

## CHAPITRE 3 – LES TASQ COMME PLATEFORME POUR LA CATALYSE PSEUDO-ENZYMATIQUE

Nous avons démontré dans le chapitre précédent que les TASQ hydrosolubles développés au cours de cette thèse étaient capables d'interagir sélectivement avec les quadruplexes d'ADN et d'ARN par un processus de reconnaissance biomimétique fondée sur la formation intramoléculaire d'une tétrade de guanines synthétique au sein des TASQ.

Bien que très polymorphique, la structure des quadruplexes repose sur la présence de plusieurs tétrades de guanines empilées et auto-stabilisées par des interactions de  $\pi$ -stacking. De nombreux modèles synthétiques mimant ces édifices tridimensionnels ont été développés depuis les travaux de M. Gellert *et al.* de 1962<sup>[35]</sup> et offrent de multiples applications, comme nous avons pu le voir dans la dernière partie du chapitre 1 (voir IV.2). Composés d'une seule tétrade, c'est-à-dire de l'unité élémentaire, les TASQ sont les mimes les plus petits et les plus simples de quadruplexes d'ADN dont la première application reportée est celle de ligand sélectifs de quadruplexe mise au point au cours de cette thèse. La seconde est elle issue des travaux de J. Sherman (voir V.1) dans lesquels un dérivé de calixarène est utilisé comme récepteur pour l'évaluation des propriétés d'affinité d'une molécule par analyse de fluorescence ou par dichroïsme circulaire ; toutefois, cette méthodologie semble peu fiable puisque certains ligands connus de la littérature tel le BRACO-19 sont reconnus comme non affins.<sup>[248]</sup>

Néanmoins, dépourvus de boucles et de squelette sucre-phosphate, nous sommes en droit de nous demander si les TASQ conservent certaines des propriétés propres aux quadruplexes. En dehors de leur rôle biologique, les quadruplexes sont également fortement utilisés dans le domaine des DNAzymes qui regroupe les multiples utilisations de l'ADN comme catalyseur de réactions chimiques dont la plus représentative, la réaction de peroxydation, fait l'objet de ce dernier chapitre.

En effet, l'activité d'une enzyme naturelle, la *horseradish peroxidase*, peut être mimée par un quadruplexe d'ADN ; il nous a donc semblé possible de simplifier encore davantage le système en utilisant nos TASQ hydrosolubles.

Après une brève introduction sur la découverte de l'activité catalytique des oligonucléotides, les recherches ayant conduit à l'utilisation d'un quadruplexe en lieu et place d'une protéine seront présentées. Fort de ces prérequis indispensables à la compréhension de ce domaine d'application, nous discuterons des résultats obtenus sur les séries DOTASQ et <sup>PNA</sup>DOTASQ ainsi que sur un troisième modèle issus des travaux de l'équipe du Pr. E. Defrancq, le RAFT-G4.<sup>[250]</sup>

Enfin, l'emploi simultané d'ADN et de TASQ dans un processus catalytique permettant d'accéder à de fortes activités pseudo-enzymatiques fera l'objet de la partie XV et précédera les conclusions et perspectives de cette nouvelle application des TASQ.

## XII. Les oligonucléotides catalytiques : ribozymes et DNazymes

Alors que la majorité des réactions catalytiques biologiques reposent sur la présence d'enzymes, il est découvert au début des années 1980 que l'ARN est également capable de remplir de telles fonctions. Ce bouleversement dans le domaine de la biochimie est initié par les travaux pionniers de l'équipe du Dr. T. Cech qui, en cherchant à purifier l'enzyme responsable de l'excision des introns d'un gène ribosomique ARNr chez *Tetrahymena Thermophila*, proposa après plusieurs échecs l'hypothèse selon laquelle l'intron se clivait seul. Il la reporta dans un article paru en 1982 dans *Cell* où il introduit pour la première fois le terme « ribozyme », né de la contraction des termes « ribonucleic acids » et « enzyme », et qui définit donc la capacité d'un ARN à réaliser une réaction chimique de type enzymatique.<sup>[375, 376]</sup> En parallèle, le laboratoire du Dr. S. Altman qui s'intéressait à l'enzyme RNase P, responsable de la maturation de l'ARNt, mis en évidence que ce complexe riboprotéinique, c'est-à-dire composé d'une partie protéinique et d'une partie ARN, était capable de fonctionner en la seule présence de l'ARN.<sup>[377, 378]</sup>

Ces découvertes et celles qui s'ensuivront mettent un terme à l'idée que seules les protéines ont la capacité de catalyser des réactions chimiques au sein du vivant et font naître la théorie du *RNA world*,<sup>[40, 379, 380]</sup> formulé par W. Gilbert en 1986 dans la revue *Nature*,<sup>[381]</sup> selon laquelle les origines de la vie prébiotique seraient fondées sur l'ARN utilisé à la fois comme support de l'information génétique mais également pour ses propriétés catalytiques lui permettant de se suffire à lui-même (Figure 111A).

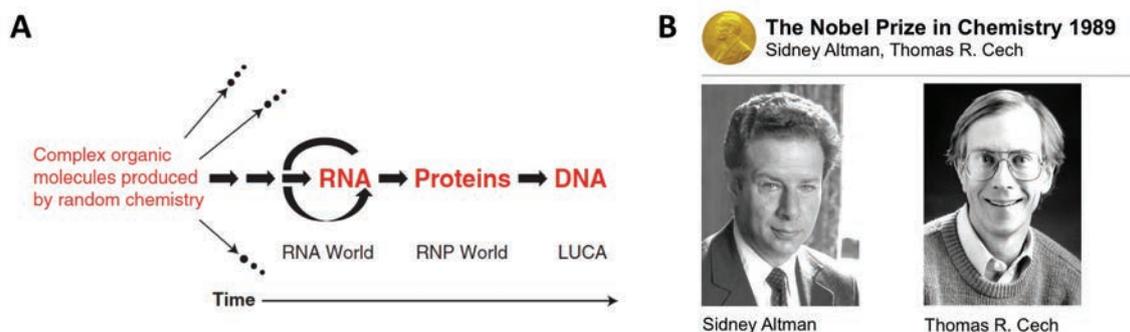


Figure 111 – Représentation de l'évolution hypothétique du *RNA world* vers le domaine des ribonucléoprotéines (*RNP world*) puis vers la biologie contemporaine fondée sur l'ADN (LUCA pour *last universal common ancestor*) au fil du temps (A). Lauréats du prix Nobel de chimie de 1989 pour leur découverte de l'activité catalytique de l'ARN (B).

Depuis, de nombreux ribozymes ont été découverts parmi lesquels la RNase P impliquée dans la maturation des ARNt,<sup>[382]</sup> les riborégulateurs (ou riboswitches) présents sur certains ARNm qui ont une capacité autolytique,<sup>[383, 384]</sup> ou encore le site actif ARNr du ribosome qui catalyse la réaction de synthèse peptidique.<sup>[385]</sup>

Ce domaine de recherche sera couronné par l'obtention du prix Nobel de Chimie de 1989 pour les deux initiateurs T. Cech et S. Altman (Figure 111B).<sup>[375, 377]</sup>

Les chimistes ayant toujours à cœur de comprendre et de mimer la nature, les premiers ribozymes artificiels sont publiés en 1990 par D. Robertson et G. Joyce dans *Nature* et permettent le clivage de séquences d'ARN simple brin.<sup>[386]</sup> Depuis lors, de nombreux autres systèmes ont été développés et permettent de catalyser de multiples réactions chimiques dont la ligation d'ARN, des réactions de Diels-Alder, la formation de liaisons peptidiques, des réactions d'amination, la métallation de porphyrine ou encore la réaction de Michael.<sup>[387]</sup>

D'une manière intéressante, aucun ADN catalytique naturel n'a à ce jour été découvert alors que dès 1994, G. Joyce en association avec R. Breaker démontrent que la technologie développée pour la sélection *in vitro* des séquences d'ARN catalytique est adaptable à l'ADN et leur permet d'isoler un petit fragment d'ADN capable de catalyser le clivage d'une séquence d'ARN en présence de  $Pb^{2+}$ .<sup>[388]</sup> Par analogie aux ribozymes, ces activités catalytiques faisant intervenir l'ADN sont nommées déoxyribozyme, plus connues sous le terme de DNAzyme.<sup>[389]</sup>

Aujourd'hui, le domaine des DNAzymes est vaste et permet de réaliser un nombre important de réactions chimiques parmi lesquelles nous citerons le clivage et la ligation d'ARN ou d'ADN, le clivage de dimères de thymines, les réactions de Diels-Alder simples et énantiosélectives,<sup>[390]</sup> les réactions d'aldolisation ou de Henry en milieu aqueux en présence de duplexe d'ADN,<sup>[391, 392]</sup> ou encore les réactions de Michael ou de Friedel-Crafts en séries énantiosélectives avec des excès énantiomériques pouvant atteindre 99%.<sup>[387, 389]</sup> De nombreuses applications dans le domaine de la biologie et de la santé s'avèrent également particulièrement prometteuses, notamment pour le ciblage et le clivage d'ARNm en thérapie antitumorale.<sup>[393, 394]</sup>

Les avantages des DNAzymes face aux ribozymes et aux protéines sont multiples. Tout d'abord du point de vue de leur stabilité à l'hydrolyse et à l'augmentation de température, l'ADN s'avère en moyenne 1000 fois plus stable que les protéines et près de 100000 fois plus stable que l'ARN. De plus, l'ADN se synthétise aisément au sein d'un laboratoire de manière automatisée ou peut être synthétisé à façon par différents fournisseurs d'oligonucléotides et offre un coût final beaucoup plus faible que l'utilisation de protéines. Un autre atout est la possibilité de modifier

facilement les séquences nucléotidiques par l'ajout de sondes fluorescentes par exemple, ou encore de les fixer sur un support solide. Le dernier avantage relevé ici est la facilité de modulation du nombre et de la nature des bases permettant d'obtenir virtuellement un nombre illimité de séquences permettant d'accéder à celle offrant la réponse désirée pour l'application souhaitée.<sup>[327]</sup>

### XIII. De la *horseradish peroxidase* aux quadruplexes d'ADN

#### XIII.1 Découverte des propriétés DNazyme des quadruplexes d'ADN

En 1996, Y. Li et D. Sen développent et publient le 4<sup>ème</sup> système DNazyme permettant la métallation de porphyrines à l'aide de brins d'ADN sélectionnés par la méthode SELEX (pour *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).<sup>[395, 396]</sup> Ils mettent en évidence que l'insertion de Cu(II) et de Zn(II) dans la mésoporphyrine IX, notée MPIX (Figure 112A), est catalysée par l'utilisation de la séquence PS5.ST1 riche en guanines (Figure 112B).<sup>[397, 398]</sup>

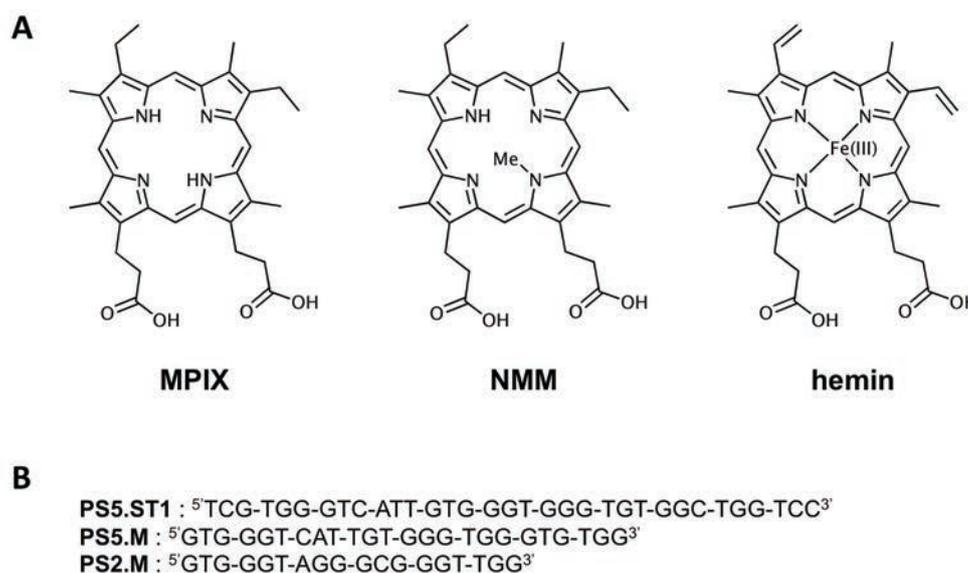


Figure 112 – Structures chimiques de la mésoporphyrine IX (MPIX), de la N-méthyl mésoporphyrine IX (NMM) et de la protoporphyrine IX de Fe(III) (hemin) utilisées par l'équipe de D. Sen pour la mise en place du premier système DNazyme construit autour de quadruplexes d'ADN (A) au départ des séquences PS5.ST1, PS5.M et PS2.M (B).

D'une manière intéressante, ils constatent que la nature du tampon utilisé joue un rôle clef dans l'efficacité catalytique. En effet, la réaction nécessite la présence de cations alcalins, principalement les ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> avec une activité relative avec ce dernier environ 300 fois supérieure à celle obtenue avec le sodium. De plus, il est constaté que la présence de cations bivalents tel Mg<sup>2+</sup> inhibe la métallation de la porphyrine.

Tous ces éléments réunis leur permettent de postuler que cette réaction est dépendante de la formation d'un quadruplexe d'ADN à partir de la séquence riche en guanines PS5.ST1.

Lors d'expériences de compétitions, les auteurs constatent que la *N*-méthyl mésoporphyrine IX (NMM, Figure 112A), connue pour interagir avec les quadruplexes d'ADN,<sup>[399-403]</sup> ainsi que la protoporphyrine IX de Fe(III), plus communément nommée hémé (Figure 112A), inhibent la métallation de la MPIX en interagissant à sa place avec l'oligonucléotide.<sup>[398]</sup>

Toutefois, l'avancée majeure de ces travaux sera publiée en 1998 dans *Chem. Biol.* en s'inspirant de cette dernière observation.<sup>[404]</sup> En effet, les avantages et applications d'un système DNAzyme utilisant comme cofacteur l'hémé pourraient être multiples au vu de son rôle dans la chimie du vivant au sein des hémoprotéines. Sous sa forme Fe(II) (*hème* en anglais), elle est responsable du transport de l'oxygène dans la myoglobine et l'hémoglobine ainsi que de l'activité des cytochromes tels le cytochrome C qui joue un rôle dans la chaîne respiratoire et l'apoptose, ou encore le cytochrome P450. Sous sa forme Fe(III) (*hémé* ; en français, le terme hème est utilisé génériquement pour ces deux états d'oxydation : afin d'éviter toute confusion dans ce manuscrit, nous nous permettrons d'utiliser les termes anglais *hème* et *hémé*) elle est présente au sein de catalases, de monooxygénases ou encore de peroxydases comme la *horseradish peroxidase*.<sup>[404]</sup>

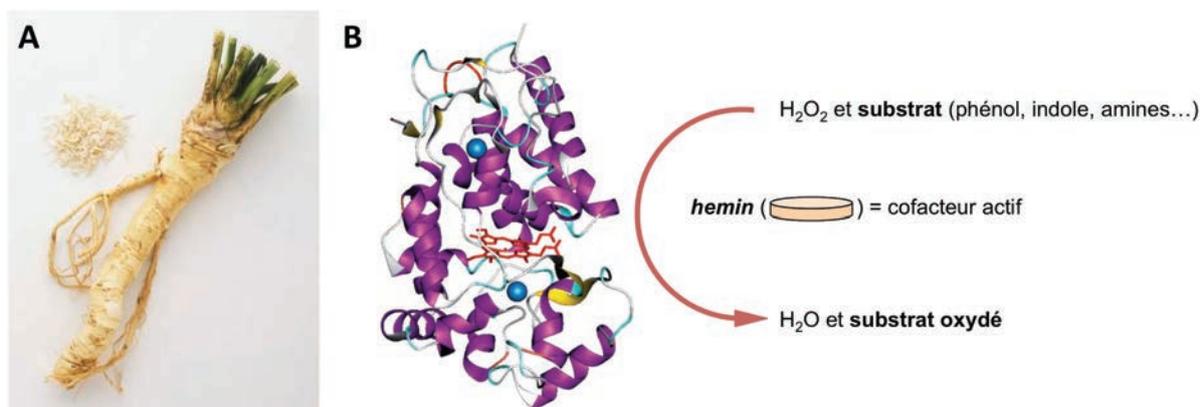


Figure 113 – Racine de raifort (A) dont est extraite la *horseradish peroxidase* capable d'oxyder un substrat en présence de peroxyde d'hydrogène grâce à son cofacteur actif qu'est l'hémé (en rouge sur la structure cristallographique) (B).

Cette dernière, contenue dans la racine de raifort, catalyse l'oxydation de substrats (composés aromatiques, phénols, indoles, amines, etc.) en présence de peroxyde d'hydrogène (Figure 113). Ses propriétés sont connues depuis 1810 grâce aux recherches de L. Planche qui s'était aperçu que la teinture de gaïac devenait bleue lorsque l'on y plongeait un morceau de racine de raifort frais, probablement dû à la réaction de peroxydation de l'acide  $\alpha$ -guaïaconique en *guaiacum blue*.<sup>[405]</sup>

Depuis, la *horseradish peroxidase* (ou HRP) est utilisée pour la purification des eaux usées<sup>[406]</sup>, pour le développement de biocapteurs, comme réactif pour la synthèse organique mais apparaît

surtout dans le domaine de la biochimie pour le marquage d'anticorps ou de protéines en vue d'applications pour des expériences de western blot, d'immunohistochimie, ou encore lors de tests ELISA (pour *enzyme-linked immunosorbent assay*, Figure 114) dont l'exemple clinique le plus représentatif est sans doute la détection des anticorps anti-VIH.<sup>[405, 407, 408]</sup> Lorsque l'antigène marqué à la HRP est en interaction avec l'anticorps que l'on cherche à détecter, l'oxydation d'un substrat spécifique, classiquement l'ABTS, le TMB ou le DAB se traduit par une coloration du milieu (test positif) ; à l'inverse, l'absence d'anticorps entraîne l'élimination de l'antigène marqué lors du lavage et se traduit par le maintien d'un milieu incolore (test négatif).

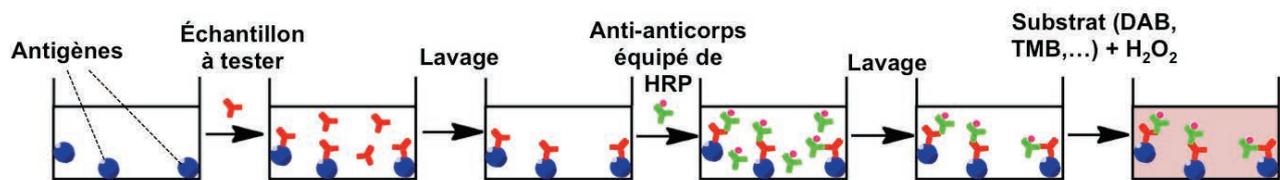


Figure 114 – Principe d'un test ELISA indirect positif dont la révélation s'effectue par l'oxydation d'un substrat dont la forme oxydée colorée est détectable à l'œil nu ou par mesure d'absorbance UV-visible. La *horseradish peroxidase* (HRP, en rose) est préalablement greffée sur l'anti-anticorps de détection.

Ainsi, l'idée particulièrement ingénieuse énoncée dans la publication de P. Travascio *et al.* est de remplacer l'environnement protéinique de l'hémine au sien de la HRP par une séquence d'ADN riche en guanine capable de former un quadruplexe d'ADN.<sup>[404]</sup> En partant de la séquence PS5.ST1 initialement étudiée,<sup>[397, 398]</sup> deux nouveaux brins sont développés : PS5.M<sup>[409]</sup> et PS2.M<sup>[410]</sup> de 24 et 18 bases, respectivement (Figure 112B). Avec cette dernière séquence, l'efficacité de catalyse de l'oxydation de la sonde ABTS s'avère 250 fois plus importante que celle mettant en jeu l'hémine seule.<sup>[410]</sup> L'essai avec rPS2.M, l'équivalent ARN de PS2.M montre des résultats équivalents,<sup>[411]</sup> et conforte, en lien avec leurs premières hypothèses, l'idée que la catalyse repose sur la formation d'un quadruplexe capable d'activer l'hémine (Figure 115).

Depuis lors, les nombreuses études de cette réaction de DNAzyme sur différentes morphologies de quadruplexes (intramoléculaires, intermoléculaires, parallèles, antiparallèles, hybrides, etc.) démontrent sans ambiguïté que la formation d'un quadruplexe est bien la condition *sine qua non* à l'obtention d'un effet catalytique, impossible à observer avec d'autres structures d'ADN ou d'ARN.<sup>[16, 411-415]</sup>

Notons toutefois que très récent, l'équipe de F. Yan a publié l'unique article dans lequel un ADN duplexe est utilisé pour catalyser cette réaction de peroxydation. Le cofacteur actif n'est dans ce cas plus l'hémine mais une TMPyP4 métallée au Mn(III).<sup>[416]</sup>

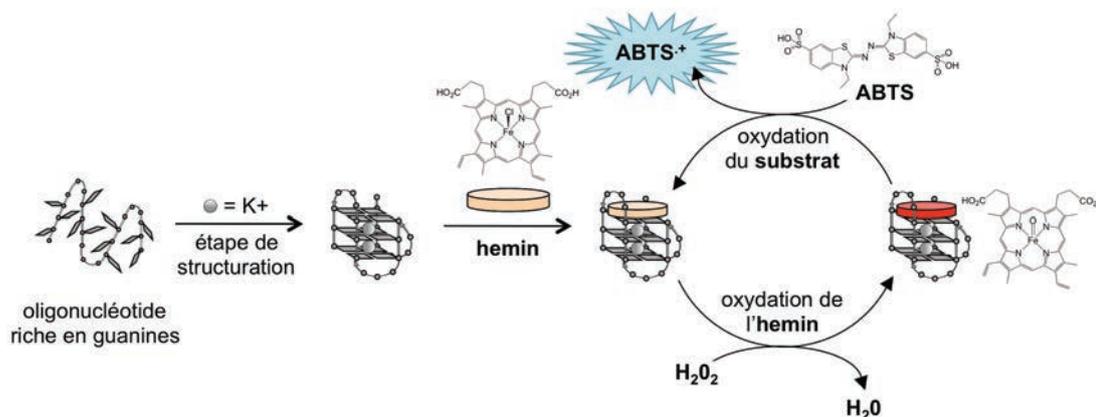


Figure 115 – Représentation schématique du procédé de DNAzyme mimant l'activité de la *horseradish peroxidase* et nécessitant la formation d'un quadruplexe d'ADN.

Néanmoins, en plus de quinze années de recherche sur cette réaction spécifique, l'effet du quadruplexe sur l'activation de l'hémine n'est à ce jour toujours pas connu avec exactitude. L'équipe du Dr. D. Sen a toutefois postulé que les quadruplexes devaient sans doute réunir les mêmes contributions majeures que les enzymes comme la HRP, à savoir :<sup>[417-419]</sup>

- la présence d'un **site de fixation hydrophobe**, attribué à l'environnement proche d'une tétrade de guanines favorisant l'interaction de l'hémine et la protégeant également de la dégradation oxydante par le peroxyde d'hydrogène.

- l'existence d'un **ligand axial** donnant de la densité électronique au fer. Dans le cas de la HRP, il s'agit de l'histidine ; pour le quadruplexe d'ADN, il est supposé qu'une des guanines de la tétrade accessible joue ce rôle en sortant du plan comme ce qui a pu être observé en présence de deux complexes de platine.<sup>[347, 420]</sup> Une seconde hypothèse est proposée suite à des analyses par modélisation moléculaire sur bcl-2 où il est observé que l'une des cytosines de la boucle s'intercale entre l'hémine et la tétrade de guanines en créant des interactions de  $\pi$ -stacking.<sup>[415]</sup> Cependant, cette dernière proposition induit la présence obligatoire d'une base supplémentaire au niveau de boucles des quadruplexes. Or, ces réactions ont également lieu avec des quadruplexes dépourvus de boucles et/ou de cytosines tels  $d((G_3T_n)_3G_3)$  ( $n=1$  à  $4$ ),<sup>[414]</sup>  $d((TG_4)_4)$ ,<sup>[421]</sup>  $d((T_4G_4)_4)$ <sup>[14]</sup> ou  $d((T_4G_6T_4)_4)$ <sup>[206]</sup> même s'il est vrai que les meilleures activités catalytiques sont obtenues, dans l'ordre croissant, pour les quadruplexes parallèles, hybrides, et antiparallèles.

- **l'environnement sur l'autre face dite distale** de l'hémine, c'est-à-dire là où se forme le complexe oxo, favorise la réaction lorsqu'il est polaire et présente des sites donneurs et accepteurs de liaisons hydrogènes. Pour l'ADN, les boucles pourraient remplir cette fonction grâce à la présence du squelette sucre-phosphate et des nucléobases, respectivement.

Quoi qu'il en soit, les preuves empiriques de la capacité des quadruplexes d'ADN à catalyser les réactions de DNAzyme mimant les peroxydases en présence du cofacteur actif qu'est l'hémine sont indiscutables et démontrent indéniablement leurs propriétés catalytiques. Nous aborderons un peu plus loin dans ce chapitre l'étude du mécanisme détaillé de l'oxydation du fer au cours de cette réaction (voir XIV.3.A).

Ainsi, de très nombreuses applications utilisent ce système quadruplexe-hémine pour les multiples raisons énoncées ci-dessus, c'est-à-dire sa facilité d'utilisation, son faible coût, sa stabilité et sa grande versatilité.

### XIII.2 Applications des systèmes DNAzyme quadruplexes, mimes de réactions de peroxydation

Depuis une quinzaine d'années, de très nombreuses applications fondées sur la structuration d'un quadruplexe d'ADN *in situ* pour réaliser une réaction de DNAzyme ont été développées.

Bien qu'il soit difficile d'établir une liste exhaustive, les exemples les plus représentatifs sont l'emploi de ce système en tant que sonde lumineuse pour la détection :

- **de cations monovalents** tels  $K^+$  (Figure 116A)<sup>[422-424]</sup> ou  $Ag^+$ <sup>[425-427]</sup> et **divalents** tels  $Cu^{2+}$ <sup>[203, 428, 429]</sup>  $Hg^{2+}$ <sup>[202, 428, 430-433]</sup> ou  $Pb^{2+}$ <sup>[432, 434-442]</sup>.

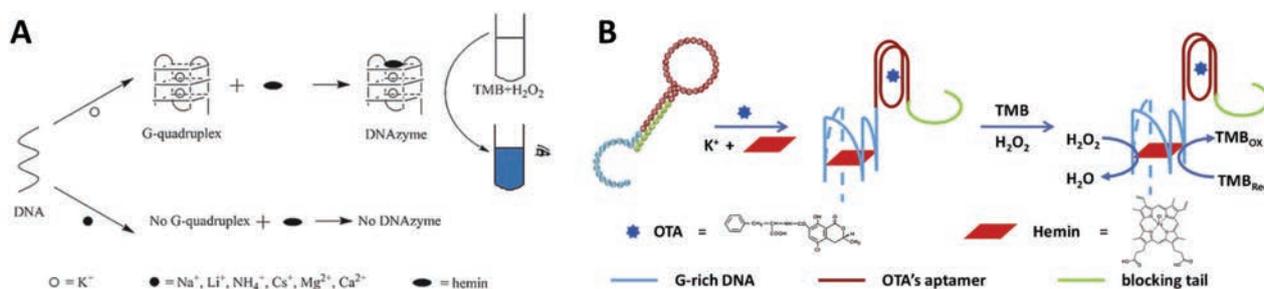


Figure 116 – Schémas de principe de la détection sélective du potassium (A) ou de l'ochratoxine (notée OTA) (B) par méthode de DNAzyme.

- **de molécules organiques** telles l'ochratoxine A présente dans certains aliments et suspectée par le Centre International de Recherche sur le Cancer comme étant potentiellement cancérigène pour l'homme. Le système de détection mis en place par C. Yang *et al.* en 2012 (Figure 116B) permet la détection de ce composé à partir de 2,5nM, en dessous de la limite fixée par la commission européenne à  $2\mu g.kg^{-1}$ , soit 5nM.<sup>[443]</sup> Notons également la mesure des concentrations en glucose dans les urines grâce à un double système catalytique mettant en jeu la glucose oxydase permettant d'obtenir une limite de détection à 1 $\mu$ M (Figure 117B).<sup>[444]</sup>

- **de protéines** comme les nucléolines,<sup>[204]</sup> la thrombine,<sup>[205, 445-447]</sup> les lysozymes,<sup>[445, 447, 448]</sup> le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF<sup>[449]</sup> ou les récepteur d'œstrogènes ER $\alpha$  qui sont des facteurs de transcription impliqués dans le cancer du sein hormono-dépendant (Figure 117A).<sup>[450]</sup>

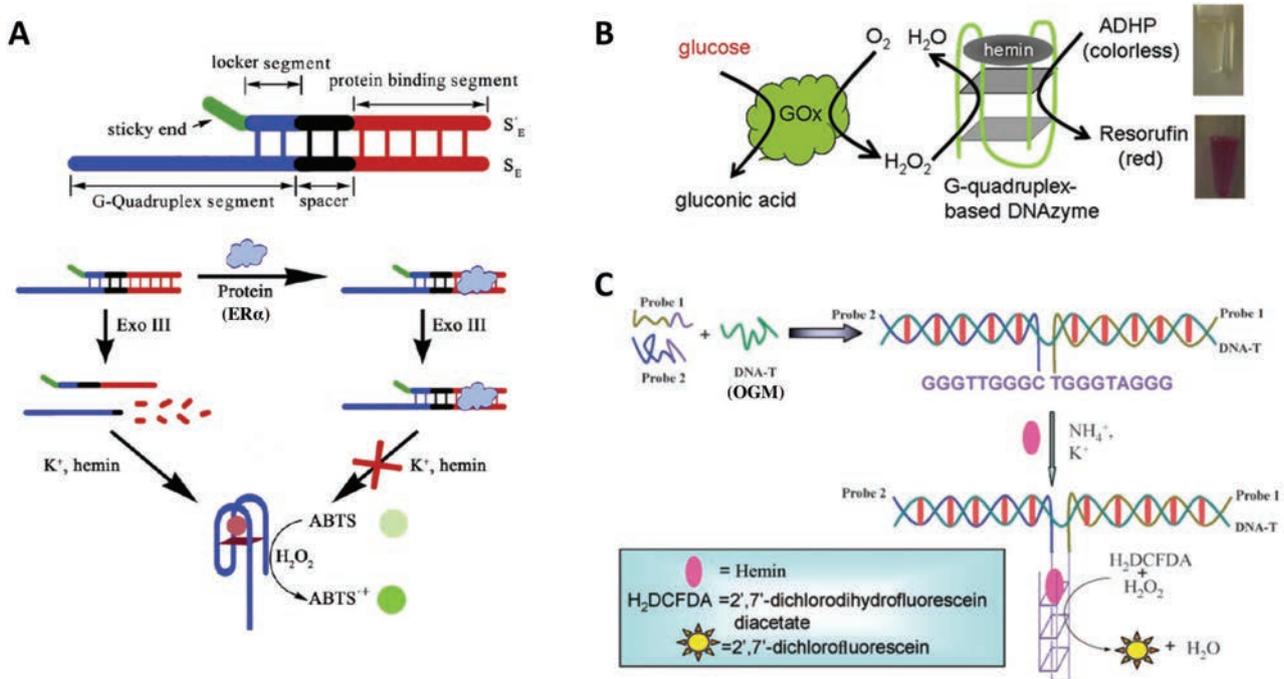


Figure 117 – Schémas de principe de la détection et sélection de la protéine ER $\alpha$  (A), du glucose (B) ou d'une séquence ADN contenue dans un organisme génétiquement modifié (C) par méthode de DNzyme.

- **d'acides nucléiques** comme l'ADN simple brin,<sup>[451]</sup> différents analytes d'ADN<sup>[452, 453]</sup> parmi lesquels la détection de séquences contenues dans les organismes génétiquement modifiés (Figure 117C),<sup>[454]</sup> les microARN,<sup>[455-457]</sup> l'ATP<sup>[458, 459]</sup> ou le diguanosine monophosphate cyclique c-di-GMP.<sup>[237]</sup>

- **de modifications de nucléotides.** La méthode développée par M. Deng *et al.* permet la détection du remplacement d'une seule base par une autre sur une séquence en contenant 39.<sup>[460]</sup> De son côté l'équipe de I. Willner publie en 2008 un protocole expérimental alternatif mettant en jeu des particules magnétiques fonctionnalisées.<sup>[461]</sup>

- **d'activité enzymatique** des méthyltransférases,<sup>[462]</sup> de la cholestérol oxydase,<sup>[463]</sup> de la glucose oxydase<sup>[464]</sup> ou encore de la télomérase.<sup>[207, 465-467]</sup> Ce dernier exemple est particulièrement intéressant puisque la télomérase, surexprimée dans un contexte tumoral, constitue un marqueur à fort potentiel pour le diagnostic (voir VI.3). Le principe de la méthode développée par R. Freeman *et al.* repose sur la mise en présence d'un extrait cellulaire renfermant ou non de la télomérase (c'est-à-dire issus de cellules tumorales ou saines, respectivement) et d'un initiateur (ou *primer*) de très courte séquence identique à la séquence télomérique humaine d(TTAGGG)<sub>n</sub> (Figure 118). Si la

téломérase est active, elle synthétise du nouveau brin d'ADN au départ du *primer* conduisant à une longue séquence qui, en présence de cations alcalins comme  $K^+$ , pourra se structurer en un ou plusieurs quadruplexes d'ADN, condition *sine qua non* à l'obtention d'une réponse DNAzyme positive. A l'inverse, sans téломérase, le *primer* ne sera pas allongé et ne pourra pas former de quadruplexe, ce qui se traduira par une réponse DNAzyme nulle. Ce test de type on/off permet de façon simple et rapide de déterminer si un lysat cellulaire est sain ou tumoral.<sup>[207]</sup>

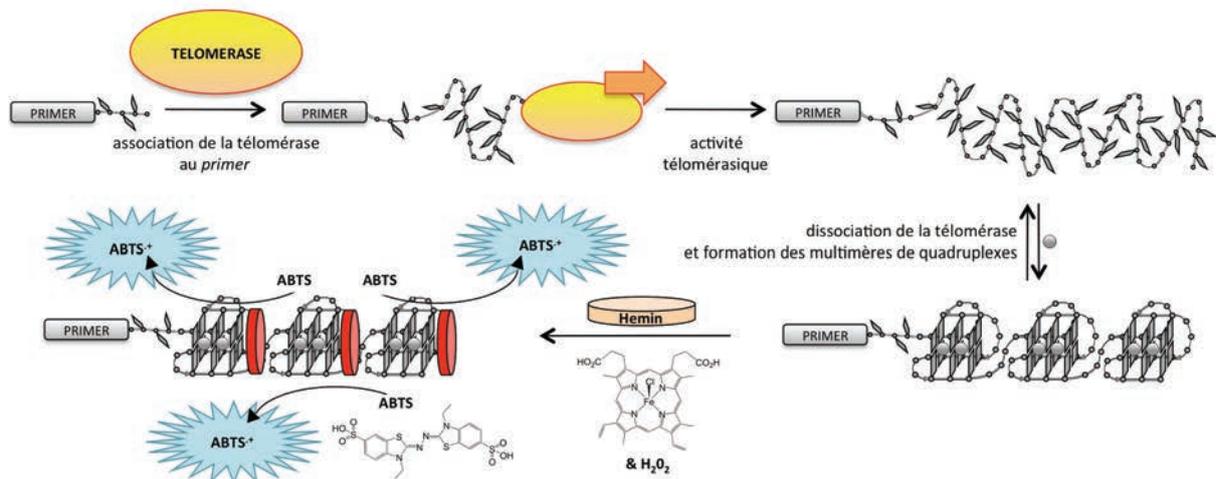


Figure 118 – Représentation schématique de la détection de l'activité télomérique *in vitro* par la méthode de DNAzyme.

- **d'anticorps** pour la mise au point de dosages immunologiques de type ELISA,<sup>[468, 469]</sup> ou de tests immunohistochimiques permettant par exemple la visualisation de l'antigène spécifique de la prostate, ou PSA, considéré comme un marqueur tumoral à fort potentiel, directement sur des coupes cellulaires.<sup>[470]</sup>

- **de ligands de quadruplexes** par une expérience de compétition entre l'hémine et le ligand potentiel.<sup>[206, 471-473]</sup> Si la molécule à tester est efficace, elle chasse l'hémine dans le milieu réactionnel et la réaction de DNAzyme ne peut pas avoir lieu ; en revanche, un ligand offrant une faible interaction laissera l'hémine se stacker sur la tétrade accessible et catalyser la réaction de peroxydation conduisant à un changement de couleur de la solution (Figure 119A).<sup>[471]</sup>

Notons également l'utilisation des quadruplexes dans des systèmes DNAzymes permettant de construire des portes logiques<sup>[173, 474-476]</sup> telles INHIBIT présentée Figure 119B et C.<sup>[477]</sup>

Tous ces exemples témoignent de l'intérêt de ce type de réaction DNAzyme qui trouve de par sa modularité et sa simplicité d'utilisation beaucoup plus d'applications que sa version naturelle protéinique la *horseradish peroxidase*, bien que son efficacité catalytique soit toutefois diminuée.

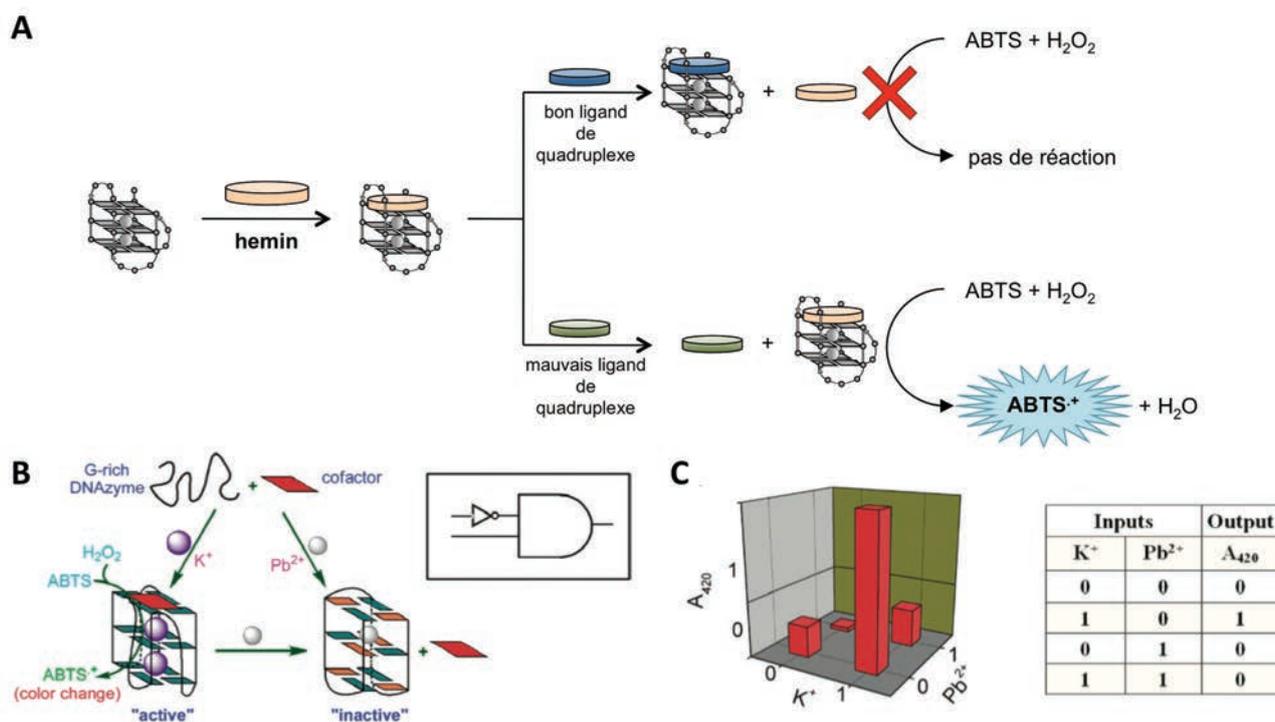


Figure 119 – Schémas de principe de l'utilisation des DNAzymes pour l'évaluation de ligands de quadruplexes (A) ou pour la construction de portes logiques (B) dont les variations d'absorbance à 420nm (C, gauche) conduisent à la table de vérité INHIBIT (C, droite).

## XIV. Des quadruplexes d'ADN aux TASQ hydrosolubles

En partant du constat que cette réaction de DNAzyme repose sur l'utilisation d'un quadruplexe d'ADN qui catalyse l'oxydation du substrat grâce à l'activation de l'hémé, il nous a semblé intéressant d'étudier le comportement des TASQ dans ce type de réaction. En effet, composés d'une seule tétrade de guanine, les TASQ hydrosolubles développés au laboratoire peuvent être considérés comme des modèles « réduits » de quadruplexes dépourvus de son squelette sucre-phosphate ainsi que de boucles et de sillons.

Nous avons donc dans un premier temps entrepris des expériences sur les DOTASQ puis sur le PNA<sup>DOTASQ</sup> pour tenter de valider cette approche innovante et simplificatrice avant de nous concentrer sur l'optimisation de la catalyse avec le RAFT-G4.

### XIV.1 Première preuve de concept avec les DOTASQ

En s'inspirant de la représentation schématique du procédé de DNAzyme impliquant un quadruplexe d'ADN (Figure 115), nous avons construit le modèle présenté Figure 120 dans lequel

l'interaction de  $\pi$ -stacking entre l'hemin et la tétrade de guanines est conservée et constitue l'étape clef de la catalyse, permettant d'abaisser l'énergie d'activation de l'oxydation de la protoporphyrine IX de Fe(III).

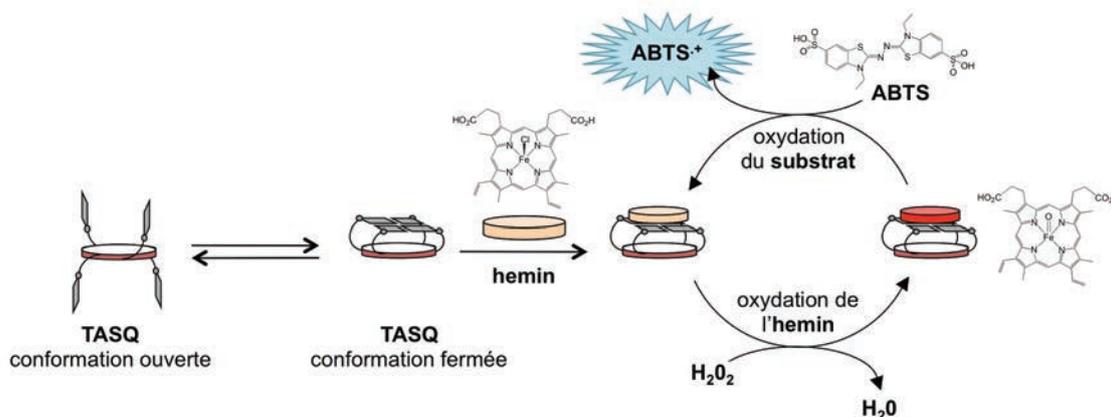


Figure 120 - Représentation schématique du procédé de TASQzyme mimant l'activité DNazyme des quadruplexes d'ADN et par extension l'activité de la *horseradish peroxidase*.

#### XIV.1.A Titrage de l'hemin par les DOTASQ

Afin de s'assurer de l'interaction entre l'hemin et les TASQ qui constitue une des étapes clefs de la catalyse, une série d'expériences de titrage a été réalisée en ajoutant des quantités croissantes de DOTASQ-C<sub>1</sub>, de DOTASQ-C<sub>5</sub> ou de 22AG à une solution contenant initialement 1  $\mu$ M ou 2  $\mu$ M d'hemin. L'utilisation du quadruplexe de séquence télomérique humaine 22AG constitue un contrôle et un point de comparaison quant à la différence d'affinité de la porphyrine pour un quadruplexe ou pour un TASQ.

De manière intéressante, les résultats obtenus sont relativement similaires et révèlent une stœchiométrie de type 1:1 pour les trois pré-catalyseurs (Figure 121). La quantification de cette affinité est obtenue au moyen du calcul d'une constante de dissociation apparente notée  $K_d$  définie comme :

$$K_d = \frac{[\text{hemin}][\text{précat.}]}{[\text{hemin} + \text{précat.}]}$$

Ainsi les valeurs de  $K_d$  moyennées sur les deux expériences menées au départ de 1  $\mu$ M puis de 2  $\mu$ M d'hemin sont de 170 nM, 135 nM et 235 nM pour le DOTASQ-C<sub>1</sub>, le DOTASQ-C<sub>5</sub> et le 22AG, respectivement.

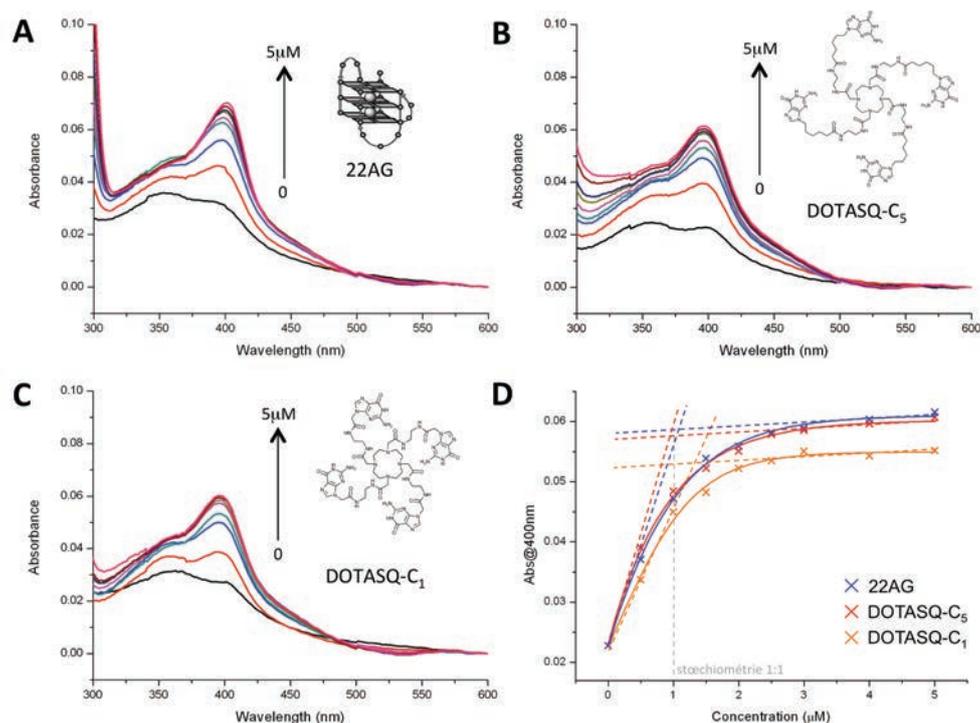


Figure 121 – Evolution du spectre d'absorbance de l'hémé (1  $\mu\text{M}$ ) par ajout de quantités croissantes de 22AG (A), DOTASQ-C<sub>5</sub> (B) et DOTASQ-C<sub>1</sub> (C) et variation de l'absorbance maximale à 400nm en fonction de la quantité de pré-catalyseur additionnée (D) dans un tampon Caco.KTD.

Ces résultats indiquent que l'hémé présente une affinité apparente similaire pour ces trois pré-catalyseurs et tendent donc à montrer que l'influence de l'environnement autour de la tétrade de guanines accessible, c'est-à-dire principalement les boucles, est moindre. Une des explications que nous proposons pour cette observation est que dans le cas du quadruplexe, même si l'interaction est favorisée par une tétrade plus stable que celle des DOTASQ, la présence des nombreuses charges négatives du ruban sucre-phosphate défavorise l'approche de l'hémé dianionique (dans ces conditions expérimentales à pH 7,2) et contrebalance donc le premier effet positif.

Cette première série de mesures nous permet donc de confirmer l'interaction entre nos TASQ et l'hémé, qui constitue l'étape clef de la réaction de peroxydation.

#### XIV.1.B Réactions de TASQzyme

En s'appuyant sur les conditions expérimentales optimisées par P. Travascio *et al.*<sup>[404]</sup> pour les quadruplexes d'ADN, une première expérience est réalisée en présence d'hémé (1  $\mu\text{M}$ ), d'ABTS (2mM), et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,6mM) avec des quantités croissantes de DOTASQ-C<sub>5</sub> (de 0 à 50  $\mu\text{M}$ ) dans un tampon Caco.KTD. Ce dernier est composé d'un tampon Caco.K classique, c'est-à-dire de 10mM de cacodylate de lithium, 10mM de KCl et 90mM LiCl auquel est ajouté 0,05% de Triton X-100, un

surfactant favorisant la désagrégation de l'hémén sous sa forme monomérique active, et 0,1% de DMSO aidant à la solubilisation de l'hémén et également des DOTASQ.

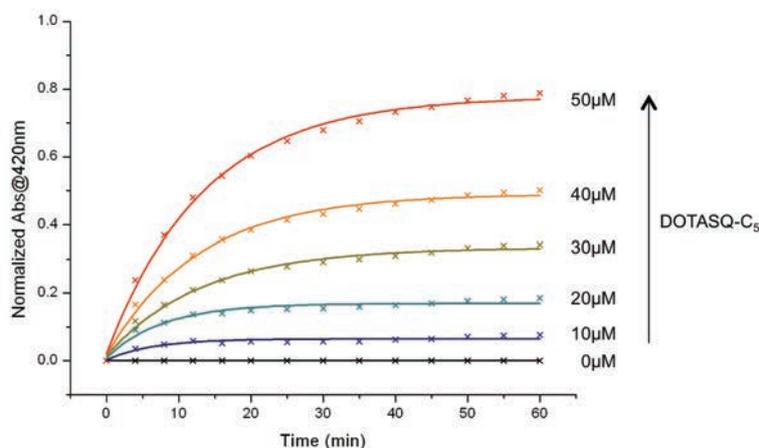


Figure 122 – Evolution de l'absorbance à 420nm correspondant au produit d'oxydation de l'ABTS en fonction du temps pour des concentration croissantes de DOTASQ-C<sub>5</sub> dans un tampon Caco.KTD.

L'évolution de l'oxydation de l'ABTS en ABTS<sup>•+</sup>,<sup>[478, 479]</sup> sonde classiquement utilisée avec la *horseradish peroxidase* ou pour les réactions de DNAzyme, est suivie par mesure d'absorbance UV-visible à 420nm en fonction du temps (Figure 122). Les résultats montrent clairement une réponse catalytique proportionnelle à la quantité de DOTASQ présent dans le milieu réactionnel. Les TASQ hydrosolubles sont donc capables de remplacer les quadruplexes d'ADN dans ce type de catalyse DNAzyme.

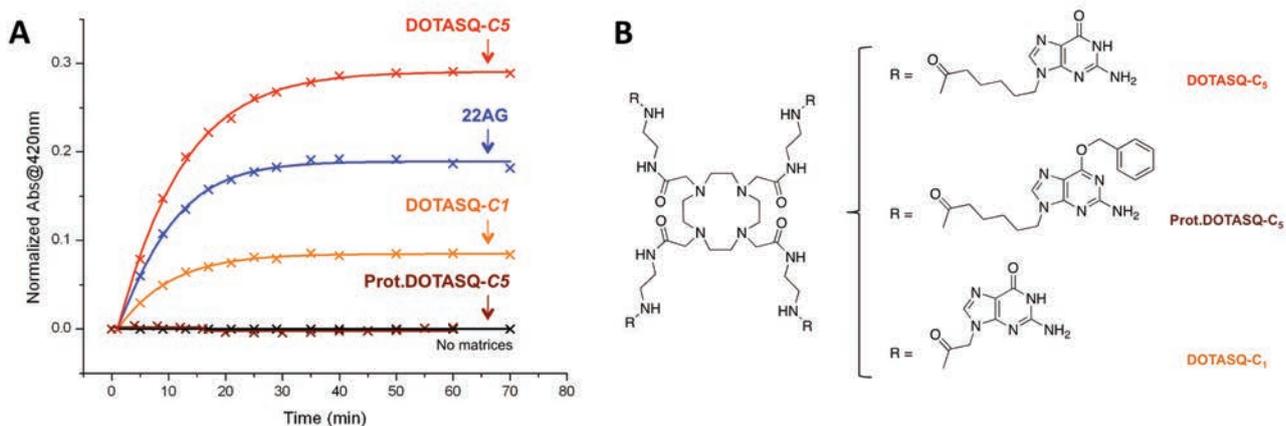


Figure 123 – Evolution de l'absorbance à 420nm correspondant au produit d'oxydation d'ABTS en fonction du temps en présence de DOTASQ-C<sub>1</sub>, DOTASQ-C<sub>5</sub> ou Prot.DOTASQ-C<sub>5</sub> (50µM) ou 22AG (2µM) dans un tampon Caco.KTD (A) et structures chimiques des dérivés DOTASQ utilisés (B).

Néanmoins, afin de s'assurer de l'importance de la formation de la tétrade de guanines intramoléculaire dans ce processus, nous avons réalisé une expérience avec le composé contrôle Prot.DOTASQ-C<sub>5</sub> dont la fonction amide de la guanine, normalement impliquée dans le réseau de liaisons hydrogènes est *O*-benzylée, empêchant donc la formation de la tétrade (Figure 123B).<sup>[20]</sup>

Au bout de 70 min, son activité catalytique est restée nulle, identique à celle de l'hemin seule alors que les DOTASQ-C<sub>1</sub> et DOTASQ-C<sub>5</sub> aux mêmes concentrations (50μM) sont actifs (Figure 123A).

Ainsi, la preuve de concept de l'utilisation des TASQ comme catalyseur de réactions de peroxydation est donc faite et nous permet d'affirmer que la formation d'une tétrade de guanines est la condition *sine qua non* à l'activation du cofacteur actif qu'est l'hemin, confirmant les hypothèses émises par l'équipe de D. Sen.<sup>[404, 411, 415, 418, 419]</sup>

En cohérence avec les premières études sur les DOTASQ (voir VIII.3.B), le DOTASQ-C<sub>5</sub> s'avère ici plus actif que le DOTASQ-C<sub>1</sub> aux bras alkyles plus courts, avec des constantes de vitesses apparentes  $k_{\text{cat}} = 0,36\text{h}^{-1}$  et  $0,29\text{h}^{-1}$ , respectivement, avec  $k_{\text{cat}}$  définie comme :

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_0}{[\text{précat.}]}$$

avec  $V_0$  vitesse initiale correspondant à la concentration en ABTS<sup>•+</sup> produit en fonction du temps.

La comparaison dans les mêmes conditions de l'efficacité de seulement 2μM de 22AG (en bleu, Figure 123A) démontre sans équivoque que l'effet catalytique des quadruplexes d'ADN est bien meilleur que celui des TASQ hydrosolubles, avec une  $k_{\text{cat}}$  de  $9,71\text{h}^{-1}$  environ 25 fois supérieur à celle du DOTASQ-C<sub>5</sub>.

Il est intéressant de noter que la similarité des constantes d'associations  $K_d$  de l'hemin avec les DOTASQ ou le 22AG ne se reflète pas dans les constantes de vitesses  $k_{\text{cat}}$  où le quadruplexe offre une activité catalytique bien supérieure. Un constat similaire a été reporté en 1999 par Travascio *et al.* sur le quadruplexe d'ADN PS2.M et son équivalent ARN rPS2.M qui présentaient des vitesses de catalyse très proches alors que leurs constantes  $K_d$  étaient respectivement de 27nM et 900nM.<sup>[411]</sup>

Ces deux exemples traduisent finalement le fait que la réaction catalytique, bien que nécessitant l'étape clef d'interaction entre l'hemin et l'aptamère, est également dépendante d'autres facteurs dont ceux énumérés dans la partie précédente (voir XIII.1),<sup>[404]</sup> à savoir la présence d'un ligand axial mais également l'existence d'un environnement polaire au dessus de l'hemin (face distale) jouant un rôle lors des multiples étapes de la catalyse. Cette dernière fonction semble détenue dans le cas d'un quadruplexe par les boucles, absentes des DOTASQ et justifiant sans doute cette perte d'efficacité. Dans le cas de l'ARN, la conformation antiparallèle supposée implique la présence de trois boucles en *chain reverse* distantes des tétrades accessibles et par conséquent de l'hemin qui s'y

fixe alors que la version ADN PS2.M de conformation parallèle renferme elle trois boucles latérales encombrantes pouvant beaucoup plus facilement interagir avec l'hemin.<sup>[419]</sup>

Afin de s'affranchir de la possible dépendance au substrat de la réaction, une seconde expérience est menée non plus sur l'ABTS mais sur le TMB (sulfate de 3,3',5,5' tétraméthylbenzidine) dont l'oxydation s'effectue en deux étapes dont le produit intermédiaire est un complexe à transfert de charge absorbant aux longueurs d'ondes spécifiques de 370nm et 652nm alors que le produit final présente une bande d'absorption à 450nm (Figure 124A).<sup>[480-482]</sup>

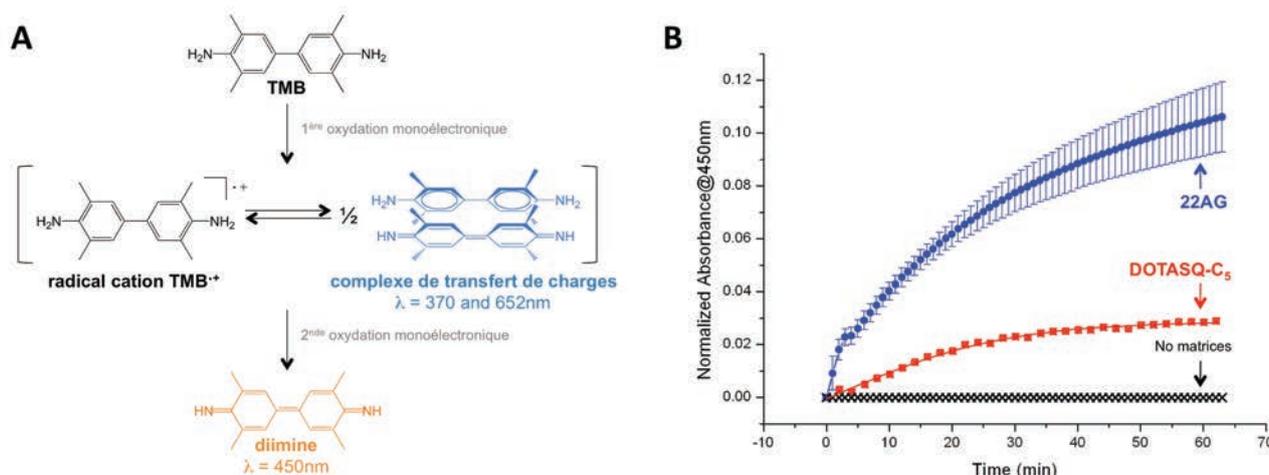


Figure 124 – Structures chimiques du TMB et de ses produits d'oxydation (A). Evolution de l'absorbance à 450nm correspondant au produit final d'oxydation du TMB en fonction du temps en présence de 22AG (2 $\mu$ M) ou de DOTASQ-C<sub>5</sub> (50 $\mu$ M) dans un tampon Caco.KTD (B).

Dans des conditions expérimentales quelque peu différentes des précédentes, à savoir 1 $\mu$ M d'hemin, 0,5mM de TMB et 1,5mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour 50 $\mu$ M de DOTASQ-C<sub>5</sub> ou 2 $\mu$ M de 22AG, les résultats confirment le bon fonctionnement du TASQ avec une  $k_{cat}$  de 0,02h<sup>-1</sup> qui demeure toutefois beaucoup plus faible que celle obtenue avec le quadruplexe 22AG pour lequel  $k_{cat} = 0,27$ h<sup>-1</sup> (Figure 124B).

Nous avons donc démontré ici que le processus de DNazyme basé sur un quadruplexe d'ADN pouvait être simplifié par l'utilisation d'une molécule de synthèse de type TASQ hydrosoluble qui, bien qu'offrant une activité catalytique moindre, présente de nombreux avantages en terme de simplicité d'utilisation, de suppression d'étapes de structuration ainsi que de quantités et de coût de production. De plus, les expériences menées avec le DOTASQ-C<sub>5</sub> et le Prot.DOTASQ-C<sub>5</sub> démontrent que la catalyse dans le cas des TASQ ou des DNazymes repose bien sur la formation d'une tétrade de guanines.

Ainsi, après avoir découvert que les enzymes pouvaient être mimées par des séquences d'ARN puis d'ADN, conduisant aux dénominations ribozymes et DNAzyme, nous présentons ici l'étape suivante de ce processus de miniaturisation en utilisant une molécule de synthèse mimant l'ADN. Cette nouvelle classe de catalyse a par conséquent été baptisée TASQzyme.

#### ***XIV.1.C Vers un système complètement synthétique***

En remplaçant l'environnement protéinique puis l'ADN quadruplexe par un TASQ, la réaction naturellement catalysée par la *horseradish peroxidase* est en phase de devenir un système parfaitement synthétique issu de l'innovation chimique. Néanmoins, un dernier composé pivot dans cette catalyse, le cofacteur actif qu'est l'hemin, a pour le moment été conservé. Présente au cœur de nombreuses hémoprotéines, l'hemin est toutefois une molécule peu avantageuse dans un contexte de développement de biotechnologies.

Son plus gros inconvénient réside dans sa faible solubilité en milieu aqueux, contraignant à travailler dans des gammes de concentrations faibles de l'ordre du micromolaire au maximum et en présence d'agents de solubilisation tels le Triton X-100 et le DMSO.

Pour le développement du DNAzyme, cette porphyrine a été conservée puisqu'elle présentait une bonne affinité pour les quadruplexes et une forte activité. De plus, elle est un des rares exemples de molécules anioniques, avec la NMM<sup>[397, 400, 404]</sup> et Cu-APC,<sup>[483]</sup> à interagir avec l'ADN quadruplexe qui possède également un fort caractère anionique apporté par les groupements phosphates. Le remplacement de l'hemin par une autre porphyrine de Fe(III) n'est donc pas aisé ; cependant, les TASQ hydrosolubles développés au cours de cette thèse sont des édifices supramoléculaires neutres qui permettent d'utiliser d'autres dérivés beaucoup plus hydrosolubles. Ainsi, notre choix s'est porté sur la 5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato Fe(III), notée FeTPPS (Figure 125A), connue pour ses excellentes propriétés de solubilité en solution aqueuse, sa stabilité, sa résistance aux conditions oxydantes et également pour son implication dans certains processus d'oxydation par le peroxyde d'hydrogène.<sup>[484-486]</sup>

La première étape a alors consisté, comme dans le cas de l'hemin, au titrage de FeTPPS par le DOTASQ-C<sub>5</sub> dans un tampon Caco.K classique dépourvu cette fois-ci d'agent de solubilisation. Dans nos conditions à pH 7,2, le FeTPPS possède une bande d'absorbance à 410nm caractéristique de sa forme dimérique où deux porphyrines sont connectées par un pont  $\mu$ -oxo entre les deux atomes de fer. Cette forme a été identifiée comme catalytiquement inactive par G. Lente *et al.*<sup>[485]</sup> L'ajout de quantités croissantes de DOTASQ-C<sub>5</sub> se traduit par la diminution de la bande d'absorbance avec un léger effet bathochrome (Figure 125C) significatif d'un déplacement de

l'équilibre de la forme dimérique vers la forme monomérique catalytiquement active. La présence d'un point isobestique à 424nm témoigne d'une transition entre deux états attribués au FeTPPS seul en solution ainsi qu'au complexe FeTPPS/DOTASQ.

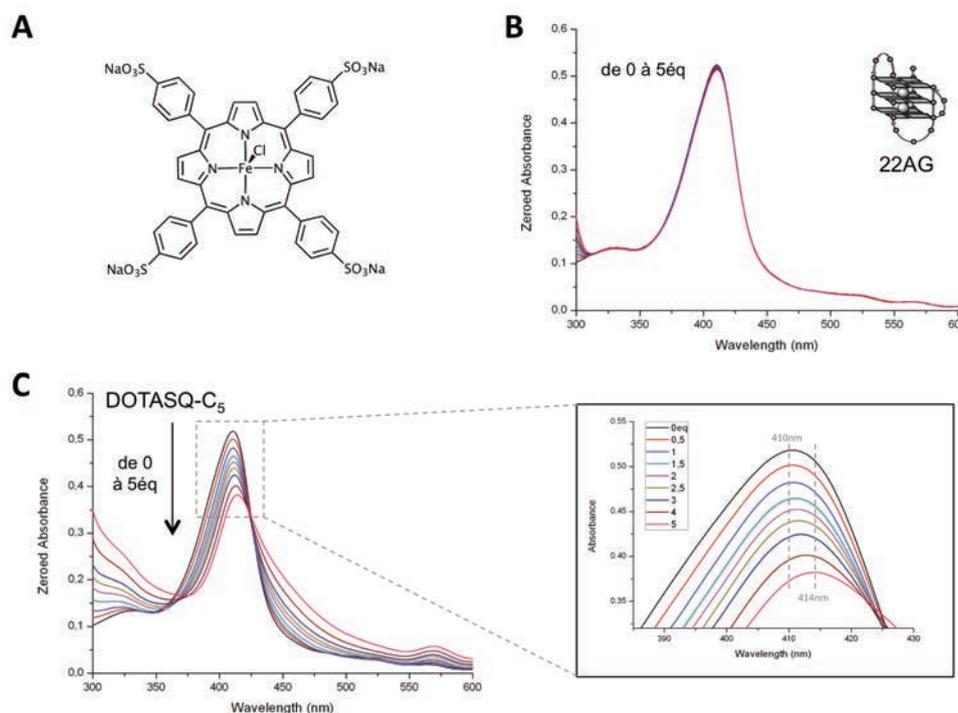


Figure 125 – Structure chimique de la FeTPPS (A). Evolution du spectre d'absorbance de FeTPPS (5 $\mu$ M) par ajout de quantités croissantes de 22AG (B) ou de DOTASQ-C<sub>5</sub> (C) dans un tampon Caco.K.

La seconde étape comprenait la vérification de l'utilisation de cette porphyrine pour catalyser la réaction de TASQzyme et de DNazyme. Dans ce premier cas, la réaction fonctionne parfaitement bien (Figure 126) et présente une constante de vitesse  $k_{cat}$  de 0,36h<sup>-1</sup>, identique à celle obtenue avec l'hemin alors que dans le second cas, l'ADN quadruple est absolument inefficace pour oxyder l'ABTS, comme nous l'avions prévu. Notons que le titrage de FeTPPS par 22AG ne s'est traduit par aucune modification du spectre (Figure 125B), démontrant qu'aucune interaction n'a lieu.

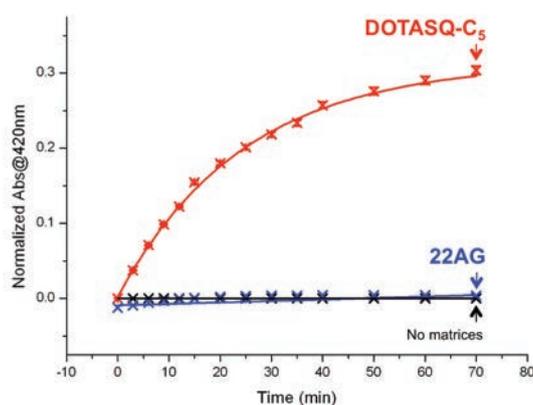


Figure 126 - Evolution de l'absorbance à 420nm correspondant au produit d'oxydation de l'ABTS en fonction du temps en présence de 22AG (2 $\mu$ M) ou de DOTASQ-C<sub>5</sub> (50 $\mu$ M) dans un tampon Caco.K.

Avec l'utilisation d'un TASQ et de la porphyrine FeTPPS en lieu et place d'une protéine ou d'un quadruplexe d'ADN et de l'hemin, nous avons réussi à construire au départ d'un processus mettant en jeu uniquement des composés naturels un système catalytique fondé sur des composés organiques de synthèse beaucoup moins chers et beaucoup plus simple d'utilisation, notamment grâce à l'excellente solubilité du nouveau cofacteur actif de la réaction.<sup>[25]</sup>

Cependant, cette simplification a un coût : comme pour le remplacement de l'enzyme par le DNAzyme, le TASQzyme s'accompagne d'une perte d'efficacité catalytique due en partie à la perte de l'environnement autour de la tétrade accessible, site d'interaction de l'hemin. Pour pallier au mieux ce problème, nous avons cherché à améliorer l'efficacité catalytique par l'emploi dans un premier temps du <sup>PNA</sup>DOTASQ puis, comme nous le verrons partie XIV.3, par la modification du milieu réactionnel.

## XIV.2 Amélioration catalytique avec le <sup>PNA</sup>DOTASQ

Les quatre bras PNA-guanines du <sup>PNA</sup>DOTASQ induisent la présence de quatre charges positives portées par les fonctions amines primaires protonées dans les conditions expérimentales à pH 7,2. Cette propriété supplémentaire lui permet d'interagir beaucoup plus fortement avec les quadruplexes d'ADN et d'ARN par la création d'interactions secondaires entre les amines cationiques et les phosphates anioniques de l'oligonucléotide comme discuté précédemment.

Il apparaît alors que par un processus semblable, le <sup>PNA</sup>DOTASQ devrait offrir une interaction plus importante avec les porphyrines de Fe(III) que le DOTASQ-C<sub>5</sub> grâce à la présence de deux charges négatives portées par les fonctions acides carboxyliques dans le cas de l'hemin (Figure 127), et par les quatre fonction sulfonates pour la FeTPPS.

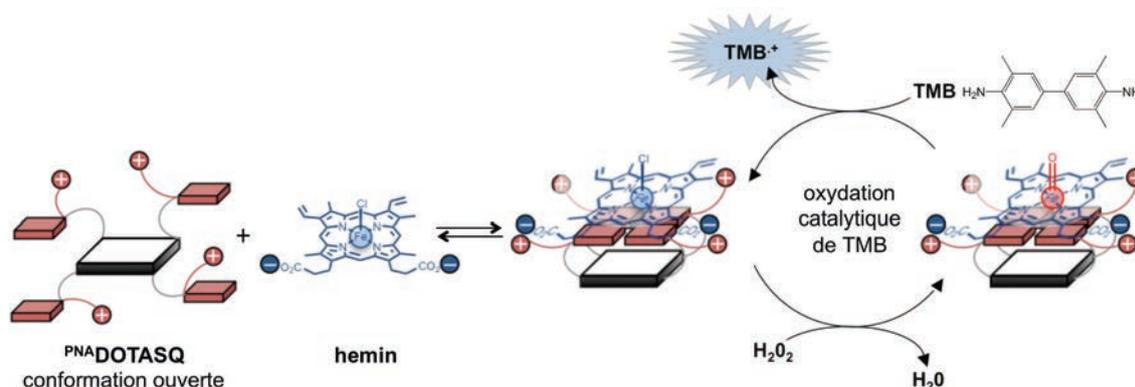


Figure 127 - Représentation schématique du procédé de TASQzyme dans le cas du TASQ de 2<sup>nd</sup>e génération : le <sup>PNA</sup>DOTASQ.

Dans ce dernier cas, l'interaction s'avère tellement forte que la rencontre entre les quatre charge positives et négatives se manifeste par une précipitation de l'adduit  $\text{PNA}^{\text{DOTASQ}}/\text{FeTPPS}$  dans le milieu réactionnel, nous empêchant de réaliser une quelconque mesure d'efficacité catalytique. Le développement d'un système complètement synthétique n'est donc pas si simple et nécessite un développement fin de chacun des composants de la réaction.

Néanmoins, les expériences ont été menées en présence d'hemin avec laquelle la solution conservait un aspect limpide et homogène tout au long de la catalyse.

Nous avons alors suivi l'oxydation du TMB dans les mêmes conditions que pour le DOTASQ-C<sub>5</sub> en suivant cette fois-ci le complexe de transfert de charge intermédiaire à 652nm et non le produit final d'oxydation à 450nm. Les résultats sont représentés Figure 128A et montrent sans aucune équivoque le gain d'efficacité apporté par l'utilisation du  $\text{PNA}^{\text{DOTASQ}}$  (courbes pleines, Figure 128) par rapport au DOTASQ-C<sub>5</sub> (courbes pointillées, Figure 128)

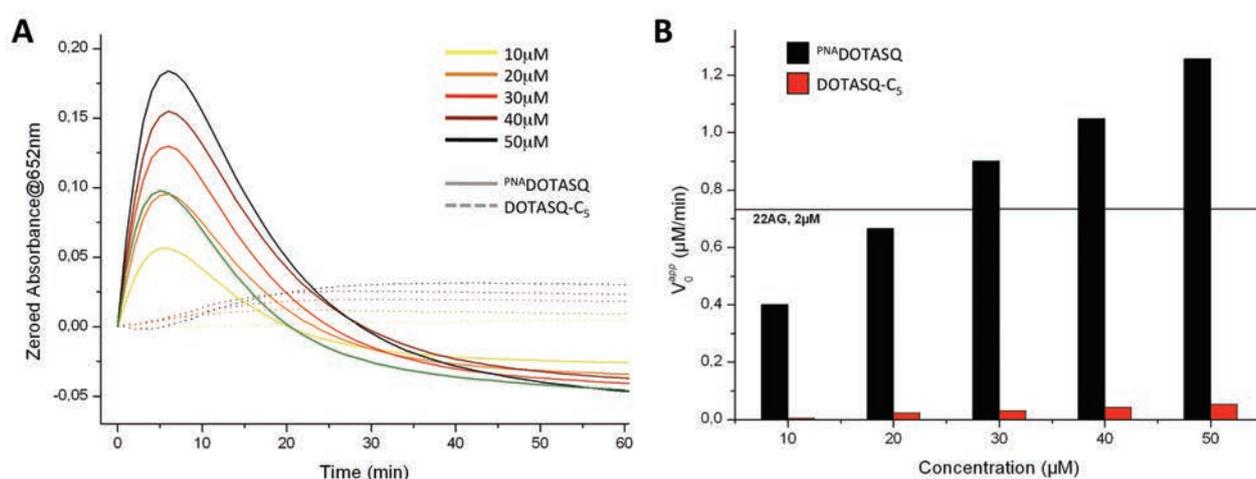


Figure 128 - Evolution de l'absorbance à 652nm correspondant au complexe de transfert de charge issu de la première oxydation du TMB en fonction du temps en présence de quantités croissantes de DOTASQ-C<sub>5</sub> (courbes pointillées) ou de  $\text{PNA}^{\text{DOTASQ}}$  (courbes pleines) ou pour 22AG (à 2μM, en vert) dans Caco.KTD (A). Evolution de la vitesse initiale apparente en fonction de la concentration en TASQ et représentation de la vitesse initiale apparente du 22AG à 2μM (ligne horizontale) (B).

Afin de comparer quantitativement l'apport des bras PNA, les valeurs  $V_0$  correspondant aux vitesses initiales apparentes, exprimées en  $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  sont reportées Figure 128B. Avec une  $V_0$  de  $1,25\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  à  $50\mu\text{M}$  pour le  $\text{PNA}^{\text{DOTASQ}}$  contre  $0,05\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$  pour le DOTASQ-C<sub>5</sub>, l'ajout de charges positives sur le TASQ hydrosoluble est un avantage fort pour l'interaction avec l'hemin ainsi que pour son activation avec un gain moyen d'activité de 27 (soit 2600%).

A titre de comparaison, la catalyse engendrée par 2μM de 22AG a été évaluée ici et conduit à une valeur  $V_0$  de  $0,73\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ . Une efficacité équivalente est obtenue avec le  $\text{PNA}^{\text{DOTASQ}}$  pour une concentration estimée à 22μM, soit 11 fois supérieure à celle de l'ADN.

Finalement, comme lors du développement des TASQ en tant que ligands de quadruplexes, le <sup>PNA</sup>DOTASQ offre de meilleurs résultats pour des applications de type TASQzyme de par la présence de quatre bras PNA-guanines chargés positivement et offrant un second mode d'interaction avec le cofacteur actif de catalyse. Alors que le DOTASQ était loin d'égaliser les performances d'un quadruplexe tel que 22AG, le <sup>PNA</sup>DOTASQ s'en rapproche de plus en plus avec un facteur 10 d'écart qui semble toutefois difficile à améliorer mais constitue un challenge à part entière. Quoi qu'il en soit, le gain de praticité apporté par l'emploi d'une molécule organique obtenue en 4 étapes de synthèse convergentes est indéniable, tant sur le plan de l'applicabilité que du coût et des simplicités d'accès et d'emploi.<sup>[19]</sup>

### XIV.3 Optimisation de l'efficacité catalytique des réactions de TASQzyme

Bien que l'efficacité d'un système catalytique repose majoritairement sur la nature intrinsèque du catalyseur, c'est-à-dire ici du quadruplexe d'ADN ou du TASQ lié au cofacteur actif qu'est l'hemin, la modulation des conditions expérimentales joue un rôle important sur la performance des réactions de peroxydation biomimétiques. Ainsi dès 1998,<sup>[404]</sup> l'équipe de D. Sen souligne l'importance de la nature du tampon utilisé (les meilleurs résultats sont obtenus en tampon HEPES-NH<sub>4</sub>OH), de la concentration en ions sodium et potassium ainsi que du ratio entre ces deux concentrations, de la concentration en peroxyde d'hydrogène (qui constitue un compromis complexe entre l'augmentation de l'activité de la réaction catalysée) et de celle de la réaction non catalysée.

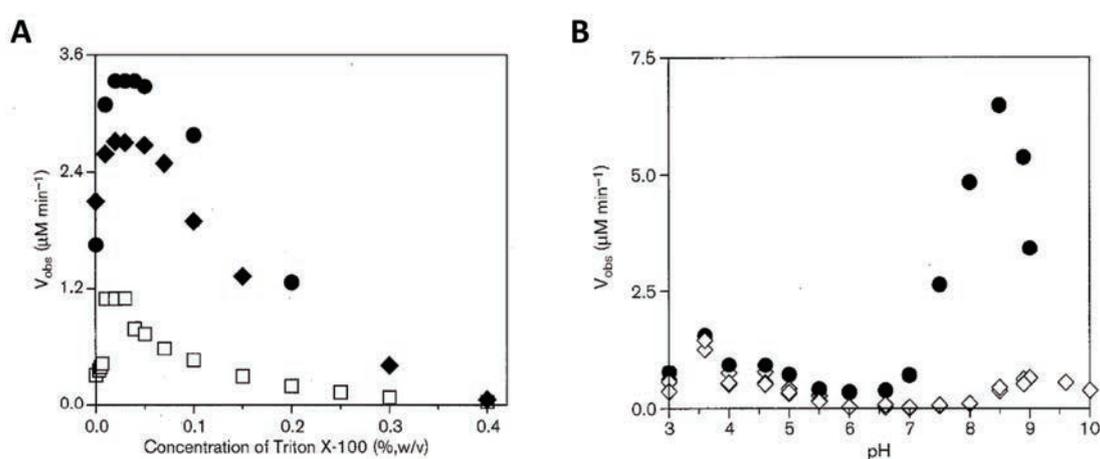


Figure 129 – Evolution de la vitesse initiale de la réaction sans catalyseur (carrés blancs, **A** et losanges blancs, **B**), avec le quadruplexe PS2.M (cercles noirs, **A** et **B**) ou PS5.M (losanges noirs, **A**) en fonction de la concentration en surfactant Triton X-100 (**A**) ou du pH (**B**).

De plus, l'ajout de surfactant tel le Triton X-100, qui permet la désagrégation de l'hemin, s'avère positif dans une gamme de 0,05 à 0,1% (Figure 129A), exprimée en pourcentage massique. Le pH de la solution tampon joue aussi un rôle important puisqu'il est défini comme optimal dans une gamme comprise entre 7 et 10, soit légèrement basique (Figure 129B).

Néanmoins, les optimisations présentées ici forment en quelque sorte une feuille de route dont les paramètres proposés exigent d'être modulés en fonction du système catalytique étudié.<sup>[418, 481]</sup> Un article récent de J. Kosman et B. Juskowiak publié dans *Cent. Eur. J. Chem* illustre bien cette observation en démontrant qu'il est nécessaire de modifier la nature du surfactant pour la réaction de DNAzyme impliquant la séquence Tel2 d(<sup>5'</sup>A(G<sub>3</sub>T<sub>2</sub>A)<sub>4</sub>G<sub>3</sub><sup>3'</sup>);<sup>[487]</sup> le choix du Brij58 est ici beaucoup plus judicieux que celui du Triton X-100 qui avait préalablement été choisi sur la base d'un système utilisant la séquence PS2.M. La température joue également un rôle tout comme la nature du substrat à oxyder pouvant être soit une sonde UV-visible, soit une sonde fluorescente.<sup>[488, 489]</sup>

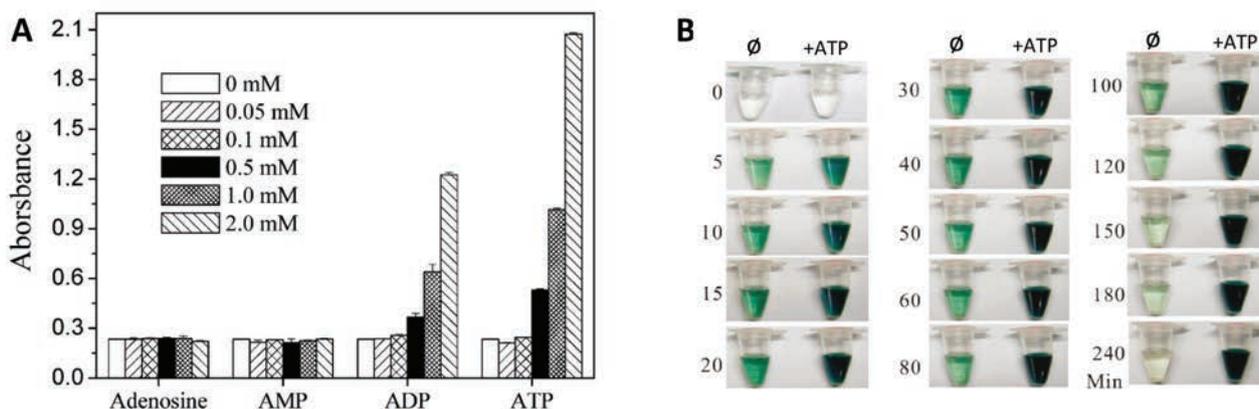


Figure 130 – Effet de l'ajout d'adénosine, d'AMP, d'ADP ou d'ATP sur la réaction de DNAzyme mettant en jeu 0,1 $\mu$ M de quadruplexe CatG4 (A) et évolution de la couleur du système catalytique en l'absence ( $\emptyset$ ) ou en présence (+ATP) d'ATP en fonction du temps (B).

Parmi les multiples possibilités permettant l'amélioration de la catalyse DNAzyme et par extension TASQzyme, une étude menée par D.-M. Kong a particulièrement attiré notre attention.<sup>[490]</sup> Elle met en évidence que l'utilisation d'adénosine 5'-triphosphate, ou ATP, à des concentrations de l'ordre du millimolaire augmente significativement l'efficacité de la réaction et offre donc une solution simple et peu coûteuse bien que son effet varie en fonction du système étudié. De manière intéressante, les dérivés à chaîne phosphate plus courte ADP et AMP (Figure 130A) ainsi que les équivalents CTP, GTP et UTP ne sont pas ou peu inefficaces pour des raisons non élucidées par les auteurs. L'effet positif apporté par l'ATP est lui décrit comme stabilisant le radical cation ABTS<sup>•+</sup> qui se forme au fur et à mesure de l'oxydation de la sonde ABTS ce qui



Dans un premier temps, l'ion chlore lié au Fe(III) en position apicale est substitué dans le milieu par une molécule d'eau à son tour remplacée par le peroxyde d'hydrogène, réactif initiant la réaction catalytique, pour former le **composé 0** en équilibre avec le **composé 0\***. Le clivage de la liaison O-H nécessite dans le cas d'une enzyme la participation d'une histidine captant le proton  $H^+$  ; dans un contexte oligonucléotidique et comme proposé précédemment, ce rôle peut être supporté par l'une des nucléobases constituant les boucles du quadruplexe. S'ensuit la perte d'une molécule d'eau conduisant au **composé 1** qui s'accompagne de la perte de deux électrons due d'une part à l'oxydation du Fe(III) en Fe(IV) et d'autre part à celle du cycle porphyrinique conférant au complexe global un caractère radical cation. Le substrat mis en jeu, ici l'ABTS, subit un transfert mono-électronique entraînant la production d'ABTS<sup>•+</sup> et du **composé 2** qui par ce gain électronique perd son caractère radicalaire et retrouve une charge globale neutre. A ce stade, une seconde molécule de peroxyde d'hydrogène entre dans le cycle catalytique (étape F) et permet la réduction du Fe(IV) en Fe(III)-hyperoxyde pour former un intermédiaire réactionnel qui deviendra, par perte d'une molécule d'eau, le **composé 3**. Ce dernier renferme un Fe(III)-superoxyde qui est, selon certaines équipes de recherche, plutôt considéré sous sa forme isoélectronique Fe(II)-oxy. Une fois de plus, la présence du substrat ABTS entraîne un nouveau transfert mono-électronique pour conduire (étape H) au composé Fe(III)-peroxy qui relargue son ligand anionique apical peroxy  $O_2^-$  pour capter une molécule d'eau, revenant ainsi à son état catalytique initial.

Au regard de ce mécanisme et de la littérature scientifique, nous avons proposé et étudié quatre rôles majeurs de l'ATP comme facteur d'optimisation de la catalyse DNAzyme :

- **activation de la réaction avec  $H_2O_2$**  (étape C, Figure 131, bas) : dans un contexte protéinique, cette étape est supportée par une histidine qui capte le proton, bien que cet équilibre ne soit pas thermodynamiquement favorisé avec des valeurs de  $pK_a$  de  $pK_a(\text{His-Im}H^+/\text{His-Im})=2,5$  et  $pK_a(\text{porph-Fe-H}_2\text{O}_2/\text{porph-Fe-HO}_2^-)=3,2-4$ , c'est-à-dire une constante d'équilibre  $K=10^{-1,5}$  à  $10^{-0,7}$ . Néanmoins, la liaison du peroxyde d'hydrogène avec la porphyrine de Fer rend la réaction « moins défavorable » selon les termes de l'équipe de B. Dunford<sup>[493]</sup> puisque seul en solution la constante d'acidité de  $H_2O_2$  est de  $pK_a(H_2O_2/HO_2^-)=11,6$ , soit une constante d'équilibre  $K=10^{-9,1}$  (la fixation au fer augmentant donc drastiquement l'acidité des protons).

En considérant l'utilisation des NTP, à savoir ATP, CTP, GTP, TTP (Figure 132A) sur un système catalytique DNAzyme en présence de 22AG et d'ABTS, nous observons une amélioration nette de l'activité globale en présence d'ATP et de CTP et un effet très faible avec les deux autres (Figure 132B). L'explication de ce phénomène nécessite de prendre en compte les constantes d'acidités de chacun de ces composés :  $pK_a(\text{ATP.H}^+/\text{ATP})=3,6$  ;  $pK_a(\text{CTP.H}^+/\text{CTP})=4,1$  ;  $pK_a(\text{TTP}/\text{TTP}^-)=9,8$  ;  $pK_a(\text{GTP}/\text{GTP}^-)=9,5$ .

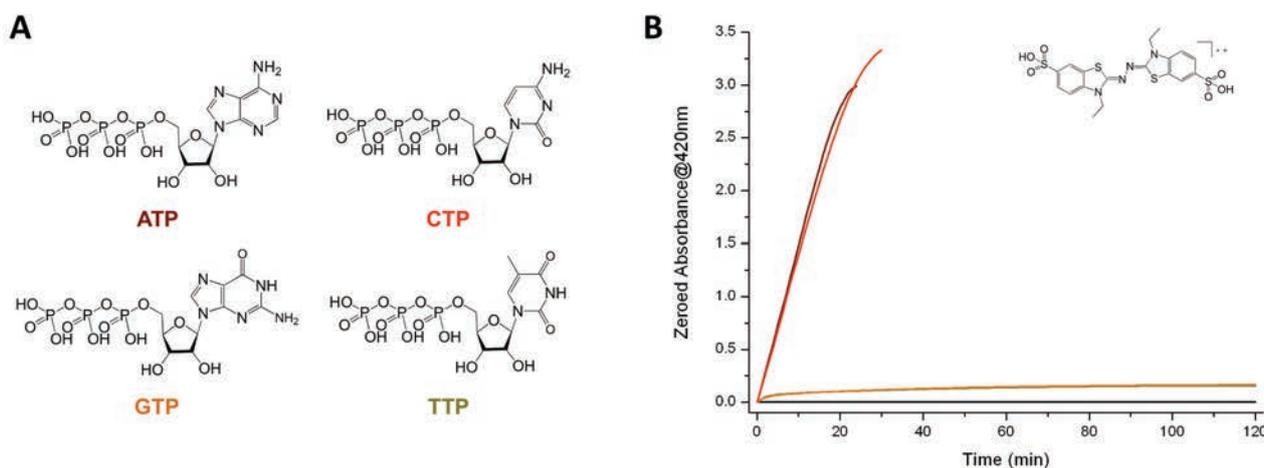


Figure 132 – Structures chimiques des 4 nucléotides triphosphates (A) utilisés dans les réactions de DNazyme dans un tampon Caco.KTD en présence du quadruplexe 22AG (100nM), d’hemin (1 $\mu$ M), de peroxyde d’hydrogène (6mM) dont l’oxydation de l’ABTS (5mM) est suivie en fonction du temps (B).

Il s’avère donc ici que ATP et CTP, qui jouent le rôle de base, ont des  $pK_a$  faibles situés dans la même gamme que celui de  $H_2O_2$  lorsqu’il est ligand apical de l’atome de fer de la porphyrine. Remarquons toutefois que, curieusement, l’étude publiée par D.-M Kong *et al.* ne montrait aucune activité pour CTP contrairement à ici, ce qui pourrait s’expliquer par des différences de concentrations de dérivés nucléotidiques utilisés (10mM contre 2mM).<sup>[490]</sup> Cependant, même si le gain apporté par CTP est proche de celui de l’ATP, son prix près de 15 fois supérieur selon les fournisseurs nous laisse considérer l’ATP comme un choix beaucoup plus judicieux en vue d’applications sur des volumes et des concentrations importantes.

- **aide aux transferts mono-électroniques** (étapes E et H, Figure 131, bas): le second rôle proposé pour l’ATP est son implication lors des deux réactions de transferts mono-électroniques (étapes E et H) du cycle catalytique. En effet l’hydrolyse de l’ATP, c’est-à-dire la rupture d’une ou de deux de ses liaisons phosphodiester, est principalement connue comme source d’énergie pour la cellule<sup>[5, 494-496]</sup> et favorise également les transferts électroniques.<sup>[497, 498]</sup> Le mécanisme sous-jacent à ce dernier effet n’est actuellement pas connu et est résumé de manière très explicite par Kurnikov *et al.* : « *one of the mysteries [...] is how the energy of the phosphate bound hydrolysis is coupled to the electron-transfer reaction* ». <sup>[498]</sup> En partant du principe que l’efficacité catalytique est en partie fonction de la réaction d’hydrolyse suivante :<sup>[5]</sup>



l’adénosine 5’-( $\beta,\gamma$ -imido)-triphosphate plus connue sous le nom de ADP-N-P (Figure 133A) au sein de laquelle la liaison P-O-P terminale a été remplacée par une liaison P-NH-P beaucoup plus robuste est classiquement utilisée comme analogue non hydrolysable de l’ATP et devrait offrir un gain sur l’efficacité catalytique moindre.<sup>[499]</sup>

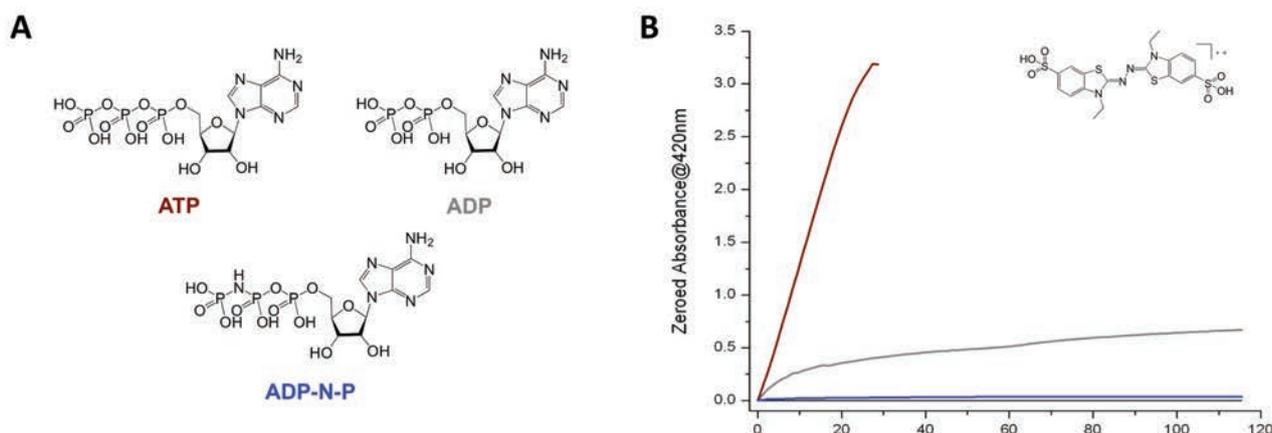


Figure 133 - Structures chimiques des 3 nucléotides triphosphates (A) utilisés dans les réactions de DNazyme dans un tampon Caco.KTD en présence du quadruplexe 22AG (100nM), d'hemin (1 $\mu$ M), de peroxyde d'hydrogène (6mM) dont l'oxydation de l'ABTS (5mM) est suivie en fonction du temps (B).

Au regard des résultats obtenus (Figure 133B), il apparaît sans équivoque que l'ATP a bien un rôle favorable lors des réactions de transferts mono-électroniques au cours du cycle DNazyme puisqu'en sa présence la réaction est efficace alors qu'elle est presque nulle en présence de même quantités d'ADP-N-P. Notons également, comme reporté par D.-M Kong *et al.*,<sup>[490]</sup> la faible activité obtenue avec l'ADP qui offre une stabilité plus grande que l'ATP et son hydrolyse en AMP est donc moins facilitée.

- **stabilisation des réactifs et produits de réaction** : comme proposé par D.-M Kong *et al.*, l'ATP joue un troisième rôle de stabilisation des radicaux cations comme l'ABTS<sup>•+</sup> produits au cours de la réaction.<sup>[490]</sup> Nous avons pour notre part confirmé cet effet avec le suivi d'une réaction de DNazyme dont l'absorbance ne cesse de croître pendant plus de 10h alors qu'elle stagne puis diminue beaucoup plus rapidement en l'absence d'ATP en moins de 90min. De plus, l'ATP semble jouer un rôle protecteur en ralentissant sensiblement la dégradation de l'hemin.<sup>[490, 491, 500]</sup>

- **effet pH** : ce quatrième rôle est indirectement lié à l'ATP est provient de l'observation que l'ajout de grandes quantités d'ATP dans une solution diminue fortement son pH. Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'addition de 10mM d'ATP dans le tampon Caco.KTD à pH 7,2 entraîne une chute du pH à 4,8. Cette concentration que nous avons jugée optimale place ainsi le milieu réactionnel dans des conditions d'acidité qui vont à l'encontre des gammes de pH optimum proposées dans la littérature scientifique tels les travaux de P. Travascio *et al.* en l'absence d'ATP (Figure 129B, pH<sub>opt.</sub>=7-10)<sup>[404]</sup> ou par ceux de D.-M. Kong *et al.* en présence d'ATP (pH<sub>opt.</sub>=7,0-7,5),<sup>[490, 491, 500]</sup> néanmoins, cette différence confirme une fois de plus le besoin de moduler les paramètres expérimentaux en fonction du système considéré, incluant la séquence d'ADN étudiée mais également les concentrations en réactifs.

Pour juger de l'efficacité de l'ATP sans cet effet pH, nous avons utilisé quatre milieux réactionnels : le premier est le même que celui utilisé parties XIV.1 et XIV.2, à savoir un tampon Caco.KTD à pH 7,2 ; le second est une solution de Caco.KTD en présence d'ATP dont le pH est fixé après l'addition d'ATP à 7,2 ; le troisième milieu est une solution Caco.KTD à pH 4,8 et le dernier est une solution de Caco.KTD en présence d'ATP à pH 4,8.

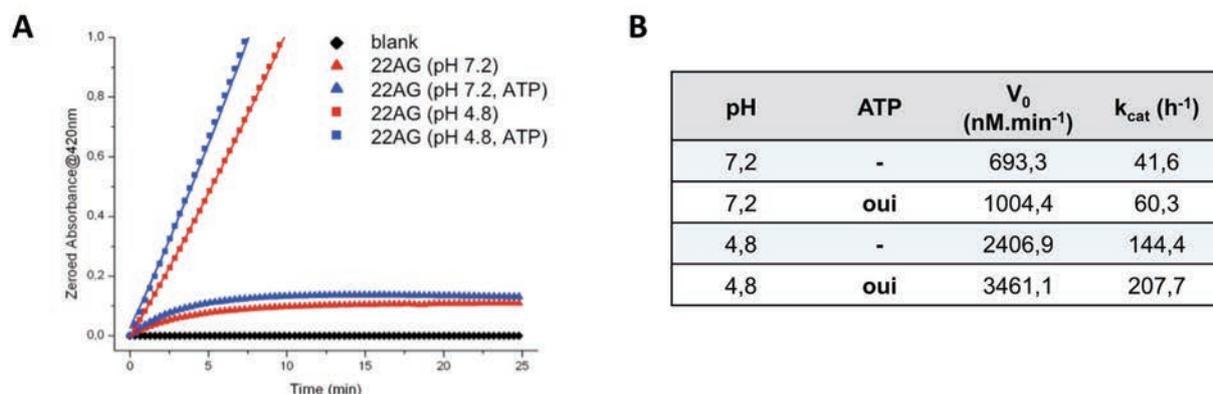


Figure 134 – Evolution de l'absorbance à 420nm correspondant au produit d'oxydation de l'ABTS en fonction du temps et en présence d'un milieu acide ou neutre, en présence ou en l'absence de 10mM d'ATP (A) et valeurs des vitesses initiales  $V_0$  et des constantes de vitesses  $k_{cat}$  qui en sont issues (B).

Les résultats (Figure 134A) ainsi que les vitesses initiales (Figure 134B) démontrent dans un premier temps l'importance de l'effet pH sur l'efficacité (avec un gain d'environ 3,5) ; ils valident également l'effet de l'ATP dont les trois contributions proposées ont été énumérées ci-avant et dont le gain est d'un facteur 1,5 environ. En cumulant ces deux effets, c'est-à-dire pH acide à 4,8 et ATP, la vitesse initiale est multipliée par 5 par rapport aux conditions « classiques » à pH 7,2 sans ATP que nous avons utilisées jusqu'à présent pour les études cinétiques du DOTASQ et du P<sup>NA</sup>DOTASQ.

Bien évidemment, ces aspects qualitatifs du rôle positif de l'ATP restent à approfondir davantage par d'autres études qui nécessiteront en parallèle une recherche détaillée du mécanisme précis sur lequel repose les réactions de DNAzyme et par extension de TASQzyme.

### XIV.3.B Résultats sur le DOTASQ et le RAFT-G4

Afin de valider l'universalité de la méthode de TASQzyme avec un autre TASQ hydrosoluble issu d'un autre laboratoire, nous avons eu la chance au cours de cette thèse de pouvoir étudier le RAFT-G4 (Figure 135A, droite) développé par P. Murat *et al.* (voir V.1) grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr. E. Defrancq du Département de Chimie Moléculaire de l'Université de

Grenoble.<sup>[250]</sup> De plus, nous avons cherché à évaluer l'impact des conditions ATP à pH 4,8 sur les TASQzyme en comparaison avec les résultats pouvant être obtenus en conditions classiques.

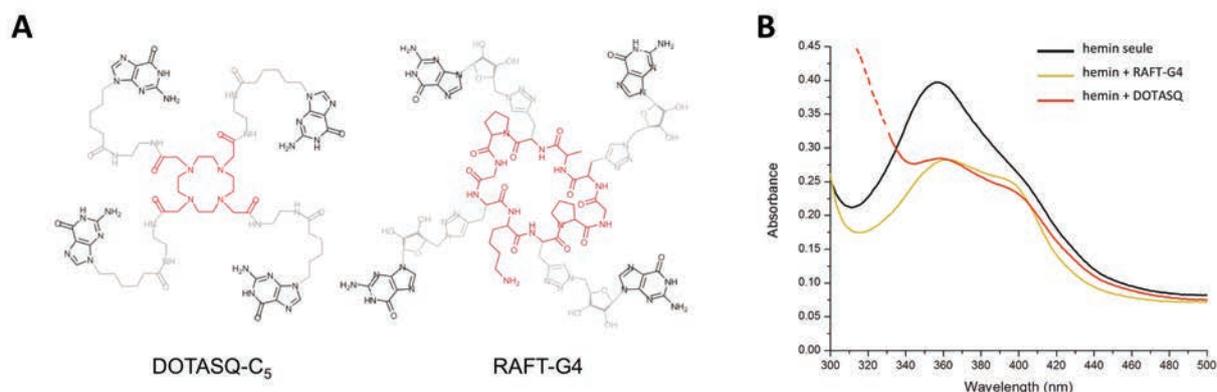


Figure 135 – Structure chimique du DOTASQ-C5 et du RAFT-G4 (A) et spectres UV-visible de l'hemin seule ou en présence de 5équivalents de TASQ hydrosoluble (B).

Dans un premier temps, une mesure d'absorbance de l'hemin a été réalisée lorsqu'elle se trouvait seule ou en présence de 5 équivalents de RAFT-G4 ou de DOTASQ (Figure 135B). Seule en solution, son spectre caractéristique témoigne de la présence majoritaire de la forme agrégée de l'hemin, avec une bande à  $\lambda=363\text{nm}$ , alors qu'en présence de chaque TASQ, une bande à  $\lambda=394\text{nm}$  est visible et atteste d'une apparition de la forme désagrégée, catalytiquement active, de l'hemin :<sup>[404]</sup> l'interaction qui constitue l'étape clef de la catalyse a donc bien lieu.

Les réactions catalytiques sont alors réalisées en présence d'hemin ( $1\mu\text{M}$ ), d'ABTS ( $2\text{mM}$ ), et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,6\text{mM}$ ) dans un tampon Caco.KTD à pH 7,2 sans ATP en présence de quantités croissantes de TASQ (10 à  $100\text{mM}$ ). Les résultats obtenus (Figure 136A-C) montrent globalement que l'efficacité est fonction de la concentration en TASQ et qu'elle est moindre dans le cas du RAFT-G4. Mais une nouvelle fois, la démonstration que les réactions de TASQzymes sont dépendantes de la formation d'une tétrade de guanines intramoléculaire est faite et ce, quelle que soit l'architecture du composé supramoléculaire.

La même série d'expériences est menée dans un milieu réactionnel à pH 4,8 composé de  $10\text{mM}$  d'ATP (Figure 136D-F) et permettent rapidement de constater le gain d'efficacité apporté par ces nouvelles conditions expérimentales. Cette amélioration se traduit par une augmentation de la vitesse initiale atteignant 1,8 pour le DOTASQ contre près de 5,1 pour le RAFT-G4. Notons également la linéarité des courbes en conditions ATP qui contraste avec leur affaissement en l'absence d'ATP (Figure 136B et E).

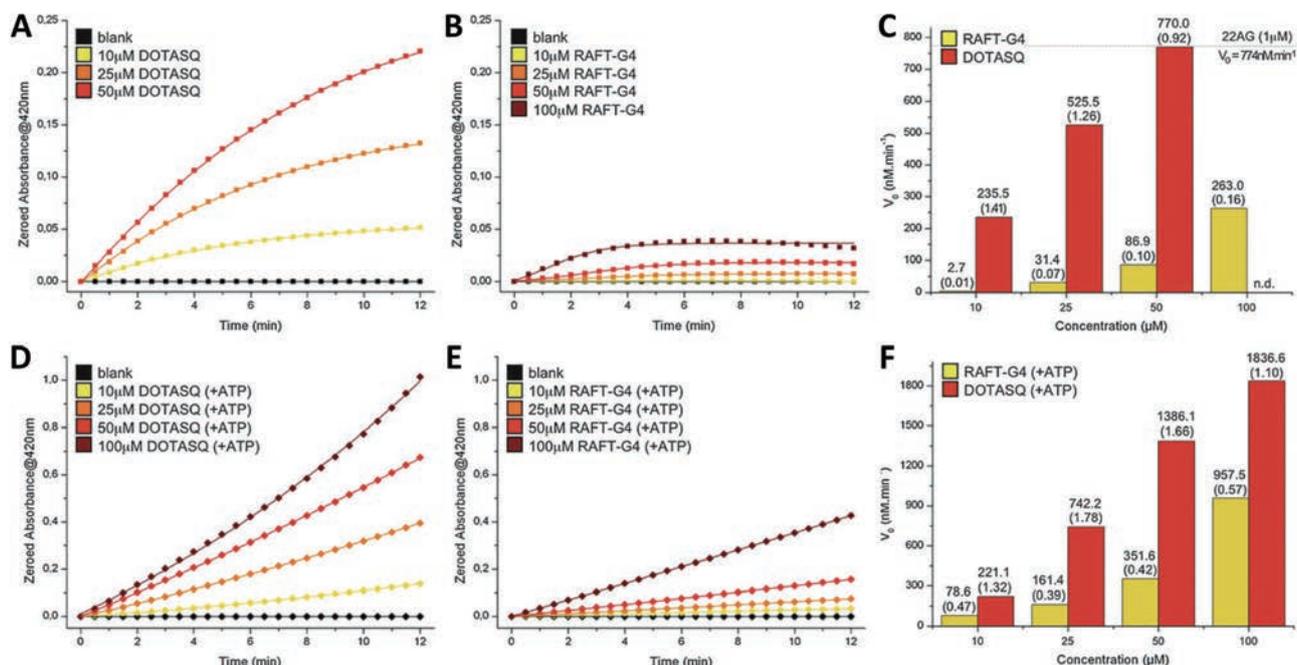


Figure 136 – Résultats de TASQzyme obtenus en présence de DOTASQ-C<sub>5</sub> (A et D) ou de RAFT-G4 (B et E) en l'absence (A et B) ou en présence (D et E) de 10mM d'ATP et évolution des vitesses initiales  $V_0$  en fonction de la concentration en TASQ en l'absence (C) ou en présence (F) d'ATP.

Nous avons ainsi démontré au cours de cette partie XIV que les TASQ hydrosolubles de type DOTASQ, <sup>PNA</sup>DOTASQ et RAFT-G4 peuvent jouer le rôle de catalyseur de réaction de TASQzyme en mimant la structure des quadruplexes d'ADN impliqués dans les réactions de DNAzyme. Ce gain de praticité s'accompagne comme lors du passage de la protéine à l'ADN d'une perte d'efficacité catalytique globale contrebalancée par une simplification d'utilisation indéniable. De manière intéressante, il est possible d'améliorer les conditions expérimentales afin de favoriser la réaction catalytique par l'emploi d'un milieu réactionnel légèrement acide et riche en ATP. Rappelons toutefois que ces conditions sont intimement liées au système envisagé et que leur optimisation est nécessaire afin d'obtenir la meilleure réponse catalytique.

## XV. Les TASQ hydrosolubles comme « boosters » des réactions de DNAzyme

La plupart des études structurales et *in vitro* portant sur les quadruplexes d'ADN se focalisent sur l'utilisation d'un quadruplexe unique, indépendant, formé à partir d'une séquence d'une vingtaine de bases. Or, comme nous l'avons développé un peu plus tôt dans ce manuscrit (voir VI.1.A.b), les publications relatives aux quadruplexes multimériques sont peu nombreuses, particulièrement dans le domaine des DNAzymes.

A ce jour, seules deux équipes autres que la notre se sont penchées sur ces structures : le groupe de C. Mao propose dès 2006 la détection de séquences d'ADN d'intérêt à partir d'un *template*

nucléotidique circulaire sur lequel sont présents à la fois la séquence complémentaire à l'analyte et une séquence riche en guanine (Figure 137A).<sup>[501]</sup> Par réplication circulaire de l'ADN (ou RCA pour *rolling circle replication*), l'analyte est allongé à l'aide de polymérase et présente à intervalles réguliers les séquences riches en guanines capables de se structurer en quadruplexes d'ADN. Par ajout d'hémine, de peroxyde d'hydrogène et d'ABTS, la réaction catalytique engendrée permet d'obtenir un signal indiquant la présence du brin d'intérêt et offre une limite de détection de 1 pM. Les auteurs notent que plus le brin est long, plus l'activité catalytique est élevée, sans qu'il n'y ait de lien de proportionnalité pour autant. Sans élucider l'origine de cette observation, ils publient trois ans plus tard un second article sur ce sujet dans lequel l'activité du multimère  $(TTAGGG)_{12}$  composé théoriquement de trois quadruplexes successifs présente une vitesse initiale 2,5 fois plus élevée (et non 3) que celle du quadruplexe discret  $(TTAGGG)_4$  (Figure 137B).<sup>[412]</sup>

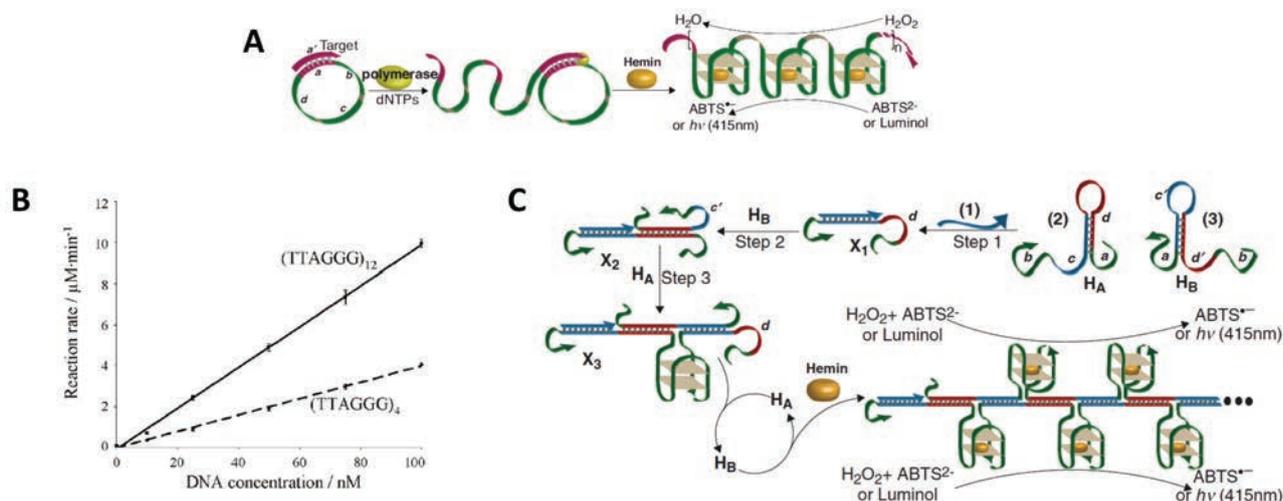


Figure 137 – Principe de détection d'analyte (en rose) par la méthode couplée RCA et DNAzyme utilisant un *template* circulaire contenant des séquences riches en guanines (en vert) (A). Evolution de la vitesse initiale d'un quadruplexe et d'un multimère en fonction de leurs concentrations (B) et principe de détection d'un analyte (en bleu noté (1)) par formation de nanofils (C).

En parallèle, l'équipe du Pr. I. Willner reporte dans *Anal. Chem.* une méthode de détection d'analyte d'ADN construite sur la formation *in situ* de nanofils renfermant de nombreux quadruplexes d'ADN (Figure 137C),<sup>[441]</sup> mais son étude la plus élégante et prometteuse est sans aucun doute celle proposant la détection de l'activité de la télomérase de lysats cellulaires. Cette technique décrite plus en détails partie XIII.2 part du postulat que plus le nombre de quadruplexes est élevé, plus le signal obtenu sera important diminuant ainsi la limite de détection.<sup>[207, 502]</sup>

Cependant, quel lien existe-t-il entre l'activité d'un multimère et celle d'un quadruplexe ? Les relations de non proportionnalité relevée par C. Mao *et al.* laissent à penser qu'un multimère ne se comporte pas comme la somme des quadruplexes qui le composent.

Pour répondre à ces questions, nous avons mis en place une série de protocoles expérimentaux qui sera résumée dans un premier temps. Elle permettra d'ajouter un degré de compréhension supplémentaire au mécanisme de DNAzyme et constituera une base pour l'emploi de TASQ en tant qu'agent « booster » pour les réactions de DNAzyme par un effet synergique.

### XV.1 Elucidation de l'activité DNAzyme des quadruplexes multimériques

Au départ de la séquence télomérique humaine de 22 bases  $d(5'AG_3(T_2AG_3)_33')$  utilisée jusqu'alors sous la dénomination 22AG et formant un seul quadruplexe, nous avons sélectionné deux nouvelles séquences où le nombre de triplets de guanines a été multiplié par deux et par trois pour obtenir respectivement les séquences  $d(5'AG_3(T_2AG_3)_73')$  notée 46AG et  $d(5'AG_3(T_2AG_3)_{11}3')$  nommée 70AG. En partant de l'hypothèse que ces brins d'ADN se structurent sous une « conformation stackée » (voir VI.1.A.b), ces trois modèles proposés sont donc potentiellement capables de former respectivement un, deux, ou trois quadruplexes en leur sein (Figure 138)

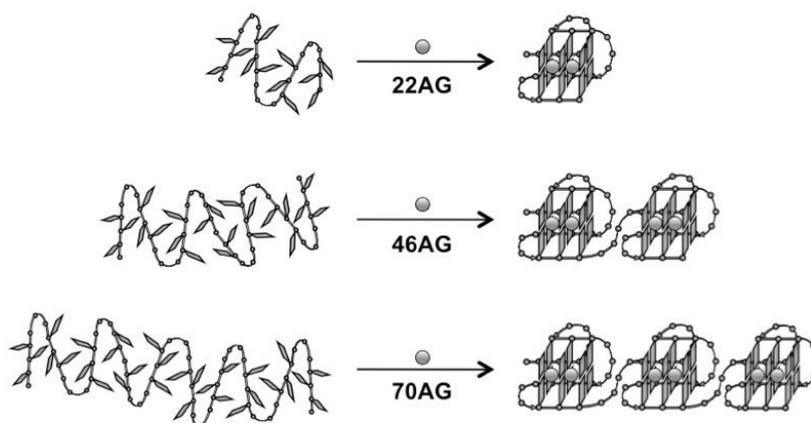


Figure 138 – Représentation schématique des trois structures étudiées.

Ainsi, au regard de ces structures apparaissent deux types de sites d'interactions envisageables pour l'hemin : un premier que nous appellerons site externe est constitué de l'une des tétrades extérieures de l'édifice et est présent au nombre de deux pour chacun des oligonucléotides. Le second se situe à l'interface entre deux quadruplexes où l'hemin peut également venir s'intercaler : le site interne (Figure 139), qui différencie les trois multimères puisque le 22AG en est dépourvu, le 46AG en possède un alors que le 70AG en renferme théoriquement deux.

D'une manière intéressante, les équipes de L. Petraccone<sup>[349]</sup> et H. Sugiyama<sup>[348]</sup> mettent en évidence que ces sites internes sont beaucoup plus hydrophobes que les sites externes favorisant

ainsi l'interaction de molécules organiques hydrophobes et par extension celle de l'hemin qui devrait se traduire par une modification de l'activité DNAzyme.

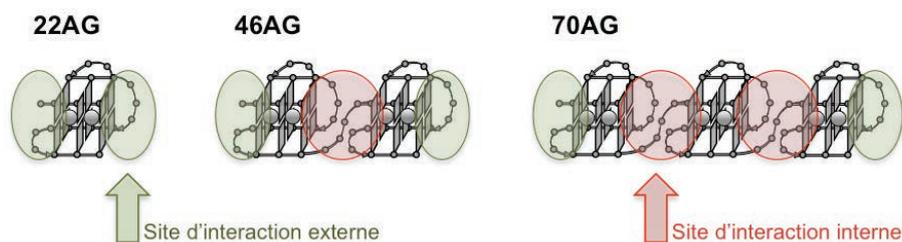


Figure 139 – Représentation des deux types de sites d'interactions pour l'hemin présents sur les quadruplexes et les multimères.

Nous avons ainsi réalisé une série d'expériences en suivant comme précédemment l'évolution de l'absorbance d'ABTS<sup>+</sup> en fonction du temps pour différentes conditions stœchiométriques. La concentration en hemin, à 1  $\mu\text{M}$ , reste fixe pour chaque réaction.

Les résultats de la réaction de DNAzyme au départ d'un équivalent de 22AG, 46AG et 70AG (Figure 140) confortent les observations de l'équipe de D. Mao puisque qualitativement,<sup>[503]</sup> plus le brin est long et forme de quadruplexes, plus l'activité pseudo-enzymatique est élevée. Le calcul des vitesses initiales (Figure 140, droite) met également en évidence l'absence de proportionnalité et une différence importante est à noter entre l'efficacité du 22AG et du 46AG, qui pourrait avoir pour origine la présence supplémentaire d'un site interne pour cette dernière structure.

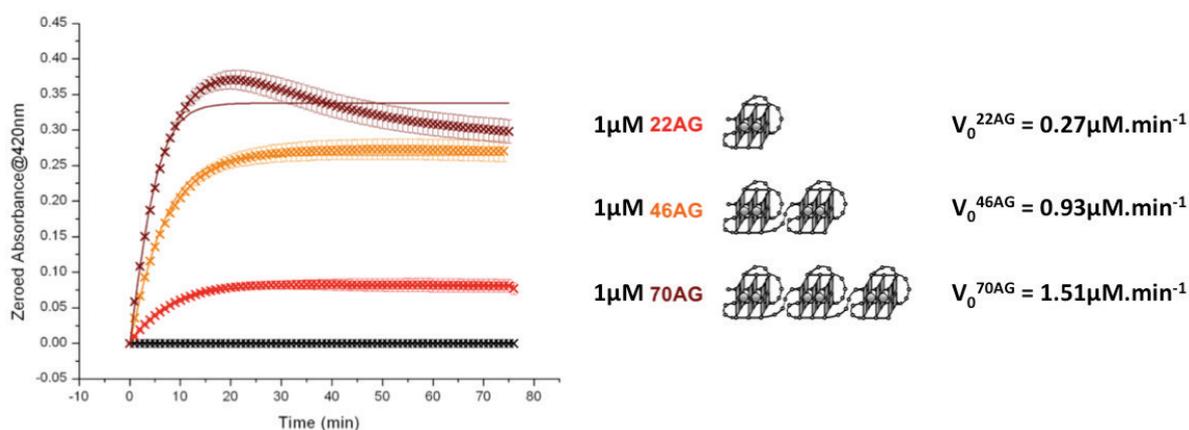


Figure 140 – Courbes (gauche), concentration en ADN (centre) et vitesses initiales (droite) des réactions de DNAzyme obtenues en présence d'un équivalent en brin d'ADN par hemin.

Afin de le vérifier, une seconde expérience mettant en jeu le même nombre d'unités quadruplexes que d'hemin a été réalisée. Plus précisément, un équivalent d'hemin a été mis en présence d'un équivalent de 22AG, de 0,5 équivalent de 46AG (qui forme en son sein deux quadruplexes) et 0,33 équivalent de 70AG (de trois quadruplexes). Les courbes représentées Figure 141 montrent que les activités des multimères sont bien meilleures que celles du 22AG, confirmant la présence d'un site de plus haute activité pour l'hemin. Ce résultat peut être attribué au site interne

plus hydrophobe et nous permet par conséquent d'appuyer l'hypothèse d'une conformation « stackée » et non « beads-on-a-string ». D'autre part, la similitude des vitesses initiales de catalyse et des profils entre le 46AG et le 70AG suggère que ce dernier possède une conformation proche de celle du 46AG en se structurant majoritairement en deux quadruplexes et non trois.

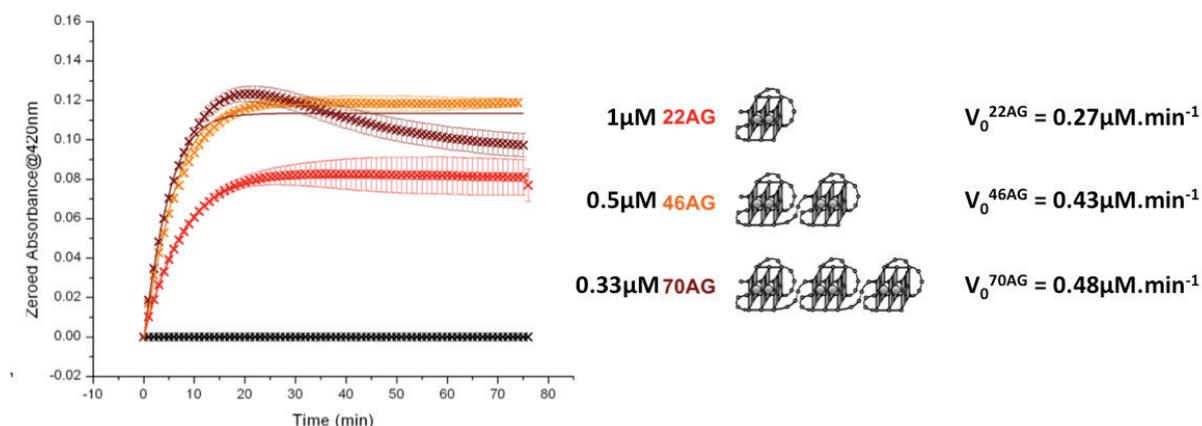


Figure 141 - Courbes (gauche), concentration en ADN (centre) et vitesses initiales (droite) des réactions de DNAzyme obtenues en présence d'un équivalent d'unité quadruplexe par hémim.

Pour le confirmer, une nouvelle expérience est menée cette fois-ci en fixant le nombre de sites internes théoriques égal au nombre d'hémim, soit un équivalent de 46AG contre seulement 0,5 de 70AG. La différence d'évolution des absorbances (Figure 142) témoigne d'un équilibre conformationnel du 70AG entre une structure à un site interne et une autre à deux, soit une structure à deux quadruplexes stackés et une autre à trois.

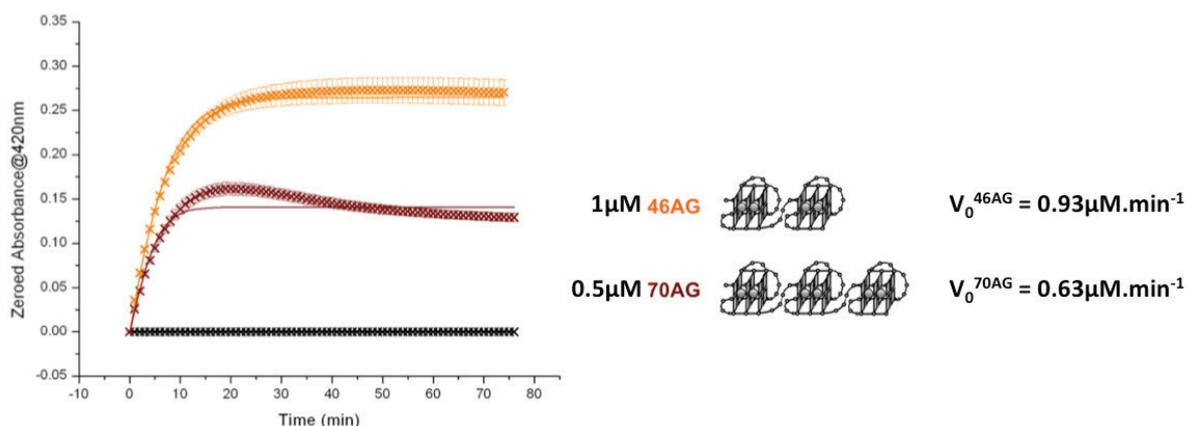


Figure 142 - Courbes (gauche), concentration en ADN (centre) et vitesses initiales (droite) des réactions de DNAzyme obtenues en présence d'un équivalent de site interne par hémim.

Parallèlement, les deux nouvelles séquences  $d(5'AG_3(T_2AG_3)_83')$  et  $d(5'AG_3(T_2AG_3)_93')$ , nommées 52AG et 58AG, plus longues que le 46AG, peuvent former un maximum de deux quadruplexes séparés par une séquence allant de 3 bases à 9 ou 15, respectivement. Bien que leurs activités DNAzyme soient très légèrement meilleures que celles du 46AG, indiquant qu'un gain de flexibilité est favorable à l'efficacité DNAzyme, elles restent inférieures à celle de 70AG.

Ainsi, en accord avec les travaux de L. Bauer *et al.*,<sup>[504]</sup> cette investigation suppose que le 70AG est majoritairement présent sous la forme de deux quadruplexes localisés à différents endroits sur le brin et interagissant entre eux par interactions de  $\pi$ -stacking ; cette forme est en équilibre avec celle proposée initialement dans laquelle trois quadruplexes s'empilent successivement (Figure 143). Cette conclusion est sans nul doute applicable aux séquences plus longues que 70AG, comme  $d(5'AG_3(T_2AG_3)_{15}3')$  ou encore  $d(5'AG_3(T_2AG_3)_{19}3')$  au sein desquelles la structure favorisée doit également être composée de plusieurs « dimères » de quadruplexes.<sup>[23]</sup>

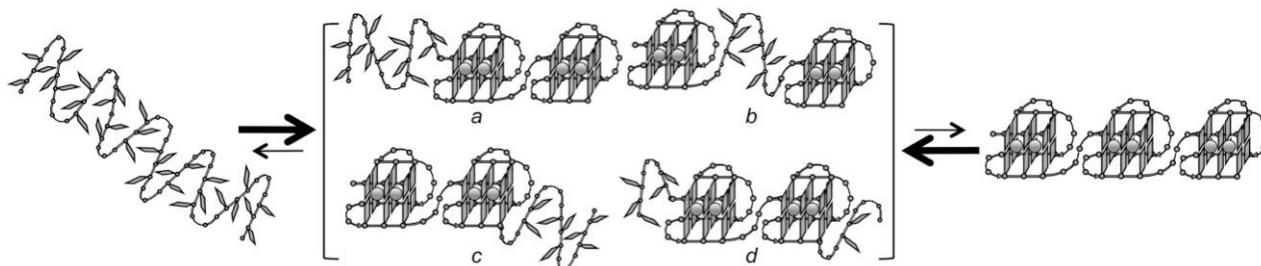


Figure 143 – Représentation schématique de l'équilibre conformationnel du multimère 70AG.

En plus de donner des informations indirectes sur la structure des multimères d'ADN, cette étude révèle que la catalyse DNAzyme faisant intervenir les quadruplexes d'ADN sera d'autant plus efficace si l'hémic se fixe à l'interface entre deux quadruplexes au niveau du site interne et non sur un site externe constitué uniquement d'une simple tétrade de guanines.

Les avantages apportés par cette interface sont en premier lieu ses propriétés hydrophobes qui favorisent la fixation de l'hémic et la protègent de la dégradation. De plus, une fois que l'hémic s'est fixée à l'une des tétrades présentes au niveau de l'interface, sa face distale se trouve au contact de la seconde tétrade de guanines qui peut alors jouer un rôle clef en mimant l'action de l'histidine, c'est-à-dire en favorisant la déprotonation du peroxyde d'hydrogène (étape C, Figure 131) grâce à l'action de l'une de ses guanines. Ainsi, la poche hydrophobe formée par le site interne se rapproche de la morphologie du site d'interaction présent dans les enzymes et offre de nombreux avantages supplémentaires par rapport aux sites externes.<sup>[418]</sup>

## XV.2 Création de sites artificiels de haute activité

Au cours de la seconde partie de ce chapitre, nous avons pu voir que la plupart des quadruplexes utilisés lors de réactions de DNAzyme sont des quadruplexes discrets de différentes séquences et conformations qui se caractérisent par la présence de deux sites externes constitués de deux tétrades extérieures. Or, comme nous venons de le démontrer, ces sites n'offrent pas la

meilleure réponse catalytique en comparaison aux sites internes beaucoup plus hydrophobes qui sont un atout en terme d'efficacité catalytique.

Notre idée fut donc d'utiliser au départ d'un système DNAzyme des quantités de TASQ hydrosolubles précédemment étudiés comme ligand de quadruplexes. Ainsi, par une reconnaissance biomimétique entre une tétrade synthétique et une tétrade naturelle, l'interaction crée virtuellement un nouveau site *pseudo-interne* répondant à une morphologie proche de celle des sites internes présents au niveau des multimères d'ADN (Figure 144). Cet apport devrait entraîner un gain d'activité global.

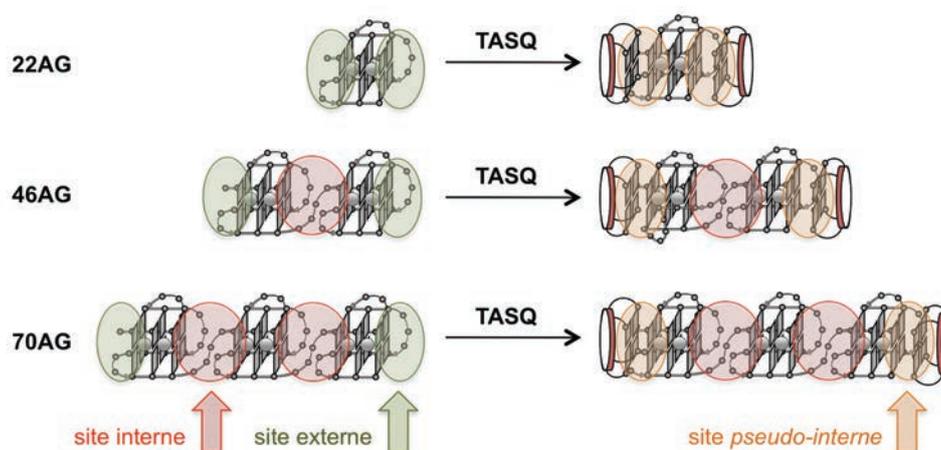


Figure 144 – Représentation schématique de la modification des sites d'interaction de l'hemin par addition de TASQ hydrosolubles.

Néanmoins, puisque les TASQ sont connus non seulement comme ligands de quadruplexes, mais aussi pour leur capacité à interagir avec l'hemin leur permettant de catalyser la réaction de peroxydation, le système mixte DNAzyme/TASQzyme peut conduire à quatre effets distincts :

- **compétition** : le TASQ et l'hemin entrent en compétition pour interagir avec l'ADN par interactions de  $\pi$ -stacking avec l'une des tétrades externes. Ainsi, l'hemin est chassée du site catalytique par le TASQ et entraîne une diminution de l'efficacité globale par rapport au système DNAzyme seul.

- **répartition** : l'hemin se répartit entre l'ADN et le TASQ offrant ainsi des réactions de DNAzyme et de TASQzyme simultanées avec une activité générale comprise entre celle du TASQzyme seule et celle du DNAzyme seule.

- **addition** : l'hemin se répartit également entre l'ADN et le TASQ mais cette fois-ci de manière alternative en passant de l'une à l'autre de ces structures. Ainsi, l'oxydation mesurée de la sonde sera équivalente à celle de l'activité du TASQ seul additionnée à l'activité de l'ADN seul.

- **synergie** : cette hypothèse correspond à notre attente. Le TASQ, en interaction avec le quadruplexe, convertit les sites externes en sites *pseudo-internes* hydrophobes dans lesquels l'hemin

va venir se fixer et offrir une réponse catalytique accentuée avec un gain important d'activité face aux systèmes DNAzymes et TASQzymes pris seuls.

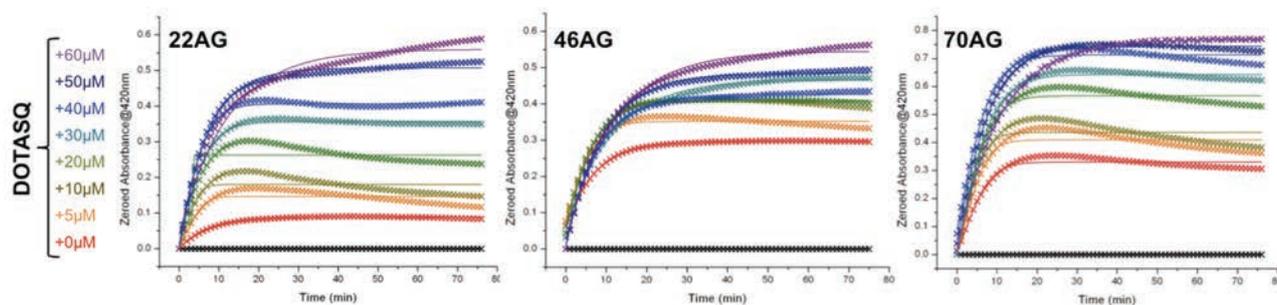


Figure 145 – Evolution des activités DNAzyme des systèmes catalytiques mixtes quadruplexe/DOTASQ pour  $1\mu\text{M}$  d'ADN et de quantités croissantes de DOTASQ en fonction du temps dans un tampon Caco.KTD.

Afin d'évaluer les effets d'un système mixte quadruplexe/TASQ, nous avons réalisé une première série d'expériences dans laquelle des quantités croissantes de DOTASQ- $\text{C}_5$  sont ajoutées à  $1\mu\text{M}$  de 22AG, 46AG ou 70AG en présence de  $1\mu\text{M}$  d'hemin, 2mM d'ABTS et 0,6mM de peroxyde d'hydrogène dans un tampon Caco.KTD. Les résultats obtenus (Figure 145) démontrent globalement une augmentation de l'activité catalytique par ajout de TASQ hydrosoluble, éliminant donc les deux premières possibilités envisagées de compétition et de répartition qui auraient conduit à une baisse d'efficacité.

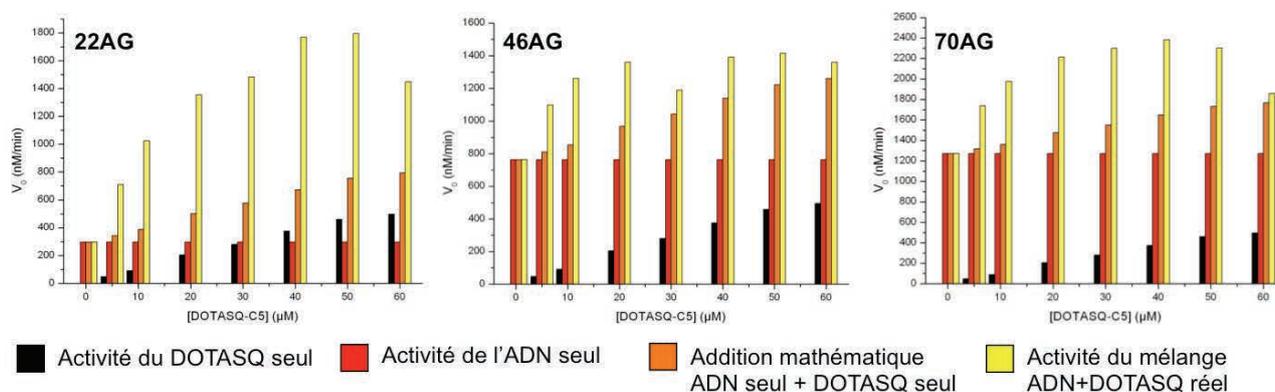


Figure 146 – Représentation graphique de l'évolution de vitesses initiales pour les systèmes mixtes quadruplexe/DOTASQ pour  $1\mu\text{M}$  d'ADN en fonction de la concentration en DOTASQ dans un tampon Caco.KTD.

Le calcul des vitesses initiales de chacun de ces systèmes permet de tracer le diagramme présenté Figure 146 dans lequel sont reportées, pour chaque condition de concentration de DOTASQ- $\text{C}_5$  et pour chacun des ADN, les activités du DOTASQ- $\text{C}_5$  seul (en noir), de l'ADN seul (à  $1\mu\text{M}$ , en rouge), et du système ADN+DOTASQ- $\text{C}_5$  (en jaune). Afin d'évaluer l'hypothèse de l'effet additif proposé, la troisième colonne (en orange) correspond à l'addition mathématique des activités de l'ADN seul et du TASQ seul et il advient que sa valeur est toujours largement inférieure à celle du système réel.

Notre approche initiale de transformation des sites externes en sites *pseudo-internes* se confirme donc par l'effet synergique observé. Il est par ailleurs intéressant de noter que cet effet est beaucoup plus marqué dans le cas du 22AG que des 46AG et 70AG avec un gain maximal de 2,7 contre 1,5 pour les deux multimères. Cette constatation provient du fait que sans DOTASQ-C<sub>5</sub>, les quadruplexes multimériques possèdent déjà des sites internes à haute activité et que la création de nouveaux sites aura une influence moindre que dans le cas d'un quadruplexe discret tel 22AG au sein duquel les deux sites de fixation de l'hemin sont des sites externes moins actifs.<sup>[23]</sup>

Cette étude permet donc d'une part de valider l'importance de sites hydrophobes formés à l'interface entre deux tétrades de guanines, qu'elles soient toutes deux naturelles (entre deux quadruplexes) ou naturelle et synthétique (quadruplexe et TASQ, respectivement), et offre d'autre part une nouvelle méthode d'amélioration de la détection des quadruplexes. En effet, l'ajout de DOTASQ-C<sub>5</sub> augmente l'efficacité de la catalyse et permet ainsi de diminuer la limite de détection ce qui, dans le cas d'une application telle que celle proposée par l'équipe de I. Willner (voir XIII.2),<sup>[207]</sup> permettra de détecter indirectement des quantités encore plus faibles de télomérase par le biais d'un nouveau système beaucoup plus sensible.

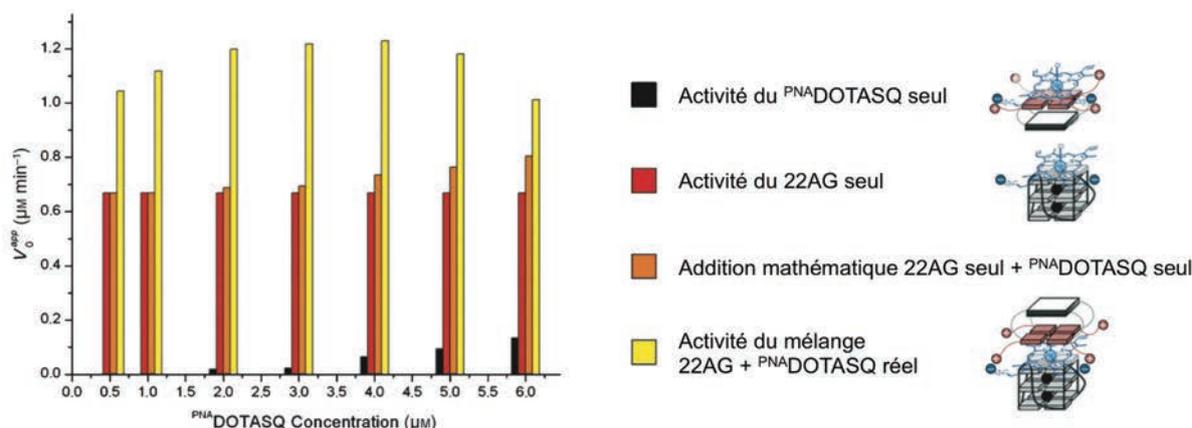


Figure 147 – Représentation graphique de l'évolution de vitesses initiales pour le système mixte 22AG/PNA-DOTASQ pour 2μM d'ADN en fonction de la concentration en PNA-DOTASQ dans un tampon Caco.KTD.

Afin de compléter cette étude, nous avons entrepris cette même série d'expériences de DNazyme en système mixte ADN/PNA-DOTAQ en se focalisant uniquement sur le quadruplexe discret 22AG pour lequel les meilleurs résultats de synergie ont été obtenus. Cependant, nous avons pu constater jusqu'ici que le PNA-DOTASQ présente une plus forte affinité pour les quadruplexes ainsi que pour l'hemin que son prédécesseur le DOTASQ-C<sub>5</sub> qui pourrait conduire ici à un effet de compétition beaucoup plus marqué. Pour pallier ce problème, la gamme de concentration a ici été réduite d'un facteur dix (ou de vingt en terme d'équivalents). Les diagrammes présentés (Figure 147) respectant le même code couleur que précédemment montrent une fois de plus l'effet

synergique apporté par la présence de TASQ dans un système DNAzyme. Les meilleures conditions expérimentales sont ici de  $2\mu\text{M}$  de  $\text{PNA}^{\text{DOTASQ}}$  pour  $2\mu\text{M}$  de 22AG pour lesquelles l'activité se voit doublée. Cette stœchiométrie 1 :1 confirme que le  $\text{PNA}^{\text{DOTASQ}}$  présente une forte affinité pour le quadruplexe et semble indiquer que le 22AG ne forme qu'un seul site catalytique en même temps, c'est-à-dire que l'interaction et la réaction avec l'hemin simultanément sur chacune des deux tétrades externes ne sont pas favorisées.

Avec le  $\text{PNA}^{\text{DOTASQ}}$ , le gain d'activité d'un facteur 2 est moindre par rapport à celui apporté par le DOTASQ-C<sub>5</sub> évalué à 2,7, mais nécessite en contrepartie une concentration 40 fois plus faible ( $40\mu\text{M}$  de DOTASQ pour  $1\mu\text{M}$  de 22AG contre  $2\mu\text{M}$  de  $\text{PNA}^{\text{DOTASQ}}$  pour  $2\mu\text{M}$  de 22AG).<sup>[19]</sup>

Ainsi, les TASQ hydrosolubles développés au cours de cette thèse peuvent être considérés comme des agents « boosters » de l'activité enzymatique des quadruplexes d'ADN en utilisant à la fois leur propriété de ligand de quadruplexe et de plateforme catalytique TASQzyme. Ils permettront ainsi de développer des applications au sein desquelles les concentrations en oligonucléotides pourront être abaissées tout en conservant une réponse catalytique identique.

## XVI. Conclusion

De par leur architecture, les TASQ hydrosolubles développés au cours de cette thèse peuvent être considérés comme des « modèles réduits » de quadruplexes d'ADN de par leur tétrade de guanines synthétique mimant l'une des tétrades extérieures naturelles de la structure oligonucléotidique. Cette ressemblance structurale peut se traduire dans certaines conditions par une similitude de propriétés, notamment de propriétés catalytiques.

Alors que la découverte des activités catalytiques des ARN naturels remonte au début des années 1980 grâce aux pionniers S. Altman et T. Cech,<sup>[375, 377]</sup> il faudra attendre une dizaine d'années pour voir les premiers systèmes synthétiques apparaître.<sup>[386]</sup> Fort de cette littérature scientifique, il sera démontré par la suite que l'ADN peut également jouer ce rôle de catalyseur et ce, pour de nombreuses applications, allant de la chimie à la biologie.<sup>[389]</sup> Mais l'emploi le plus représentatif des DNAzymes est sans nul doute celui de mimes de réactions des peroxydases. Cette nouvelle propriété voit le jour grâce aux travaux novateurs de l'équipe du Dr D. Sen qui démontrent que l'activité de ces peroxydases naturelles, en particulier celle de la *horseradish peroxidase* peut être mimée par l'utilisation d'un quadruplexe d'ADN en lieu et place de l'environnement protéinique de l'enzyme. Dans les deux cas, la catalyse repose sur le cofacteur actif qu'est l'hemin,

une protoporphyrine de Fe(III) sur laquelle s'effectuent les multiples réactions du cycle catalytique.<sup>[418]</sup>

Bien qu'il soit clairement établi que la formation du quadruplexe d'ADN est une condition *sine qua non* à l'activation de l'hemin, aucune preuve claire ne permet de vérifier l'hypothèse de l'interaction indispensable de l'hemin avec l'une des tétrades.

L'utilisation de nos « modèles réduits » DOTASQ et <sup>PNA</sup>DOTASQ ainsi que du RAFT-G4 développé par l'équipe du Pr. E. Defrancq, démontre un effet catalytique réel des TASQ qui, parce qu'ils n'ont en commun que la tétrade de guanines, semblent clairement indiquer que la catalyse repose bien sur l'étape clef d'interaction de  $\pi$ -stacking de l'hemin sur une tétrade.<sup>[19, 25]</sup> Cette démonstration est une pierre supplémentaire apportée à l'édifice de la compréhension du rôle des quadruplexes au cours de ce mécanisme catalytique dont les applications se développent aujourd'hui de manière exponentielle dans des domaines aussi variés que la détection de cations que de protéines, d'anticorps, ou encore pour le développement de portes logiques (voir XIII.2).

Afin de comprendre encore davantage les raisons d'un tel effet catalytique, nous avons tenté de décrypter les différentes étapes du cycle catalytique sur la base de la littérature scientifique relative aux peroxydases et catalases naturelles. Cette base solide nous a permis de mettre en place un protocole expérimental offrant la possibilité d'accentuer drastiquement la vitesse de réaction par l'ajout de quantités d'ATP introduit pour la première fois par les travaux de D.-M Kong en 2010.<sup>[490]</sup> L'apport de ce composé est multiple puisqu'il favorise à la fois l'activation de la réaction avec le peroxyde d'hydrogène ainsi que les transferts mono-électroniques. Il aide également à la stabilisation des réactifs et des produits de réactions et présente également un effet pH bénéfique.<sup>[24, 421]</sup>

Cette démonstration de l'utilisation d'une molécule de synthèse de type TASQ mimant l'activité catalytique d'un quadruplexe d'ADN et par extension l'activité enzymatique d'une protéine telle que la *horseradish peroxidase* (Figure 148) est une élégante preuve de concept des multiples facettes des TASQ hydrosolubles, et constitue également une approche innovante pour les nombreuses applications fondées sur ce type de réaction. Ainsi, en plus de leurs interactions sélectives avec les quadruplexes d'ADN et d'ARN par une reconnaissance biomimétique, les TASQ hydrosolubles forment de nouveaux catalyseurs qui, bien qu'offrant une activité moindre par rapport à leur équivalent ADN, présentent de nombreux avantages en terme de coût, de simplicité d'utilisation, d'échelle de production et de stabilité thermique. Etant en présence d'une molécule organique, les modifications structurales comme l'ajout d'une fonction chimique, ou d'un

chromophore, la métallation, etc. sont également plus simples et offrent de nombreuses possibilités en termes de modularité réactionnelle.

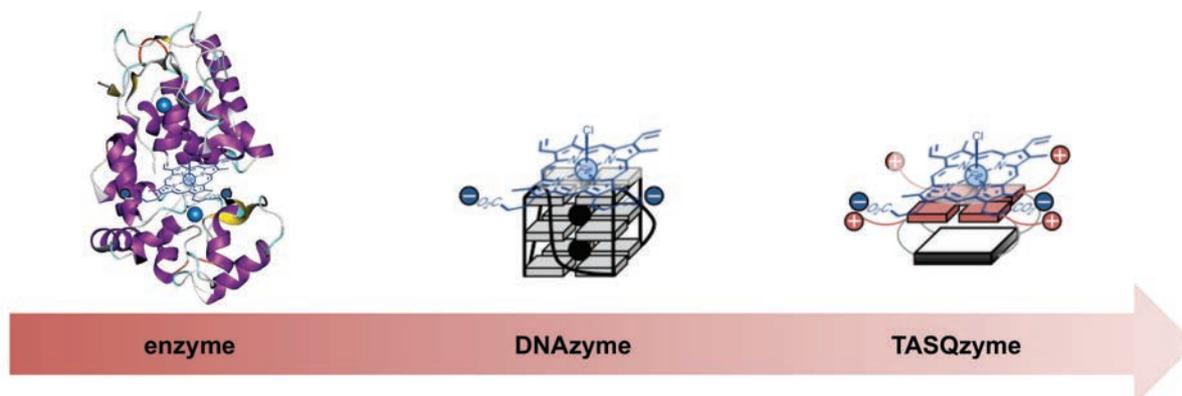


Figure 148 – Miniaturisation du catalyseur activant l’hémine pour les réactions de peroxydation.

Dans cette optique, nous développons actuellement une nouvelle méthode de détection de biomolécules par un test de type ELISA. La première étape qui consiste en la détection de la streptavidine en plaque 96 puits s’est montrée particulièrement efficace avec l’utilisation de RAFT-quadruplexes biotinylés synthétisés par l’équipe du Pr. E. Defrancq.<sup>[22]</sup> Sa simplification par l’utilisation de TASQ hydrosolubles est notre objectif principal et nécessite de nombreuses optimisations qui sont au cœur de notre travail de recherche actuel. Une fois ce palier franchi, nous espérons étendre ce mode de détection à de nombreuses biomolécules d’intérêt thérapeutique telles les anticorps ou les caspases qui jouent un rôle clef dans les phénomènes d’inflammation et d’apoptose, etc.

Forts des deux premières applications utilisant les TASQ hydrosolubles développés au laboratoire basées d’une part sur leurs propriétés d’interaction avec les quadruplexes ainsi que sur leur propriété catalytique nommée TASQzyme, nous avons reporté en dernière partie de ce chapitre la convergence de ces deux domaines. Elle consiste en l’utilisation d’un système mixte quadruplexe/TASQ dont l’interaction entre l’oligonucléotide et nos molécules organiques permet de former *in situ* un site plus hydrophobe, offrant ainsi une meilleure activité catalytique de l’hémine et permet donc de travailler dans des conditions de concentrations en ADN moindres.<sup>[19, 23]</sup> Cette avancée ouvre ainsi la voie à des détections plus sensibles d’analytes qui peuvent s’avérer cruciales dans un contexte biologique tel que la détection de l’activité de la télomérase dans un lysat cellulaire.

Ce chapitre fait donc la lumière sur la capacité des TASQ hydrosolubles à catalyser des réactions de peroxydation grâce à leur architecture moléculaire mimant la structure des quadruplexes d'ADN connus eux-même comme mimes de peroxydase.



## CONCLUSION GENERALE

Le travail de recherche mené au cours de cette thèse illustre bien la diversité et les multiples perspectives et opportunités offertes par la chimie. Grâce à cette liberté dépendante de quelques règles fondamentales, la Nature réussit à assembler la matière sous de nombreuses morphologies complexes et parfois étonnantes dont le plus bel exemple est sans nul doute celui de l'ADN. Elle réussit à organiser et à coordonner un nombre très restreint de briques élémentaires, les nucléotides, pour construire des assemblages polymorphiques parmi lesquels nous pouvons compter la célèbre double hélice d'ADN, mais aussi les triplexes, les jonctions à trois et quatre voies, les *i-motifs* ou encore les quadruplexes.

Cette dernière structure qui est au cœur d'un intense travail de recherche depuis une vingtaine d'années a constitué notre point de départ et notre source d'inspiration pour élaborer une toute nouvelle série de molécules : les TASQ hydrosolubles. Véritables modèles réduits des quadruplexes d'ADN ou d'ARN, les TASQ se définissent par la présence de quatre guanines capables de s'auto-assembler intramoléculairement selon les règles de la chimie supramoléculaire sous la forme d'une tétrade de guanines.

En utilisant le savoir-faire de la chimie moléculaire, nous avons synthétisé trois composés biomimétiques originaux construits autour d'un cœur cyclène pour le DOTASQ et le <sup>PNA</sup>DOTASQ, ou porphyrinique pour le PorphySQ.

Le premier édifice, le DOTASQ s'est avéré dans un premier temps peu efficace face à nos attentes et nous a conduit à considérer la chimie de coordination comme une alternative favorable. L'insertion d'un terbium au sein de sa cavité macrocyclique offre une contrainte géométrique importante se soldant par une forte amélioration de ses propriétés d'affinité et de sélectivité pour les quadruplexes.

En cherchant à développer un second système renfermant cette fois-ci un *template* actif favorisant la formation de la tétrade de guanines intramoléculaire, nous avons mis au point le PorphySQ, le cœur porphyrine étant en effet connu pour créer des interactions de  $\pi$ -stacking favorables. Afin de valider cette approche, nous avons fait appel à la chimie théorique par le biais de la modélisation moléculaire qui s'est avérée concluante. Une fois la synthèse réalisée, le composé a montré une amélioration par rapport au DOTASQ mais souffrait en contrepartie d'une hydrosolubilité moindre.

Enfin, le <sup>PNA</sup>DOTASQ revenait sur un motif cyclène sur lequel quatre bras PNA-guanines ont été greffés. Cette molécule est à ce jour le meilleur TASQ hydrosoluble développé grâce à l'effet synergique apporté par les quatre fonctions amines primaires protonées en milieu physiologique.

Néanmoins, tous ces nouveaux objets synthétiques innovants ne sont pas de simples curiosités de laboratoire mais s'inscrivent au contraire dans deux domaines de recherche en pleine expansion.

Le premier consiste au ciblage des quadruplexes d'ADN et d'ARN qui sont des structures présentes dans des régions clés du génome et du transcriptome dont la stabilisation par un ligand pourrait ouvrir de nouvelles perspectives en terme de thérapie antitumorale ciblée. Ainsi les TASQ hydrosolubles développés ici sont capables *in vitro* d'interagir sélectivement avec les quadruplexes sans perturber les structures duplexes majoritaires, propriété indispensable afin de réduire les éventuels effets secondaires non désirés lors d'utilisation *in vivo*. Les bons résultats rencontrés en particulier avec le <sup>PNA</sup>DOTASQ demandent maintenant à être confirmés par des études *in cellulo* pour lesquelles une collaboration est en cours.

En parallèle, la seconde application émane de l'architecture même des TASQ qui en fait des « modèles réduits » de quadruplexes d'ADN. Ainsi, il est possible de substituer ces derniers par les premiers dans bon nombre d'applications. La plus représentative et sans aucun doute la plus prometteuse est l'emploi actuel des quadruplexes comme catalyseurs pour les réactions de peroxydation en lieu et place des protéines. Afin de simplifier encore davantage cette miniaturisation, l'emploi des TASQ s'est avéré efficace, bien que l'activité catalytique observée soit moindre. Toutefois, cette preuve de concept ouvre la voie vers une simplification des techniques actuelles de détection où l'une des enzymes phare, la *horseradish peroxidase*, pourrait ainsi être remplacée par une petite molécule de synthèse d'une masse 25 fois plus faible.

Ainsi, ce travail de thèse s'est appuyé sur la chimie moléculaire, supramoléculaire, et biomimétique pour concevoir de nouveaux objets aux applications biologiques et nanotechnologiques prometteuses. La chimie analytique, catalytique et biologique ainsi que la biophysique nous ont permis d'étudier ces systèmes pour en faire des outils aux multiples propriétés.

Nous avons su, semble-t-il, tirer profit du meilleur de chacun des mondes, de chacune des facettes de la chimie pour mener à bien ce projet de recherche qui prouve, une fois de plus, que la chimie est un instrument incroyable qui permet de créer à l'infini, et dont la seule limite est notre propre imagination.





## EXPERIMENTAL PART

### XVII. Materials and chemicals

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 or 600 spectrometer (300MHz or 600MHz for  $^1\text{H}$ ; 75MHz or 150MHz for  $^{13}\text{C}$ ). All chemical shifts were referenced to the solvent peak. Deuterated solvents ( $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ) were purchased from SDS. The following abbreviations are used: singlet (s), doublet (d), triplet (t) and multiplet (m).

Mass spectroscopy services were provided by PACSMUB (Plateforme d'Analyse Chimique et de Synthèse Moléculaire de l'Université de Bourgogne), Dijon. Mass spectra were obtained with a Bruker Daltonics Ultraflex II spectrometer in the MALDI-TOF (MALDI for *matrix assisted laser desorption ionisation* and TOF for *time of flight*) reflection mode using dithranol as a matrix or by ESI (for *electrospray ionization*) on a Bruker microTOF-Q<sup>TM</sup> ESI-TOF mass spectrometer or on a LTQ Orbitrap XL Thermo spectrometer for HRMS (for *high resolution mass spectroscopy*).

Purifications were carried out by RP-HPLC Dionex Ultimate 3000 from ThermoScientific.

UV-Vis spectra were recorded on a JASCO V630Bio spectrophotometer with a thermally controlled six-cell holder in 1mL-quartz cuvettes (Starna) or on a ThermoScientific MultiSkan GO microplate spectrophotometer in a 96-well plate (with a 200 $\mu\text{L}$  total volume per well).

Fluorescence measurements were carried out in 1mL-quartz cuvettes (Starna) on a JASCO FP8500 spectrophotometer with a thermally controlled four-cell holder or on a Stratagene Mx3005P from Agilent Technologies in a 96-well plate (with a 100 $\mu\text{L}$  total volume per well).

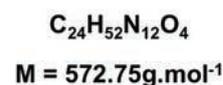
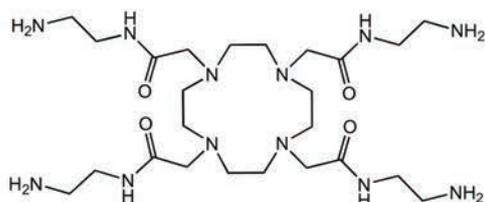
Reagents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, except for DOTAEt from CheMatech, Boc-PNA-G(Z)-OH from ASM Research Chemicals, TO-PRO3 from Life Technologies and ADP-N-P (for adenosine 5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphate) from Jena Bioscience and used without purification. Solvents were purchased from SDS.

All oligonucleotides were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium) in OligoGold purity grade at  $\approx 200\text{nmol}$  scale for unlabeled oligonucleotides and at  $\approx 1000\text{nmol}$  scale for labeled oligonucleotides (purified by RP-HPLC, except for 46AG and 70AG purified by IEX-HPLC and PAGE, respectively).

## XVIII. Chemical synthesis

### XVIII.1 Synthesis of DOTASQ-C<sub>1</sub>

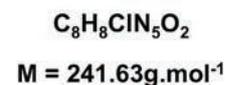
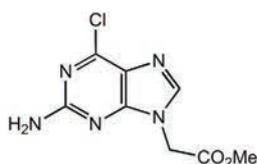
#### XVIII.1.A DOTA-4NH<sub>2</sub>



A solution of DOTAEt (506.5mg, 0.98mmol, 1.0eq) in ethylene diamine (3.2mL) was stirred at 20°C for 4 days under inert atmosphere. The mixture was then concentrated under reduced pressure and the resulting sluggish residue was taken up in CH<sub>3</sub>CN (10mL); the mixture was concentrated under reduced pressure and this protocol was repeated 3 times. The final compound, obtained as a white powder, was washed several times with CH<sub>3</sub>CN (2 x 20mL) and finally dried under reduced pressure (508.0mg, 0.89mmol, chemical yield = 91%).

**MS (ESI):**  $m/z = 573.4 [M+H]^+$ ;  $595.4 [M+Na]^+$  (100%).

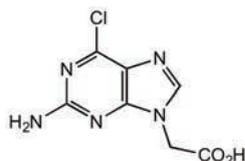
#### XVIII.1.B methyl 2-(2-amino-6-chloro-9H-purin-9-yl)acetate



To a cold (4°C) solution of 2-amino-6-chloropurine (1.19g, 7.02mmol, 1.0eq) in DMF (15mL) was added NaH (60% dispersed, 280.6mg, 7.02mmol, 1.0eq). The mixture was stirred till complete homogenization, and methyl bromoacetate (1.13g, 7.37 mmol, 1.1eq) was added. The yellow mixture was stirred at 20°C for 16 hours under inert atmosphere. After concentration under reduced pressure, the final compound was precipitated upon addition of water (50mL). The solid was collected by filtration, washed successively with water (40mL) and ethanol (10mL) and dried under reduced pressure. The final compound was obtained as a white solid. Retreatment of mother liquors (2 days at 20°C) leads to the crystallization of the final product as colorless needles; 1.05g of the final product were thus obtained (4.36mmol, chemical yield = 62%).

**$^1\text{H}$  NMR** (300MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO, 298K)  $\delta$  (ppm): 8.10 (s, 1H); 7.00 (s, 2H); 5.01 (s, 2H); 3.71 (s, 3H);  **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR** (75MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO, 298K)  $\delta$  (ppm): 168.1 (C=O); 159.9 (C-NH<sub>2</sub>); 154.2 (C<sup>9</sup>); 149.4 (C-Cl); 143.4 (C-H); 122.9 (C<sup>9</sup>); 52.5 (CH<sub>3</sub>); 44.9 (CH<sub>2</sub>); **MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 241.6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### XVIII.1.C 2-(2-amino-6-chloro-9H-purin-9-yl)acetic acid



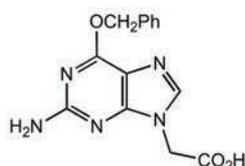
$\text{C}_7\text{H}_6\text{ClN}_5\text{O}_2$

$M = 227.61\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of methyl 2-(2-amino-6-chloro-9H-purin-9-yl)acetate (769.3mg, 3.18mmol) in dioxane (14mL) was added a solution of LiOH (1M, 14mL). The mixture was stirred at 20°C for 3 hours and then it was acidified (at pH = 5) by adding a solution of HCl (1M). The mixture was then concentrated under reduced pressure; the resulting residue was solved in a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (10mL), and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (40mL). The resulting aqueous phase was acidified at pH = 1 by adding a solution of HCl (1M). The white precipitate formed was collected by filtration and dried under reduced pressure; the final compound was obtained as a white solid (481.4mg, 2.12mmol, chemical yield = 67%).

**$^1\text{H}$  NMR** (300MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO, 298K)  $\delta$  (ppm): 13.39 (s, 1H); 8.09 (s, 1H); 6.97 (s, 2H); 4.85 (s, 2H);  **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR** (75MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO, 298K)  $\delta$  (ppm): 169.0 (C=O); 159.9 (C-NH<sub>2</sub>); 154.2 (C<sup>9</sup>); 143.6 (C-H); 44.1 (CH<sub>2</sub>); **MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 226.6$   $[\text{M}-\text{H}]^{+\bullet}$  (100%).

### XVIII.1.D (2-amino-6-(benzyloxy)-9H-purin-9-yl)acetic acid



$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$

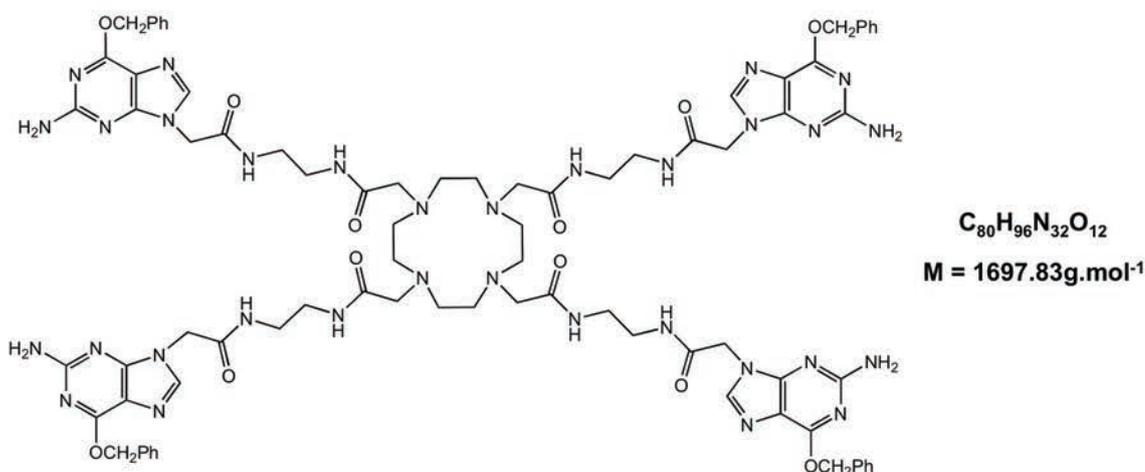
$M = 299.28\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

To a solution of 2-(2-amino-6-chloro-9H-purin-9-yl)acetic acid (514.7mg, 2.26mmol, 1.0eq) in benzyl alcohol (25mL) were added K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (343.8mg, 2.49mmol, 1.1eq) and DABCO (50.7mg, 0.45mmol, 0.2eq). The mixture was stirred overnight at 85°C. The sluggish orange residue was solved in water (30mL) and the resulting aqueous phase was solved with ethyl acetate (30mL); the aqueous phase was acidified to pH = 2 by a solution of HCl (1M). The white precipitate formed was extracted by ethyl acetate (2 x 40mL). The resulting solution was concentrated under reduced

pressure. The final product was obtained as a white solid (563.5mg, 1.88mmol, chemical yield = 83%).

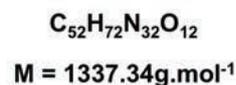
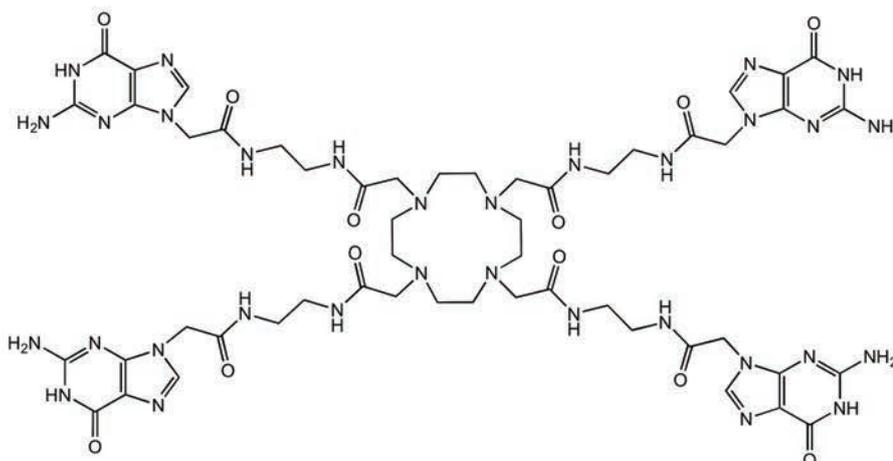
$^1\text{H NMR}$  (300MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 298K)  $\delta$  (ppm): 7.82 (s, 1H); 7.53 - 7.35 (m, 5H); 6.49 (s, 2H); 5.50 (s, 2H); 4.79 (s, 2H);  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR (75MHz,  $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ , 298K)  $\delta$  (ppm): 169.3 (C=O); 159.8 (C-NH<sub>2</sub>); 142.5 (C-H); 136.7; 128.4; 128.0; 126.6; 126.4; 113.2 (C<sup>q</sup>); 66.8 (O-CH<sub>2</sub>-Ph); 62.8 (-CH<sub>2</sub>-); **MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 299.6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%).

### XVIII.1.E Prot.DOTASQ-C<sub>1</sub>



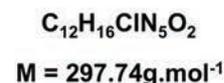
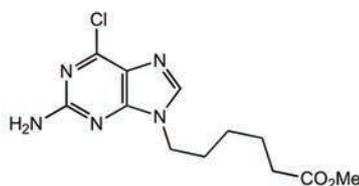
To a solution of DOTA-4NH<sub>2</sub> (80.1mg, 0.14mmol, 1.0eq) in DMF (11mL) was added 2-(2-amino-6-(benzyloxy)-9H-purin-9-yl)acetic acid (209.3mg, 0.70mmol, 5.0eq). HOBt (94.6mg, 0.70mmol, 5.0eq) and EDCI (134.2mg, 0.70mmol, 5.0eq) were thus added and the resulting mixture was stirred at 20°C for 4 days. After concentration under reduced pressure the yellow oily residue was taken up in water/ethyl acetate (1/1, 20mL). The formed white precipitate was collected by filtration, and the resulting solid was solved in methanol (10mL). The resulting mixture was concentrated under reduced pressure and the final compound was obtained as a white solid (149.5mg, 0.088mmol, chemical yield = 63%).

**MS** (ESI):  $m/z = 1719.8$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; **MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 1697.7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100%).

**XVIII.1.F DOTASQ-C<sub>1</sub>**

Prot.DOTASQ-C<sub>1</sub> (140.0mg, 0.08mmol) was taken up in a solution of MeOH saturated by HCl (4mL). The mixture was stirred at 20°C for 1 hour. The final product was precipitated by addition of diethyl ether (80mL). DOTASQ-C<sub>1</sub> is obtained as a white solid (108.5mg, 0.08mmol, chemical yield = 99%).

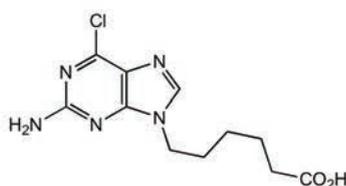
**MS** (ESI):  $m/z = 1337.6$  [M+H]<sup>+</sup>;  $1359.6$  [M+Na]<sup>+</sup>;  $1375.5$  [M+K]<sup>+</sup>; **MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 1337.5$  [M+H]<sup>+</sup> (100%).

**XVIII.2 Synthesis of DOTASQ-C<sub>5</sub>****XVIII.2.A Methyl 6-(2-amino-6-chloro-9H-purin-9-yl)hexanoate**

To a cold (4°C) solution of 2-amino-6-chloropurine (1.01g, 5.95mmol, 1.0eq) in DMF (20mL) was added NaH (60% dispersed, 237.9mg, 5.95mmol, 1.0eq). The mixture was stirred till complete homogenization, and methyl 6-bromohexanoate (1.31g, 6.24mmol, 1.1eq) was added. The yellow mixture was stirred at 20°C for 16 hours under inert atmosphere. After concentration under reduced pressure, the final compound was precipitated upon addition of water (70mL). The solid was collected by filtration, washed successively with water (60mL) and ethanol (10mL) and dried under reduced pressure. The final compound was obtained as a white solid (1.42g, 4.76mmol, chemical yield = 80%).

**$^1\text{H}$  NMR** (300MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO, 298K)  $\delta$  (ppm): 8.20 (s, 1H); 6.96 (s, 2H); 4.09 (t, 2H,  $^3J = 7.20\text{Hz}$ ); 2.35 (t, 2H,  $^3J = 7.35\text{Hz}$ ); 1.83 (m, 2H); 1.60 (m, 2H); 1.31 (m, 2H);  **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR** (75MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO, 298K)  $\delta$  (ppm): 173.2 (C=O); 159.7 (C-NH<sub>2</sub>); 154.0 (C<sup>q</sup>); 149.2 (C-Cl); 143.2 (C-H); 123.3 (C<sup>q</sup>); 51.1 (-OCH<sub>3</sub>); 42.8 (-CH<sub>2</sub>-); 33.0 (-CH<sub>2</sub>-); 28.6 (-CH<sub>2</sub>-); 25.4 (-CH<sub>2</sub>-); 23.8 (-CH<sub>2</sub>-); **MS** (MALDI):  $m/z = 297.7$  [ $\text{M}^{35}\text{Cl}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (100%); 299.7 [ $\text{M}^{37}\text{Cl}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (38%); 319.7 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> (30%).

### XVIII.2.B 6-(2-amino-6-chloro-9H-purin-9-yl)hexanoic acid

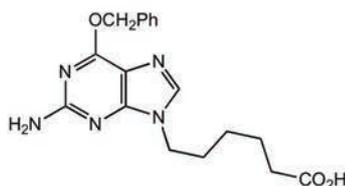


**C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>2</sub>**  
**M = 283.71g.mol<sup>-1</sup>**

To a solution of methyl 6-(2-amino-6-chloro-9H-purin-9-yl)hexanoate (1.38g, 4.63mmol) in dioxane (28mL) was added a solution of LiOH (1M, 18mL). The mixture was stirred at 20°C for 3 hours and then it was acidified (to pH = 5) by adding a solution of HCl (1M). The mixture was then concentrated under reduced pressure; the resulting residue was solved in a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (20mL), and the aqueous phase was extracted with ethyl acetate (20mL). The resulting aqueous phase was acidified to pH = 1 by adding a solution of HCl (1M). The white precipitate formed was collected by filtration and dried under reduced pressure; the final compound was obtained as a white solid (581mg, 2.05mmol, chemical yield = 44%).

**$^1\text{H}$  NMR** (300MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO, 298K)  $\delta$  (ppm): 8.14 (s, 1H); 6.91 (s, 2H); 4.03 (t, 2H,  $^3J = 7.20\text{Hz}$ ); 2.19 (t, 2H,  $^3J = 7.20\text{Hz}$ ); 1.77 (m, 2H); 1.51 (m, 2H); 1.25 (m, 2H);  **$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  NMR** (75MHz,  $[\text{D}_6]$ DMSO, 298K)  $\delta$  (ppm): 159.7 (C-NH<sub>2</sub>); 154.0; 149.2 (C-Cl); 143.2 (C-H); 48.3 (-CH<sub>2</sub>-); 33.5 (-CH<sub>2</sub>-); 28.7 (-CH<sub>2</sub>-); 25.5 (-CH<sub>2</sub>-); 23.9 (-CH<sub>2</sub>-); **MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 283.7$  [ $\text{M}^{35}\text{Cl}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (100%); 285.7 [ $\text{M}^{37}\text{Cl}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> (30%); 305.7 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup> (12%).

### XVIII.2.C 6-(2-amino-6-(benzyloxy)-9H-purin-9-yl)hexanoic acid

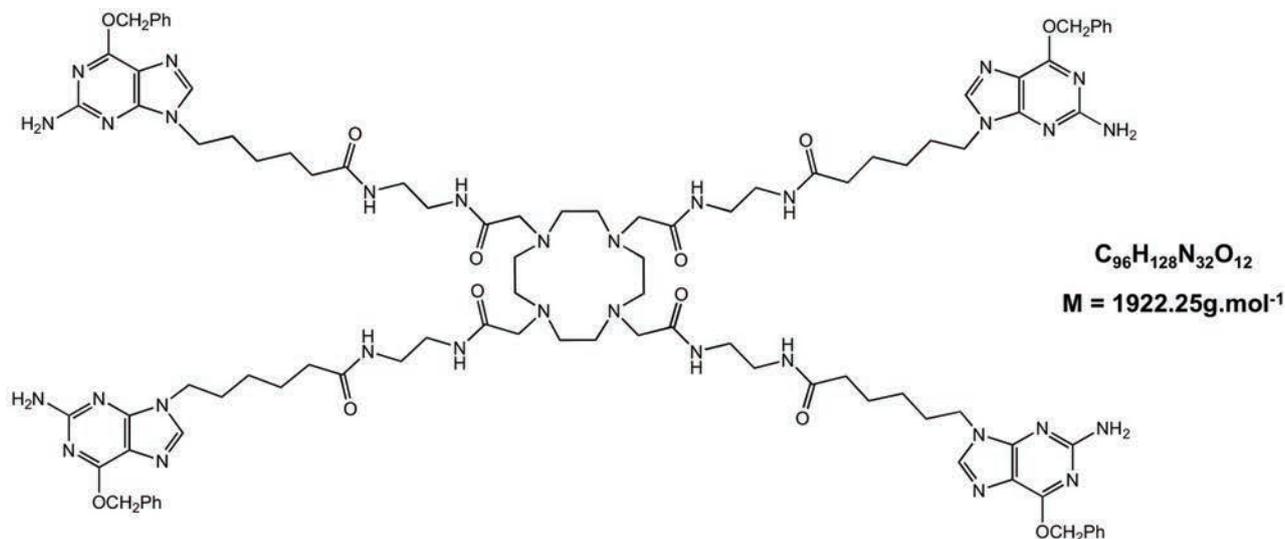


**C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>**  
**M = 355.39g.mol<sup>-1</sup>**

To a solution of 6-(2-amino-6-chloro-9*H*-purin-9-yl)hexanoic acid (571.0mg, 2.01mmol, 1.0eq) in benzyl alcohol (30mL) were added  $K_2CO_3$  (306.0mg, 2.21mmol, 1.1eq) and DABCO (45mg, 0.40mmol, 0.2eq). The mixture was stirred overnight at 85°C. The sluggish orange residue was solved in water (50mL) and the resulting aqueous phase was extracted with ethyl acetate (40mL); the aqueous phase was acidified to pH = 2 by a solution of HCl (1M). The white precipitate formed was extracted by ethyl acetate (2 x 30mL) and the resulting solution was concentrated under reduced pressure. The final product was obtained as a white solid (350mg, 0.98mmol, chemical yield = 49%).

$^1H$  NMR (300MHz,  $[D_6]DMSO$ , 298K)  $\delta$  (ppm): 7.93 (s, 1H); 7.55 - 7.19 (m, 5H); 6.50 (s, 2H); 5.50 (s, 2H); 4.00 (t, 2H,  $^3J = 7.05Hz$ ); 2.20 (t, 2H,  $^3J = 7.20Hz$ ); 1.75 (m, 2H); 1.52 (m, 2H); 1.24 (m, 2H);  $^{13}C\{^1H\}$  NMR (75MHz,  $[D_6]DMSO$ , 298K)  $\delta$  (ppm): 174.4 (C=O); 159.9 (C-OBn); 159.7 (C-NH<sub>2</sub>); 154.3 (C<sup>9</sup>); 142.5 (C-H); 136,6; 128,5; 128,4; 128,0; 126,6; 126,4; 113,4; 62.9 (-CH<sub>2</sub>-Ph); 46.5 (-CH<sub>2</sub>-); 34.0 (-CH<sub>2</sub>-); 29.3 (-CH<sub>2</sub>-); 26.4 (-CH<sub>2</sub>-); 24.4 (-CH<sub>2</sub>-); MS (MALDI-TOF) :  $m/z = 355.8 [M+H]^+$  (100%); 377.8  $[M+Na]^+$  (8%); 393.8  $[M+K]^+$  (16%).

### XVIII.2.D Prot.DOTASQ-C<sub>5</sub>

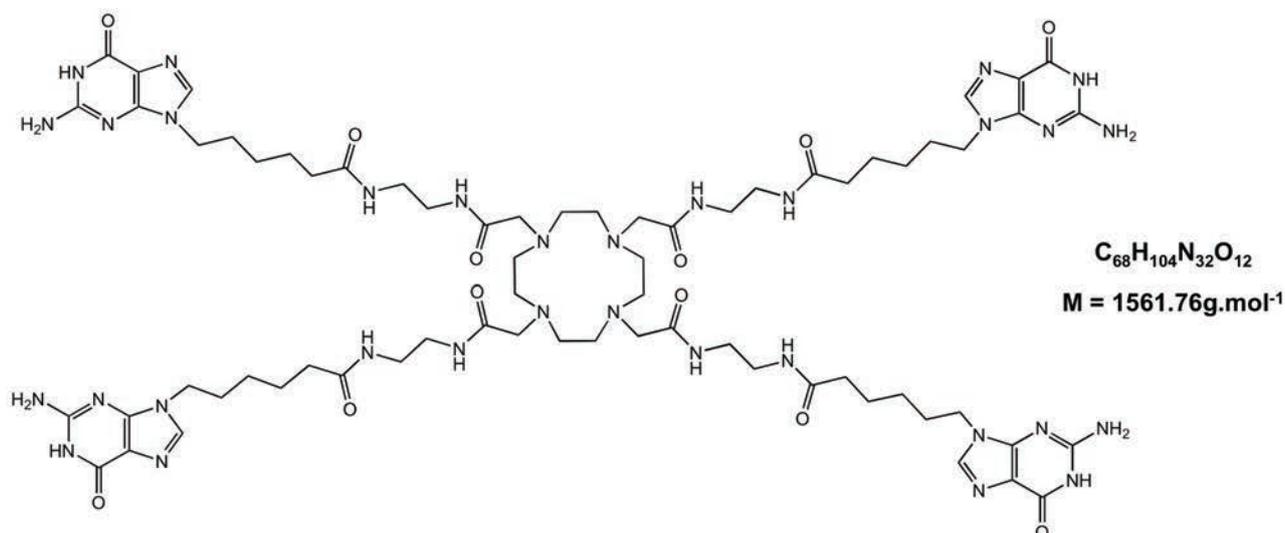


To a solution of DOTA-4NH<sub>2</sub> (52.5mg, 0.09mmol, 1.0eq) in DMF (7mL) was added 4-(2-amino-6-(benzyloxy)-9*H*-purin-9-yl)hexanoic acid (185.1mg, 0.55mmol, 6.0eq). HOBt (74.6mg, 0.55mmol, 6.0eq) and EDCI (105.8mg, 0.55mmol, 6.0eq) were thus added and the resulting mixture was stirred at 20°C for 4 days. After concentration under reduced pressure the yellow oily residue was taken up in water (20mL) and concentrated under reduced pressure (3 times). The oily residue was solved in a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub> (10mL) that led to the formation of a precipitate; the liquid phase was removed and ethyl acetate was added (10mL) thus maximizing the precipitation of

the final product. The formed white precipitate was collected by filtration and was dried under reduced pressure. The final compound was obtained as a pale yellow solid (166.3mg, 0.09mmol, chemical yield = 95%).

**MS** (ESI):  $m/z = 981.0$   $[M+H+K]^{2+}$ ; **MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 1945.2$   $[M+Na]^+$  (3%); 981.1  $[M+H+K]^{2+}$  (100%).

### XVIII.2.E DOTASQ-C<sub>5</sub>

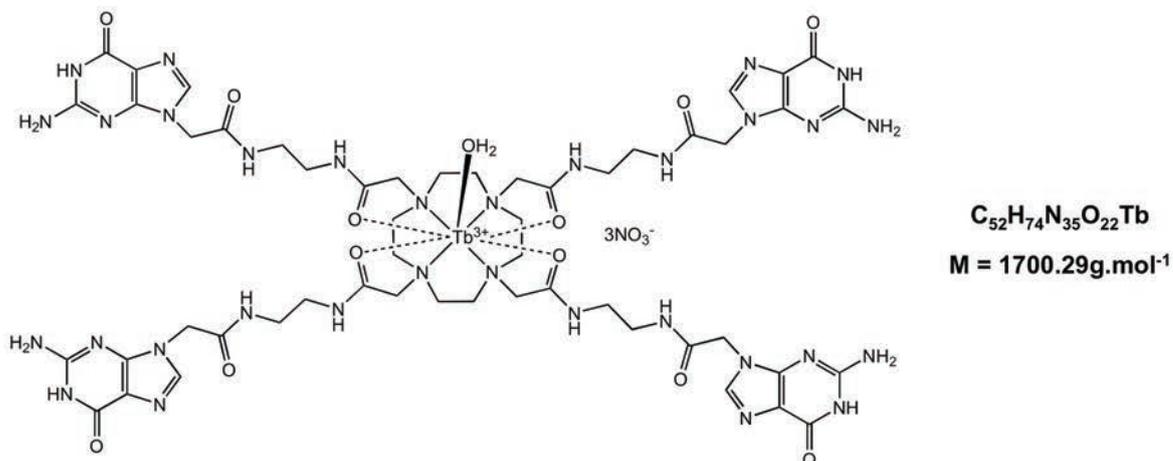


Prot.DOTASQ-C<sub>5</sub> (105.0mg, 0.05mmol) was taken up in a solution of MeOH saturated by HCl (3mL). The mixture was stirred at 20°C for 1 hour. The final product was precipitated by addition of diethyl ether (50mL). DOTASQ-C<sub>5</sub> was obtained as a white solid (85.0mg, 0.05mmol, chemical yield = 100%).

**MS** (ESI):  $m/z = 1561.3$   $[M+H]^+$  (100%).

### XVIII.3 Synthesis of Tb.DOTASQ-C<sub>1</sub> and Tb.DOTASQ-C<sub>5</sub>

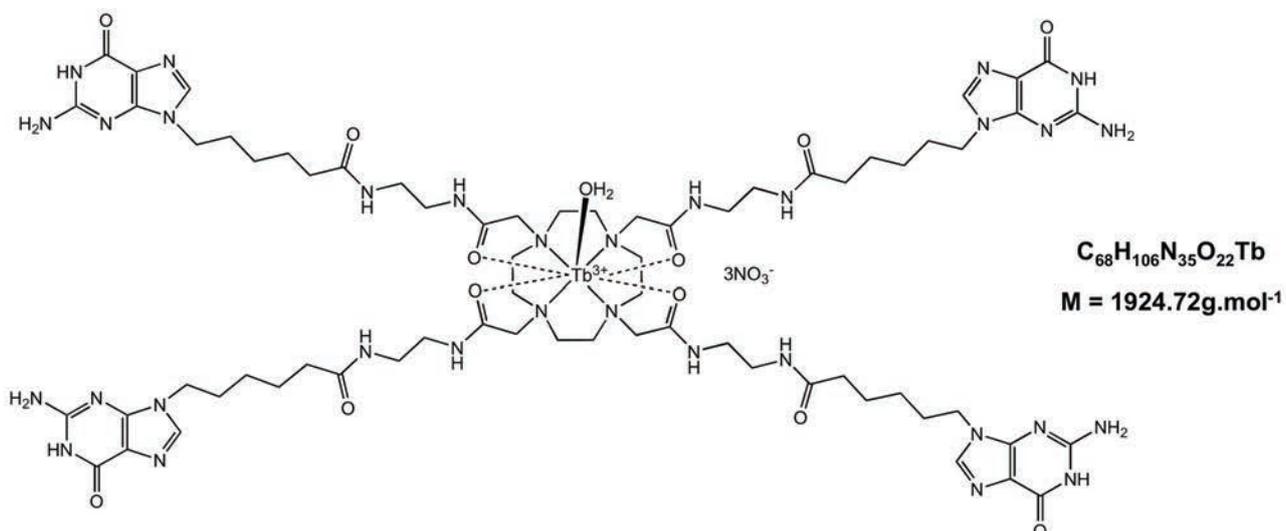
#### XVIII.3.A Tb.DOTASQ-C<sub>1</sub>



To a solution of DOTASQ-C<sub>1</sub> (37.7mg, 0.03mmol, 1.0eq) in a mixture of MeOH/lithium cacodylate buffer 20mM, pH 7.2 (1/1, 2mL) was added Tb(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (13.4mg, 0.03mmol, 1.0eq). The mixture was stirred at 55°C for 3 days. After cooling to 20°C, the final product was precipitated by addition of acetone (6mL); the solid was collected by filtration and washed with acetone (2 x 6mL). After being dried under reduced pressure, Tb.DOTASQ-C<sub>1</sub> was obtained as a white solid (30.9mg, 0.02mmol, chemical yield = 72%).

**MS (ESI):**  $m/z = 498.5$  [M-3NO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>3+</sup> (100%);  $747.3$  [M-3NO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O-H]<sup>2+</sup> (22%).

#### XVIII.3.B Tb.DOTASQ-C<sub>5</sub>

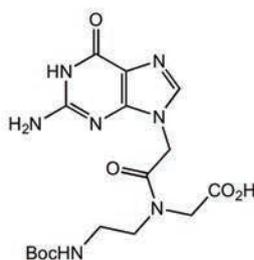


To a solution of DOTASQ-C<sub>5</sub> (12.2mg, 0.07mmol, 1.0eq) in a mixture of MeOH/lithium cacodylate buffer 20mM, pH 7.2 (1/1, 2 mL) was added Tb(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (3.9mg, 0.08mmol, 1.1eq). The mixture was stirred at 55°C for 3 days. After cooling to 20°C, the final product was precipitated by addition of acetone (6mL); the solid was collected by filtration and washed with acetone (2 x 6mL). After being dried under reduced pressure, Tb.DOTASQ-C<sub>1</sub> was obtained as a white solid (10.0mg, 0.06mmol, chemical yield = 75%).

**MS (ESI):**  $m/z = 573.3$  [M-3NO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>3+</sup> (100%);  $859.4$  [M-3NO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O-H]<sup>2+</sup> (13%).

## XVIII.4 Synthesis of <sup>PNA</sup>DOTASQ

### XVIII.4.A Boc-PNA-G-OH

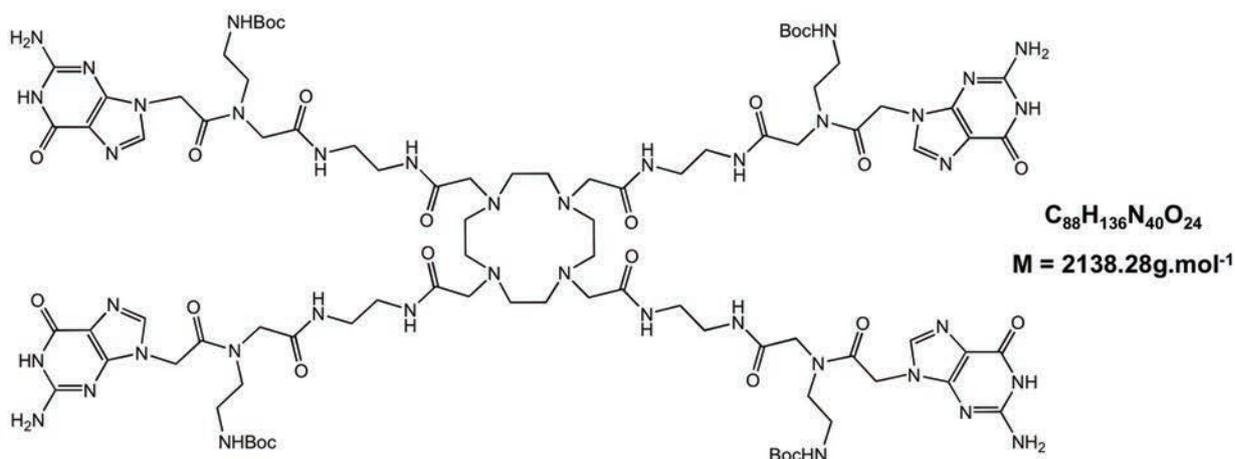


**C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>**  
**M = 409.40g.mol<sup>-1</sup>**

To a solution of Boc-PNA-G(Z)-OH (200mg, 0.37mmol) in MeOH (10mL) was added Pd/C (100mg). The suspension was stirred at room temperature under H<sub>2</sub> for 1 hour. The solid was then filtered over dicalite and washed three times with methanol (3 x 20mL). The residue was concentrated under reduced pressure to afford Boc-PNA-G-OH as a white solid (134mg, 0.33mmol, 89%).

**<sup>1</sup>H NMR** (300MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO)<sup>a</sup>  $\delta$  (ppm): 10.59 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 6.96 (m, 1H), 6.47 (s, 2H), 4.86 (s, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.20 - 3.80 (m, 4H), 1.37 (s, 9H). *<sup>a</sup>Due to the presence of a tertiary amido moiety, all peaks are actually splitted: mean chemical shifts are reported herein.*

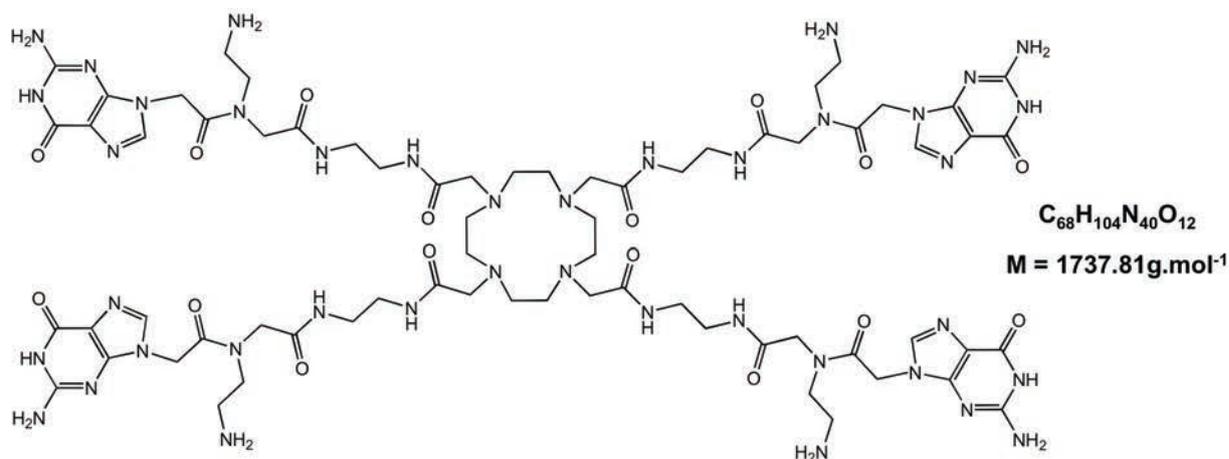
### XVIII.4.B Prot.<sup>PNA</sup>DOTASQ



To a solution of DOTA-4NH<sub>2</sub> (30.5mg, 0.05mmol, 1eq) in DMF (4mL) were added Boc-PNA-G-OH (131mg, 0.32mmol, 6.4eq), HOBt (49mg, 0.32mmol, 6.4eq) and EDCI (61mg, 0.32mmol, 6.4eq), and the solution was stirred at room temperature for 6 days. After concentration under reduced pressure, water (20mL) was added and the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was taken up in a minimum of methanol, and diethyl ether (40mL) was added. The precipitate was filtered, washed with diethyl ether and dried to afford Prot.<sup>PNA</sup>DOTASQ as a white solid (113mg, 0.053mmol, 100%).

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 2137.9 [M+H]^+$ ;  $2159.9 [M+Na]^+$ ;  $2175.8 [M+K]^+$ . **HRMS** (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>88</sub>H<sub>136</sub>N<sub>40</sub>O<sub>24</sub>Na<sub>2</sub> [M+2Na]<sup>2+</sup> (100%), 1092.023, found, 1092.026.

### XVIII.4.C PNA DOTASQ

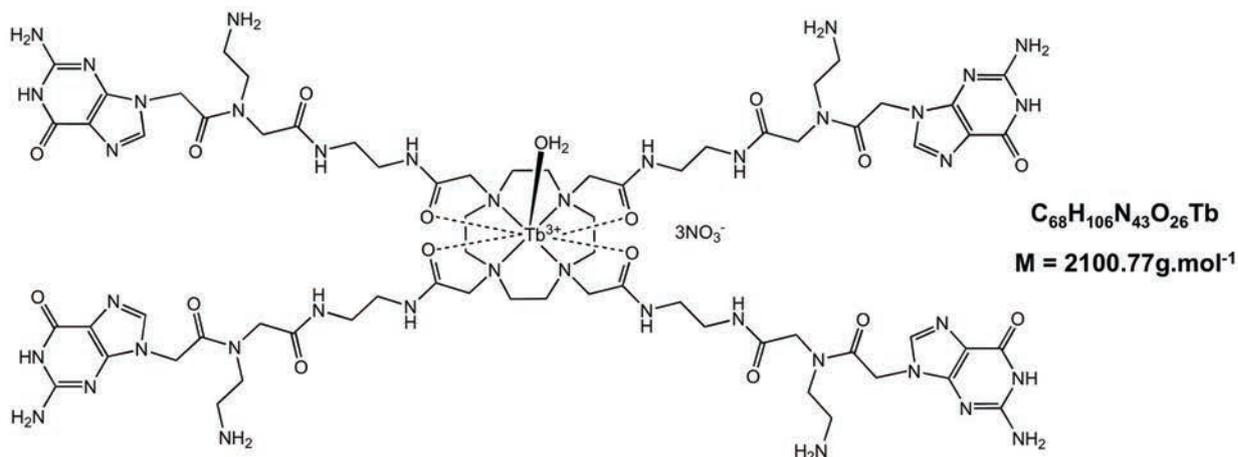


A solution of Prot.<sup>PNA</sup>DOTASQ (35mg, 0.016mmol) in methanol saturated by HCl (2mL) was stirred at room temperature overnight. Diethyl ether (8mL) was then added, and the solid was filtered, washed with diethyl ether and dried to afford PNA DOTASQ as a white solid (22mg,

0.013mmol, 81%). A fraction of the solid was purified by reverse-phase semi-preparative HPLC and lyophilized to afford pure <sup>PNA</sup>DOTASQ as a white solid.

**MS** (MALDI-TOF):  $m/z = 1737.8 [M+H]^+$ ;  $1759.8 [M+Na]^+$ ;  $1775.786 [M+K]^+$ . **HRMS** (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{68}H_{106}O_{16}N_{40}K [M+2H+K]^{3+}$  (100%), 592.611, found, 592.609.

#### XVIII.4.D *Tb.* <sup>PNA</sup>DOTASQ



To a solution of <sup>PNA</sup>DOTASQ (7.5mg, 0.0043mmol, 1eq) in a 1:1 mixture of MeOH and lithium cacodylate buffer at 20mM, pH 7.2 (1.5mL) was added Tb(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (2.15mg, 0.0048mmol, 1.1eq). The solution was stirred at 55 °C for 4 days. After cooling, diethyl ether (3mL) was added, the precipitate was filtered, washed with diethyl ether (2 x 5mL) and dried to afford Tb.<sup>PNA</sup>DOTASQ as a white solid (6.4mg, 0.0033mmol, 78%).

**HRMS** (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{68}H_{103}N_{40}O_{16}Tb [M-3NO_3-H_2O-H]^{2+}$  (100%), 947.386, found, 947.388.

## XIX. Biophysical experiments

### XIX.1 Preparation of the DNA and RNA structures

#### XIX.1.A DNA and RNA sequences

Unlabeled DNA sequences (5'-to-3' direction)		
<b>22AG</b>	Strand 1	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
<b>Cmyc</b>	Strand 1	GAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAG
<b>Ckit</b>	Strand 1	CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGG
<b>(TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub></b>	Strand 1 to 4	TGGGGT
<b>(TG<sub>5</sub>T)<sub>4</sub></b>	Strand 1 to 4	TGGGGGT
<b>(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>T)<sub>4</sub></b>	Strand 1 to 4	TTAGGGT
<b>(T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>)<sub>4</sub></b>	Strand 1 to 4	TTAGGG
<b>46AG</b>	Strand 1	AGGG(TTAGGG) <sub>6</sub> TTAGGG
<b>52AG</b>	Strand 1	AGGG(TTAGGG) <sub>7</sub> TTAGGG
<b>58AG</b>	Strand 1	AGGG(TTAGGG) <sub>8</sub> TTAGGG
<b>70AG</b>	Strand 1	AGGG(TTAGGG) <sub>10</sub> TTAGGG
<b>ds12</b>	Strand 1 & 2	CGCGAATTCGCG
<b>ds17</b>	Strand 1 Strand 2	CCAGTTCGTAGTAACCC GGTACTACGAACTGG
<b>ds26</b>	Strand 1 & 2	CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG
Unlabeled RNA sequence (5'-to-3' direction)		
<b>(UG<sub>5</sub>U)<sub>4</sub></b>	Strand 1 to 4	UGGGGU
Labeled DNA sequences (5'-to-3' direction)		
<b>F21T</b>	Strand 1	FAM-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-TAMRA
<b>F-myc-T</b>	Strand 1	FAM-GAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAG-TAMRA
<b>F-kit2-T</b>	Strand 1	FAM-CGGGCGGGCGCGAGGGAGGGG-TAMRA
<b>F-duplex-T</b>	Strand 1	FAM-TATAGCTATATTTTTTTATAGCTATA-TAMRA
Labeled RNA sequences (5'-to-3' direction)		
<b>L-VEGF</b>	Strand 1	FAM-GGAGGAGGGGAGGAGGA-TAMRA
<b>L-TRF2</b>	Strand 1	FAM-CGGGAGGGCGGGGAGGGC-TAMRA
<b>L-TERRA</b>	Strand 1	FAM-GGGUUAGGGUUAGGGUUAGGG-TAMRA

With **FAM** = 6-carboxyfluorescein and **TAMRA** = tetramethyl-6-carboxyrhodamine.

### ***XIX.1.B Preparation of the oligonucleotide stock solutions***

The lyophilized strands were firstly diluted in deionised water (18.2M $\Omega$ .cm resistivity) to 500 $\mu$ M for monomolecular and bimolecular DNA and RNA constitutive strands and to 1000 $\mu$ M for all tetramolecular DNA and RNA constitutive strands.

### ***XIX.1.C Preparation of the DNA and RNA structures***

All DNA structures were prepared in a Caco.K buffer comprised of 10mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2) plus 10mM KCl/90mM LiCl. Classically, monomolecular structures were prepared by mixing 40 $\mu$ L of the constitutive strand (500 $\mu$ M) with a lithium cacodylate buffer solution (8 $\mu$ L, 100mM, pH 7.2), plus a KCl/LiCl solution (8 $\mu$ L, 100mM/900mM) and water (24 $\mu$ L). Bimolecular structures were prepared by mixing 40 $\mu$ L of each constitutive strand (500 $\mu$ M) with a lithium cacodylate buffer solution (16 $\mu$ L, 100mM, pH 7.2), plus a KCl/LiCl solution (16 $\mu$ L, 100mM/900mM) and water (48 $\mu$ L). Tetramolecular structures were prepared by mixing 20 $\mu$ L of each constitutive strand (1000 $\mu$ M) with a lithium cacodylate buffer solution (32 $\mu$ L, 100mM, pH 7.2), plus a KCl/LiCl solution (32 $\mu$ L, 100mM/900mM) and water (96 $\mu$ L). The final concentrations were theoretically 250, 125 and 83.3 $\mu$ M for mono-, bi-, and tetramolecular DNA structures.

*N.B.:* specific preparations for ESI-MS and  $^1\text{H}$  NMR studies are detailed on each corresponding section (cf. XIX.4 and XIX.5, respectively).

### ***XIX.1.D Determination of the DNA and RNA concentrations***

The actual concentration of each DNA and RNA was determined through a dilution to 1 $\mu$ M theoretical concentration (expressed in motif concentration) for monomolecular structure (*i.e.*, 4 $\mu$ L in 996 $\mu$ L water), to 1 $\mu$ M for bimolecular structures (*i.e.*, 8 $\mu$ L in 992 $\mu$ L water) and to 0.2 $\mu$ M for tetramolecular structures (*i.e.*, 2.4 $\mu$ L in 997.6 $\mu$ L water), through UV spectral analysis at 260nm (after 5min at 90°C) using the molar extinction coefficient value provided by the manufacturer.

### ***XIX.1.E Folding of the higher-order DNA structures***

The high-order DNA and RNA structures were folded according to two procedures:

- for the intramolecular architectures, solutions were heated (90°C, 5min), cooled in ice (7h) and then stored at least overnight (4°C).

- for the intermolecular architectures, the solutions were heated (90°C, 5min), slowly cooled (65°C, 1h; 55°C, 1h; 50°C, 1h, 45°C, 1h; 40°C, 30min; 35°C, 30min; 30°C, 30min; 25°C, 1h) and then stored at least overnight (4°C).

## XIX.2 FRET-melting experiments

Experiments were performed as a high-throughput screening assay in a 96-well format using an Agilent Stratagene Mx3005P real-time PCR machine equipped with a FAM filter ( $\lambda_{\text{ex}} = 492\text{nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 516\text{nm}$ ). All the experiments were carried out with a total reaction volume of 100 $\mu\text{L}$  and 0.2 $\mu\text{M}$  of labeled DNA or RNA in a Caco.K buffer (comprised of lithium cacodylate buffer (10mM, pH 7.2) and KCl/LiCl (10mM/90mM)) except for F-myc-T, F-kit2-T, L-VEGF, L-TRF2, and L-TERRA carried out in a modified Caco.K buffer (lithium cacodylate buffer (10mM, pH 7.2) and KCl/LiCl (1mM/99mM)).

The ligands were prepared as 100 $\mu\text{M}$  stock solutions in H<sub>2</sub>O or DMSO and were classically added at 1 $\mu\text{M}$  (5 equivalents) or from 0.25 $\mu\text{M}$  to 3.0 $\mu\text{M}$  for dose-response experiments. Competitive FRET-melting experiments were carried out with labeled DNA or RNA (1 $\mu\text{M}$ ) with 15 or 50 equivalents of competitors, expressed in motif concentration.

After a first equilibration step at 25°C during 30s, a stepwise increase of 1°C every 30s for 65 cycles to reach 90°C was performed and measurements were made after each cycle. Final data were analyzed by using Microsoft Excel and OriginPro8<sup>®</sup> software. The emission of FAM is normalized between 0 and 1, and  $T_{1/2}$  is defined as the temperature for which the normalized emission is 0.5.  $\Delta T_{1/2}$  values are mean of 2 to 4 experiments.

*N.B.:* first experiments of DOTASQ-C<sub>1</sub> and DOTASQ-C<sub>5</sub> were carried out in the J.-L. Mergny group at the IECB, Pessac by A. Guédin following their published FRET-melting protocol.<sup>[354]</sup>

## XIX.3 G4-FID experiments

Fluorescence intercalators displacement (FID) assays were performed on a JASCO FP-8500 spectrofluorometer with 1mL started solutions comprised of DNA (1 $\mu\text{M}$ ) and TO-PRO3 (2 $\mu\text{M}$  for 22AG, Cmyc and Ckit, or 3 $\mu\text{M}$  for ds26) in a Caco.K buffer (comprised of lithium cacodylate buffer (10mM, pH 7.2) and KCl/LiCl (10mM/90mM)).

After a stabilization step (20min), the solutions were excited at 630nm and emission spectra were recorded between 640 and 750nm. Afterwards, the ligand (1mM) was progressively added

(from 0 to 5 $\mu$ M by 0.5 $\mu$ M steps and then 6.0 $\mu$ M, 8.0 $\mu$ M and 10.0 $\mu$ M) and emissions were measured after fluorescence stabilization (5min for 22AG, Ckit, ds26; 20-50min for Cmyc).

The percentages of displacement were calculated from the variation of fluorescence intensity  $F$  at 657nm, using: TO-PRO3 displacement (%) =  $100 - [(F/F_0) \times 100]$ , with  $F_0$  as the maximum fluorescence of TO-PRO3 (bound to DNA and without ligand). The TO-PRO3 displacement (%) was then plotted as a function of the concentration of added ligand.

#### XIX.4 ESI-MS experiments

Electrospray mass spectroscopy experiments were performed on a LTQ Orbitrap XL (Thermo) comprised of an electrospray ionization source (ESI), using the following parameters: spray voltage = 4.00kV; capillary voltage = -2V to -50V; capillarity temperature = 275°C; tube lens = -150V to -200V and flow = 10 $\mu$ L.min<sup>-1</sup>.

The lyophilized strands of ds12 and (TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> were firstly diluted in deionised water (18.2M $\Omega$ .cm resistivity) at 500 $\mu$ M and 2000 $\mu$ M, respectively. All DNA structures were prepared in an ammonium acetate buffer (150mM, pH 7.1), by mixing the constitutive strand (50 $\mu$ L) with an ammonium acetate buffer (15 $\mu$ L, 1M, pH 7.1) and water (35 $\mu$ L). DNA structures were folded by heating (90°C, 5min), progressively cooling (65°C, 110min; 55°C, 110min; 50°C, 55min; 45°C, 40min; 40°C, 30min; 35°C, 45min; 30°C, 35min; 25°C, 60min) and then stored overnight (4°C). The final concentrations of each DNA were determined by dilution to 1 $\mu$ M theoretical concentration (expressed in motif concentration) and UV spectral analysis at 260nm (after 5min at 90°C) using the molar extinction coefficient values provided by the manufacturer.

The DNA solutions (10 $\mu$ M) were prepared in an ammonium acetate buffer (150mM, pH 7.1) and 15% methanol by mixing the folded solution of (TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> (11.17 $\mu$ L, 179 $\mu$ M) or ds12 (13.16 $\mu$ L, 152 $\mu$ M) with ammonium acetate buffer (159 $\mu$ L or 157 $\mu$ L respectively, 150mM) and methanol (30 $\mu$ L). Experiments carried out with TMPyP4 or <sup>PNA</sup>DOTASQ were prepared by mixing the folded solution of (TG<sub>4</sub>T)<sub>4</sub> (11.17 $\mu$ L, 179 $\mu$ M) or ds12 (13.16 $\mu$ L, 152 $\mu$ M) with TMPyP4 or <sup>PNA</sup>DOTASQ (4 $\mu$ L, 1mM), ammonium acetate buffer (155 $\mu$ L or 153 $\mu$ L respectively, 150mM) and methanol (30 $\mu$ L).

## **XIX.5 $^1\text{H}$ NMR studies**

All the NMR spectra acquired in Dijon (PACSMUB) were carried out at 20°C on a Bruker Avance II 600MHz spectrometer using the “1D\_watergate” solvent suppression sequence (p3919gp pulse sequence). The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of  $^{\text{PNA}}\text{DOTASQ}$  alone in a Caco.K solution (comprised of lithium cacodylate buffer (10mM, pH 7.2) and KCl/LiCl (10mM/90mM)) plus 10%  $\text{D}_2\text{O}$  (300 $\mu\text{M}$ ) was obtained after 19700 scans.

### ***XIX.5.A Studies with $(\text{T}_2\text{AG}_3\text{T})_4$ in presence of $^{\text{PNA}}\text{DOTASQ}$***

The G-quadruplex forming sequence  $(\text{T}_2\text{AG}_3\text{T})_4$  was prepared by dissolving lyophilized  $\text{T}_2\text{AG}_3\text{T}$  strands in 620 $\mu\text{L}$  Caco.K buffer (comprised of lithium cacodylate buffer (10mM, pH 7.2) and KCl/LiCl (10mM/90mM)) and folded by heating (90°C, 5min), progressively cooling (65°C, 110min; 55°C, 110min; 50°C, 55min; 45°C, 40min; 40°C, 30min; 35°C, 45min; 30°C, 35min; 25°C, 60min) and then stored overnight (4°C). The actual concentration, determined by dilution to 0.50 $\mu\text{M}$  theoretical motif concentration and UV-Vis spectral analysis at 260nm (after 5min at 90°C) with the molar extinction coefficient value provided by the manufacturer, was 116 $\mu\text{M}$ .

The first NMR solution (650 $\mu\text{L}$ ) was prepared by mixing  $(\text{T}_2\text{AG}_3\text{T})_4$  (600 $\mu\text{L}$ , 116 $\mu\text{M}$ ) with  $\text{D}_2\text{O}$  (50 $\mu\text{L}$ ) to obtain a 107 $\mu\text{M}$  final concentration of 10%  $\text{D}_2\text{O}$  and recorded by 18300 scans. Subsequent experiments were realized after additions of 4 x 0.5 equivalents of  $^{\text{PNA}}\text{DOTASQ}$  (4 x 3.97 $\mu\text{L}$ , 10mM in water) and 18000 scans.

### ***XIX.5.B Studies with $(\text{T}_2\text{AG}_3)_4$ in low ionic conditions (10mM $\text{K}^+$ )***

The G-quadruplex forming DNA sequence  $(\text{T}_2\text{AG}_3)_4$  was prepared by dissolving lyophilized  $\text{T}_2\text{AG}_3$  strands in 600 $\mu\text{L}$  Caco.K buffer (comprised of lithium cacodylate buffer (10mM, pH 7.2) and KCl/LiCl (10mM/90mM)) and folded by heating (90°C, 5min), progressively cooling (65°C, 110min; 55°C, 110min; 50°C, 55min; 45°C, 40min; 40°C, 30min; 35°C, 45min; 30°C, 35min; 25°C, 60min) and then stored overnight (4°C). The actual concentration, determined by dilution to 0.50 $\mu\text{M}$  theoretical motif concentration and UV-Vis spectral analysis at 260nm (after 5min at 90°C) with the molar extinction coefficient value provided by the manufacturer, was 373 $\mu\text{M}$ .

The first NMR solution (600 $\mu\text{L}$ ) was prepared by mixing  $(\text{T}_2\text{AG}_3)_4$  (540 $\mu\text{L}$ , 373 $\mu\text{M}$ ) with  $\text{D}_2\text{O}$  (60 $\mu\text{L}$ ) to obtain a 339 $\mu\text{M}$  final concentration comprised of 10%  $\text{D}_2\text{O}$  and recorded by 6900 scans. Subsequent experiments were realized after a first addition of 0.5 equivalent of  $^{\text{PNA}}\text{DOTASQ}$

(11.1 $\mu$ L, 10mM in water) and 23400 scans, followed by a further addition of 0.5 equivalents of <sup>PNA</sup>DOTASQ (11.1 $\mu$ L, 10mM in water) and 28900 scans.

### ***XIX.5.C Studies of ds12***

The self-complementary duplex-DNA forming sequence ds12 was prepared by dissolving the lyophilized single strands in 560 $\mu$ L Caco.K buffer (comprised of lithium cacodylate buffer (50mM, pH 7.2) and KCl (333mM)) and folded by heating (90°C, 5min), progressively cooling (65°C, 110min; 55°C, 110min; 50°C, 55min; 45°C, 40min; 40°C, 30min; 35°C, 45min; 30°C, 35min; 25°C, 60min) and then stored overnight (4°C). The actual concentration, determined by dilution to 1.46 $\mu$ M theoretical motif concentration and UV-Vis spectral analysis at 260nm (after 5min at 90°C) with the molar extinction coefficient value provided by the manufacturer, was 140 $\mu$ M, expressed in motif concentration.

The first NMR solution (597 $\mu$ L) was prepared by mixing ds12 (510 $\mu$ L, 140 $\mu$ M) with D<sub>2</sub>O (57 $\mu$ L) to obtain a 126 $\mu$ M final concentration comprised of 10% D<sub>2</sub>O and recorded by 22000 scans. Subsequent experiments were realized after additions of 2 x 1.0 equivalents of <sup>PNA</sup>DOTASQ (2 x 7.14 $\mu$ L, 10mM in water) and 22000 scans.

## **XX. DNAzyme and TASQzyme experiments**

All the DNAzyme and TASQzyme experiments were carried out either in a Caco.K buffer comprised of lithium cacodylate buffer (10mM, pH 7.2) and KCl/LiCl (10mM/90mM) in water, or in a Caco.KTD buffer comprised of lithium cacodylate buffer (10mM, pH 7.2), KCl/LiCl (10mM/90mM), 0.05% Triton X-100 and 0.1% DMSO in water.

### **XX.1 Experiments carried out in 1mL-quartz cuvettes**

UV-Vis spectra were recorded on a JASCO V630Bio spectrophotometer with a thermally controlled six-cell holder in 1mL-quartz cuvettes (Starna). Classically, all the experiments were carried out at 25°C using the following stock solutions: ABTS (20 or 50mM in water), TMB (5mM in DMSO), hemin (1mM in DMSO), FeTPPS (1mM in water), DNA (250 $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60mM in water), NTP (20mM in Caco.KTD), DOTASQ and RAFT-G4 (1mM in DMSO) and <sup>PNA</sup>DOTASQ (1mM in water).

Experimental conditions were classically defined as: ABTS (2 or 5mM), TMB (0.5mM), hemin (1 to 3 $\mu$ M), FeTPPS (1 $\mu$ M), DNA (0.065 to 8 $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.6mM), NTP (10mM), DOTASQ, <sup>PNA</sup>DOTASQ and RAFT-G4 (0.5 to 100 $\mu$ M).

For DNAzyme experiments: The DNA, hemin or FeTPPS and/or NTP mixtures in Caco.KTD buffer (or Caco.K with FeTPPS) were stirred at room temperature for 30min, then ABTS or TMB were added and the DNAzyme reactions were thus initiated by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For TASQzyme experiments: The TASQ, hemin or FeTPPS and/or NTP mixtures in Caco.KTD buffer (or Caco.K with FeTPPS) were stirred at room temperature for 30min, then ABTS or TMB were added and the DNAzyme reactions were thus initiated by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For DNAzyme experiments in the presence of TASQ: The DNA, TASQ, hemin and/or NTP mixtures in Caco.KTD buffer were stirred at room temperature for 30min, then ABTS or TMB were added and the DNAzyme reactions were thus initiated by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For each experiment, a control experiment (named *blank*) was carried out in the absence of pre-catalyst (*i.e.* DNA or TASQ) for the sake of comparison.

The characteristic UV-Vis signal of ABTS (420nm) or of TMB (370, 450, 652nm) of each experiment was plotted as a function of time with OriginPro8<sup>®</sup> software. Raw data were firstly subtracted from the control experiment and, for sake of comparison, subsequently zeroed at their very first point to obtain the *zeroed data*.

For  $V_0$  determination, the absorbance at the very first four points was plotted as a function of time and linearly fitted to access the slope of this linear function, which corresponds to  $V_0$  (in Abs.min<sup>-1</sup>) subsequently converted to  $\mu$ M.min<sup>-1</sup> *via* the Beer-Lambert law: Abs =  $\epsilon$ .l.c, using  $\epsilon(\text{ABTS}^{*+}) = 36000\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  at 420nm and  $\epsilon(\text{TMB}^{*+}) = 59000\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  at 450nm. Furthermore, the pre-catalytic constants  $k_{\text{cat}}$  (min<sup>-1</sup>) were determined by divided the initial rate  $V_0$  (in  $\mu$ M.min<sup>-1</sup>) by the pre-catalyst concentration (*i.e.* TASQ), finally converted in h<sup>-1</sup> for the sake of clarity.

## XX.2 Experiments carried out in a 96-well plate

UV-Vis spectra were recorded on a ThermoScientific MultiSkan GO microplate spectrophotometer in a 96-well plate with a 200 $\mu$ L total volume per well. Classically, all the experiments were carried out at 25°C using classically the following stock solutions: ABTS (100mM

in water), TMB (5mM in DMSO), hemin (100 $\mu$ M in DMSO), DNA (25, 2.5 or 0.25 $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60mM in water), NTP (20mM in Caco.KTD), DOTASQ and RAFT-G4 (1mM or 100 $\mu$ M in DMSO) and <sup>PNA</sup>DOTASQ (1mM or 100 $\mu$ M in water).

Experimental conditions were classically defined as: ABTS (5mM), TMB (0.25mM), hemin (1 $\mu$ M), DNA (5nM to 2 $\mu$ M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.6mM in ABTS conditions or 6mM in TMB conditions), NTP (10mM), DOTASQ, <sup>PNA</sup>DOTASQ and RAFT-G4 (0.5 to 60 $\mu$ M).

For DNAzyme experiments: The DNA, hemin and/or NTP mixtures in Caco.KTD buffer were stirred at room temperature for 30min, then ABTS or TMB were added and the DNAzyme reactions were thus initiated by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For TASQzyme experiments: The TASQ, hemin and/or NTP mixtures in Caco.KTD buffer were stirred at room temperature for 30min, then ABTS or TMB were added and the DNAzyme reactions were thus initiated by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For DNAzyme experiments in the presence of TASQ: The DNA, TASQ, hemin and/or NTP mixtures in Caco.KTD buffer were stirred at room temperature for 30min, then ABTS or TMB were added and the DNAzyme reactions were thus initiated by the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

For each experiment, a control experiment (named *blank*) was carried out in the absence of pre-catalyst (*i.e.* DNA or TASQ) for the sake of comparison.

The characteristic UV-Vis signal of ABTS (420nm) or of TMB (370, 450, 652nm) of each experiment was plotted as a function of time with OriginPro8<sup>®</sup> software. Raw data were firstly subtracted from the control experiment and, for sake of comparison, subsequently zeroed at their very first point to obtain the *zeroed data*.

For V<sub>0</sub> determination, the absorbance at the very first four points was plotted as a function of time and linearly fitted to access the slope of this linear function, which corresponds to V<sub>0</sub> (in Abs.min<sup>-1</sup>) subsequently converted to  $\mu$ M.min<sup>-1</sup> *via* the Beer-Lambert law: Abs =  $\epsilon$ .l.c, using  $\epsilon(\text{ABTS}^{\bullet+}) = 36000\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  at 420nm and  $\epsilon(\text{TMB}^{\bullet+}) = 59000\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  at 450nm. Furthermore, the pre-catalytic constants k<sub>cat</sub> (min<sup>-1</sup>) were determined by divided the initial rate V<sub>0</sub> (in  $\mu$ M.min<sup>-1</sup>) by the pre-catalyst concentration (*i.e.* TASQ), finally converted in h<sup>-1</sup> for the sake of clarity.



**BIBLIOGRAPHIE**

- [1] J.-M. Lehn, *La chimie supramoléculaire: concepts et perspectives*, De Boeck Université, Bruxelles, Paris, **1997**.
- [2] K. Petkau-Milroy, L. Brunsveld, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 219-232.
- [3] D. A. Uhlenheuer, K. Petkau, L. Brunsveld, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2817-2826.
- [4] M. Harry, *Génétique moléculaire et évolutive*, Maloine, Paris, **2008**.
- [5] W. Muller-Esterl, *Biochimie et biologie moléculaire*, Dunod, Paris, **2007**.
- [6] J. T. Davis, G. P. Spada, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 296-313.
- [7] M. Fathalla, C. M. Lawrence, N. Zhang, J. L. Sessler, J. Jayawickramarajah, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1608-1620.
- [8] J. L. Sessler, C. M. Lawrence, J. Jayawickramarajah, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 314-325.
- [9] S. Sivakova, S. J. Rowan, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 9-21.
- [10] S. Balasubramanian, L. H. Hurley, S. Neidle, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 261-275.
- [11] T. Vy Thi Le, S. Han, J. Chae, H.-J. Park, *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 1948-1972.
- [12] Y. Xu, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2719-2740.
- [13] D. Yang, K. Okamoto, *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 619-646.
- [14] J. Kosman, B. Juskowiak, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *707*, 7-17.
- [15] Y. Krishnan, F. C. Simmel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3124-3156.
- [16] I. Willner, B. Shlyahovsky, M. Zayats, B. Willner, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1153-1165.
- [17] M. Nikan, J. C. Sherman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4900-4902.
- [18] R. Haudecoeur, L. Stefan, F. Denat, D. Monchaud, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 550-553.
- [19] R. Haudecoeur, L. Stefan, D. Monchaud, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 12739-12747.
- [20] L. Stefan, A. Guedin, S. Amrane, N. Smith, F. Denat, J.-L. Mergny, D. Monchaud, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4992-4994.
- [21] H.-J. Xu, L. Stefan, R. Haudecoeur, S. Vuong, P. Richard, F. Denat, J.-M. Barbe, C. P. Gros, D. Monchaud, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5212-5218.
- [22] P. Murat, B. Gennaro, J. Garcia, N. Spinelli, P. Dumy, E. Defrancq, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5791-5795.
- [23] L. Stefan, F. Denat, D. Monchaud, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20405-20415.
- [24] L. Stefan, D. Duret, N. Spinelli, E. Defrancq, D. Monchaud, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1500-1502.
- [25] L. Stefan, H.-J. Xu, C. P. Gros, F. Denat, D. Monchaud, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 10857-10862.
- [26] J.-M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 871-892.
- [27] D. J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 1009-1020.
- [28] J.-M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 89-112.
- [29] C. J. Pedersen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 1021-1027.
- [30] E. A. Appel, J. del Barrio, X. J. Loh, O. A. Scherman, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 6195-6214.
- [31] K. Ariga, H. Ito, J. P. Hill, H. Tsukube, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5800-5835.
- [32] A. P. de Silva, S. Uchiyama, T. P. Vance, B. Wannalerse, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1623-1632.
- [33] D. P. Patel, B. G. Chaudhari, *J. Curr. Pharm. Res.* **2012**, *9*, 1-5.
- [34] A. Ghosh, M. Bansal, *Acta Crystallogr. D.* **2003**, *59*, 620-626.
- [35] M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, *48*, 2013-2018.
- [36] D. G. Johnson, C. L. Walker, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*, 295-312.

- [37] B. Novák, J. C. Sible, J. J. Tyson, in *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, **2001**.
- [38] J. Pines, *Biochem. J.* **1995**, *308*, 697-711.
- [39] A. Porter, *Cell Division* **2008**, *3*, 3.
- [40] A. Leman, E. Noguchi, *Genes* **2013**, *4*, 1-32.
- [41] M. L. DePamphilis, P. M. Wassarman, *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 627-666.
- [42] R. Okazaki, T. Okazaki, K. Sakabe, K. Sugimoto, A. Sugino, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *59*, 598-605.
- [43] R. R. Iyer, A. Pluciennik, V. Burdett, P. L. Modrich, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 302-323.
- [44] C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider, *Nature* **1990**, *345*, 458-460.
- [45] L. Hayflick, *Exp. Cell Res.* **1965**, *37*, 614-636.
- [46] W. Lu, Y. Zhang, D. Liu, Z. Songyang, M. Wan, *Exp. Cell Res.* **2013**, *319*, 133-141.
- [47] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5th ed., W. J. Freeman, New York, **2002**.
- [48] D. P. Bartel, *Cell* **2004**, *116*, 281-297.
- [49] W. Sun, Y.-S. Julie Li, H.-D. Huang, J. Y. J. Shyy, S. Chien, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2010**, *12*, 1-27.
- [50] C. Langer, F. G. Rucker, C. Buske, H. Dohner, F. Kuchenbauer, *Ther. Adv. Hematol.* **2012**, *3*, 97-104.
- [51] S. Sassen, E. Miska, C. Caldas, *Virchows Archiv.* **2008**, *452*, 1-10.
- [52] A. A. Staton, A. J. Giraldez, in *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd, **2001**.
- [53] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [54] M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson, *Nature* **1953**, *171*, 738-740.
- [55] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature* **1953**, *171*, 740-741.
- [56] B. M. Marty, H., *Le premier âge de l'ADN*, Vuibert & Adapt, Paris, **2003**.
- [57] S. Furberg, *Acta Chem. Scand.* **1952**, *6*, 634-640.
- [58] L. Pauling, R. B. Corey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1953**, *39*, 84-97.
- [59] L. Pauling, R. B. Corey, H. R. Branson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1951**, *37*, 205-211.
- [60] P. A. Levene, L. A. Mikeska, T. Mori, *J. Biol. Chem.* **1930**, *85*, 785-787.
- [61] P. A. Levene, T. Mori, *J. Biol. Chem.* **1929**, *83*, 803-816.
- [62] A. Kossel, *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1901-1921*, Elsevier Publishing Company, **1967**.
- [63] M. E. Jones, *Yale J. Biol. Med.* **1953**, *26*, 80-97.
- [64] E. Chargaff, *Experientia* **1950**, *6*, 201-209.
- [65] S. Zamenhof, G. Brawerman, E. Chargaff, *Biochim. Biophys. Acta* **1952**, *9*, 402-405.
- [66] H. Judson, *Minerva* **1980**, *18*, 369-421.
- [67] B. Maddox, *Rosalind Franklin: la dark lady de l'ADN*, Des femmes - Antoinette Fouque ed., Paris, **2012**.
- [68] J. D. Watson, *La double hélice*, Hachette, **1968**.
- [69] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964-967.
- [70] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature* **1953**, *172*, 156-157.
- [71] P. A. J. Levene, W. A., *Chem. Ber.* **1909**, *42*, 2703-2706.
- [72] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402-5415.
- [73] J. E. Sokoloski, S. A. Godfrey, S. E. Dombrowski, P. C. Bevilacqua, *RNA* **2011**, *17*, 1-13.
- [74] O. Doluca, J. M. Withers, V. V. Filichev, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3044-3083.
- [75] A. Herbert, A. Rich, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 11595-11598.
- [76] B. Rauzan, E. McMichael, R. Cave, L. R. Sevcik, K. Ostrosky, E. Whitman, R. Stegemann, A. L. Sinclair, M. J. Serra, A. A. Deckert, *Biochemistry* **2013**, *52*, 765-772.
- [77] J. SantaLucia, H. T. Allawi, P. A. Seneviratne, *Biochemistry* **1996**, *35*, 3555-3562.
- [78] T. Xia, J. SantaLucia, M. E. Burkard, R. Kierzek, S. J. Schroeder, X. Jiao, C. Cox, D. H. Turner, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14719-14735.

- [79] A. Rich, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 7693-7696.
- [80] N. N. Shaw, D. P. Arya, *Biochimie* **2008**, *90*, 1026-1039.
- [81] J. H. Gommers-Ampt, P. Borst, *The FASEB Journal* **1995**, *9*, 1034-1042.
- [82] S. Kriaucionis, N. Heintz, *Science* **2009**, *324*, 929-930.
- [83] D. Ratel, J. L. Ravanat, F. Berger, D. Wion, *Bioessays* **2006**, *28*, 309-315.
- [84] M. A. Machnicka, K. Milanowska, O. Osman Oglou, E. Purta, M. Kurkowska, A. Olchowik, W. Januszewski, S. Kalinowski, S. Dunin-Horkawicz, K. M. Rother, M. Helm, J. M. Bujnicki, H. Grosjean, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D262-D267.
- [85] P. F. Agris, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 223-238.
- [86] U. Nagaswamy, N. Voss, Z. Zhang, G. E. Fox, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 375-376.
- [87] R. T. Batey, R. P. Rambo, J. A. Doudna, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2327-2343.
- [88] S. E. Butcher, A. M. Pyle, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1302-1311.
- [89] P. Svoboda, A. D. Cara, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 901-908.
- [90] C. Laing, D. Wen, J. T. L. Wang, T. Schlick, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 487-498.
- [91] A. E. Walter, D. H. Turner, J. Kim, M. H. Lyttle, P. Müller, D. H. Mathews, M. Zuker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 9218-9222.
- [92] D. W. Staple, S. E. Butcher, *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e213.
- [93] E. H. Blackburn, K. Collins, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*.
- [94] C. Brunel, R. Marquet, P. Romby, C. Ehresmann, *Biochimie* **2002**, *84*, 925-944.
- [95] J. Ishikawa, Y. Fujita, Y. Maeda, H. Furuta, Y. Ikawa, *Methods* **2011**, *54*, 226-238.
- [96] L. Wu, D. Chai, M. E. Fraser, S. Zimmerly, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49225.
- [97] F. A. Buske, D. C. Bauer, J. S. Mattick, T. L. Bailey, *Genome Res.* **2012**, *22*, 1372-1381.
- [98] A. Jain, G. Wang, K. M. Vasquez, *Biochimie* **2008**, *90*, 1117-1130.
- [99] M. J. Hannon, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 280-295.
- [100] I. Radhakrishnan, D. J. Patel, *Structure* **1994**, *2*, 17-32.
- [101] M. D. Frank-Kamenetskii, S. M. Mirkin, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 65-95.
- [102] M. Duca, P. Vekhoff, K. Oussedik, L. Halby, P. B. Arimondo, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5123-5138.
- [103] A. Mukherjee, K. M. Vasquez, *Biochimie* **2011**, *93*, 1197-1208.
- [104] A. Jain, M. Magistri, S. Napoli, G. M. Carbone, C. V. Catapano, *Biochimie* **2010**, *92*, 317-320.
- [105] S. B. Boulware, L. A. Christensen, H. Thames, L. Coghlan, K. M. Vasquez, R. A. Finch, *Mol. Carcinog.* **2013**, *in press*, doi: 10.1002/mc.22026.
- [106] V. Thiviyanathan, B. A. Luxon, N. B. Leontis, N. Illangasekare, D. G. Donne, D. G. Gorenstein, *J. Biomol. NMR* **1999**, *14*, 209-221.
- [107] D. R. Duckett, A. I. H. Murchie, R. M. Clegg, G. S. Bassi, M.-J. p. E. Giraud-Panis, D. M. J. Lilley, *Biophys. Chem.* **1997**, *68*, 53-62.
- [108] D. M. J. Lilley, *Q. Rev. Biophys.* **2000**, *33*, 109-159.
- [109] T. Sabir, A. Toulmin, L. Ma, A. C. Jones, P. McGlynn, G. F. Schröder, S. W. Magennis, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6280-6285.
- [110] A. Lescoute, E. Westhof, *RNA* **2006**, *12*, 83-93.
- [111] N. N. Degtyareva, C. A. Barber, M. J. Reddish, J. T. Petty, *Biochemistry* **2010**, *50*, 458-465.
- [112] S. M. Mirkin, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 351-358.
- [113] C. Ducani, A. Leczkowska, N. J. Hodges, M. J. Hannon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8942-8945.
- [114] M. R. Singleton, S. Scaife, D. B. Wigley, *Cell* **2001**, *107*, 79-89.
- [115] M. de la Peña, D. Dufour, J. Gallego, *RNA* **2009**, *15*, 1949-1964.
- [116] Y. Brown, M. Abraham, S. Pearl, M. M. Kabaha, E. Elboher, Y. Tzfati, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 6280-6289.
- [117] J. Ouellet, S. Melcher, A. Iqbal, Y. Ding, D. M. J. Lilley, *RNA* **2010**, *16*, 1597-1609.
- [118] L. A. Howell, M. Searcey, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2139-2143.

- [119] J. Malina, M. J. Hannon, V. Brabec, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 10408-10414.
- [120] G. I. Pascu, A. C. G. Hotze, C. Sanchez-Cano, B. M. Kariuki, M. J. Hannon, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4374-4378.
- [121] S. Vuong, L. Stefan, P. Lejault, Y. Rousselin, F. Denat, D. Monchaud, *Biochimie* **2012**, *94*, 442-450.
- [122] C. Teller, I. Willner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 376-391.
- [123] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11547-11548.
- [124] M. N. Stojanovic, P. de Prada, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4928-4931.
- [125] M. N. Stojanovic, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9678-9679.
- [126] M. N. Stojanovic, E. G. Green, S. Semova, D. B. Nikic, D. W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6085-6089.
- [127] T. Kato, K. Yano, K. Ikebukuro, I. Karube, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 1963-1968.
- [128] B. F. Eichman, J. M. Vargason, B. H. M. Mooers, P. S. Ho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3971-3976.
- [129] R. Holliday, *Genet. Res.* **1964**, *5*, 282-304.
- [130] R. M. Clegg, A. I. Murchie, D. M. Lilley, *Biophys. J.* **1994**, *66*, 99-109.
- [131] G. A. Cromie, R. W. Hyppa, A. F. Taylor, K. Zakharyevich, N. Hunter, G. R. Smith, *Cell* **2006**, *127*, 1167-1178.
- [132] M. P. Longhese, D. Bonetti, I. Guerini, N. Manfrini, M. Clerici, *DNA Repair* **2009**, *8*, 1127-1138.
- [133] J. W. Szostak, T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein, F. W. Stahl, *Cell* **1983**, *33*, 25-35.
- [134] J. L. Youds, S. J. Boulton, *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 501-513.
- [135] T. Helleday, *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* **2003**, *532*, 103-115.
- [136] T. Helleday, J. Lo, D. C. van Gent, B. P. Engelward, *DNA Repair* **2007**, *6*, 923-935.
- [137] J. T. Holthausen, C. Wyman, R. Kanaar, *DNA Repair* **2010**, *9*, 1264-1272.
- [138] A. J. R. Bishop, R. H. Schiestl, *Exp. Mol. Pathol.* **2003**, *74*, 94-105.
- [139] M. Shrivastav, L. P. De Haro, J. A. Nickoloff, *Cell Res.* **2008**, *18*, 134-147.
- [140] T. Helleday, *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 955-960.
- [141] A. L. Brogden, N. H. Hopcroft, M. Searcey, C. J. Cardin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3850-3854.
- [142] K. Ghosh, C. K. Lau, F. Guo, A. M. Segall, G. D. Van Duyne, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8290-8299.
- [143] L. A. Howell, Z. A. E. Waller, R. Bowater, M. O'Connell, M. Searcey, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8262-8264.
- [144] K. V. Kepple, J. L. Boldt, A. M. Segall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 6867-6872.
- [145] K. V. Kepple, N. Patel, P. Salamon, A. M. Segall, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 5319-5334.
- [146] P.-S. Pan, F. A. Curtis, C. L. Carroll, I. Medina, L. A. Liotta, G. J. Sharples, S. R. McAlpine, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4731-4739.
- [147] S. C. M. Teixeira, J. H. Thorpe, A. K. Todd, H. R. Powell, A. Adams, L. P. G. Wakelin, W. A. Denny, C. J. Cardin, *J. Mol. Biol.* **2002**, *323*, 167-171.
- [148] N. Kim, M. Piatyszek, K. Prowse, C. Harley, M. West, P. Ho, G. Coviello, W. Wright, S. Weinrich, J. Shay, *Science* **1994**, *266*, 2011-2015.
- [149] A. J. Cesare, R. R. Reddel, *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 319-330.
- [150] N. Fouché, A. J. Cesare, S. Willcox, S. Özgür, S. A. Compton, J. D. Griffith, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37486-37495.
- [151] G. J. Nora, N. A. Buncher, P. L. Opresko, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 3984-3998.
- [152] A. Poulet, R. Buisson, C. Faivre-Moskalenko, M. Koelblen, S. Amiard, F. Montel, S. Cuesta-Lopez, O. Bornet, F. Guerlesquin, T. Godet, J. Moukhtar, F. Argoul, A.-C. Declais, D. M. J. Lilley, S. C. Y. Ip, S. C. West, E. Gilson, M.-J. Giraud-Panis, *EMBO J.* **2009**, *28*, 641-651.

- [153] J. B. Thomson, D. M. Lilley, *RNA* **1999**, *5*, 180-187.
- [154] T. A. Brooks, S. Kendrick, L. Hurley, *FEBS J.* **2010**, *277*, 3459-3469.
- [155] J. Choi, T. Majima, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5893-5909.
- [156] J. Weil, T. Min, C. Yang, S. Wang, C. Sutherland, N. Sinha, C. Kang, *Acta Crystallogr. D.* **1999**, *55*, 422-429.
- [157] L. Lacroix, J.-L. Mergny, J.-L. Leroy, C. Hélène, *Biochemistry* **1996**, *35*, 8715-8722.
- [158] J. Zhou, C. Wei, G. Jia, X. Wang, Z. Feng, C. Li, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 580-586.
- [159] J. A. Brazier, A. Shah, G. D. Brown, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10739-10741.
- [160] S. Kendrick, Y. Akiyama, S. M. Hecht, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17667-17676.
- [161] T. A. Brooks, L. H. Hurley, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 849-861.
- [162] D. Sun, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2863-2874.
- [163] M. Canalia, J. L. Leroy, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5471-5481.
- [164] S. Nonin, A. T. Phan, J.-L. Leroy, *Structure* **1997**, *5*, 1231-1247.
- [165] M. Guéron, J.-L. Leroy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 326-331.
- [166] E. Guittet, D. Renciuik, J.-L. Leroy, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 5162-5170.
- [167] H. Mei, S. Budow, F. Seela, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 4196-4204.
- [168] Y. Yang, C. Zhou, T. Zhang, E. Cheng, Z. Yang, D. Liu, *Small* **2012**, *8*, 552-556.
- [169] K. Guo, A. Pourpak, K. Beetz-Rogers, V. Gokhale, D. Sun, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10220-10228.
- [170] Y. Xu, H. Sugiyama, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 949-954.
- [171] A. T. Phan, J. L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4618-4625.
- [172] S. Kendrick, L. H. Hurley, *Pure Appl. Chem.* **2010**, *82*, 1609-1621.
- [173] D. Miyoshi, M. Inoue, N. Sugimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7716-7719.
- [174] J. Zhou, S. Amrane, D. N. Korkut, A. Bourdoncle, H. Z. He, D. L. Ma, J. L. Mergny, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**.
- [175] T. Li, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1593-1599.
- [176] Y. Wan, G. Liu, X. Zhu, Y. Su, *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 14.
- [177] C. Wang, Y. Du, Q. Wu, S. Xuan, J. Zhou, J. Song, F. Shao, H. Duan, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5739-5741.
- [178] K. Snoussi, S. Nonin-Lecomte, J. L. Leroy, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 139-153.
- [179] N. Borovok, T. Molotsky, J. Ghabboun, D. Porath, A. Kotlyar, *Anal. Biochem.* **2008**, *374*, 71-78.
- [180] H. Cohen, T. Sapir, N. Borovok, T. Molotsky, R. Di Felice, A. B. Kotlyar, D. Porath, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 981-986.
- [181] J. T. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 668-698.
- [182] A. B. Kotlyar, N. Borovok, T. Molotsky, H. Cohen, E. Shapir, D. Porath, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1901-1905.
- [183] S. Lyonnais, O. Pietrement, A. Chepelianski, S. Gueron, L. Lacroix, E. Le Cam, J. L. Mergny, *Nucleic acids symposium series (2004)* **2008**, 689-690.
- [184] M. Črnugelj, N. V. Hud, J. Plavec, *J. Mol. Biol.* **2002**, *320*, 911-924.
- [185] X. Guo, S. Liu, Z. Yu, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1467-1476.
- [186] J. Zhou, A. Bourdoncle, F. Rosu, V. Gabelica, J.-L. Mergny, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11002-11005.
- [187] J. L. Mergny, A. De Cian, A. Ghelab, B. Sacca, L. Lacroix, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 81-94.
- [188] P. Tran, A. Cian, J. Gros, R. Moriyama, J.-L. Mergny, in *Quadruplex Nucleic Acids, Vol. 330* (Eds.: J. B. Chaires, D. Graves), Springer Berlin Heidelberg, **2013**, pp. 243-273.
- [189] J. Dai, M. Carver, D. Yang, *Biochimie* **2008**, *90*, 1172-1183.
- [190] A. T. Phan, V. Kuryavyi, D. J. Patel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 288-298.
- [191] A. Joachimi, A. Benz, J. r. S. Hartig, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 6811-6815.

- [192] S. Neidle, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 239-250.
- [193] P. Hazel, J. Huppert, S. Balasubramanian, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16405-16415.
- [194] J.-L. Mergny, A.-T. Phan, L. Lacroix, *FEBS Lett.* **1998**, *435*, 74-78.
- [195] A. De Cian, L. Lacroix, C. Douarre, N. Temime-Smaali, C. Trentesaux, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, *Biochimie* **2008**, *90*, 131-155.
- [196] S. Neidle, *FEBS J.* **2010**, *277*, 1118-1125.
- [197] A. Bugaut, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 4727-4741.
- [198] J. L. Huppert, A. Bugaut, S. Kumari, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 6260-6268.
- [199] C. M. Azzalin, P. Reichenbach, L. Khoriantuli, E. Giulotto, J. Lingner, *Science* **2007**, *318*, 798-801.
- [200] S. Feuerhahn, N. Iglesias, A. Panza, A. Porro, J. Lingner, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 3812-3818.
- [201] S. Schoeftner, M. A. Blasco, *EMBO J.* **2009**, *28*, 2323-2336.
- [202] D.-M. Kong, N. Wang, X.-X. Guo, H.-X. Shen, *Analyst* **2010**, *135*, 545-549.
- [203] B.-C. Yin, B.-C. Ye, W. Tan, H. Wang, C.-C. Xie, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14624-14625.
- [204] T. Li, L. Shi, E. Wang, S. Dong, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1036-1042.
- [205] J. Zhu, T. Li, J. Hu, E. Wang, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 2923-2927.
- [206] X. Cheng, X. Liu, T. Bing, Z. Cao, D. Shangguan, *Biochemistry* **2009**, *48*, 7817-7823.
- [207] R. Freeman, E. Sharon, C. Teller, A. Henning, Y. Tzfati, I. Willner, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2362-2367.
- [208] J. L. Sessler, D. Magda, H. Furuta, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 818-826.
- [209] J. L. Sessler, R. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9808-9809.
- [210] J. L. Sessler, R. Wang, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4079-4091.
- [211] O. F. Schall, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6089-6100.
- [212] H. T. Baytekin, E. U. Akkaya, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 1725-1727.
- [213] J. L. Sessler, B. Wang, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 704-714.
- [214] J. L. Sessler, J. Jayawickramarajah, *Chem. Commun.* **2005**, 1939-1949.
- [215] V. Kral, J. L. Sessler, H. Furuta, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 8704-8705.
- [216] J. L. Sessler, V. Král, T. V. Shishkanova, P. A. Gale, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4848-4853.
- [217] J. L. Sessler, J. Jayawickramarajah, M. Sathiosatham, C. L. Sherman, J. S. Brodbelt, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2627-2630.
- [218] M. F. White, D. M. J. Lilley, *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 122-134.
- [219] E. Freisinger, S. Meier, B. Lippert, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 3274-3280.
- [220] T. Shimizu, R. Iwaura, M. Masuda, T. Hanada, K. Yase, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5947-5955.
- [221] C. Arnal-Herault, M. Barboiu, A. Pasc, M. Michau, P. Perriat, A. van der Lee, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 6792-6800.
- [222] A. Wong, R. Ida, L. Spindler, G. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6990-6998.
- [223] G. Gottarelli, S. Masiero, G. P. Spada, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2555-2557.
- [224] S. L. Forman, J. C. Fettingner, S. Pieraccini, G. Gottarelli, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4060-4067.
- [225] T. Giorgi, F. Grepioni, I. Manet, P. Mariani, S. Masiero, E. Mezzina, S. Pieraccini, L. Saturni, G. P. Spada, G. Gottarelli, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2143-2152.
- [226] R. Rinaldi, G. Maruccio, A. Biasco, V. Arima, R. Cingolani, T. Giorgi, S. Masiero, G. P. Spada, G. Gottarelli, *Nanotechnology* **2002**, *13*, 398.
- [227] R. Otero, M. Schock, L. M. Molina, E. Lægsgaard, I. Stensgaard, B. Hammer, F. Besenbacher, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2270-2275.

- [228] J. L. Sessler, M. Sathiosatham, K. Doerr, V. Lynch, K. A. Abboud, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1300-1303.
- [229] A. Ghossoub, J.-M. Lehn, *Chem. Commun.* **2005**, 5763-5765.
- [230] M. S. Kaucher, W. A. Harrell, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 38-39.
- [231] L. Ma, W. A. Harrell, J. T. Davis, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1599-1602.
- [232] L. Ma, M. Melegari, M. Colombini, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2938-2939.
- [233] C. Arnal-Herault, A. Pasc, M. Michau, D. Cot, E. Petit, M. Barboiu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8409-8413.
- [234] U. Römling, M. Y. Galperin, M. Gomelsky, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77*, 1-52.
- [235] S. Nakayama, I. Kelsey, J. Wang, K. Roelofs, B. Stefane, Y. Luo, V. T. Lee, H. O. Sintim, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 4856-4864.
- [236] S. Nakayama, I. Kelsey, J. Wang, H. O. Sintim, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4766-4768.
- [237] S. Nakayama, K. Roelofs, V. T. Lee, H. O. Sintim, *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 726-729.
- [238] B. T. Roembke, J. Wang, S. Nakayama, J. Zhou, H. O. Sintim, *RSC Advances* **2013**, *3*, 6305-6310.
- [239] X. Shi, J. C. Fetting, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6738-6739.
- [240] N. Sreenivasachary, J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5938-5943.
- [241] S. Lena, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7792-7806.
- [242] F. W. Kotch, V. Sidorov, Y.-F. Lam, K. J. Kayser, H. Li, M. S. Kaucher, J. T. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15140-15150.
- [243] V. Sidorov, F. W. Kotch, M. El-Kouedi, J. T. Davis, *Chem. Commun.* **2000**, 2369-2370.
- [244] H. E. K. Huttunen-Hennelly, J. C. Sherman, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3637-3650.
- [245] M. Nikan, B. O. Patrick, J. C. Sherman, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1413-1415.
- [246] M. Nikan, J. C. Sherman, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5211-5218.
- [247] M. Nikan, G. A. L. Bare, J. C. Sherman, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1791-1793.
- [248] G. A. L. Bare, B. Liu, J. C. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11985-11989.
- [249] P. Murat, D. Cressend, N. Spinelli, A. Van der Heyden, P. Labbe, P. Dumy, E. Defrancq, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2588-2591.
- [250] P. Murat, R. Bonnet, A. Van der Heyden, N. Spinelli, P. Labbe, D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, P. Dumy, E. Defrancq, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6106-6114.
- [251] R. Bonnet, P. Murat, N. Spinelli, E. Defrancq, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5992-5994.
- [252] R. E. Mewis, S. J. Archibald, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 1686-1712.
- [253] J. D. Watson, *Nature New Biology* **1972**, *239*, 197-201.
- [254] A. M. Olovnikov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1971**, *201*, 1496-1499.
- [255] A. M. Olovnikov, *J. Theor. Biol.* **1973**, *41*, 181-190.
- [256] A. M. Olovnikov, *Exp. Gerontol.* **1996**, *31*, 443-448.
- [257] E. H. Blackburn, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7405-7421.
- [258] E. H. Blackburn, J. G. Gall, *J. Mol. Biol.* **1978**, *120*, 33-53.
- [259] E. Henderson, C. C. Hardin, S. K. Walk, I. Tinoco, E. H. Blackburn, *Cell* **1987**, *51*, 899-908.
- [260] W. I. Sundquist, A. Klug, *Nature* **1989**, *342*, 825-829.
- [261] R. K. Moyzis, J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff, J. R. Wu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 6622-6626.
- [262] M. T. Teixeira, E. Gilson, *Chromosome Res.* **2005**, *13*, 535-548.
- [263] Y. Wang, D. J. Patel, *Structure* **1993**, *1*, 263-282.
- [264] H. J. Lipps, D. Rhodes, *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 414-422.
- [265] K. Paeschke, T. Simonsson, J. Postberg, D. Rhodes, H. J. Lipps, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 847-854.
- [266] C. Schaffitzel, I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H. J. Lipps, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8572-8577.
- [267] C. W. Greider, E. H. Blackburn, *Cell* **1985**, *43*, 405-413.

- [268] K. Collins, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 643-648.
- [269] C. W. Greider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7422-7439.
- [270] J. W. Szostak, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7386-7404.
- [271] D. R. Corey, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1219-1223.
- [272] C. B. Harley, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 167-179.
- [273] A. M. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech, D. M. Prescott, *Nature* **1991**, *350*, 718-720.
- [274] D. Sun, B. Thompson, B. E. Cathers, M. Salazar, S. M. Kerwin, J. O. Trent, T. C. Jenkins, S. Neidle, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2113-2116.
- [275] S. N. Georgiades, N. H. Abd Karim, K. Suntharalingam, R. Vilar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4020-4034.
- [276] D. Monchaud, M. P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627-636.
- [277] T. de Lange, *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2100-2110.
- [278] A. J. Zaugg, E. R. Podell, T. R. Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 10864-10869.
- [279] D. Gomez, M.-F. O'Donohue, T. Wenner, C. Douarre, J. Macadré, P. Koebel, M.-J. Giraud-Panis, H. Kaplan, A. Kolkes, K. Shin-ya, J.-F. Riou, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6908-6912.
- [280] D. Gomez, T. Wenner, B. Brassart, C. Douarre, M.-F. O'Donohue, V. El Khoury, K. Shin-ya, H. Morjani, C. Trentesaux, J.-F. Riou, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 38721-38729.
- [281] M. Gunaratnam, O. Greciano, C. Martins, A. P. Reszka, C. M. Schultes, H. Morjani, J.-F. Riou, S. Neidle, *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 679-689.
- [282] R. Rodriguez, S. Muller, J. A. Yeoman, C. Trentesaux, J.-F. Riou, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15758-15759.
- [283] C. M. Kong, X. W. Lee, X. Wang, *FEBS J.* **2013**, *280*, 3180-3193.
- [284] J. D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R. M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, T. de Lange, *Cell* **1999**, *97*, 503-514.
- [285] Y. Xu, H. Sato, Y. Sannohe, K.-i. Shinohara, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16470-16471.
- [286] A. T. Phan, *FEBS J.* **2010**, *277*, 1107-1117.
- [287] H. Martadinata, B. Heddi, K. W. Lim, A. T. Phan, *Biochemistry* **2011**, *50*, 6455-6461.
- [288] H.-Q. Yu, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15461-15468.
- [289] S. Haider, G. N. Parkinson, S. Neidle, *Biophys. J.* **2008**, *95*, 296-311.
- [290] L. Petraccone, N. C. Garbett, J. B. Chaires, J. O. Trent, *Biopolymers* **2010**, *93*, 533-548.
- [291] Y. Xu, T. Ishizuka, K. Kurabayashi, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7833-7836.
- [292] S. Balasubramanian, S. Neidle, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 345-353.
- [293] L. Kelland, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 4960-4963.
- [294] C. Granotier, G. Pennarun, L. Riou, F. Hoffschir, L. R. Gauthier, A. De Cian, D. Gomez, E. Mandine, J. F. Riou, J. L. Mergny, P. Mailliet, B. Dutrillaux, F. D. Boussin, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4182-4190.
- [295] M. Di Antonio, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, *Methods* **2012**, *57*, 84-92.
- [296] R. Rodriguez, K. M. Miller, J. V. Forment, C. R. Bradshaw, M. Nikan, S. Britton, T. Oelschlaegel, B. Xhemalce, S. Balasubramanian, S. P. Jackson, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 301-310.
- [297] G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 182-186.
- [298] Y. Xu, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 927-928.
- [299] J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2908-2916.
- [300] A. K. Todd, M. Johnston, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2901-2907.
- [301] Y. Qin, L. H. Hurley, *Biochimie* **2008**, *90*, 1149-1171.
- [302] J. Eddy, N. Maizels, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3887-3896.
- [303] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [304] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646-674.

- [305] J. Alzeer, B. R. Vummidi, P. J. C. Roth, N. W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9362-9365.
- [306] E. Y. N. Lam, D. Beraldi, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1796.
- [307] G. W. Collie, S. M. Haider, S. Neidle, G. N. Parkinson, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5569-5580.
- [308] H. Martadinata, A. T. Phan, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2570-2578.
- [309] H. Martadinata, A. T. Phan, *Biochemistry* **2013**, *52*, 2176-2183.
- [310] G. W. Collie, G. N. Parkinson, S. Neidle, F. Rosu, E. De Pauw, V. Gabelica, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9328-9334.
- [311] Y. Xu, M. Komiyama, *Methods* **2012**, *57*, 100-105.
- [312] B. Luke, J. Lingner, *EMBO J.* **2009**, *28*, 2503-2510.
- [313] G. Biffi, D. Tannahill, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11974-11976.
- [314] X. H. Ji, H. X. Sun, H. X. Zhou, J. F. Xiang, Y. L. Tang, C. Q. Zhao, *Nucl. Acid Ther.* **2011**, *21*, 185-200.
- [315] S. Redon, P. Reichenbach, J. Lingner, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 5797-5806.
- [316] S. Schoeftner, M. A. Blasco, *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 228-236.
- [317] A. Smirnova, R. Gamba, L. Khoriali, V. Vitelli, S. G. Nergadze, E. Giulotto, *Frontiers in Oncology* **2013**, *3*, 1-7.
- [318] S. Kumari, A. Bugaut, J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 218-221.
- [319] J. R. Babendure, J. L. Babendure, J.-H. Ding, R. Y. Tsien, *RNA* **2006**, *12*, 851-861.
- [320] A. Arora, M. Dutkiewicz, V. Scaria, M. Hariharan, S. Maiti, J. Kurreck, *RNA* **2008**, *14*, 1290-1296.
- [321] C. Schaeffer, B. Bardoni, J.-L. Mandel, B. Ehresmann, C. Ehresmann, H. Moine, *EMBO J.* **2001**, *20*, 4803-4813.
- [322] A. Bugaut, R. Rodriguez, S. Kumari, S.-T. D. Hsu, S. Balasubramanian, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2771-2776.
- [323] D. Gomez, A. Guédin, J.-L. Mergny, B. Salles, J.-F. Riou, M.-P. Teulade-Fichou, P. Calsou, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 7187-7198.
- [324] K. Halder, E. Largy, M. Benzler, M.-P. Teulade-Fichou, J. S. Hartig, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1663-1668.
- [325] S. Bonnal, C. Schaeffer, L. Créancier, S. Clamens, H. Moine, A.-C. Prats, S. Vagner, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 39330-39336.
- [326] M. J. Morris, Y. Negishi, C. Pazsint, J. D. Schonhoft, S. Basu, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17831-17839.
- [327] D.-M. Kong, *Methods* **2013**, *in press*, doi: 10.1016/j.ymeth.2013.07.013.
- [328] K. W. Kohn, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 5533-5546.
- [329] S. M. Haider, S. Neidle, G. N. Parkinson, *Biochimie* **2011**, *93*, 1239-1251.
- [330] F. Hamon, E. Largy, A. Guédin-Beaurepaire, M. Rouchon-Dagois, A. Sidibe, D. Monchaud, J.-L. Mergny, J.-F. Riou, C.-H. Nguyen, M.-P. Teulade-Fichou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8745-8749.
- [331] Q. Li, J. F. Xiang, Q. F. Yang, H. X. Sun, A. J. Guan, Y. L. Tang, *Nucleic Acids Res* **2013**, *41*, D1115-1123.
- [332] D. P. N. Goncalves, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.* **2006**, 4685-4687.
- [333] A. M. Burger, F. Dai, C. M. Schultes, A. P. Reszka, M. J. Moore, J. A. Double, S. Neidle, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1489-1496.
- [334] M. J. B. Moore, C. M. Schultes, J. Cuesta, F. Cuenca, M. Gunaratnam, F. A. Tanious, W. D. Wilson, S. Neidle, *J. Med. Chem.* **2005**, *49*, 582-599.
- [335] C. Hounsou, L. Guittat, D. Monchaud, M. Jourdan, N. Saettel, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 655-666.

- [336] S. Ladame, J. A. Schouten, J. Stuart, J. Roldan, S. Neidle, S. Balasubramanian, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 2925-2931.
- [337] J. E. Redman, J. M. Granadino-Roldan, J. A. Schouten, S. Ladame, A. P. Reszka, S. Neidle, S. Balasubramanian, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 76-84.
- [338] J. A. Schouten, S. Ladame, S. J. Mason, M. A. Cooper, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5594-5595.
- [339] S. M. Hampel, A. Pepe, K. M. Greulich-Bode, S. V. Malhotra, A. P. Reszka, S. Veith, P. Boukamp, S. Neidle, *Mol. Pharmacol.* **2013**, *83*, 470-480.
- [340] J. Dai, M. Carver, L. H. Hurley, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17673-17680.
- [341] B. Guyen, C. M. Schultes, P. Hazel, J. Mann, S. Neidle, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 981-988.
- [342] Y. J. Lu, T. M. Ou, J. H. Tan, J. Q. Hou, W. Y. Shao, D. Peng, N. Sun, X. D. Wang, W. B. Wu, X. Z. Bu, Z. S. Huang, D. L. Ma, K. Y. Wong, L. Q. Gu, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6381-6392.
- [343] T. M. Ou, J. Lin, Y. J. Lu, J. Q. Hou, J. H. Tan, S. H. Chen, Z. Li, Y. P. Li, D. Li, L. Q. Gu, Z. S. Huang, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5671-5679.
- [344] W. Xu, J. H. Tan, S. B. Chen, J. Q. Hou, D. Li, Z. S. Huang, L. Q. Gu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *406*, 454-458.
- [345] J. L. Zhou, Y. J. Lu, T. M. Ou, J. M. Zhou, Z. S. Huang, X. F. Zhu, C. J. Du, X. Z. Bu, L. Ma, L. Q. Gu, Y. M. Li, A. S. Chan, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7315-7321.
- [346] J. E. Reed, A. A. Arnal, S. Neidle, R. Vilar, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5992-5993.
- [347] H. Bertrand, S. Bombard, D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2007**, *12*, 1003-1014.
- [348] K.-I. Shinohara, Y. Sannohe, S. Kaieda, K.-I. Tanaka, H. Osuga, H. Tahara, Y. Xu, T. Kawase, T. Bando, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3778-3782.
- [349] A. Cummaro, I. Fotticchia, M. Franceschin, C. Giancola, L. Petraccone, *Biochimie* **2011**, *93*, 1392-1400.
- [350] P. Hermann, J. Kotek, V. Kubicek, I. Lukes, *Dalton Trans.* **2008**, 3027-3047.
- [351] C. Schwergold, G. Depecker, C. Di Giorgio, N. Patino, F. Jossinet, B. Ehresmann, R. Terreux, D. Cabrol-Bass, R. Condom, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5675-5687.
- [352] M. Adrian, B. Heddi, A. T. Phan, *Methods* **2012**, *57*, 11-24.
- [353] J. L. Mergny, L. Lacroix, *Current protocols in nucleic acid chemistry / edited by Serge L. Beaucage ... [et al.]* **2009**, Chapter 17, Unit 17 11.
- [354] A. De Cian, L. Guittat, M. Kaiser, B. Sacca, S. Amrane, A. Bourdoncle, P. Alberti, M.-P. Teulade-Fichou, L. Lacroix, J.-L. Mergny, *Methods* **2007**, *42*, 183-195.
- [355] L. Stefan, B. Bertrand, P. Richard, P. Le Gendre, F. Denat, M. Picquet, D. Monchaud, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1905-1912.
- [356] K. E. Sapsford, L. Berti, I. L. Medintz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4562-4589.
- [357] L. Martino, B. Pagano, I. Fotticchia, S. Neidle, C. Giancola, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 14779-14786.
- [358] C. Y. Wei, G. Q. Jia, J. Zhou, G. Y. Han, C. Li, *PCCP* **2009**, *11*, 4025-4032.
- [359] J. Gu, J. Leszczynski, *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 6308-6313.
- [360] P. E. Nielsen, *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 786-804.
- [361] Y. Kato, T. Ohyama, H. Mita, Y. Yamamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9980-9981.
- [362] E. Gavathiotis, R. A. Heald, M. F. G. Stevens, M. S. Searle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4749-4751.
- [363] K. Saito, H. Tai, M. Fukaya, T. Shibata, R. Nishimura, S. Neya, Y. Yamamoto, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 437-445.
- [364] K. Saito, H. Tai, H. Hemmi, N. Kobayashi, Y. Yamamoto, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 8168-8176.

- [365] D. J. Patel, S. A. Kozlowski, J. A. Rice, C. Broka, K. Itakura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 7281-7284.
- [366] F. d. r. Rosu, E. De Pauw, V. r. Gabelica, *Biochimie* **2008**, *90*, 1074-1087.
- [367] V. r. Gabelica, F. d. r. Rosu, E. De Pauw, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 6708-6715.
- [368] E. Largy, A. Granzhan, F. Hamon, D. Verga, M.-P. Teulade-Fichou, in *Quadruplex Nucleic Acids, Vol. 330* (Eds.: J. B. Chaires, D. Graves), Springer Berlin Heidelberg, **2013**, pp. 111-177.
- [369] E. Largy, F. Hamon, M.-P. Teulade-Fichou, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 3419-3427.
- [370] D. Monchaud, C. Allain, H. Bertrand, N. Smargiasso, F. Rosu, V. Gabelica, A. De Cian, J. L. Mergny, M. P. Teulade-Fichou, *Biochimie* **2008**, *90*, 1207-1223.
- [371] D. Monchaud, C. Allain, M.-P. Teulade-Fichou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4842-4845.
- [372] D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, in *G-Quadruplex DNA, Vol. 608* (Ed.: P. Baumann), Humana Press, **2010**, pp. 257-271.
- [373] M. Di Antonio, G. Biffi, A. Mariani, E.-A. Raiber, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 11073-11078.
- [374] T. Mitchell, A. Ramos-Montoya, M. Di Antonio, P. Murat, S. Ohnmacht, M. Micco, S. Jurmeister, L. Fryer, S. Balasubramanian, S. Neidle, D. E. Neal, *Biochemistry* **2013**, *52*, 1429-1436.
- [375] T. R. Cech, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 759-768.
- [376] K. Kruger, P. J. Grabowski, A. J. Zaug, J. Sands, D. E. Gottschling, T. R. Cech, *Cell* **1982**, *31*, 147-157.
- [377] S. Altman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 749-758.
- [378] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell* **1983**, *35*, 849-857.
- [379] T. R. Cech, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, doi: 10.1101/cshperspect.a006742.
- [380] M. P. Robertson, G. F. Joyce, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, doi: 10.1101/cshperspect.a003608.
- [381] W. Gilbert, *Nature* **1986**, *319*, 618-618.
- [382] A. Mondragón, *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 537-557.
- [383] R. R. Breaker, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, doi: 10.1101/cshperspect.a003566.
- [384] A. D. Garst, A. L. Edwards, R. T. Batey, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, doi: 10.1101/cshperspect.a003533.
- [385] P. B. Moore, T. A. Steitz, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, doi: 10.1101/cshperspect.a003780.
- [386] D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* **1990**, *344*, 467-468.
- [387] S. K. Silverman, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc., **2008**.
- [388] R. R. Breaker, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 223-229.
- [389] S. K. Silverman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7180-7201.
- [390] C. Wang, G. Jia, J. Zhou, Y. Li, Y. Liu, S. Lu, C. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9352-9355.
- [391] J. Fan, G. Sun, C. Wan, Z. Wang, Y. Li, *Chem. Commun.* **2008**, 3792-3794.
- [392] G. Sun, J. Fan, Z. Wang, Y. Li, *Synlett* **2008**, 2491-2494.
- [393] C. W. S. Chan, L. M. Khachigian, *Intern. Med. J.* **2009**, *39*, 249-251.
- [394] C. R. Dass, P. F. M. Choong, L. M. Khachigian, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 243-251.
- [395] S. C. Gopinath, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 171-182.
- [396] R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz, *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 381-403.
- [397] Y. Li, R. Geyer, D. Sen, *Biochemistry* **1996**, *35*, 6911-6922.
- [398] Y. Li, D. Sen, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **1996**, *3*, 743-747.
- [399] H. Arthanari, S. Basu, T. L. Kawano, P. H. Bolton, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 3724-3728.

- [400] J. M. Nicoludis, S. P. Barrett, J.-L. Mergny, L. A. Yatsunyk, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 5432-5447.
- [401] S. Paramasivan, I. Rujan, P. H. Bolton, *Methods* **2007**, *43*, 324-331.
- [402] P. Ragazzon, J. B. Chaires, *Methods* **2007**, *43*, 313-323.
- [403] F. Rosu, V. Gabelica, C. Houssier, P. Colson, E. D. Pauw, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1729-1736.
- [404] P. Travascio, Y. Li, D. Sen, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 505-517.
- [405] N. C. Veitch, *Phytochem.* **2004**, *65*, 249-259.
- [406] A. A. Gungor, *Asian J. Chem.* **2011**, *23*, 3710-3712.
- [407] A. M. Azevedo, V. C. Martins, D. M. F. Prazeres, V. Vojinović, J. M. S. Cabral, L. P. Fonseca, in *Biotechnol. Ann. Rev., Vol. Volume 9*, Elsevier, **2003**, pp. 199-247.
- [408] G. S. Zakharova, I. V. Uporov, V. I. Tishkov, *Biochemistry. Biokhimiia* **2011**, *76*, 1391-1401.
- [409] Y. Li, D. Sen, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5589-5599.
- [410] Y. Li, D. Sen, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 1-12.
- [411] P. Travascio, A. J. Bennet, D. Y. Wang, D. Sen, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 779-787.
- [412] Y. He, Y. Tian, C. Mao, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 238-240.
- [413] D.-M. Kong, L.-L. Cai, J.-H. Guo, J. Wu, H.-X. Shen, *Biopolymers* **2009**, *91*, 331-339.
- [414] D.-M. Kong, W. Yang, J. Wu, C.-X. Li, H.-X. Shen, *Analyst* **2010**, *135*, 321-326.
- [415] L. C. H. Poon, S. P. Methot, W. Morabi-Pazooki, F. Pio, A. J. Bennet, D. Sen, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1877-1884.
- [416] J. Xu, J. Wu, C. Zong, H. Ju, F. Yan, *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 3374-3379.
- [417] D. Sen, C. R. Geyer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 680-687.
- [418] D. Sen, L. C. H. Poon, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2011**, *46*, 478-492.
- [419] P. Travascio, P. K. Witting, A. G. Mauk, D. Sen, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1337-1348.
- [420] I. Ourliac-Garnier, M.-A. Elizondo-Riojas, S. Redon, N. P. Farrell, S. Bombard, *Biochemistry* **2005**, *44*, 10620-10634.
- [421] L. Stefan, F. Denat, D. Monchaud, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 8759-8772.
- [422] T. Li, E. Wang, S. Dong, *Chem. Commun.* **2009**, 580-582.
- [423] H. Sun, X. Li, Y. Li, L. Fan, H.-B. Kraatz, *Analyst* **2013**, *138*, 856-862.
- [424] X. Yang, T. Li, B. Li, E. Wang, *Analyst* **2010**, *135*, 71-75.
- [425] D.-M. Kong, L.-L. Cai, H.-X. Shen, *Analyst* **2010**, *135*, 1253-1258.
- [426] X.-H. Zhou, D.-M. Kong, H.-X. Shen, *Anal. Chim. Acta* **2010**, *678*, 124-127.
- [427] X.-H. Zhou, D.-M. Kong, H.-X. Shen, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 789-793.
- [428] F. Wang, R. Orbach, I. Willner, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 16030-16036.
- [429] L. Zhang, J. Zhu, J. Ai, Z. Zhou, X. Jia, E. Wang, *Biosensors Bioelectron.* **2013**, *39*, 268-273.
- [430] S.-M. Jia, X.-F. Liu, P. Li, D.-M. Kong, H.-X. Shen, *Biosensors Bioelectron.* **2011**, *27*, 148-152.
- [431] T. Li, S. Dong, E. Wang, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2144-2149.
- [432] Y.-W. Lin, C.-W. Liu, H.-T. Chang, *Talanta* **2011**, *84*, 324-329.
- [433] Z. Zhang, J. Yin, Z. Wu, R. Yu, *Anal. Chim. Acta* **2013**, *762*, 47-53.
- [434] J. Elbaz, B. Shlyahovsky, I. Willner, *Chem. Commun.* **2008**, 1569-1571.
- [435] H.-Z. He, K.-H. Leung, H. Yang, D. Shiu-Hin Chan, C.-H. Leung, J. Zhou, A. Bourdoncle, J.-L. Mergny, D.-L. Ma, *Biosensors Bioelectron.* **2013**, *41*, 871-874.
- [436] T. Lan, K. Furuya, Y. Lu, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3896-3898.
- [437] C.-L. Li, K.-T. Liu, Y.-W. Lin, H.-T. Chang, *Anal. Chem.* **2010**, *83*, 225-230.
- [438] T. Li, S. Dong, E. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13156-13157.
- [439] T. Li, E. Wang, S. Dong, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1515-1520.
- [440] Z. Lin, X. Li, H.-B. Kraatz, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6896-6901.
- [441] G. Pelossof, R. Tel-Vered, I. Willner, *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3703-3709.

- [442] X. Yang, J. Xu, X. Tang, H. Liu, D. Tian, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 3107-3109.
- [443] C. Yang, V. Lates, B. Prieto-Simon, J.-L. Marty, X. Yang, *Biosensors Bioelectron.* **2012**, 32, 208-212.
- [444] H. Bo, C. Wang, Q. Gao, H. Qi, C. Zhang, *Talanta* **2013**, 108, 131-135.
- [445] D. Li, B. Shlyahovsky, J. Elbaz, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 5804-5805.
- [446] T. Li, E. Wang, S. Dong, *Chem. Commun.* **2008**, 3654-3656.
- [447] Y. Zhang, B. Li, Y. Jin, *Analyst* **2011**, 136, 3268-3273.
- [448] J. Zhang, Y. Chai, R. Yuan, Y. Yuan, L. Bai, S. Xie, L. Jiang, *Analyst* **2013**, 138, 4558-4564.
- [449] R. Freeman, J. Girsh, A. Fang-ju Jou, J.-a. A. Ho, T. Hug, J. Dervede, I. Willner, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 6192-6198.
- [450] Z. Ye, W. Zhang, L. Liu, G. Chen, Z. Shen, N. Zhou, *Biosensors Bioelectron.* **2013**, 46, 108-112.
- [451] Y. Weizmann, M. K. Beissenhirtz, Z. Cheglakov, R. Nowarski, M. Kotler, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7384-7388.
- [452] S. Nakayama, H. O. Sintim, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 10320-10333.
- [453] Y. Weizmann, Z. Cheglakov, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17224-17225.
- [454] B. Qiu, Z.-Z. Zheng, Y.-J. Lu, Z.-Y. Lin, K.-Y. Wong, G.-N. Chen, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 1437-1439.
- [455] X. Meng, Y. Zhou, Q. Liang, X. Qu, Q. Yang, H. Yin, S. Ai, *Analyst* **2013**, 138, 3409-3415.
- [456] T. Tian, H. Xiao, Z. Zhang, Y. Long, S. Peng, S. Wang, X. Zhou, S. Liu, X. Zhou, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 92-95.
- [457] X.-P. Wang, B.-C. Yin, P. Wang, B.-C. Ye, *Biosensors Bioelectron.* **2013**, 42, 131-135.
- [458] H.-Z. He, V. Pui-Yan Ma, K.-H. Leung, D. Shiu-Hin Chan, H. Yang, Z. Cheng, C.-H. Leung, D.-L. Ma, *Analyst* **2012**, 137, 1538-1540.
- [459] F. Liu, J. Zhang, R. Chen, L. Chen, L. Deng, *Chem. Biodivers.* **2011**, 8, 311-316.
- [460] M. Deng, D. Zhang, Y. Zhou, X. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13095-13102.
- [461] I. Willner, Z. Cheglakov, Y. Weizmann, E. Sharon, *Analyst* **2008**, 133, 923-927.
- [462] W. Li, Z. Liu, H. Lin, Z. Nie, J. Chen, X. Xu, S. Yao, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 1935-1941.
- [463] R. Li, C. Xiong, Z. Xiao, L. Ling, *Anal. Chim. Acta* **2012**, 724, 80-85.
- [464] E. Golub, A. Niazov, R. Freeman, M. Zatsepin, I. Willner, *J. Phys. Chem. C* **2012**, 116, 13827-13834.
- [465] Y. Li, X. Li, X. Ji, X. Li, *Biosensors Bioelectron.* **2011**, 26, 4095-4098.
- [466] V. Pavlov, Y. Xiao, R. Gill, A. Dishon, M. Kotler, I. Willner, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2152-2156.
- [467] Y. Xiao, V. Pavlov, R. Gill, T. Bourenko, I. Willner, *ChemBioChem* **2004**, 5, 374-379.
- [468] J. Zhou, W. Lai, J. Zhuang, J. Tang, D. Tang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 2773-2781.
- [469] C. Zong, J. Wu, J. Xu, H. Ju, F. Yan, *Biosensors Bioelectron.* **2013**, 43, 372-378.
- [470] D. Thirstrup, G. S. Baird, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 2498-2504.
- [471] L. Fu, B. Li, Y. Zhang, *Anal. Biochem.* **2012**, 421, 198-202.
- [472] D.-M. Kong, J. Wu, Y.-E. Ma, H.-X. Shen, *Analyst* **2008**, 133, 1158-1160.
- [473] Y. Qiao, J. Deng, Y. Jin, G. Chen, L. Wang, *Analyst* **2012**, 137, 1663-1668.
- [474] B. Shlyahovsky, Y. Li, O. Lioubashevski, J. Elbaz, I. Willner, *ACS Nano* **2009**, 3, 1831-1843.
- [475] M. Zhou, F. Kuralay, J. R. Windmiller, J. Wang, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3815-3817.
- [476] J. Zhu, T. Li, L. Zhang, S. Dong, E. Wang, *Biomaterials* **2011**, 32, 7318-7324.
- [477] T. Li, E. Wang, S. Dong, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15082-15083.
- [478] R. E. Childs, W. G. Bardsley, *Biochem. J.* **1975**, 93.
- [479] E. N. Kadnikova, N. M. Kostic, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 18, 39-48.
- [480] P. D. Josephy, T. Eling, R. P. Mason, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 3669-3675.

- [481] B. Li, Y. Du, T. Li, S. Dong, *Anal. Chim. Acta* **2009**, *651*, 234-240.
- [482] L. A. Marquez, H. B. Dunford, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9349-9355.
- [483] H. Yaku, T. Murashima, D. Miyoshi, N. Sugimoto, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5740-5742.
- [484] G. Labat, J.-L. Seris, B. Meunier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 1471-1473.
- [485] G. Lente, J. H. Espenson, *New J. Chem.* **2004**, *28*, 847-852.
- [486] G. Lente, J. H. Espenson, *Int. J. Chem. Kinet.* **2004**, *36*, 449-455.
- [487] J. Kosman, B. Juskowiak, *Cent. Eur. J. Chem.* **2012**, *10*, 368-372.
- [488] S. Nakayama, H. O. Sintim, *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 95-97.
- [489] Y. Cai, N. Li, D.-M. Kong, H.-X. Shen, *Biosensors Bioelectron.* **2013**, *49*, 312-317.
- [490] D.-M. Kong, J. Xu, H.-X. Shen, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6148-6153.
- [491] X. Yang, C. Fang, H. Mei, T. Chang, Z. Cao, D. Shangguan, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 14475-14484.
- [492] W. Jantschko, P. Georg Furtmüller, M. Zederbauer, M. Lanz, C. Jakopitsch, C. Obinger, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *312*, 292-298.
- [493] P. Jones, H. B. Dunford, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2292-2298.
- [494] P. D. Boyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2296-2307.
- [495] J. C. Skou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2320-2328.
- [496] J. E. Walker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2308-2319.
- [497] W. Buckel, M. Hetzel, J. Kim, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 462-467.
- [498] I. V. Kurnikov, A. K. Charnley, D. N. Beratan, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 5359-5367.
- [499] R. G. Yount, D. Babcock, W. Ballantyne, D. Ojala, *Biochemistry* **1971**, *10*, 2484-2489.
- [500] S.-M. Jia, X.-F. Liu, D.-M. Kong, H.-X. Shen, *Biosensors Bioelectron.* **2012**, *35*, 407-412.
- [501] Y. Tian, Y. He, C. Mao, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1862-1864.
- [502] F. Wang, B. Willner, I. Willner, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 562-574.
- [503] D. Koirala, T. Mashimo, Y. Sannohe, Z. Yu, H. Mao, H. Sugiyama, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 2006-2008.
- [504] L. Bauer, K. Tluczkova, P. Tothova, V. Viglasky, *Biochemistry* **2011**, *50*, 7484-7492.

## VALORISATION

### SCIENTIFIC PUBLICATIONS

**13** - “Benefits, shortcomings and challenges of surface-immobilized DNAzyme-type biocatalysis”, L. Stefan, T. Lavergne, N. Spinelli, E. Defrancq, D. Monchaud, *submitted*.

**12** - “Porphyrin-based design of bioinspired multitarget quadruplex ligand”, A. Laguerre, L. Stefan, D. Genest, P. Richard, C. P. Gros, N. Desbois, D. Monchaud, *submitted*.

**11** - “Development of caffeine-based gold(I) N-heterocyclic carbenes as possible anticancer agents: synthesis, biological properties and interactions with G-quadruplex structures”, B. Bertrand, L. Stefan, M. Pirrotta, D. Monchaud, E. Bodio, P. Richard, P. Le Gendre, M. H. de Jager, G. M. M. Groothuis, M. Picquet, A. Casini, *submitted*.

**10** - “Multitasking water-soluble synthetic G-quartets”, R. Haudecoeur, L. Stefan, D. Monchaud, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 12739.

**9** - “Closer to nature: a ATP-dependent bioinspired catalytic oxidation process”, L. Stefan, D. Duret, N. Spinelli, E. Defrancq, D. Monchaud, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 1500.

**8** - “A model of smart G-quadruplex ligand”, R. Haudecoeur, L. Stefan, F. Denat, D. Monchaud, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 550; recommended by the “faculty of 1000”.

**7** - “Assessing the differential affinity of small molecules for noncanonical DNA structures”, L. Stefan, B. Bertrand, P. Richard, P. Le Gendre, F. Denat, M. Picquet, D. Monchaud, *ChemBioChem*, **2012**, *13*, 1905.

**6** - “Insights into how nucleoside supplements enhance the peroxidase-mimicking DNAzyme activity of the G-quadruplex/hemin system”, L. Stefan, F. Denat, D. Monchaud, *Nucleic Acids Res.*, **2012**, *40*, 8759.

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

**4** - “Identifying three-way DNA junction-specific small-molecules”, S. Vuong, L. Stefan, P. Lejault, Y. Rousselin, F. Denat, D. Monchaud, *Biochimie*, **2012**, *94*, 442.

**3** - “Deciphering the DNAzyme activity of multimeric quadruplexes: insights into their actual role in the telomerase activity evaluation assay”, L. Stefan, F. Denat, D. Monchaud, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 20405.

2 - “*Harnessing nature’s insights: synthetic small molecules with peroxidase-mimicking DNAzyme properties*”, L. Stefan, H.-J. Xu, C. P. Gros, F. Denat, D. Monchaud, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 10857.

1 - “*DOTASQ as a prototype of nature-inspired G-quadruplex ligand*”, L. Stefan, A. Guédin, S. Amrane, N. Smith, F. Denat, J.-L. Mergny, D. Monchaud, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 4992.

### **POSTERS**

11 - “*<sup>PNA</sup>DOTASQ as a model of multitasking intramolecular synthetic G-quartet*”, L. Stefan, R. Haudecoeur, F. Denat, D. Monchaud, 246th ACS National Meeting & Exposition, **Indianapolis**, United States of America, September **2013**.

10 - “*New gold(I) N-heterocyclic carbene complexes as anticancer agents : synthesis and biological applications*”, B. Bertrand, M. Picquet, L. Stefan, D. Monchaud, E. Bodio, P. Richard, P. Le Gendre, G. M. M. Groothuis, A. Casini, 11th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EUROBIC11), **Granada**, Spain, September **2012**.

9 - “*Multitasking water-soluble G-quartet*”, L. Stefan, R. Haudecoeur, M. Levillain, F. Denat, D. Monchaud, 4th Gpol meeting (Study group in chemistry of cyclic and linear polyamines), **Toulouse**, France, July **2012**.

8 - “*Using water-soluble synthetic G-quartet*”, L. Stefan, 13<sup>th</sup> meeting of the Carnot and Pasteur doctoral school, **Dijon**, France, May **2012**.

7 - “*Deciphering the DNAzyme activity of multimeric quadruplexes: insights into their actual role in the telomerase activity evaluation assay*”, L. Stefan, S. Vuong, F. Denat, D. Monchaud, Artzyme congress, **Marseille**, France, September **2011**.

6 - “*Harnessing nature’s insights: synthetic small-molecules with peroxidase-mimicking DNAzyme properties*”, L. Stefan, S. Vuong, F. Denat, D. Monchaud, Artzyme congress, **Marseille**, France, September **2011**.

5 - “*Turning peroxidase-mimicking DNAzyme into a fully synthetic process*”, L. Stefan, S. Vuong, H.-J. Xu, C. P. Gros, F. Denat, D. Monchaud, Third International Meeting on G-quadruplex and G-assembly, **Sorrento**, Italy, June **2011**.

4 - “*DOTASQ as a prototype of nature inspired G-quadruplex ligand*”, L. Stefan, A. Guédin, S. Amrane, N. Smith, F. Denat, J.-L. Mergny, D. Monchaud, Third International Meeting on G-quadruplex and G-assembly, **Sorrento**, Italy, June **2011**.

3 - “*Turning peroxidase-mimicking DNAzyme into a fully synthetic process*”, L. Stefan, H.-J. Xu, C. P. Gros, F. Denat, D. Monchaud, 12<sup>th</sup> meeting of the Carnot and Pasteur doctoral school, **Dijon**, France, May **2011**.

2 - “*Noncanonical DNA structures as therapeutic targets*”, L. Stefan, S. Vuong, F. Denat, D. Monchaud, Scientific conference IFR100 “Santé-STIC” (Federation of life science and health laboratory in the Bourgogne), **Dijon**, France, March **2011**.

1 - “*Targeting telomeric G-quadruplexes for a tumoro-specific diagnosis*”, L. Stefan, A. Guédin, F. Denat, J.-L. Mergny, D. Monchaud, 3<sup>rd</sup> Gpol meeting (Study group in chemistry of cyclic and linear polyamines), **Orléans**, France, June **2010**.

### **ORAL PRESENTATIONS**

3 - “*Development of bioinspired G-quadruplex ligands: from DOTASQ to <sup>PNA</sup>DOTASQ*”, 14<sup>th</sup> meeting of the Carnot and Pasteur doctoral school, **Dijon**, France, May **2013**. *Best oral presentation award*.

2 - “*<sup>PNA</sup>DOTASQ as a model of smart G-quadruplex ligand*”, 20<sup>th</sup> young research fellow meeting of the chemical therapeutic society (SCF), **Biocitech – Romainville**, France, February **2013**. *Best oral presentation award*.

3 - “*Deciphering the DNazyme activity of multimeric quadruplexes*”, research network GDR-Quadruplexes meeting, **Bordeaux**, France, January **2012**.





## Résumé

Parmi les nombreux assemblages supramoléculaires utilisés par la Nature, l'ADN est un bel exemple d'architecture complexe et polymorphique qui selon les conditions peut revêtir une forme de double hélice, de triplex, de jonction à trois ou quatre voies, de *i-motif* ou encore de quadruplexe. Formés à partir de brins riches en guanines, les quadruplexes résultent de l'empilement de tétrades de guanines constituées chacune par l'auto-assemblage dans un même plan de quatre guanines, stabilisées entre elles par un réseau de liaisons hydrogènes.

En s'inspirant de cet édifice naturel, il est présenté au long de ce manuscrit de thèse la synthèse et l'étude de molécules de type **TASQ** (pour *template-assembled synthetic G-quartet*) hydrosolubles capables de former de manière intramoléculaire une tétrade de guanines synthétique : les **DOTASQ**, le **PorphySQ** et le <sup>PNA</sup>**DOTASQ**.

La première application développée pour ces composés est le **ciblage des quadruplexes d'ADN et d'ARN** présents dans des régions clés du génome (télomères, promoteurs d'oncogènes) et du transcriptome (régions 5'-UTR et TERRA) et dont la stabilisation par un ligand pourrait ouvrir de nouvelles perspectives en terme de thérapie antitumorale ciblée. Les résultats *in vitro* sont présentés et permettent de démontrer que les TASQ hydrosolubles développés sont des composés offrant une bonne sélectivité pour les quadruplexes mais surtout une excellente sélectivité grâce à un mode d'action bioinspiré basé sur une reconnaissance biomimétique.

La seconde application mise au point est l'utilisation des TASQ comme **catalyseurs pour des réactions de peroxydation** : leur architecture même leur permet de mimer l'activité catalytique de l'ADN (ou **DNAzyme**) ainsi que celle de protéines (enzyme) comme la *horseradish peroxidase*. Ce processus est dépendant de la formation intramoléculaire de la tétrade de guanines synthétique et ouvre de nombreuses perspectives en terme d'utilisation en biologie ainsi qu'en nanotechnologie.

**Mots-clés** : *biocatalyse, chimie supramoléculaire, conception biomimétique, DNAzyme, G-quadruplexe, hemin, smart-ligand, structures non-usuelles d'ADN, TASQ, tétrade de guanines.*

---

## Abstract

Natural G-quartets, a cyclic and coplanar array of four guanine residues held together *via* Hoogsteen H-bond network, have recently received much attention due to their involvement in G-quadruplex-DNA, an alternative higher-order DNA structure strongly suspected to play important roles in key cellular events (chromosomal stability, regulation of gene expression). Besides this, synthetic G-quartets, which artificially mimic native G-quartets, have also been widely studied for their involvement in nanotechnological applications (*i.e.* nanowires, artificial ion channels, etc.). In contrast, intramolecular synthetic G-quartets, also named **template-assembled synthetic G-quartet** (TASQ), have been more sparingly investigated, despite a technological potential just as interesting.

In this way, we designed and synthesized three series of innovative hydrosoluble TASQ: **DOTASQ** (for DOTA-Templated Synthetic G-Quartet), **PorphySQ** (containing a porphyrin *template*) and the most effective <sup>PNA</sup>**DOTASQ** where PNA-guanine arms replace native DOTASQ alkyl-guanine arms. We report herein the results of both DNA and RNA interactions (notably their selective recognition of quadruplex-DNA according to a bioinspired process) and **peroxidase-like hemin-mediated catalytic activities** (either in an autonomous fashion as precatalysts for **TASQzyme** reactions, or in conjunction with quadruplex-DNA as enhancing agents for **DNAzyme** processes). These results provide a solid scientific basis for TASQ to be used as multitasking tools for bionanotechnological applications.

**Keywords** : *biocatalysis, biomimetics, DNAzyme, G-quadruplex, G-quartet, hemin, non-canonical DNA structures, smart-ligand, supramolecular chemistry, TASQ.*