes d'émission de  $d(TG_4T)_4/Na^+$ , nous avons mesuré l'évolution temporelle du facteur d'anisotropie par comptage de photons uniques. Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure V-4, sur une échelle temporelle sub-nanoseconde.

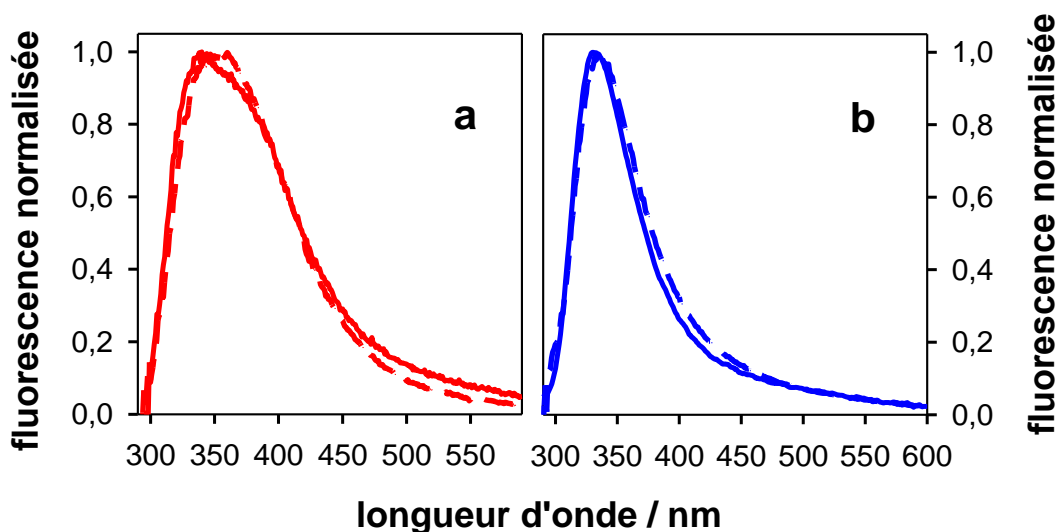


**Figure V-4.** Anisotropies de fluorescence des quadruplexes (a)  $d(TG_4T)_4/Na^+$  et (b)  $d(TG_4T)_4/K^+$  enregistrées par comptage de photons uniques à différentes longueurs d'onde d'émission : 310 nm (violet), 330 nm (bleu), 360 nm (verte) et 450 nm (rouge).

On remarque qu'après 0,1 ns, temps à partir duquel les signaux détectés ne sont plus influencés par la fonction d'appareil, l'anisotropie diminue lorsque la longueur d'onde d'émission augmente. A 450 nm, après un déclin très rapide (proche de la fonction d'appareil) l'anisotropie devient négative, ce qui indique que la lumière émise avec une polarisation en dehors du plan des guanines, en accord avec l'hypothèse d'une transition à caractère de transfert de charge impliquant deux guanines situées dans des quartets différents. Par contre, en présence de  $K^+$ , l'anisotropie à 330 et 360 nm après 0,1 ns reste positive, avec des valeurs autour de 0,1. A 450 nm, on remarque que l'anisotropie tout d'abord diminue pendant un temps de 0,16 ns puis elle revient à sa valeur initiale à 0,5 ns. Cela indique qu'à l'échelle du temps sub-nanoseconde, nous avons vraisemblablement une contribution d'états à caractère de transfert de charge dans l'émission de fluorescence, dans le régime temporel sub-nanoseconde. Celle-ci se

superpose à une émission de durée de vie plus longue qui pourrait être due à des états de type  $\pi\pi^*$ .

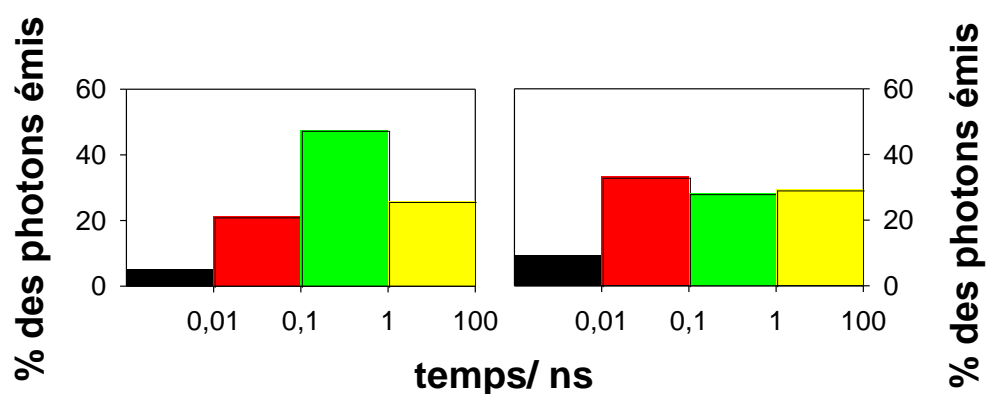
Afin de voir si l'effet de cation que nous avons observé pour  $d(TG_4T)_4$  est également valable pour d'autres structures quadruplexes, nous avons comparé nos résultats avec ceux d'une étude antérieure réalisée par P. Changenet-Barret sur des nanos-fils de guanine (« G<sub>4</sub>-wires »), formés par le repliement d'un simple brin contenant plus d'un millier de guanines.<sup>16-17</sup> La Figure V-5 montre que les spectres de fluorescence de  $d(TG_4T)_4$  et des « G<sub>4</sub>-wires » en présence de Na<sup>+</sup> ou de K<sup>+</sup> sont très similaires (cf. Figure V-5). En présence de Na<sup>+</sup> ou de K<sup>+</sup>, la partie rouge du spectre est cependant légèrement plus prononcée dans le cas des « G<sub>4</sub>-wires ». Cette petite différence pourrait être due à la participation des thymines dans le cas de  $d(TG_4T)_4$ , dont l'émission de fluorescence est plus bleue que celle des guanines.<sup>3-4</sup>



*Figure V-5. Spectre de fluorescence de  $d(TG_4T)_4$  (ligne solide) et des « G<sub>4</sub>-wires » (ligne pointillée) en présence de (a) Na<sup>+</sup> et (b) K<sup>+</sup>.*

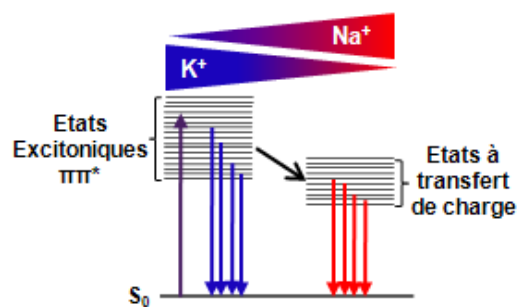
Les « G<sub>4</sub>-wires » ont également fait l'objet d'une étude par comptage de photons uniques. Leurs déclin de fluorescence sont beaucoup plus lents que ceux de  $d(TG_4T)_4$ . Pour comparaison, la Figure V-6 représente les histogrammes construits à partir des paramètres issus des ajustements paramétriques des déclin de fluorescence des « G<sub>4</sub>-wires ». On peut y voir que le nombre de photons émis après 0,1 ns

augmente avec la taille du quadruplexe. Toutefois, l'effet de cation ne varie pas avec la taille. En présence de  $\text{Na}^+$ , l'émission des photons à 450 nm a lieu principalement dans l'intervalle de temps entre 0,1 et 1 ns.



*Figure V-6. Histogrammes construits à partir des paramètres des ajustements paramétriques des déclinés de fluorescence des « G4-wires » enregistrés à 450 nm par comptage de photons uniques.*

Une étude théorique menée sur des quadruplexes contenant deux quartets de 9-Méthyl-guanine, en présence de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ , a été réalisée par R. Improta à l'aide de la théorie de la fonctionnelle de la densité dépendante du temps (TD-DFT). Les géométries des quadruplexes à l'état fondamental et dans le premier état excité à caractère de transfert de charge ont été optimisées, respectivement, avec les fonctionnelles PCM/M052X/6-31G(d) et de PCM/TD-PBE0/6-31G(d). Les calculs montrent qu'à l'état fondamental, la distance entre les deux quartets des quadruplexes est la même quel que soit le cation, en accord avec les mesures RMN.<sup>1</sup> Le cation  $\text{K}^+$  est intercalé entre les deux quartets à distance égale, tandis que le cation  $\text{Na}^+$  est plus proche d'un des deux quartets. Dans l'état excité à caractère de transfert de charge, un quartet est chargé positivement, et l'autre négativement. La localisation des cations dans cet état n'est plus la même qu'à l'état fondamental. Les cations se rapprochent du quartet chargé négativement. Le cation  $\text{Na}^+$ , qui est plus mobile que le cation  $\text{K}^+$  en raison de sa taille, est dévié d'un angle de  $5^\circ$  vers la guanine chargée négativement par rapport à l'axe central du quadruplexe, tandis que le cation  $\text{K}^+$  reste centré sur l'axe du quadruplexe.



*Figure V-7. Représentation schématique des processus induits par l'excitation des G-quadruplexes en présence de  $K^+$  ou de  $Na^+$ .*

En tenant compte de nos résultats expérimentaux et de l'étude théorique de R. Improta, nous avons formulé l'hypothèse suivante, concernant les processus de relaxation électronique dans les G-quadruplexes en présence des cations  $K^+$  ou  $Na^+$ : L'excitation à 267 nm peuple les mêmes états Franck-Condon en présence de  $K^+$  ou  $Na^+$ . Mais selon le type de cation, différentes voies de désactivation peuvent être suivies. En présence de  $K^+$ , l'émission de fluorescence semble provenir principalement des états  $\pi\pi^*$  (localisés ou délocalisés) des guanines. Tandis qu'en présence de  $Na^+$ , la mobilité des cations dans la cavité interne des quadruplexes semble favoriser la formation d'états à caractère de transfert de charge. L'ensemble de ces résultats font l'objet d'une publication dans "The Journal of Physical Chemistry C" donnée en annexe du manuscrit.

## RÉFÉRENCES

1. Hua, Y.; Chaugenet-Barret, P.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D., The effect of size on the optical properties of guanine nanostructures: a femtosecond to nanosecond study. *Physical chemistry chemical physics : PCCP* **2013**, *15*, 7396-7402.
2. Miannay, F.-A.; Banyasz, A.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D., Excited States and Energy Transfer in G-quadruplexes. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 11760-11765.
3. Onidas, D.; Markovitsi, D.; Marguet, S.; Sharonov, A.; Gustavsson, T., Fluorescence properties of DNA nucleosides and nucleotides: a refined steady-state and femtosecond investigation. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11367-11374.
4. Miannay, F. A.; Gustavsson, T.; Banyasz, A.; Markovitsi, D., Excited state dynamics of deoxy-guanosine monophosphate dGMP measured by steady-state and femtosecond fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 3256-3263.
5. Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Vayá, I., Fluorescence of DNA Duplexes: From Model Helices to Natural DNA. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 3271-3276.
6. Banyasz, A.; Gustavsson, T.; Onidas, D.; Chaugenet-Barret, P.; Markovitsi, D.; Improta, R., Multi-Pathway Excited State Relaxation of Adenine Oligomers in Aqueous Solution: A Joint Theoretical and Experimental Study. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 3762-3774.
7. Bouvier, B.; Gustavsson, T.; Markovitsi, D.; Millié, P., Dipolar coupling between electronic transitions of the DNA bases and its relevance to exciton states in double helices. *Chem. Phys.* **2002**, *275*, 75-92.
8. Bittner, E. R., Lattice theory of ultrafast excitonic and charge transfer dynamics in DNA. *J. Chem. Phys.* **2006**, *125*, 094909 (094901-094912).
9. Tonzani, S.; Schatz, G. C., Electronic excitations and spectra in single-stranded DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 7607-7612.
10. Burin, A. L.; Dickman, J. A.; Uskov, D. B.; Hebbard, C. F. F.; Schatz, G. C., Optical absorption spectra and monomer interaction in polymers: Investigation of exciton coupling in DNA hairpins. *J. Chem. Phys.* **2008**, *129*.
11. Starikov, E. B.; Cuniberti, G.; Tanaka, S., Conformation dependence of DNA exciton parentage. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 10428-10435.
12. Lange, A. W.; Herbert, J. M., Both intra- and interstrand charge-transfer excited states in aqueous B-DNA are present at energies comparable to, or just above, the  $^1\text{pp}^*$  excitonic bright states. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3913-3922.



13. Santoro, F.; Barone, V.; Improta, R., Excited States Decay of the A-T DNA: A PCM/TD-DFT Study in Aqueous Solution of the (9-Methyl-adenine)<sub>2</sub>(1-methyl-thymine)<sub>2</sub> Stacked Tetramer. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15232-15245.
14. Improta, R.; Barone, V., Interplay between “neutral” and “charge-transfer” excimers rules the excited state decay in adenine-rich polynucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 12016-12019.
15. Bouvier, B.; Dognon, J. P.; Lavery, R.; Markovitsi, D.; Millié, P.; Onidas, D.; Zakrzewska, K., Influence of conformational dynamics on the exciton states of DNA oligomers. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 13512-13522.
16. Changenet-Barret, P.; Emanuele, E.; Gustavsson, T.; Improta, R.; Kotlyar, A. B.; Markovitsi, D.; Vaya, I.; Zakrzewska, K.; Zikich, D., Optical properties of guanine nanowires: experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 14339–14346.
17. Hua, Y.; Changenet-Barret, P.; Improta, R.; Vaya, I.; Gustavsson, T.; Kotlyar, A.; Zikich, D.; Sket, P.; Plavec, J.; Markovitsi, D., Cation effect on the electronic excited states of guanine nanostructures studied by time-resolved fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 14682-14689.

# Chapitre VI : Etude spectroscopique des G-quadruplexes télomériques : d(GGG(TTAGGG)<sub>3</sub>)

Après l'étude des G-quadruplexes tétramoléculaires d(TG<sub>n</sub>T)<sub>4</sub>, nous avons choisi d'examiner des quadruplexes intramoléculaires constitués de la séquence télomérique humaine : d(GGG(TTAGGG)<sub>3</sub>) (Tel21). Ils sont formés par repliement d'un simple brin et adoptent des conformations différentes, en fonction des cations présents dans la solution.<sup>1-3</sup> Nous les avons étudiés en présence de Na<sup>+</sup> ou de K<sup>+</sup>, nous les notons par Tel21/Na<sup>+</sup> et Tel21/K<sup>+</sup>, respectivement.

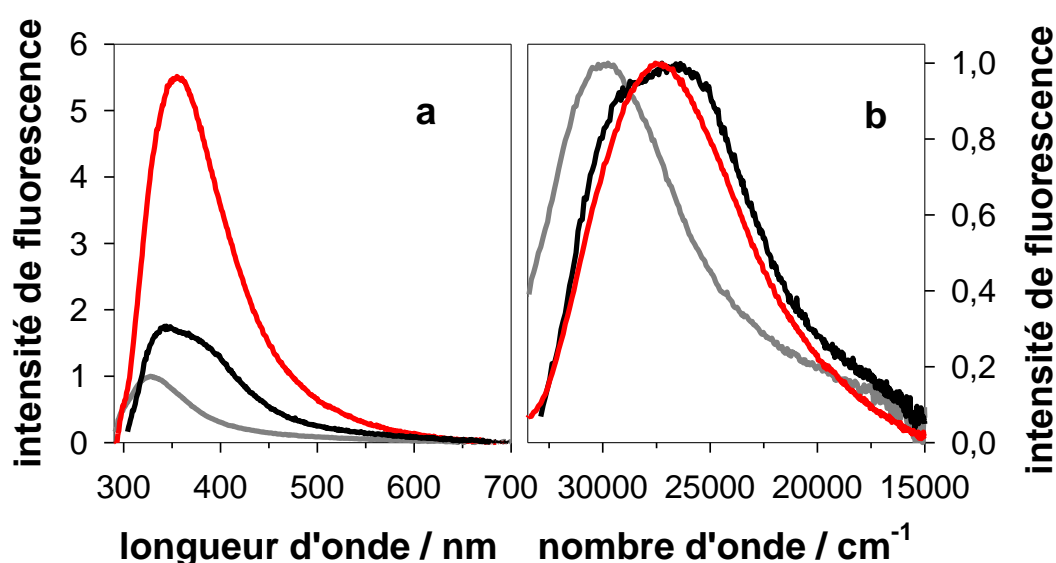
Dans un premier temps, nous comparerons les propriétés photophysiques de Tel21/Na<sup>+</sup> avec celles de d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup>. Cette comparaison a pour but de comprendre l'effet de la conformation pour un nombre de tétrades à peu près équivalent, trois pour Tel21 et quatre pour d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>. Rappelons que d(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup>, qui est constitué de trois tétrades, n'est pas stable à température ambiante. Par ailleurs, la comparaison entre d(TG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub>/K<sup>+</sup>, qui est stable à température ambiante et Tel21/K<sup>+</sup> n'est pas pertinente car la séquence télomérique présente deux conformations distinctes. Dans une deuxième étape, nous avons comparé les propriétés photophysiques de Tel21/Na<sup>+</sup> et Tel21/K<sup>+</sup>. Compte tenu du polymorphisme du deuxième, cette comparaison reste très phénoménologique.

## 1. Comparaison de Tel21 et d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> en présence d'ions Na<sup>+</sup>

### 1.1 Résultats

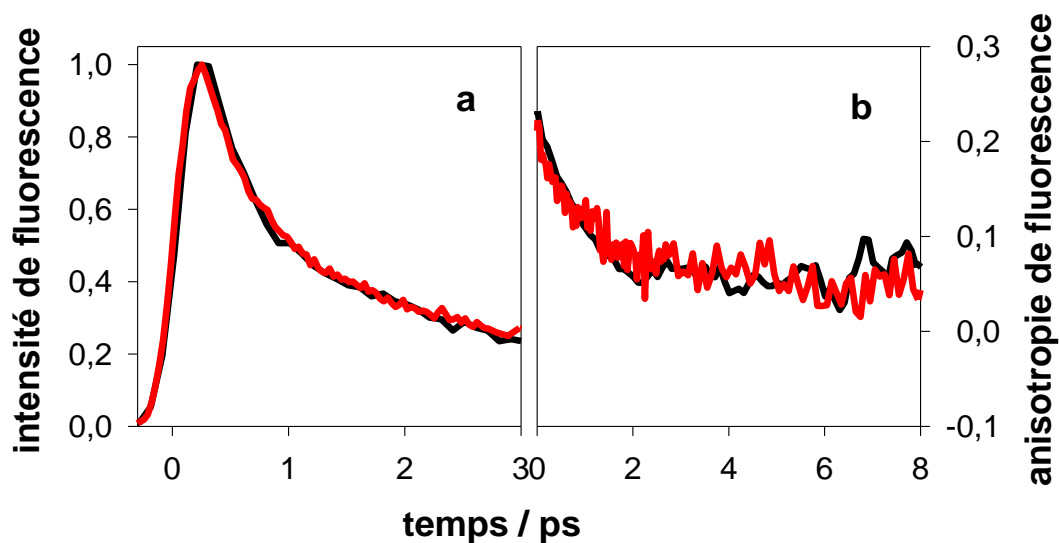
Les spectres d'absorption de Tel21/Na<sup>+</sup> et de d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub>/Na<sup>+</sup> sont assez similaires, avec un maximum à 256 nm. Par contre, leurs spectres de fluorescence bien que localisés dans le même domaine spectral, diffèrent par leur intensité et leur forme (Figure VI-1). Le rendement quantique de Tel21 ( $8,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$ ) est presque trois fois plus élevé que celui de d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> ( $3,0 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$ ). Notons que le rendement quantique des mélanges stœchiométriques de monomères est  $1,3 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$ . Le spectre du

$d(TG_4T)_4$  semble la combinaison de deux bandes d'émission car on distingue un pic à 340 nm et un épaulement autour de 380 nm. Par contre, le spectre de Tel21 ne présente qu'une bande unique, dont le pic se situe autour de 360 nm. Ces différences se reflètent sur la largeur des spectres et sont illustrées sur la Figure VI-1b. La largeur à mi-hauteur des spectres de fluorescence est de 8940 et 8100  $cm^{-1}$ , respectivement pour  $d(TG_4T)_4$  et Tel21. Le maximum du spectre de Tel21 est déplacé vers le rouge de 4200  $cm^{-1}$  par rapport à celui du mélange stœchiométrique de monomères correspondant.



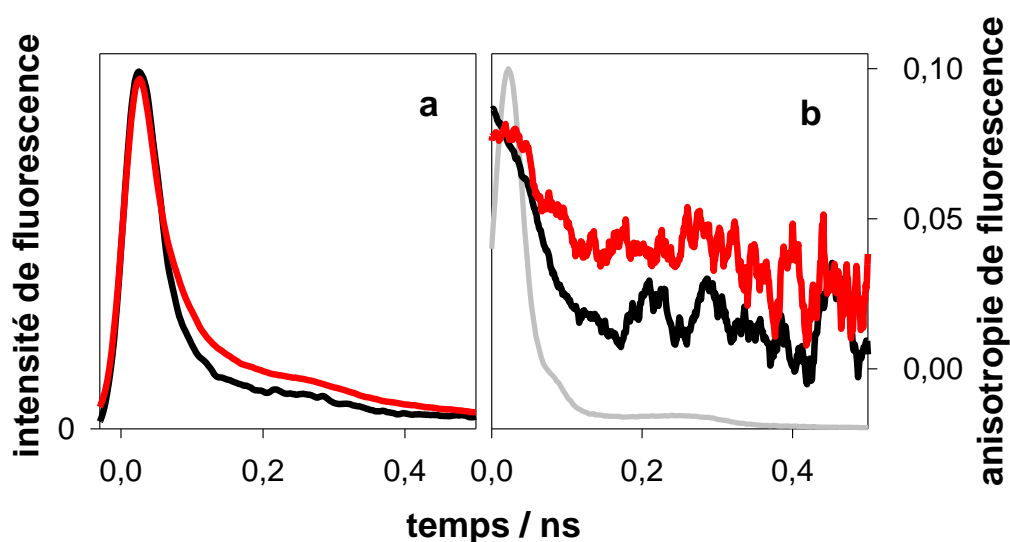
**Figure VI-1.** Spectre de fluorescence de  $d(TG_4T)_4/Na^+$  (noir), de  $Tel21/Na^+$  (rouge) et du mélange stœchiométrique de monomères correspondant à  $Tel21$  (gris). (a) Les intensités de fluorescence sont représentatives des rendements quantiques. (b) Spectres normalisés.

La Figure VI-2 montre les déclinés de fluorescence de  $Tel21/Na^+$  et la variation du facteur d'anisotropie au cours du temps obtenus par fluorescence « up-conversion ». Nous observons que, malgré les différences de leurs spectres de fluorescence stationnaires, les signaux enregistrés pour  $Tel21/Na^+$  et  $d(TG_4T)_4/Na^+$  sont identiques. Les déclinés de fluorescence sont superposables. Les anisotropies présentent également un comportement similaire, avec un déclin jusqu'à environ 2 ps suivi d'un pallier d'une amplitude de  $0,06 \pm 0,02$  (valeur moyenne entre 2 et 8 ps).



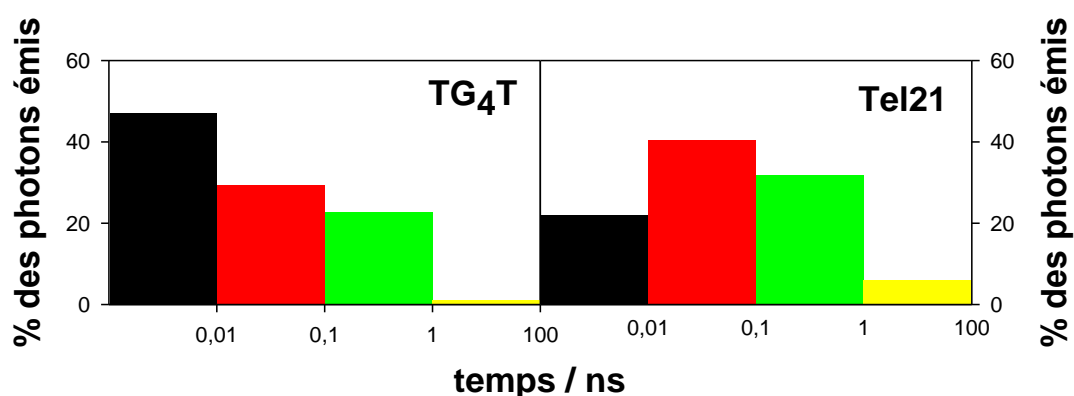
**Figure VI-2.** (a) Déclins normalisés de fluorescence et (b) anisotropies de fluorescence de  $d(TG_4T)_4/Na^+$  (noir) et de  $Tel/Na^+$  (rouge) enregistrés à 360 nm par fluorescence « up-conversion ».

Les déclins de fluorescence et la variation du facteur d'anisotropie de fluorescence au cours du temps de  $Tel21/Na^+$  et  $d(TG_4T)_4/Na^+$  enregistrés par comptage de photons uniques, à 360 nm, sur une échelle de temps sub-nanoseconde sont montrés sur la Figure VI-3. Nous observons que le déclin de fluorescence de  $Tel21$  est plus lent que celui de  $d(TG_4T)_4$ . L'anisotropie de fluorescence, après 0,1 ns, où les signaux sont peu influencés par la fonction d'appareil, est plus élevée pour  $Tel21$  que  $d(TG_4T)_4$ .



**Figure VI-3.** (a) Déclins de fluorescence normalisés et (b) anisotropies de fluorescence de  $d(TG_4T)_4/Na^+$  (noir) et de  $Tel/Na^+$  (rouge) enregistrés à 360 nm par comptage de photons uniques. La fonction d'appareil est représentée en gris.

Comme pour les quadruplexes de séquence  $d(TG_nT)_4$ , nous avons effectué des ajustements paramétriques des déclin de fluorescence de  $Tel21/Na^+$  mesurés par comptage de photons uniques, à l'aide d'une fonction multi-exponentielle. Avec les paramètres extraits des ajustements, nous avons ensuite construit l'histogramme qui représente la distribution des photons émis par décade de temps, représenté sur la Figure VI-4, avec l'histogramme correspondant à  $d(TG_4T)_4/Na^+$ . Nous remarquons que, dans le cas de  $d(TG_4T)_4$ , la moitié des photons est émise avant 10 ps, alors que pour  $Tel21$ , la majorité des photons est émise entre 10 et 100 ps.

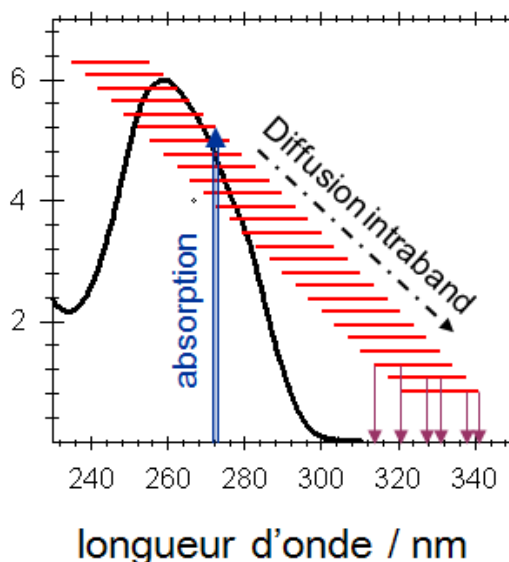


*Figure VI-4. Histogrammes construits à partir des paramètres des ajustements paramétriques des déclin de fluorescence de  $d(TG_4T)_4/Na^+$  enregistrés à 360 nm par comptage de photons uniques.*

## 1.2 Discussion

Notre étude de l'effet des cations sur la fluorescence de  $d(TG_4T)_4/Na^+$  (chapitre V) a montré que le pic de fluorescence à 340 nm est vraisemblablement dû à l'émission des états  $\pi\pi^*$  tandis que l'épaule à 380 nm serait dû à l'émission d'états à caractère de transfert de charge. Le fait que  $Tel21$  ne présente qu'une seule bande (*cf.* Figure VI-1), suggère qu'une des deux bandes d'émission est devenue prépondérante et/ou que leur écart énergétique a diminué. Cette deuxième hypothèse est basée sur le fait que l'arrangement géométrique des tétrades n'est pas le même pour les deux systèmes, ce qui peut influencer le couplage dipolaire entre les états  $\pi\pi^*$  des guanines, et donc changer l'énergie des états excitoniques. Le recouvrement des orbitales des guanines

localisées dans des tétrades voisines peut également être différent, ce qui peut aussi affecter les propriétés des états à transfert de charge. C'est l'anisotropie de fluorescence qui nous permet de distinguer entre les deux types de transition électronique. Celle correspondante à l'émission d'un état à caractère de transfert de charge est en principe plus faible que celle associée à l'émission des états  $\pi\pi^*$  qui absorbent les photons. Nous avons cherché cette information à l'échelle sub-nanoseconde, où est émise la majorité des photons dans le cas de Tel21 (Figure VI-3). L'anisotropie plus élevée de Tel21/ $\text{Na}^+$  par rapport à celle de  $\text{d}(\text{TG}_4\text{T})_4/\text{Na}^+$  suggère que, dans le cas de la séquence télomérique, l'émission provenant des états  $\pi\pi^*$  est plus importante. Cela signifie que non seulement le rendement quantique de fluorescence associé aux états  $\pi\pi^*$  a augmenté mais aussi que leur énergie a légèrement diminué.



**Figure VI-5.** Représentation schématique de la diffusion intrabande des états excitoniques.

Le fait que l'émission des états  $\pi\pi^*$  de Tel21/ $\text{Na}^+$  soit caractérisée par une énergie plus faible que celle du mélange stœchiométrique de monomères (Figure VI-1) indique qu'elle provient vraisemblablement d'états  $\pi\pi^*$  délocalisés (excitons). En effet, dans ce cas, ce sont les états localisés en bas de la bande excitonique, peuplés *via* la diffusion intra-bande qui fluorescent (*cf.* Figure VI-5). Certains d'entre eux peuvent perdurer jusqu'à quelques centaines de picosecondes. Ce comportement rappelle celui des

nano-fils de guanines dont la durée de vie des états  $\pi\pi^*$  est plus longue que celle des quadruplexes tétramoléculaires.<sup>4</sup> Par ailleurs, nous pouvons penser que la polarisation des états à transfert de charge n'est pas la même pour Tel21/ $\text{Na}^+$  et  $\text{d}(\text{TG}_4\text{T})_4/\text{Na}^+$ , à cause de leur géométrie différente. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les anisotropies de fluorescence de Tel21/ $\text{Na}^+$  et  $\text{d}(\text{TG}_4\text{T})_4/\text{Na}^+$  mesurées par comptage de photons uniques à 450 nm, où la contribution des états à transfert de charge est dominante. Les valeurs moyennes entre 200 et 600 ps sont de  $-0.032 \pm 0.009$  pour Tel21 et  $-0.043 \pm 0.007$  pour  $\text{d}(\text{TG}_4\text{T})_4$ . La différence est inférieure aux barres d'erreurs, ce qui indique une polarisation similaire des états à transfert de charge dans les deux systèmes.

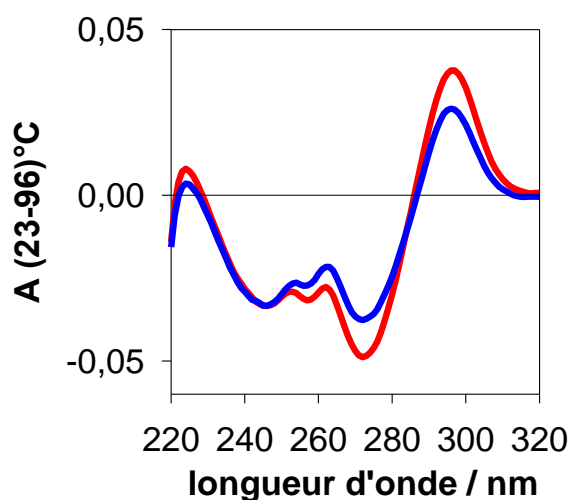
Nous expliquons la durée de vie longue des états excitoniques de Tel21 par sa structure plus rigide que celle de  $\text{d}(\text{TG}_4\text{T})_4$ . Cette rigidité structurale pourrait empêcher la localisation de l'excitation sur des bases individuelles qui est suivie par une relaxation non radiative très efficace.<sup>5</sup> Une autre explication pourrait être une différence entre la durée de vie radiative des états excitoniques des deux systèmes, qui dépend du couplage excitonique et donc de l'arrangement géométrique des chromophores.

Enfin, la grande similitude des signaux mesurés par fluorescence « up-conversion » pour Tel21/ $\text{Na}^+$  et  $\text{d}(\text{TG}_4\text{T})_4/\text{Na}^+$ , jusqu'à environ 3 ps, pourrait être due, en partie au moins, au fait qu'à cette échelle du temps nous observons principalement les déclinés des états  $\pi\pi^*$  localisés des monomères. Malgré le fait que Tel21 contienne des adénines, ces bases contribuent peu à l'émission à 360 nm. En effet, le maximum de leur spectre de fluorescence est situé à 306 nm, alors que ceux de TMP et dGMP sont localisés à 330 nm et 334 nm, respectivement.<sup>6</sup>

## 2. Comparaison des propriétés photophysiques de Tel21/Na<sup>+</sup> et Tel21/K<sup>+</sup>

### 2.1 Résultats

Bien que les spectres d'absorption de Tel21/Na<sup>+</sup> et Tel21/K<sup>+</sup> à 23°C se ressemblent, ils ne sont pas identiques. Afin de visualiser cette différence, nous avons comparé le spectre d'absorption de Tel21/Na<sup>+</sup> à celui de Tel21/K<sup>+</sup> à 23°C, où les oligo-nucléotides adoptent à >99,9% une structure quadruplexe,<sup>7</sup> avec ceux enregistrés à 96°C, où la forme simple-brin est essentiellement présente. La différence entre les spectres d'absorption des formes quadruplexes et simples-brins, pour chaque type de cation est illustrée sur la Figure VI-6. L'absorbance différentielle est plus élevée en présence de Na<sup>+</sup> qu'en présence de K<sup>+</sup>. Notons, en particulier, la présence de deux pics positifs à 225 et 297 nm et deux pics négatifs à 244 et 272 nm.

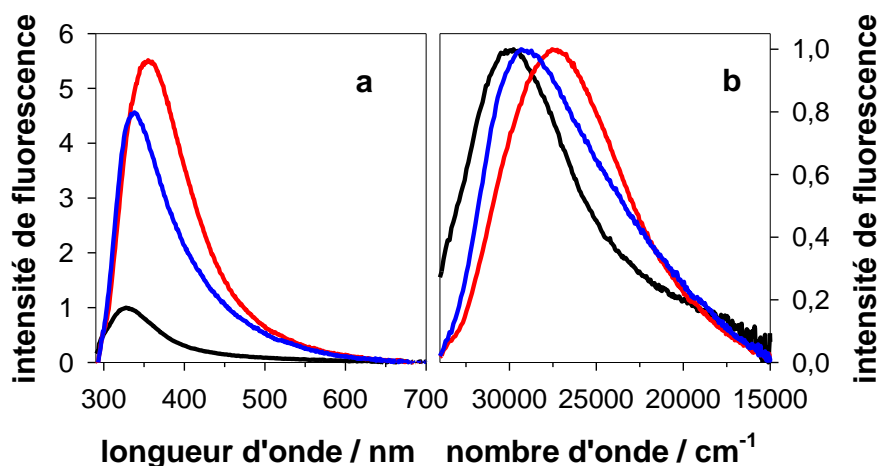


*Figure VI-6.* Absorption différentielle ( $A_{23^{\circ}\text{C}}-A_{96^{\circ}\text{C}}$ ) de Tel21/Na<sup>+</sup> (rouge) et Tel21/K<sup>+</sup> (bleu) à 23°C et 96°C.

La Figure VI-7 représente les spectres de fluorescence de Tel21/K<sup>+</sup>, Tel21/Na<sup>+</sup> et du mélange stœchiométrique de monomères. Le maximum du spectre de fluorescence de Tel21/K<sup>+</sup> est situé à 340 nm. Il est déplacé de 20 nm vers le bleu par rapport à celui de Tel21/Na<sup>+</sup> (360 nm) mais il est plus rouge que celui du mélange stœchiométrique de monomères ( $\lambda_{\text{max}} = 328$  nm). Le rendement quantique de fluorescence de Tel21/K<sup>+</sup> est de  $6,8 \pm 0,2 \cdot 10^{-4}$ , c'est-à-dire 22% plus petit que celui de Tel21/Na<sup>+</sup> ( $8,7 \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$ ).

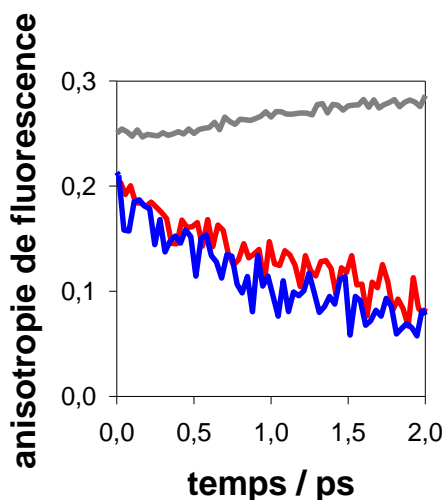


Après conversion des spectres de fluorescence en échelle d'énergie, nous trouvons leur maxima à 29330, 27550 et 29760  $\text{cm}^{-1}$  avec des largeurs à mi-hauteur de 8500, 8100 et 7500  $\text{cm}^{-1}$ , respectivement pour  $\text{Tel21}/\text{K}^+$ ,  $\text{Tel21}/\text{Na}^+$  et le mélange stœchiométrique de monomères.



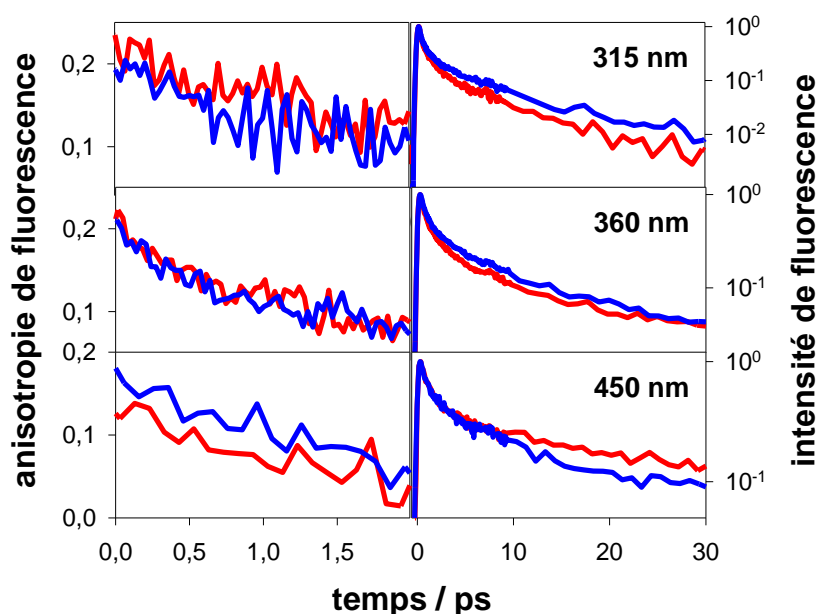
**Figure VI-7.** Spectres de fluorescence de  $\text{Tel21}/\text{Na}^+$  (rouge), de  $\text{Tel21}/\text{K}^+$  (bleu), et du mélange stœchiométrique de monomères (noir). (a) Les intensités de fluorescence sont représentatives des rendements quantiques. (b) Les spectres normalisés.

Sur la Figure VI-8 nous avons représenté l'anisotropie de fluorescence enregistrée par fluorescence « up-conversion », à 340 nm, pour  $\text{Tel21}$  en présence de  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$ , ainsi que celle correspondant au mélange stœchiométrique de monomères déterminée comme décrit au chapitre II.



**Figure VI-8.** Anisotropies de fluorescence de  $\text{Tel21}/\text{Na}^+$  (rouge) et de  $\text{Tel21}/\text{K}^+$  (bleu) à 340 nm enregistrées par fluorescence « up-conversion ». L'anisotropie du mélange stœchiométrique de monomères est représentée en gris.

Nous observons que l'anisotropie initiale des quadruplexes ( $0,21 \pm 0,02$ ) est plus faible que celle de monomères ( $0,25 \pm 0,01$ ). L'anisotropie de fluorescence des monomères augmente légèrement au cours du temps. Cet effet est dû aux déclin de fluorescence plus rapides des purines associés à des anisotropies plus faibles (dAMP : 0,24 et dGMP : 0,15) que celle du TMP (0,36).<sup>6</sup> Par contre, l'anisotropie des quadruplexes décroît entre 0 et 2 ps, la décroissance étant légèrement plus rapide en présence de  $K^+$ .



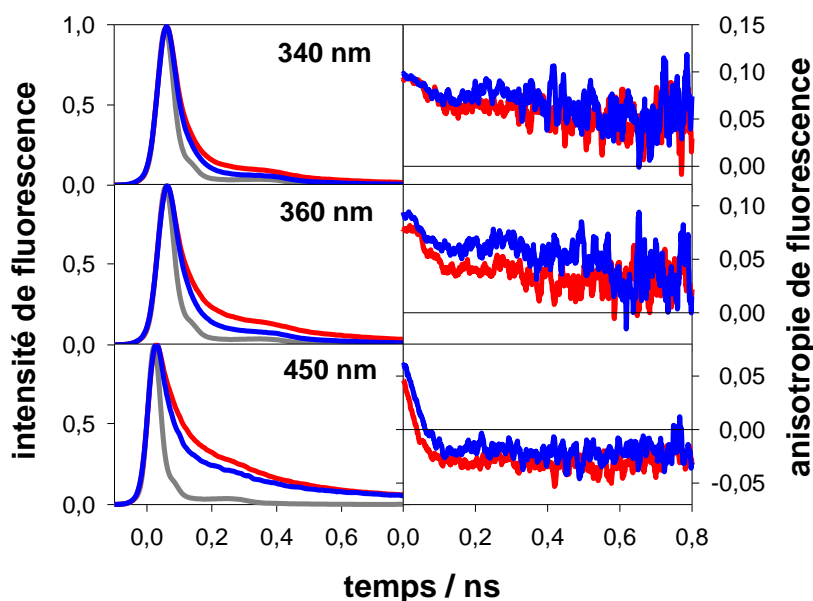
**Figure VI-9.** Anisotropies de fluorescence (à gauche) et déclin de fluorescence (à droite) enregistrés par fluorescence « up-conversion » pour Tel21/Na<sup>+</sup> (rouge) et Tel21/K<sup>+</sup> (bleu).

A toutes les longueurs d'onde d'émission mesurées, nous observons un déclin de l'anisotropie de fluorescence des quadruplexes jusqu'à 2 ps (Figure VI-9), suivi d'un palier jusqu'à 8 ps (non-représenté). Au-delà de 8 ps les signaux deviennent trop bruités pour être analysés. La position relative des anisotropies de Tel21/K<sup>+</sup> et Tel21/Na<sup>+</sup> n'est pas toujours la même. En particulier, sur le côté rouge des spectres de fluorescence, l'anisotropie de Tel21/Na<sup>+</sup> est plus faible que celle de Tel21/K<sup>+</sup>, alors que c'est l'inverse à 315 et 340 nm. A 360 nm, l'anisotropie de Tel21 en présence de K<sup>+</sup> et celle en présence de Na<sup>+</sup> sont superposables. Cette tendance est également observée sur l'amplitude des paliers des anisotropies rassemblées dans la Table VI-1. Nous constatons que la variation d'anisotropie avec la longueur d'onde d'émission semble plus importante en présence de Na<sup>+</sup> que de K<sup>+</sup>.

**Tableau VI-1. Amplitudes moyennes des paliers des anisotropies de Tel21/Na<sup>+</sup> et Tel21/K<sup>+</sup>, entre 2 et 8 ps (cf. Figure VI-2, en fonction de la longueur d'onde d'émission).**

$\lambda_{\text{ém}}$	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
<b>315 nm</b>	0,12 ± 0,06	0,08 ± 0,05
<b>340 nm</b>	0,09 ± 0,02	0,07 ± 0,02
<b>360 nm</b>	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,02
<b>450 nm</b>	0,03 ± 0,03	0,06 ± 0,03

L'effet du cation sur les déclin de fluorescence de Tel21 change en fonction de la longueur d'onde d'émission. De 315 à 360 nm, les déclin de Tel21/K<sup>+</sup> sont plus lents que ceux de Tel21/Na<sup>+</sup>. Par contre, les signaux enregistrés à 450 nm pour les quadruplexes en présence des deux types de cations sont identiques jusqu'à environ 8 ps, puis celui de Tel21/Na<sup>+</sup> devient plus lent.

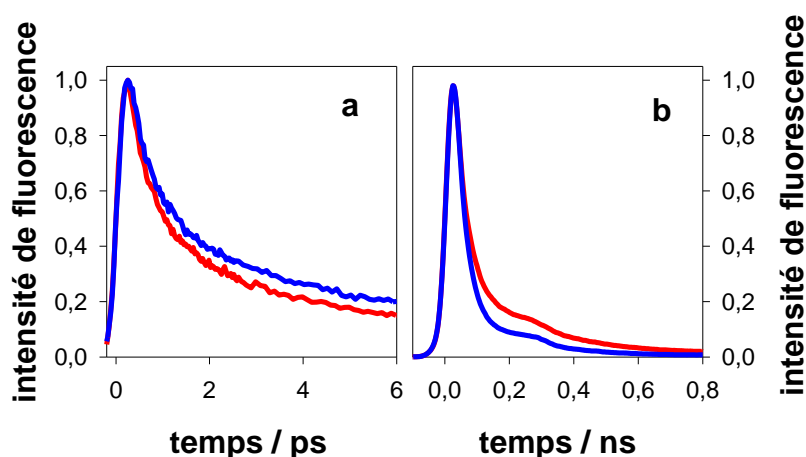


**Figure VI-10. Déclin de fluorescence (à gauche) et anisotropies de fluorescence (à droite) enregistrés par comptage de photons uniques pour Tel21/Na<sup>+</sup> (rouge) et Tel21/K<sup>+</sup> (bleu). La fonction d'appareil est représentée en gris.**

Les déclin de fluorescence et d'anisotropie de fluorescence enregistrés par comptage de photons uniques sont présentés sur la Figure VI-10. Nous observons que, pour toutes les longueurs d'onde d'émission, le déclin de Tel21/Na<sup>+</sup> est plus lent que

celui de  $\text{Tel21}/\text{K}^+$ , et que l'anisotropie de fluorescence de  $\text{Tel21}/\text{Na}^+$  est plus faible que celle de  $\text{Tel21}/\text{K}^+$ . De plus, nous avons remarqué que, lorsque la longueur d'onde d'émission augmente, les déclin de fluorescence, quelque soit le cation présent, sont ralentis et l'anisotropie de fluorescence devient plus faible et atteint même des valeurs négatives à 450 nm.

Sur la Figure VI-11, nous comparons les déclin de  $\text{Tel21}/\text{K}^+$  et  $\text{Tel21}/\text{Na}^+$  obtenus par fluorescence « up-conversion », qui permet de sonder la fluorescence associées aux transitions fortement permises, et par comptage de photons uniques, qui sonde la fluorescence associée aussi bien aux transitions fortement permises que faiblement permises. Nous observons que les déclin enregistrés par la première technique, sont plus lents pour  $\text{Tel21}/\text{K}^+$  que ceux de  $\text{Tel21}/\text{Na}^+$ , alors que l'effet inverse est observé pour les déclin mesurés par la seconde technique.



*Figure VI-11. Déclin de fluorescence de  $\text{Tel21}/\text{Na}^+$  (rouge) et  $\text{Tel21}/\text{K}^+$  (bleu) enregistrés à 360 nm par (a) fluorescence « up-conversion » et par (b) comptage de photons uniques.*

## 2.2 Discussion

Nous avons vu au Chapitre V, que dans le cas de  $\text{d}(\text{TG}_4\text{T})_4$ , il n'y pas de différence entre les spectre d'absorptions enregistrés en présence de  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{K}^+$ . Nous avons alors déduit que les états excitoniques Franck-Condon peuplés sont les mêmes quelque soit la nature des cations présents en solution. Ceci s'explique par l'arrangement similaire des tétrades observé par RMN.<sup>8</sup> Dans le cas de  $\text{Tel21}$ , les quadruplexes

adoptent une conformation de type « panier » en présence de  $\text{Na}^+$ , alors qu'en présence  $\text{K}^+$ , les quadruplexes présentent deux conformations dites "hybrides".<sup>1-3</sup> De telles différences structurales peuvent expliquer les différences spectrales observées sur la Figure VI-6. Notons qu'à 96°C, les grandes fluctuations conformationnelles minimisent, *à priori*, les effets collectifs. Les variations plus grandes du spectre d'absorption différentielle en présence de  $\text{Na}^+$ , indique que le caractère collectif des états Franck-Condon est plus prononcé pour quadruplexes formés en présence  $\text{Na}^+$  que de  $\text{K}^+$ .

Etant donné que les états Franck-Condon ne sont pas les mêmes dans  $\text{Tel21}/\text{K}^+$  et  $\text{Tel21}/\text{Na}^+$ , les différences observées sur leur propriétés de fluorescence pourraient être aussi bien dues au peuplement d'états Franck Condon différents qu'à des mécanismes de relaxation différents des états excités. Nous avons trouvé quelques points communs concernant les effets de cations entre  $\text{Tel21}$ ,  $\text{d}(\text{TG}_4\text{T})_4$  et les nano-fils de guanine. Pour tous les trois systèmes, nous constatons que:

- leurs spectres de fluorescence sont déplacés vers les basses énergies, en présence de  $\text{Na}^+$  vs.  $\text{K}^+$ . Le déplacement des spectres correspond à 1800, 2500 et de 2800  $\text{cm}^{-1}$  pour  $\text{Tel21}$ ,  $\text{d}(\text{TG}_4\text{T})_4$  et les nano-fils de guanine, respectivement.
- En présence de  $\text{Na}^+$ , l'anisotropie de fluorescence à échelle sub-nanoseconde varie plus fortement avec la longueur d'onde d'émission qu'en présence de  $\text{K}^+$  et devient même négative dans l'aile rouge du spectre de fluorescence. (Ces données n'existent pas pour les nano-fils).
- Dans l'aile rouge des spectres de fluorescence, la proportion des photons émis sur une échelle temporelle sub-nanoseconde est plus élevée en présence de  $\text{Na}^+$  que de  $\text{K}^+$ .
- Dans l'aile bleue des spectres de fluorescence, les déclin de fluorescence sur une échelle temporelle de 10 ps sont plus rapides en présence de  $\text{Na}^+$  que de  $\text{K}^+$ . (Ces données n'existent pas pour les nano-fils).

L'ensemble de ces observations semble donc monter que l'interprétation que nous avons proposée pour  $\text{d}(\text{TG}_4\text{T})_4$  et les nano-fils de guanine reste valable pour  $\text{Tel21}$ , *i.e.*

la présence de cation  $\text{Na}^+$  favoriserait la relaxation des états  $\pi\pi^*$  vers des états à caractère de transfert de charge. Néanmoins, la contribution des états  $\pi\pi^*$  à la fluorescence de Tel21 est plus importante, et ce même en présence de  $\text{Na}^+$ . Nos résultats ne permettent pas de savoir si cela est dû à une efficacité moindre du piégeage des excitons  $\pi\pi^*$  par les états à caractère de transfert de charge et/ou à une efficacité moindre des processus de relaxation non-radiative vers l'état fondamental. Toutefois, le couplage entre les états  $\pi\pi^*$  et les états à transfert de charge semble être plus fort dans le cas du Tel21/ $\text{Na}^+$ , comme l'indique l'anisotropie plus basse mesurée à 450 nm sur la gamme temporelle 0-2 ps (Figure VI-9). Sachant que la technique de fluorescence « up-conversion » détecte la fluorescence associée à des transitions fortement permises, les signaux observés semblent indiquer l'existence d'états  $\pi\pi^*$  possédant déjà un caractère partiel de transfert de charge.

## RÉFÉRENCES

1. Phan, A.-T.; Kuryavyi, V.; Luu, K. N.; Patel, D. J., Structure of two intramolecular G-quadruplexes formed by natural human telomere sequences in  $K^+$  solution. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6517-6525.
2. Lane, A. N.; Chaires, J. B.; Gray, R. D.; Trent, J. O., Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5482-5515.
3. Wang, Y.; Patel, D. J., Solution structure of the human telomeric repeat dAG(3)(T(2)AG(3))<sub>3</sub> G-tetraplex. *Structure* **1993**, *1*, 263-282.
4. Changenet-Barret, P.; Emanuele, E.; Gustavsson, T.; Improta, R.; Kotlyar, A. B.; Markovitsi, D.; Vaya, I.; Zakrzewska, K.; Zikich, D., Optical properties of guanine nanowires: experimental and theoretical study. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 14339-14346.
5. Gustavsson, T.; Improta, R.; Markovitsi, D., DNA/RNA: Building Blocks of Life Under UV Irradiation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, *1*, 2025-2030.
6. Onidas, D.; Markovitsi, D.; Marguet, S.; Sharonov, A.; Gustavsson, T., Fluorescence properties of DNA nucleosides and nucleotides: a refined steady-state and femtosecond investigation. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 11367-11374.
7. Tran, P. L. T.; Mergny, J. L.; Alberti, P., Stability of telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 3282-3294.
8. Hua, Y.; Changenet-Barret, P.; Improta, R.; Vaya, I.; Gustavsson, T.; Kotlyar, A.; Zikich, D.; Sket, P.; Plavec, J.; Markovitsi, D., Cation effect on the electronic excited states of guanine nanostructures studied by time-resolved fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 14682-14689.

## Chapitre VII : Conclusions et perspectives

Pendant ce travail de thèse, nous avons étudié l'influence des paramètres structuraux sur les propriétés photophysiques de nanostructures de guanine. En étudiant des structures G-quadruplexes formées par l'association de quatre simples-brins de longueur variable, nous avons, dans un premier temps, examiné l'effet de la taille des nano-structures sur leur propriétés photophysiques. Puis dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au rôle des cations dans la cavité interne des G-quadruplexes. Enfin, en comparant les propriétés des G-quadruplexes tétramoléculaires avec ceux formés par repliement d'un simple brin, nous avons cherché l'influence de la conformation qui détermine l'arrangement géométrique entre les tétrades sur leurs propriétés photophysiques. L'ensemble des résultats obtenus ont été interprétés de la manière suivante:

- Les états Franck-Condon

La possibilité d'une délocalisation de l'excitation sur plusieurs guanines avait déjà été décrite auparavant d'un point de vue théorique. Nous l'avons mise en évidence expérimentalement, en comparant l'écart entre les spectres d'absorption des structures G-quadruplexes avec ceux de leurs chromophores monomériques en absence d'interaction. Nous avons ainsi pu constater que le caractère collectif des états Franck-Condon est renforcé lorsque le nombre de tétrades augmente et dépend de la conformation de la structure quadruplexe.

- Le transfert d'énergie

Nous avons étudié le transfert de l'énergie d'excitation au sein des G-quadruplexes en mesurant l'anisotropie de fluorescence sur une échelle temporelle sub-picoseconde, lorsque les mouvements conformationnels sont figés. Pour tous les systèmes examinés, nous avons trouvé que l'anisotropie des G-quadruplexes est plus basse que celle des monomères en absence d'interaction. Nous attribuons cette diminution de l'anisotropie



à un transfert de l'énergie d'excitation ultrarapide entre les bases. L'efficacité de ce transfert d'énergie ultrarapide augmente avec la taille des G-quadruplexes, en accord avec l'idée d'un renforcement de la nature excitonique des états Franck-Condon. Nous avons observé que ce transfert d'énergie conduit à une dépolarisation de la fluorescence dans le plan des quartets des états  $\pi\pi^*$ , à des temps inférieurs à 2 ps.

- L'émission des états  $\pi\pi^*$

La contribution des états excitoniques à l'émission de fluorescence semble favorisée par la rigidité structurale des G-quadruplexes. Celle-ci est renforcée par l'augmentation du nombre des tétrades ou par les conformations issues du repliement d'un simple-brin. L'émission à partir des états  $\pi\pi^*$ , qui est bien que plus importante sur la gamme temporelle de 0-10 ps, peut s'étaler sur plusieurs décades de temps, jusqu'à la nanoseconde.

- Les états à caractère de transfert de charge

La présence des cations  $\text{Na}^+$  dans la cavité centrale des G-quadruplexes favorise le piégeage des états  $\pi\pi^*$  par des états à caractère de transfert de charge, du fait de leur taille plus petite et de leur mobilité plus grande que celles des cations  $\text{K}^+$ . Les états à transfert de charge impliquent des guanines situées dans des tétrades différentes. Ils émettent dans le visible. Ils ont une durée de vie sub-nanoseconde et sont caractérisés par une anisotropie de fluorescence négative.

Ce travail de thèse ouvre de nouvelles perspectives en vue de mieux comprendre le rôle des paramètres structuraux sur les propriétés photophysiques des G-quadruplexes.

Tout d'abord, nos résultats sur l'effet de conformation nous ont amené à formuler certaines hypothèses. Ainsi nous avons postulé que l'orientation relative des tétrades voisines influence l'énergie des états excitoniques qui contribuent à la fluorescence. Des calculs théoriques décrivant la relaxation des états excités dans les G-quadruplexes tenant compte de leur topologie permettrait d'examiner la validité de cette hypothèse.

Ensuite, il a été bien établi que les propriétés excitoniques des états excités sont renforcées avec l'augmentation de la taille des quadruplexes. Afin de déterminer l'étendue maximale des excitons, il serait intéressant de poursuivre les études en fonction de la taille en examinant des nano-fils de guanine constitués, par exemple, de 10, 15, 20 et 25 tétrades.

Par ailleurs, la topologie des quadruplexes dépend la séquence de bases. Il serait donc intéressant d'examiner l'influence de la séquence de bases de quadruplexes mono-moléculaires sur leurs propriétés photophysiques.

Enfin, d'un point de vue biologique, il serait intéressant d'explorer les dommages spécifiques provoqués dans les G-quadruplexes par l'absorption des photons UV. Etant donné que les propriétés des états excités des guanines sont largement modifiées dans ces structures, on s'attend donc à ce que leur réactivité le soit aussi. La caractérisation des photoproduits des quadruplexes, d(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> et Tel21 que j'ai étudiés, fait partie du projet ANR OPHID coordonné par le laboratoire d'accueil. La connaissance de leurs propriétés photophysiques acquise pendant de mon travail de thèse pourrait contribuer à la compréhension du mécanisme de leur formation.