

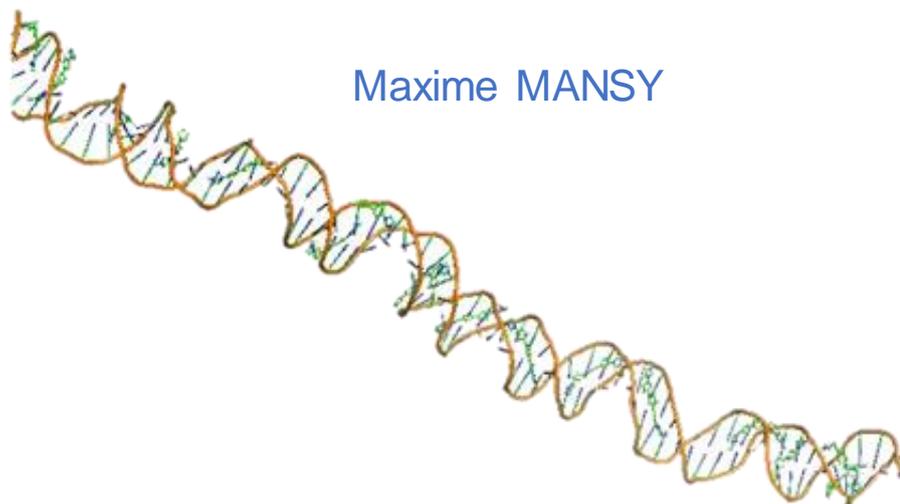
---

# PROPRIÉTÉS CHIROPTIQUES ET MORPHOLOGIE D'ASSEMBLAGES SUPRAMOLÉCULAIRES ADN/OLIGOTHIOPHÈNE CATIONIQUE

---

Service de Chimie des Matériaux Nouveaux  
Service d'Interfaces et Fluides Complexes

Maxime MANSY



Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Master en Sciences  
chimiques, finalité approfondie

Promoteur : Prof. Mathieu SURIN

Co-promoteur : Prof. Sylvain GABRIELE

ANNÉE ACADÉMIQUE 2022-2023



# Remerciements

Cette dernière année d'étude fut pour moi enrichissante d'un point de vue humain et scientifique. Ce fut également une période qui m'a permis de découvrir d'autres facettes de moi-même.

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à l'aide et au soutien de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Dans un premier temps, je tiens à adresser mes remerciements au professeur Roberto Lazzaroni pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Chimie des Matériaux Nouveaux (CMN).

Je remercie particulièrement mon promoteur, le professeur Mathieu Surin ainsi que mon co-promoteur, le professeur Sylvain Gabriele, d'avoir cru en moi en me donnant l'opportunité de réaliser un travail de recherche. Je vous remercie pour vos précieux conseils tout au long de cette année et votre bienveillance.

Je tiens à adresser toute ma gratitude au personnel du CMN pour l'ambiance chaleureuse pendant ces quelques mois.

J'adresse mes sincères remerciements à David Delleme et Alexandre Remson qui ont su me guider, me conseiller et m'épauler tout au long de ce mémoire. Merci David pour avoir eu la patience de répondre à mes innombrables questions.

Je tiens à adresser mes remerciements à Sébastien Clément et à son équipe pour la synthèse du terthiophène (T3Im) utilisé durant ce mémoire ainsi que pour l'accueil chaleureux qui m'a été réservé durant mon stage à l'institut Charles Gerhardt à l'Université de Montpellier (ICGM). Je tiens à remercier particulièrement le docteur Hisham Idriss pour son encadrement et sa disponibilité durant ce séjour. Je n'oublierai pas les bons moments partagés autour d'un bon café. Merci également à Samira, Amina et toute l'équipe pour leur aide. Merci à Aurélie Ancelin pour les analyses de cryo-TEM.

Je remercie le Professeur Roger Olsson et son équipe de l'Université de Lund en Suède pour la synthèse du second terthiophène (ETE.TMA).

Un petit clin d'œil à Julien, à Komivi et à Ari pour les bons moments passés ensemble et nos parties de rigolades.

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille pour les encouragements dans les moments difficiles. Merci à mes parents pour leur disponibilité, leur patience, leur encouragement et leur précieux conseils pendant mon parcours universitaire et pour le suivi lors de la rédaction de ce mémoire.

Pour terminer, je tiens à remercier ma sœur jumelle pour ses encouragements et pour nos délires pendant les périodes de blocus.

# Résumé

Les biocapteurs sont intéressants pour le diagnostic médical, la sécurité alimentaire, la détection des contaminants dans l'environnement et dans bien d'autres domaines. Ces dernières années, les biocapteurs d'ADN ont fait l'objet d'une grande attention en raison de la nécessité de développer des méthodes de détection rapides, simples, sensibles et spécifiques dans le domaine biomédical.

Dans le cadre de ce mémoire, la stratégie suivie pour le développement de biocapteurs optiques à ADN repose sur l'auto-assemblage supramoléculaire entre l'ADN et des oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques. Les oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques sont constitués d'un squelette  $\pi$ -conjugué à base de thiophène avec des substituants cationiques qui peuvent se lier à l'ADN par le biais d'interactions électrostatiques. Ces oligomères cationiques sont des candidats intéressants pour la détection de (macro)molécules biologiques telle que l'ADN car ils combinent solubilité en solution aqueuse, une conception sur mesure de la chaîne principale et des fonctionnalités ioniques pour parvenir à une reconnaissance moléculaire ciblée ainsi qu'une réponse optique sensible à des perturbations mineures qui peuvent affecter leur conformation, telles que les interactions avec une biomacromolécule.

La première partie du mémoire consiste à étudier les complexes supramoléculaires oligothiophène  $\pi$ -conjugué cationique/ADN double brin en solution aqueuse par spectroscopie chiroptique (absorption UV-Vis, dichroïsme circulaire, fluorescence). Les interactions entre l'ADN chiral et les oligothiophènes achiraux mènent à des modifications de leurs propriétés chiroptiques. En particulier, nous évaluerons l'effet de la longueur d'ADN, du rapport oligomère/ADN et de la nature des substituants cationiques sur les signaux chiroptiques. En outre, l'affinité des complexes oligothiophène/ADN a été estimée par une méthode spectroscopique de compétition.

La deuxième partie du mémoire consiste à caractériser la morphologie des dépôts minces d'assemblages oligothiophène/ADN sur une surface par microscopie à force atomique et dans leur état hydraté par cryo-microscopie électronique à transmission.

# Table des matières

I.	Introduction.....	1
I.1	Les oligo- et poly-électrolytes $\pi$ -conjugués pour la biodétection.....	1
I.2	ADN.....	4
I.2.1	Découverte de la structure de l'ADN.....	4
I.2.2	Structure et propriétés de l'ADN.....	5
I.3	Biosenseur d'ADN.....	10
I.4	Objectif du mémoire.....	19
II.	Méthodologie.....	20
II.1	Aspects théoriques.....	20
II.1.1	Spectroscopie optique.....	20
	• Spectroscopie d'absorption ultraviolet-visible.....	21
	• Spectroscopie de fluorescence.....	22
	• Spectroscopie de dichroïsme circulaire.....	24
II.1.2	Microscopie.....	27
	• Microscopie à force atomique.....	27
	• Microscopie électronique à transmission et cryo-microscopie électronique à transmission.....	32
II.2	Aspects pratiques.....	36
II.2.1	Préparation des échantillons.....	36
II.2.2	Spectroscopie chiroptique.....	37
II.2.3	Microscopie.....	38
III.	Résultats et discussion.....	40
III.1	Oligothiophènes $\pi$ -conjugués cationiques et ADN double brin étudiés.....	40
III.2	Propriétés chiroptiques des assemblages oligothiophène $\pi$ -conjugué cationique/ADN.....	41
III.2.1	Estimation des coefficients d'extinction molaire par spectroscopie UV-Vis.....	42
III.2.2	Titration spectroscopique.....	43
	• Titration spectroscopique de stDNA par T3Im.....	44
	• Titration spectroscopique de T3Im par stDNA.....	48
	• Titration spectroscopique de htDNA par T3Im.....	50
	• Titration spectroscopique de T3Im par htDNA.....	53
	• Titration de fluorescence de T3Im par stDNA.....	56
	• Titration spectroscopie de ETE.TMA par stDNA.....	59
	• Titration spectroscopique de ETE.TMA par htDNA.....	62

• Comparaison entre les titrages spectroscopiques.....	64
III.3 Estimation de la constante d'association des complexes oligothiophène $\pi$ -conjugué cationique/DNA.....	66
III.3.1 Fluorescence des complexes DAPI/ADN .....	68
III.3.2 Estimation de la constante d'association des complexes T3Im/dsDNA .....	69
III.3.3 Estimation de la constante d'association des complexes ETE.TMA/dsDNA.....	71
III.4 Morphologie d'assemblages supramoléculaires oligothiophène $\pi$ -conjugué cationique /DNA	74
III.4.1 Microscopie à force atomique .....	74
• Morphologie des oligothiophènes $\pi$ -conjugués cationiques purs.....	74
• Morphologie des ADN double brin .....	75
• Morphologie des assemblages T3Im/stDNA et T3Im/htDNA.....	76
• Morphologie des assemblages ETE.TMA/stDNA et ETE.TMA/htDNA.....	79
III.4.2 Cryo-microscopie électronique à transmission .....	80
• Morphologie microscopique de T3Im.....	80
• Morphologie microscopique des complexes T3Im/stDNA et T3Im/htDNA.....	81
IV. Conclusion et perspectives .....	83
V. Annexes.....	86
VI. Bibliographie.....	89

# I. Introduction

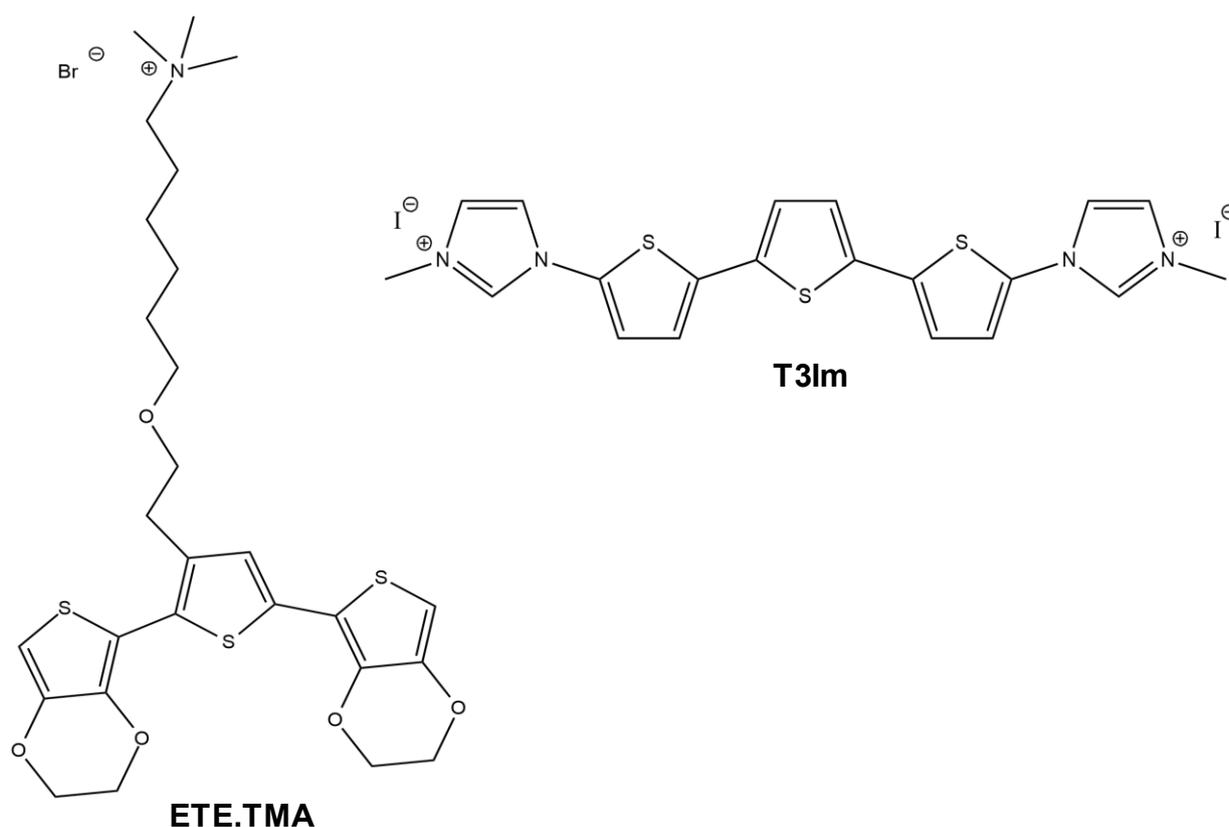
---

## I.1 Les oligo- et poly-électrolytes $\pi$ -conjugués pour la biodétection

Les oligo- et poly-électrolytes  $\pi$ -conjugués (CPEs) constituent une large classe de matériaux conjugués qui suscitent un vif intérêt dans des domaines très variés, allant de l'électronique organique et moléculaire au biomédical. Les CPEs sont envisagés en tant que composants dans de nombreuses applications comme les diodes émettrices de lumière (OLEDs), les transistors électrochimiques (OECTs), les dispositifs photovoltaïques, les senseurs chimiques et biologiques ou encore l'imagerie en raison de leurs propriétés uniques. En effet, ils allient les propriétés optiques et électroniques des polymères conjugués avec les caractéristiques physico-chimiques des polyélectrolytes.[1-6] Leur structure moléculaire est composée d'un squelette  $\pi$ -conjugué et de ramifications avec des groupements ioniques. Selon la nature de la fonctionnalisation, trois types de CPEs peuvent être distingués : les polyélectrolytes conjugués cationiques, les polyélectrolytes conjugués anioniques et les polyélectrolytes conjugués zwitterioniques.[3]

Au sein de la famille des CPEs, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à de courts oligomères cationiques  $\pi$ -conjugués à base de thiophènes (Figure 1). Grâce à l'atome de soufre présent au sein du cycle, la structure des oligothiophènes est complètement conjuguée ce qui leur confère d'excellentes propriétés de transport de charges. La fonctionnalisation de la chaîne principale conjuguée par des groupements cationiques favorise la solubilité en solution aqueuse et leur confère la capacité d'interagir avec des espèces anioniques.[4,5,7] Pour des applications biologiques, notamment pour concevoir des systèmes de détection de biomolécules tels que l'ADN, l'ATP ou des protéines, la solubilité en milieu aqueux est un prérequis essentiel.[8] G. *Barbarella* et son groupe ont montré que la taille et le type de fonctionnalisation des oligothiophènes pouvaient être modifiés afin qu'ils absorbent et émettent de la lumière dans l'entièreté de la gamme du visible.[9] La possibilité de moduler finement leurs propriétés structurales et optoélectroniques, notamment pour atteindre une reconnaissance (bio)moléculaire ciblée, par un design de la chaîne principale et des

fonctionnalités ioniques sont attrayantes pour des applications de détection biologique.[3,4,9] De plus, une des particularités des oligo- et poly-thiophènes conjugués est la sensibilité structurale de leurs propriétés (chir)optiques à des modifications de leur microenvironnement comme le pH, la température, la force ionique ou lorsqu'ils interagissent avec une (bio)molécule cible (ADN, ATP, protéines). De telles perturbations affectent la conformation des oligomères et donc leurs propriétés optiques. Par exemple, l'interaction entre un analyte et un oligothiophène via des interactions supramoléculaires perturbe la conformation de la chaîne principale de l'oligomère. Ce réarrangement conformationnel mène à des modifications des propriétés optiques (changement dans les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission) de l'oligomère lui-même.[3,7,10,11] Ces effets conformationnels peuvent être suivis par des méthodes spectroscopiques (absorption UV-Vis, fluorescence ou dichroïsme circulaire). L'ensemble de ces propriétés optiques et de ces caractéristiques structurales et physico-chimiques en font d'excellents candidats pour la conception de (bio)senseurs optiques.



**Figure 1:** Structures chimiques des oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques étudiés.

Dans le cadre de ce mémoire, deux dérivés d'oligothiophène conjugué cationique ont été étudiés : un terthiophène cationique avec des groupements terminaux imidazolium (**T3Im**) et un terthiophène basé sur deux unités ethylènedioxythiophènes (EDOTs) et une unité thiophène centrale substituée par une chaîne alkyle-éther portant à son extrémité un groupement triméthylammonium (**ETE.TMA**). La structure chimique de ces deux composés est représentée en Figure 1.

**T3Im** a été synthétisé dans le laboratoire du Prof. Sébastien Clément, à l'Institut Charles Gerhard, Université de Montpellier (ICGM). **ETE.TMA** a été synthétisé dans le laboratoire du Prof. Roger Olsson à l'Université de Lund en Suède. Les substituants imidazolium et triméthylammonium ont été choisis car ces ions améliorent la solubilité en milieu aqueux de ces composés et leur confèrent la capacité d'interagir par des interactions électrostatiques avec le squelette phosphodiester anionique de l'ADN. Dans le cas de **T3Im**, les deux groupements cationiques imidazolium se situent aux deux extrémités du squelette terthiophène. Autrement dit, les substituants imidazolium sont conjugués avec le cœur terthiophène de l'oligomère. En revanche pour **ETE.TMA**, le groupement cationique triméthylammonium se situe à l'extrémité de la chaîne alkyle-éther latérale. **T3Im** présente deux charges positives tandis que **ETE.TMA** présente une charge positive. Des différences au niveau de la nature, de la localisation et du nombre de substituants cationiques peuvent influencer la conformation de l'oligomère au sein des complexes supramoléculaires ADN/oligothiophène et leurs propriétés chiroptiques.

Des études antérieures au sein du laboratoire de Chimie des Matériaux Nouveaux ont révélé qu'un signal de dichroïsme circulaire induit (ICD) a été observé pour des assemblages supramoléculaires polythiophène/ADN. Les polythiophènes conjugués (CPTs) utilisés ont été fonctionnalisés soit avec un groupement triméthylammonium, soit avec un groupement triméthylphosphonium (Figure 2).[12,13]

Le choix d'utiliser des oligomères plutôt que des polymères est motivé par différentes raisons. Contrairement aux polymères qui sont des échantillons polydisperses, les oligomères sont des échantillons monodisperses qui possèdent par conséquent des propriétés optiques (bande d'absorption et d'émission) mieux définies. Cet avantage permet de suivre les changements sur les spectres chiroptiques lors de l'interaction avec l'ADN, de manière plus fine. La caractérisation des interactions oligomère/ADN

est également plus simple que celle des interactions polymère/ADN puisque les polymères ont une plus grande diversité conformationnelle que les oligomères.

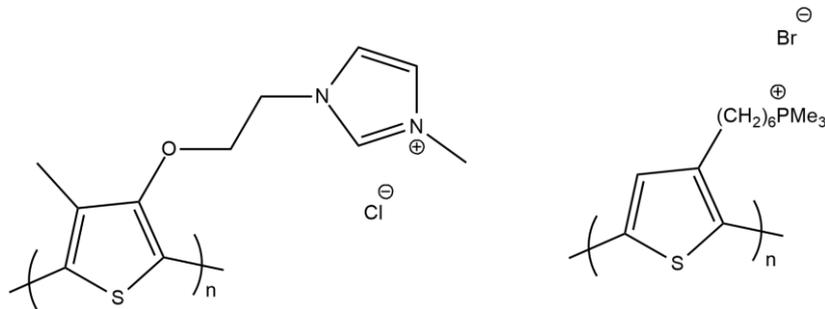


Figure 2: Structures chimiques de deux polythiophènes cationiques étudiés préalablement.[12,13]

## I.2 ADN

### I.2.1 Découverte de la structure de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique, plus connu sous son abréviation ADN, a été découvert en 1869 par le chercheur F. Miescher mais ce n'est que de nombreuses années plus tard que le rôle de l'ADN dans l'hérédité a été compris et que la structure caractéristique en double hélice de l'ADN a été découverte.[14,15] De la découverte de l'ADN à nos jours, de nombreux chercheurs ont contribué à la compréhension que nous avons aujourd'hui à son sujet.

En 1919, P. Levene détermina la composition chimique des nucléotides, les blocs de construction de l'ADN. Il suggéra que les nucléotides sont formés d'un sucre, d'une base et d'un groupement phosphate. L'ADN est donc un polymère de nucléotides. Cependant, il n'avait pas mis en évidence que l'ADN est le support de l'information génétique.[15]

En 1928, Les travaux de F. Griffith et plus tard, en 1944, les recherches de O. Avery et de ses collaborateurs ont démontré que l'ADN est la molécule qui stocke et transfère l'information génétique. Ces expériences ont mis en évidence le phénomène de « transformation » : des cellules bactériennes virulentes avec un phénotype donné ont

été converties en espèces non virulentes exprimant un autre phénotype et l'ADN est « l'agent transformant ».[14,15,16]

En 1950, E. Chargaff a établi deux règles universelles à propos de la composition en base azotée dans l'ADN [14,17] :

1. La proportion totale de base pyrimidique (Thymine (T) + Cytosine (C)) est égale à la proportion totale de base purique (Adénine (A) + Guanine (G)).
2. Le rapport A/T et G/C est généralement égal à 1 mais le rapport A+T/C+G varie selon l'espèce. Autrement dit, la composition de l'ADN diffère d'une espèce à l'autre renforçant ainsi l'idée que l'ADN puisse être porteuse de l'information génétique.

Une fois que la nature chimique de l'ADN a été déterminée et que son rôle dans l'hérédité était indéniable, de nombreux chercheurs ont tenté d'élucider la structure secondaire de l'ADN. En 1953, J. Watson et F. Crick ont proposé la structure en double hélice de l'ADN sur base des travaux de diffraction de rayons X de R. Franklin et M. Wilkins.[18] J. Watson, F. Crick et M. Wilkins ont reçu le prix Nobel de médecine en 1962 pour l'élucidation de la structure moléculaire de l'ADN.

## 1.2.2 Structure et propriétés de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique est une supramolécule centrale de la vie qui stocke et transfère l'information génétique.

L'ADN est constitué de deux macromolécules complémentaires maintenues ensemble par des interactions intermoléculaires.[19] L'unité monomérique d'une macromolécule s'appelle le nucléotide. Un nucléotide est constitué de trois composants : un groupement phosphate, une base hétérocyclique azotée et un désoxyribose. La base est liée au désoxyribose par un lien glycosidique et le désoxyribose est lié à un groupement phosphate par un lien phosphoester. L'ADN n'est constitué que de quatre nucléotides qui ne diffèrent que par la nature de la base azotée. On distingue ainsi deux types de bases : les bases puriques : adénine (A) et guanine (G) et les bases pyrimidiques : thymine (T) et cytosine (C).



spécifique des bases : chaque nucléobase d'un brin ne s'apparie qu'avec la nucléobase complémentaire du second brin. Ainsi, l'adénine et la thymine sont deux bases complémentaires qui s'apparient via deux ponts hydrogène alors que la cytosine et la guanine sont les deux autres bases complémentaires qui s'apparient via trois ponts hydrogène entre elles. Ce mode d'association spécifique, connu sous le nom d'« appariement de Watson-Crick », permet de maximiser les liens hydrogène entre les bases. L'ADN double brin a une structure hélicoïdale qui résulte de l'appariement de deux brins antiparallèles de séquence nucléotidique complémentaire.

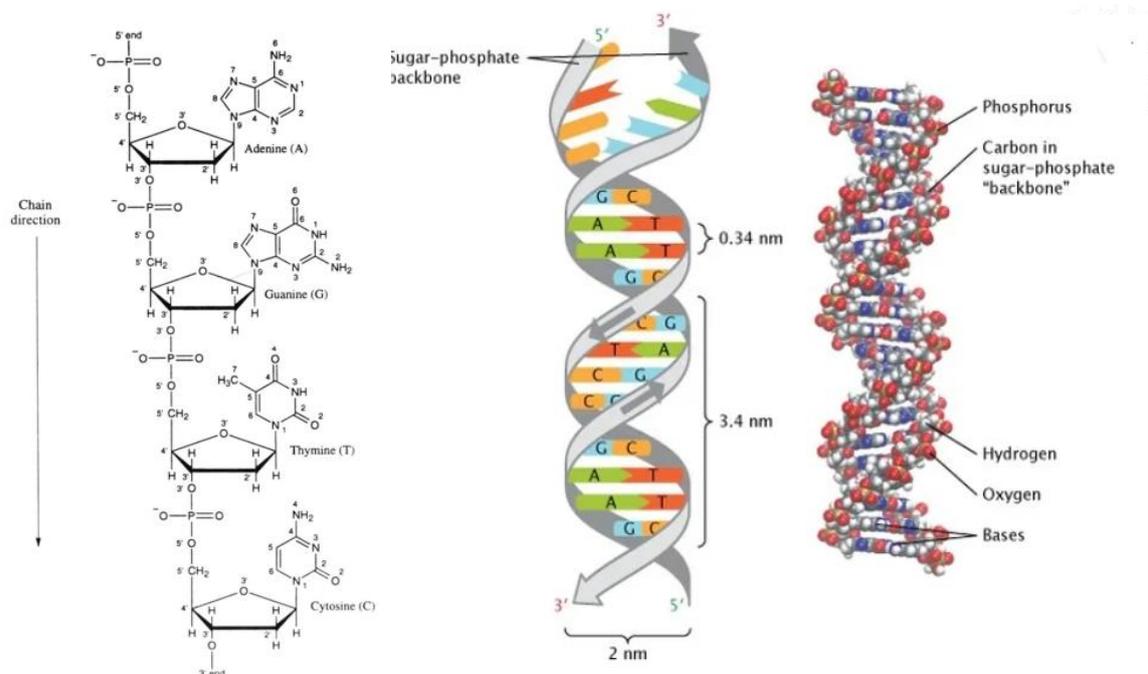


Figure 5 : Représentation de la structure de l'ADN monobrin (à gauche), de l'ADN double brin (au centre et à droite).[21,22]

L'ADN double brin de type B, forme la plus commune et prédominante in vivo, est une double hélice de pas droit. Cette structure est caractérisée par un diamètre d'environ 2 nm et un pas d'hélice de 3,4 nm comprenant 10 paires de bases par tour d'hélice. Les paires de bases voisines sont distantes d'environ 0,34 nm. L'axe des paires de bases est perpendiculaire par rapport à l'axe de l'hélice. L'empilement des bases au sein de la double hélice et les caractéristiques structurales des liens glycosidiques des brins appariés les font tourner autour de l'axe de l'hélice résultant en la formation de deux sillons de taille différente : un sillon majeur avec une largeur de 2,2 nm et un sillon mineur avec une largeur de 1,2 nm.[15,19,20]

Outre les interactions par ponts hydrogène, d'autres interactions intermoléculaires contribuent à la stabilisation de la structure en double hélice de l'ADN.[21] Les bases sont des structures planes, hydrophobes et  $\pi$ -conjuguées. Dans l'ADN monobrin et double brin, ces nucléobases ont tendance à s'empiler les uns sur les autres perpendiculairement à l'axe de la double hélice via des interactions de  $\pi$ -stacking. Le squelette phosphodiester de l'ADN est chargé négativement à pH physiologique, caractéristique essentielle pour conférer sa solubilité dans l'eau. En d'autres termes, les ADN sont des polyanions à pH physiologique. Dès lors, les ponts hydrogène stabilisent en partie cette structure mais ne sont pas suffisants. En réalité, la double hélice d'ADN est entourée de contre-ions, généralement des cations monovalents, qui établissent des interactions électrostatiques avec les groupements phosphates et assurent la stabilité de cette structure.

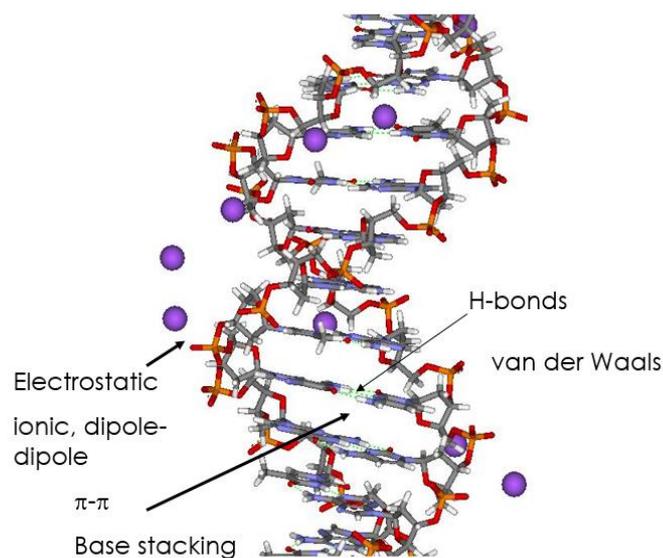
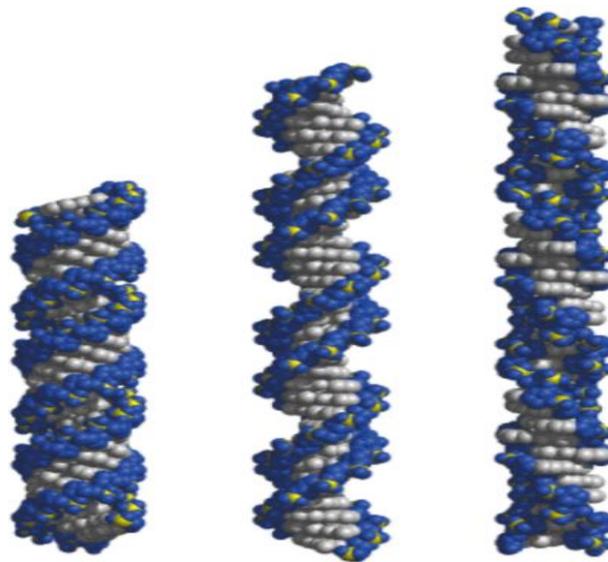


Figure 6 : Représentation des différentes interactions intermoléculaires dans l'ADN.[21]

La double hélice d'ADN n'a pas une structure unique, elle peut revêtir des structures très différentes en fonction de l'environnement et des conditions. En plus de la forme B, on distingue l'ADN de type A et l'ADN de type Z (Figure 7).[19-21]

L'ADN de type A adopte également une structure hélicoïdale de pas droit. Ce type de double hélice est caractérisé par un diamètre d'environ 2,6 nm et un pas d'hélice de 2,9 nm comprenant 11 paires de bases par tour d'hélice. Dans cette structure, l'axe des paires de bases est incliné par rapport à l'axe de l'hélice. La forme A de l'ADN

s'observe dans des conditions non physiologiques (milieu faiblement hydraté et/ou la salinité est élevée). L'ADN de type Z nécessite la présence d'une séquence alternant guanines et cytosines (dG-dC)<sub>n</sub>. Cette forme Z est une double hélice de pas gauche. Cette caractéristique résulte de l'orientation des bases au sein de la double hélice d'ADN. Les nucléobases peuvent adopter deux conformations différentes : une conformation syn- ou une conformation anti- car la liaison glycosidique est une liaison simple. Dans la forme B et A, l'ensemble des nucléobases adoptent une conformation anti-. Au contraire, dans la double hélice de type Z, les pyrimidines adoptent une conformation anti- et les purines adoptent une conformation en syn-. Ce système syn-anti des bases qui se répète régulièrement au sein de la structure de type Z engendre l'apparition d'une hélice de pas gauche. L'ADN de type Z possède un squelette hautement désorganisé en zig-zag caractérisé par un diamètre d'environ 1,8 nm et un pas d'hélice de 3,8 nm comprenant 12 paires de bases.[19-21]



*Figure 7 : Représentation de la forme A (à gauche), de la forme B (au milieu) et de la forme Z (à droite) de l'ADN.[14]*

Outre son rôle dans le stockage et le transfert de l'information génétique, rapidement après la découverte de la structure de l'ADN, cette supramolécule a été envisagée en tant que bloc de construction pour concevoir des nanomatériaux. *N. Seeman* a été un des pionniers dans la nanotechnologie d'ADN.[23-24] Le rôle de l'ADN en tant que bloc de construction pour concevoir des nanomatériaux en 1D, 2D et même en 3D par auto-assemblage est motivé par plusieurs avantages notamment :

- La disponibilité : les acides nucléiques sont facilement disponibles par des méthodes de synthèse contrôlées et automatisées.
- La précision et le contrôle : l'ADN offre un contrôle précis en termes de taille et de forme pour la conception de nanomatériaux.
- La stabilité chimique et la solubilité en solution aqueuse.
- La prédictibilité des interactions et des propriétés de reconnaissance moléculaire unique : la reconnaissance entre l'ADN et un ligand est assurée par le biais d'interactions intermoléculaires ce qui confère une affinité. L'ADN fournit de multiples modes de reconnaissance possibles pour les ligands : l'appariement des nucléobases, reconnaissance par liaison au sillon mineur ou au sillon majeur, reconnaissance par interaction avec le squelette phosphodiester anionique et reconnaissance par intercalation.

Pour toutes ces raisons, l'ADN est une matrice unique pour diriger et contrôler finement l'organisation de la matière au sein d'architecture souhaitée et programmable avec une précision nanométrique.[25-27]

Le processus d'auto-assemblage entre l'ADN et des ligands via des interactions non-covalentes conduit à la formation de systèmes supramoléculaires complexes et fonctionnels avec des propriétés uniques ayant un très grand intérêt pour de nombreuses applications comme la délivrance de gènes, l'imagerie médicale ou encore la biodétection, application qui sera expliquée plus en détail ci-après.[28-30]

### **I.3 Biosenseur d'ADN**

Les biosenseurs sont très attrayants pour le diagnostic médical, l'analyse génétique, la sécurité alimentaire, la détection de contaminants dans l'environnement et bien d'autres domaines.[31,32] En particulier, les biosenseurs à ADN ont fait l'objet d'une grande attention ces dernières années en raison de la nécessité de mettre au point des méthodes de détection rapides, simples, sensibles et spécifiques dans le domaine biomédical.[32] L'ADN est considéré comme une cible clé pour identifier/diagnostiquer

de manière précoce des maladies héréditaires, des cancers ou détecter des bactéries pathogènes. En ce sens, la détection de modifications génétiques ou épigénétiques anormales tels que le polymorphisme mononucléotidique (SNP), un taux de méthylation anormal de l'ADN ou d'autres lésions est un enjeu majeur puisque ces modifications peuvent être associées à un risque accru de contracter certaines maladies ou sont intimement liés à certaines pathologies.[3-34]

Le SNP correspond à la substitution d'un nucléotide par un autre nucléotide à une position spécifique au sein du génome d'individus d'une même espèce. Ces mutations représentent les variations génétiques les plus fréquemment rencontrées dans le génome humain. L'analyse des SNPs est particulièrement intéressante pour réaliser des études associatives de gènes ou pour identifier des prédispositions à certaines pathologies. En effet, certains SNPs, généralement ceux résidant dans les régions codantes du génome, peuvent provoquer certaines pathologies ou sont associés à diverses maladies.[3,34]

La méthylation de l'ADN correspond à l'addition d'un groupement méthyle sur certains nucléotides et est catalysée par une méthyltransférase. Dans l'immense majorité des cas, la nucléotide méthylé est la cytosine mais chez les bactéries, la méthylation peut également se dérouler sur l'adénosine. Le type de méthyltransférase varie selon l'espèce. La méthylation de l'ADN est une composante essentielle de la régulation épigénétique. L'hypométhylation et l'hyperméthylation sont intimement liées au développement et à la prolifération de cellules cancéreuses tumorales. Dès lors, La détection du taux de méthylation de l'ADN est une voie intéressante pour diagnostiquer et identifier de manière précoce certains cancers spécifiques (cancer du sein, colon).[3,34,35]

Un biosenseur est un dispositif analytique composé des éléments suivants.[31,32,36]

**Une unité de bio-reconnaissance** : un récepteur, généralement une molécule biologique qui détecte sélectivement et spécifiquement l'analyte.

**Une unité de signalisation** : un transducteur qui génère un signal mesurable et détectable lors de la détection du substrat.

La détection se définit comme la reconnaissance entre un récepteur et un analyte menant à la transduction d'un signal. Ce signal est généralement de nature optique,

électrique ou magnétique. Un détecteur idéal doit répondre à certaines conditions comme une sélectivité et une spécificité élevée envers l'analyte, une grande reproductibilité, une stabilité et une sensibilité importante ainsi qu'une grande échelle dynamique.[31,32] La sélectivité représente l'affinité d'un récepteur pour l'analyte cible vis-à-vis de son affinité pour d'autres composés. En revanche, la spécificité d'un récepteur signifie que celui-ci détecte uniquement l'analyte cible.

La Figure 8 représente un biosenseur de glucose qui permet de mesurer en quelques secondes la concentration en glucose dans le sang de personnes atteintes de diabète.

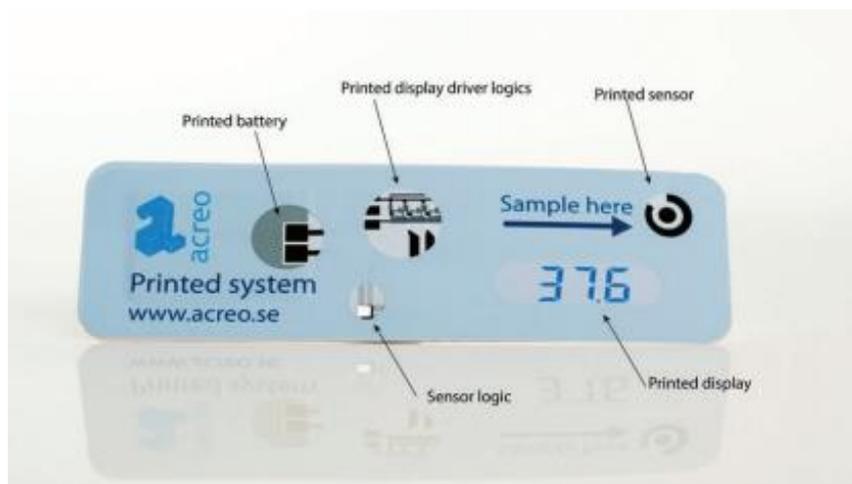


Figure 8 : Photographie d'un biosenseur de glucose. [38]

### Détection optique de l'ADN basée sur les oligo- et poly-électrolytes $\pi$ -conjugués

La détection optique d'ADN basé sur les oligo- et poly-électrolytes  $\pi$ -conjugués se déroule généralement selon trois types de mécanisme : soit par un quenching de la fluorescence de l'oligomère/du polymère, soit par un transfert d'énergie (FRET) à partir de l'oligomère/du polymère, soit par un changement conformationnel du squelette de l'oligomère/du polymère.[3,10,33]

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous focaliserons plus particulièrement sur les systèmes de détection basés sur une perturbation de la conformation/organisation du transducteur optique lors de l'interaction ADN/oligothiophène. Dans ce type de

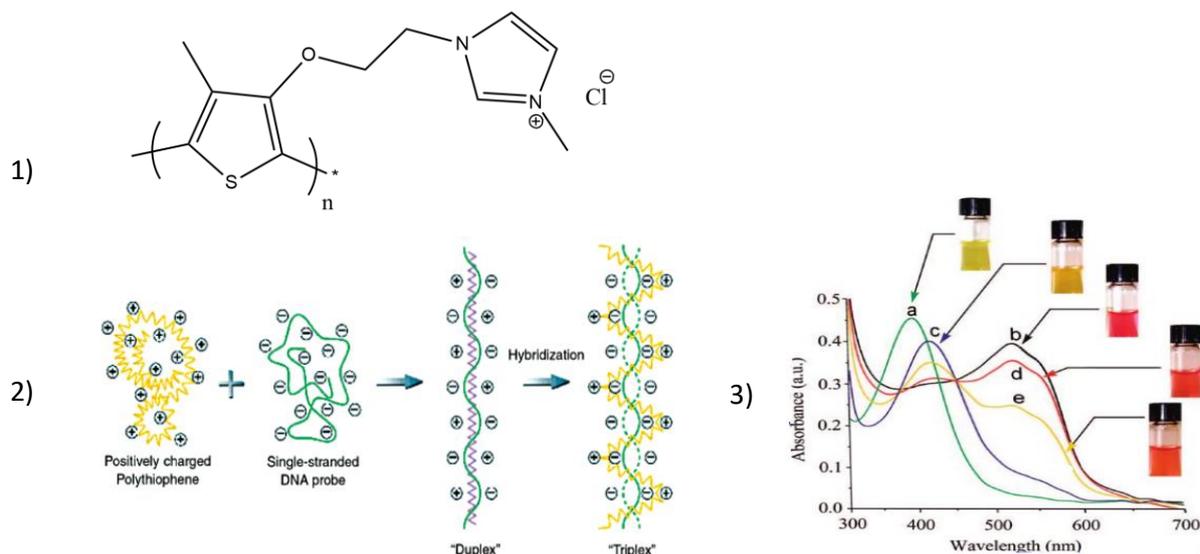
système, l'ADN est l'unité de reconnaissance et l'oligomère joue le rôle de transducteur optique. Ces oligomères  $\pi$ -conjugués cationiques sont très attractifs en tant que sonde optique car ils combinent solubilité en milieux aqueux, propriétés chiroptiques (absorption, émission et dichroïsme circulaire) hautement sensibles pour détecter une cible biologique et une affinité élevée envers l'ADN via les interactions électrostatiques qui peuvent s'établir entre le squelette phosphodiester anionique de l'ADN et ces oligomères cationiques.[3,8,10,3,33] L'interaction entre un oligothiophène ou un polythiophène cationique et l'ADN mène à des perturbations conformationnelles de la chaîne principale du polyélectrolyte qui peuvent modifier les spectres optiques du polymère/de l'oligomère.[3,10,33] Le principe de détection est donc lié à des modifications des propriétés optiques causées par des changements conformationnels au niveau du squelette du polythiophène/de l'oligothiophène lorsqu'il interagit avec l'ADN. La reconnaissance entre l'ADN et la sonde peut être suivie par spectroscopie chiroptique (absorption UV-Vis, fluorescence et CD).

Une telle approche supramoléculaire pour la détection de l'ADN est attrayante pour maintenir l'intégrité, les propriétés et la spécificité de la cible car aucune modification chimique de l'ADN n'est requise (par marquage covalent d'une dye fluorescente ou par un radio-isotope par exemple). Cette stratégie offre également d'autres avantages comme une détection simple, rapide, en temps réel de l'analyte et la possibilité de détecter le processus de reconnaissance ADN/oligothiophène  $\pi$ -conjugué cationique par spectroscopie chiroptique au cours du temps.[36]

Le groupe de Mario Leclercq a été un des pionniers dans le développement d'un système de détection d'hybridation d'ADN basé sur les effets conformationnels de polythiophène  $\pi$ -conjugué cationique.[3,10,11,33]

Comme on peut le voir sur la Figure 9, le polythiophène pur, présent dans une conformation de pelote statistique fournit une coloration jaune à la solution aqueuse. Lorsque la sonde ADN monobrin est ajoutée en solution et se lie au polythiophène cationique via des interactions électrostatiques, la couleur de la solution vire au rouge dû à la formation d'un duplex CPT/sonde ADN. Dans l'état duplex, la complexation entre l'ADN et le polythiophène force le polymère à adopter une conformation planaire et hautement conjuguée ce qui favorise l'agrégation des chaînes des CPTs. Une fois que le monobrin ADN complémentaire est ajouté à la solution, l'hybridation entre la

sonde ADN monobrin et l'ADN cible mène à la formation d'un état triplex CPT/sonde ADN/ADN cible et provoque une modification colorimétrique, la couleur de la solution vire au rouge. Dans l'état triplex, l'hybridation entre la sonde ADN monobrin et le brin d'ADN complémentaire induit de nouveau un changement conformationnel du polythiophène qui adopte une conformation non-planaire et faiblement conjuguée.[3,10,11,33]

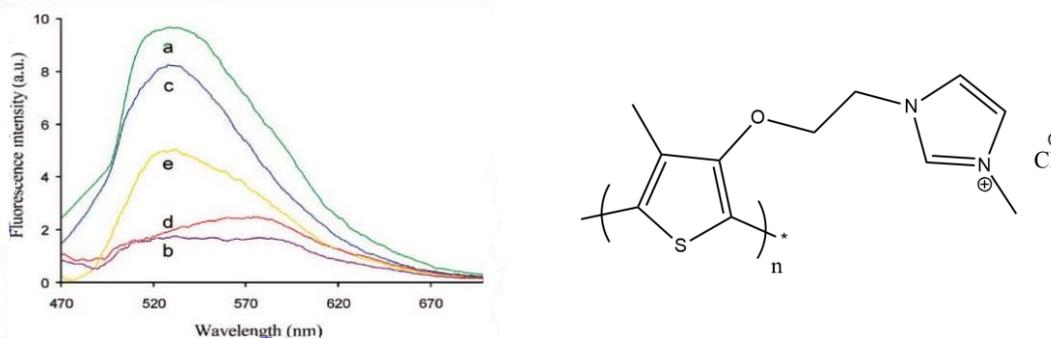


**Figure 9 :**1) Structure chimique du CPT utilisé 2) représentation schématique de la formation de l'état duplex (sonde d'ADN monobrin/CPT) et de l'état triplex (CPT/sonde ADN monobrin/oligonucléotide cible) 3) spectre UV-Vis et image d'une solution du a) CPT pure, b) duplex CPT/sonde ADN monobrin c) triplex CPT/sonde ADN monobrin/ADN monobrin cible d) mélange CPT/sonde ADN monobrin/ADN monobrin cible avec 2 mésappariements e) mélange CPT/sonde ADN monobrin/ADN monobrin cible avec 1 mésappariement.[3,11]

Comme expliqué précédemment, ces changements conformationnels peuvent aussi être détectés par spectroscopie de fluorescence et CD en raison de la sensibilité des propriétés chiroptiques du CPT quand une perturbation se déroule.

Comme on peut le voir sur la Figure 10, le transducteur optique polymérique pur en solution est fluorescent (courbe a). Lorsque la sonde d'ADN monobrin est ajoutée à la solution du polymère, l'intensité de fluorescence diminue drastiquement et le maximum d'émission est légèrement déplacé vers des plus grandes longueurs (courbe b). Le quenching de la fluorescence du polymère est causé par la complexation entre le polythiophène et la sonde d'oligonucléotide monobrin menant à la formation d'un état duplex (conformation planaire et hautement conjuguée du polymère en interaction

avec l'ADN monobrin). La formation de l'état triplex (conformation non-planaire et faiblement conjuguée du polymère en interaction l'ADN double brin) survient lorsque la sonde d'oligonucléotide s'hybride avec le monobrin d'ADN cible complémentaire et s'accompagne d'une augmentation importante de l'intensité de fluorescence (courbe c). À l'inverse, si la séquence de l'oligonucléotide cible présente 2 mésappariements, l'intensité de fluorescence reste faible et ne varie pratiquement pas par rapport à l'état duplex (courbe d). Dans le cas où l'oligonucléotide cible présente 1 mésappariement, une faible augmentation de l'intensité de fluorescence apparaît (courbe e). Le spectre de fluorescence diffère selon la séquence de l'ADN cible.[3,11]



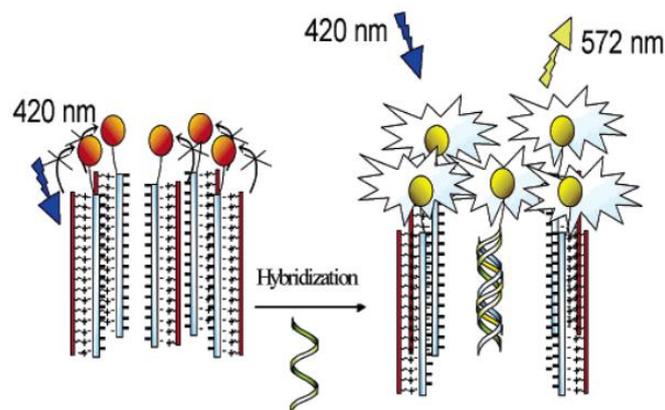
**Figure 10** : Spectres de fluorescence d'une solution a) CPT pur b) duplex CPT/sonde ADN monobrin c) triplex CPT/sonde ADN monobrin/ADN monobrin cible d) mélange CPT/sonde ADN monobrin/ADN monobrin cible avec 2 mésappariements e) mélange CPT/sonde ADN monobrin/ADN monobrin cible avec 1 mésappariement.[11]

Les chercheurs du groupe de Mario Leclercq ont développé un système de détection optique (fluorescence, absorption UV-Vis) d'ADN basé sur des perturbations conformationnelles de la chaîne conjuguée d'un CPT lors de son interaction avec un ADN monobrin ou double brin. Cette approche est hautement sensible puisqu'elle permet de différencier des oligonucléotides dont la séquence ne diffère que d'un seul nucléotide. Des études semblables qui reposent sur le développement de méthode de détection ADN basée sur divers CPTs ont également révélé des résultats prometteurs.[3,37]

L'équipe de recherche de M. Leclercq a également rapporté un nouveau système de détection d'ADN basé sur un changement conformationnel et une amplification du signal de fluorescence du polythiophène cationique.[3,11,39] Cette technique a permis d'améliorer grandement la sensibilité de détection. Cette stratégie repose sur le

mécanisme de transfert d'énergie de résonance Forster (FRET) qui consiste à exciter un chromophore donneur, le polythiophène cationique. Un transfert d'énergie peut avoir lieu entre le polythiophène cationique et un chromophore accepteur, un fluorophore lié à la sonde d'ADN monobrin dont l'état excité est de plus faible énergie. Il est indispensable que le spectre d'émission du donneur recouvre efficacement le spectre d'absorption de l'accepteur de manière à maximiser le signal FRET. Il est également important de souligner que l'efficacité du processus FRET dépend de la distance entre l'accepteur et le donneur. La reconnaissance moléculaire entre la sonde d'ADN et l'ADN cible modifie la distance entre le donneur et l'accepteur ce qui induit une amplification du signal de fluorescence qui peut être détecté. Le principal inconvénient de cette approche est la nécessité de fonctionnaliser la sonde d'ADN monobrin avec un fluorophore pour exploiter le mécanisme FRET.

Sur base de la Figure 11, on s'aperçoit qu'au départ, en absence de l'ADN cible, la distance entre le polymère donneur et le fluorophore lié à la sonde d'ADN monobrin est trop élevée pour observer une amplification du signal FRET. En présence de l'ADN cible de séquence complémentaire, un duplex ADN/ADN est formé par hybridation. Cet état duplex réduit la distance entre l'accepteur et le donneur et conduit ainsi à une amplification du signal FRET.[3,11,39]



**Figure 11 :** Représentation schématique du principe de détection basé sur un changement conformationnel d'un CPT et le mécanisme FRET.[39]

Au sein de notre laboratoire, des études récentes ont été menées sur l'auto-assemblage entre une série de polythiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques (CPTs) et divers oligonucléotides mono et double brin.

*J. Rubio-Magnieto et al.* ont rapporté la formation de structure supramoléculaire chirale lors de la complexation entre l'ADN et divers CPTs.[12,40] Au départ, les différents CPTs purs en solution sont achiraux. Par conséquent, ils ne présentent aucun signal chiroptique intrinsèque. En présence d'ADN, la complexation ADN/CPT via principalement des interactions électrostatiques conduit à la formation d'assemblage chirale qui se manifeste par l'apparition d'un signal CD induit (ICD) dans la région d'absorption du visible du polymère (450-500 nm). Ils ont montré que les signaux chiroptiques (CD intrinsèque à ADN et ICD du complexe supramoléculaire ADN/CPT) varient en fonction de la séquence d'ADN, du rapport molaire ADN/polymère, de la température et de la nature des substituants cationiques du polythiophène, ouvrant ainsi la voie à des applications de détection par spectroscopie CD.

En se basant sur la sensibilité des propriétés chiroptiques (CD, absorption UV-Vis et fluorescence) du P3HT-PMe<sub>3</sub>, un des polythiophènes étudié précédemment, en interaction avec divers ADNs et en utilisant une approche expérimentale et théorique conjointe, ce même groupe de chercheur a réalisé une étude approfondie du mécanisme d'auto-assemblage.[12,41] En ce sens, ils ont examiné l'effet de la séquence, de la topologie et de la longueur de l'ADN sur le processus d'auto-assemblage ADN/P3HT-PMe<sub>3</sub>. Ils ont investigué le mécanisme d'hybridation entre oligonucléotide complémentaire en présence du P3HT-PMe<sub>3</sub>. Les processus de déshybridation et de ré-hybridation ADN/ADN en présence de P3HT-PMe<sub>3</sub> ont également été étudiés en appliquant des cycles de chauffage-refroidissement pour évaluer la stabilité des duplex ADN/ADN et des triplex ADN/ADN/ P3HT-PMe<sub>3</sub>. [12] De plus, la chiralité supramoléculaire des assemblages ADN/P3HT-PMe<sub>3</sub> en particulier la sensibilité des signaux chiroptiques envers la séquence ADN a été exploitée pour suivre le clivage enzymatique de l'ADN par une endonucléase, *HpaI*, issue d'un micro-organisme nommé *Haemophilus parainfluenzae*. [42] Ce système de détection chiroptique basé sur une approche supramoléculaire permet d'une part de sonder l'activité enzymatique de manière continue et d'autre part ne requiert aucune modification de l'ADN (fonctionnalisation avec un fluorophore par exemple).

Récemment, dans le cadre de son projet de thèse, Maxime Leclercq s'est focalisé sur la conception de deux types de biosenseurs optiques en exploitant l'auto-assemblage supramoléculaire de l'ADN avec divers oligomères/polymères  $\pi$ -conjugués cationiques. Le premier système de détection a été développé pour sonder la

méthylation de l'ADN catalysé par *HpaII*, une méthyltransférase, en exploitant les propriétés de fluorescence et chiroptique de plusieurs oligo- et poly-électrolytes  $\pi$ -conjugués.[43] Parmi les différents composés étudiés, **T3Im** s'est révélé être prometteur pour détecter le taux de méthylation de l'ADN.[43] Le second système de détection, un biosenseur d'hybridation d'ADN, a été développé pour détecter des séquences spécifiques d'ADN basé sur les propriétés de fluorescence d'un polyfluorène-éthylène (PFE). Ce PFE a été utilisé spécifiquement pour détecter l'ADN génomique de *E. coli* à travers une approche FRET.[43] La détection et l'identification d'agents pathogènes tel que *E. coli* ou *Salmonella* est d'une très grande importance en particulier dans le secteur alimentaire pour éviter tout problème de santé publique. Enfin, des structures supramoléculaires hybrides à base d'ADN revêtent également d'un grand intérêt pour des applications prospectives d'imagerie médicale, de système de délivrance et de médecine régénérative.[4,44,45]

## I.4 Objectif du mémoire

Mon projet de mémoire vise à étudier les complexes supramoléculaires formés par auto-assemblage entre l'ADN et différents oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques nouvellement conçus (Figure 1) dans le but d'évoluer vers des matériaux pour des biocapteurs optiques et des dyes pour l'imagerie d'ADN. Les ADN étudiés sont des ADN génomiques variant de 2000 à 20000 paires de bases. Le processus d'auto-assemblage supramoléculaire est évalué en utilisant diverses techniques expérimentales, telles que la spectroscopie (chir)optique (absorption UV-Vis, dichroïsme circulaire, fluorescence), la microscopie à force atomique (AFM) et la cryo-microscopie électronique (cryo-TEM).

La première partie de ce mémoire consistera à étudier les propriétés (chir)optiques des assemblages supramoléculaires à base d'ADN par absorption UV-Vis, dichroïsme circulaire et fluorescence afin d'obtenir des informations sur le processus d'auto-assemblage en solution. Pura en solution, les oligothiophènes ne présentent aucun signal CD car ils sont achiraux. Lorsqu'ils interagissent avec l'ADN, un transfert de chiralité est observé de l'ADN à l'oligomère par l'apparition d'un signal de dichroïsme circulaire induit (ICD) dans la région spectrale de l'oligothiophène. Le but est d'étudier et de comprendre comment les signaux chiroptiques dépendent de la longueur d'ADN, des rapports molaires ADN/oligothiophène, de la nature des substituants cationiques de l'oligothiophène.

La seconde partie de ce mémoire consiste à déterminer la constante d'association ( $K_a$ ) des différents complexes ADN/oligothiophène par une méthode spectroscopique de compétition en utilisant 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), une petite molécule connue pour se lier à l'ADN.

Une dernière partie de ce mémoire consistera à caractériser la morphologie des complexes ADN/oligothiophène à l'échelle microscopique par AFM afin de mieux comprendre le mécanisme d'auto-assemblage sur des surfaces. Une étude supplémentaire de la morphologie des complexes ADN/oligothiophène cationique par cryo-TEM a été effectuée durant un stage réalisé à l'Institut Charles Gerhardt, à l'Université de Montpellier (ICGM) sous la supervision du Prof. Sébastien Clément.

## II. Méthodologie

---

Les ADN, les oligothiophènes et les différents complexes supramoléculaires ADN/oligothiophène ont été étudiés en utilisant une approche expérimentale basée sur la spectroscopie chiroptique (absorption UV-Vis, dichroïsme circulaire et fluorescence), la microscopie à force atomique (AFM) et la cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM).

Les différentes techniques de spectroscopie chiroptique (absorption UV-Vis, dichroïsme circulaire et fluorescence) ont permis d'étudier les interactions entre les divers ADN (différence de longueur) et une série d'oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques afin d'obtenir des indices sur les propriétés d'auto-assemblage en solution. L'AFM est utilisé pour caractériser la morphologie des complexes supramoléculaires ADN/oligothiophène à l'échelle microscopique de manière à obtenir un aperçu des assemblages sur des surfaces. La cryo-TEM permet d'étudier la morphologie et la structure interne des complexes ADN/oligothiophène telle qu'elle existe en solution.

### II.1 Aspects théoriques

#### II.1.1 Spectroscopie optique

La spectroscopie optique repose sur l'étude des interactions entre la matière et un rayonnement électromagnétique afin d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives sur un analyte, comme la structure et les propriétés de cet analyte ou sa concentration en solution. Les différentes méthodes spectroscopiques se distinguent par la longueur d'onde, l'énergie et la fréquence du rayonnement électromagnétique incident ainsi que par le phénomène étudié (absorption, fluorescence, dichroïsme circulaire).

Selon le principe de dualité onde-corpuscule, la lumière peut être définie soit comme une radiation électromagnétique composée d'un champ électrique et d'un champ

magnétique qui oscillent perpendiculairement entre eux, soit comme un flux de particules appelé photons.

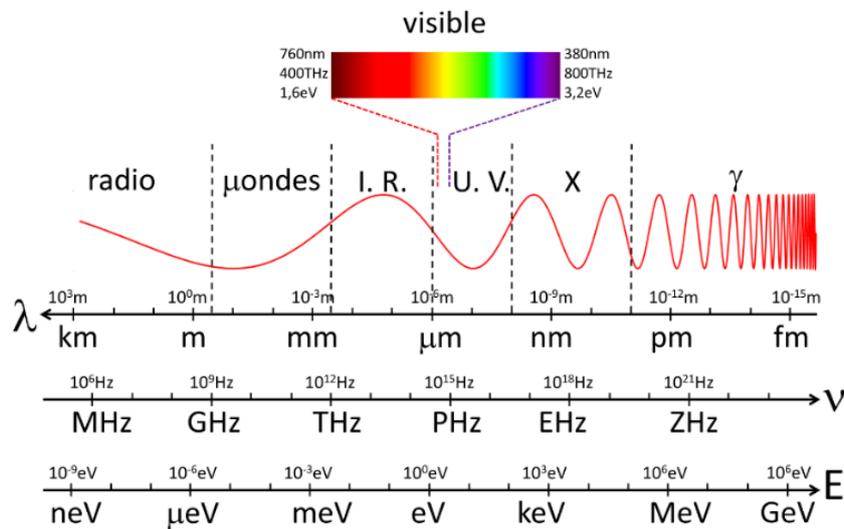


Figure 12 : Spectre électromagnétique.[46]

- *Spectroscopie d'absorption ultraviolet-visible*

La spectroscopie d'absorption UV-Vis consiste à envoyer un faisceau de lumière incident avec une énergie caractéristique du domaine UV-Vis sur un analyte afin d'obtenir des informations sur les molécules constituant l'échantillon telle que la concentration en solution. À température ambiante et en absence de perturbations extérieures, l'analyte est généralement dans son état électronique de plus basse énergie appelé l'état fondamental. L'absorption par l'analyte d'une partie des photons incidents peut mener au passage d'un électron de l'état électronique fondamental (état de plus basse énergie) vers un état électronique excité (état de plus haute énergie). Ce phénomène causé par l'absorption d'une radiation électromagnétique correspond à une transition électronique.[47] Selon le principe de conservation de l'énergie, la probabilité d'observer une transition électronique est d'autant plus élevée que l'énergie du rayonnement incident est proche de la différence d'énergie entre deux états électroniques distincts de l'analyte. Ainsi, la probabilité d'absorption d'un photon incident est maximale si l'énergie du photon est exactement égale à la différence d'énergie entre deux états. L'excitation électronique est un processus extrêmement rapide de l'ordre de la femtoseconde empêchant tout renversement de spin.[47] On

n'observe donc pas de transition entre un état singulet ( $S_n$ ) et un état triplet ( $T_n$ ). La spectroscopie d'absorption est régie par la loi empirique de Beer-Lambert qui relie l'absorbance d'un analyte à sa concentration en solution. Cette relation n'est valable que pour des solutions diluées ou la concentration n'excède pas  $10^{-1}$  M. Cette loi est décrite ci-dessous :

$$A = -\log \frac{I_1}{I_0} = -\log T = \varepsilon \cdot C \cdot l$$

Avec  $A$  = absorbance,  $C$  = concentration (mol. L<sup>-1</sup>),  $l$  = longueur du trajet optique (cm),  $\varepsilon$  = coefficient d'extinction molaire (L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>),  $I_0$  = intensité de la lumière incidente émise par la source,  $I_1$  = intensité de la lumière détectée après absorption par l'échantillon et  $T$  = transmittance.

Le coefficient d'extinction molaire dépend de la nature de l'analyte, du solvant, de la température et de la longueur du rayonnement incident.[47]

Il est possible d'obtenir des spectres d'absorption d'ADN, d'oligothiophène et des systèmes supramoléculaires ADN/oligothiophène étudiés. L'ADN absorbe dans la région de l'UV proche entre 240 et 280 nm avec un maximum d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ) situé environ à 260 nm. Les bases puriques et pyrimidiques qui ont une structure  $\pi$ -conjuguée sont responsables de l'absorption de l'ADN dans l'UV.[52] La position exacte du maximum d'absorption dépend de plusieurs paramètres : de la séquence de l'ADN, du pH et de la concentration en sel dans la solution. Le coefficient d'extinction molaire ( $\varepsilon$ ) varie également avec la séquence et la longueur de l'ADN. Les oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques étudiés absorbent dans le domaine du visible avec un  $\lambda_{\max}$  situé à environ de 370 nm.

- *Spectroscopie de fluorescence*

La spectroscopie de fluorescence est une méthode qui consiste à détecter les photons émis par un échantillon après excitation électronique afin d'obtenir un spectre d'émission. Typiquement, un faisceau de lumière incident avec une longueur d'onde

proche du  $\lambda_{\max}$  de la molécule, déterminée préalablement par spectroscopie d'absorption, est envoyé sur un échantillon. La longueur d'onde est fixée par un monochromateur. Comme dit précédemment, l'absorption d'une partie du rayonnement incident peut mener à une transition électronique entre l'état fondamental et un état excité. À la suite du phénomène d'excitation électronique, le système moléculaire dans un état électronique excité ( $S_n$  avec  $S_n > S_1$ ) peut rapidement retomber dans le premier état électronique excité ( $S_1$ ) par conversion interne.[47,48,49] La conversion interne (émission de chaleur) est un processus non radiatif. Ensuite, la désexcitation de l'état électronique  $S_1$  vers l'état électronique fondamental ( $S_0$ ) s'effectue soit par conversion interne, soit par un phénomène radiatif, la photoluminescence.[47,48,49] Dans le cas de la photoluminescence, le faisceau de lumière émis par l'échantillon est analysé, après son passage dans un second monochromateur qui sépare ce faisceau en ses différentes longueurs d'ondes composantes, par un détecteur placé à  $90^\circ$  de la source afin que le faisceau de lumière incident ne soit pas détecté. La photoluminescence peut être divisée en deux catégories selon le type d'état excité (état singulet ou triplet) : la fluorescence et la phosphorescence. La fluorescence est un processus rapide de l'ordre de la nanoseconde qui correspond à la relaxation d'un état électronique excité singulet vers l'état fondamental par émission de lumière.[47,48,49] La fluorescence est donc un phénomène consécutif à l'absorption. Selon la règle empirique de Kasha, dans l'immense majorité des cas, la fluorescence se déroule uniquement au départ du premier état électronique excité ( $S_1$ ).[47,49] La phosphorescence est un processus beaucoup plus lent de l'ordre de la microseconde-milliseconde qui correspond à la relaxation d'un état électronique excité triplet vers l'état fondamental singulet par émission de lumière.[48] Le processus de fluorescence se déroule uniquement si un renversement de spin a eu lieu précédemment. Ce phénomène est appelé croisement inter-système.

Dans le cadre de ce mémoire, on s'intéresse uniquement à la fluorescence car les oligothiophènes étudiés sont des composés fluorescents. En revanche, l'ADN est une molécule non fluorescente qui requiert un marquage covalent par un fluorophore, par exemple, pour observer un signal de fluorescence caractéristique.

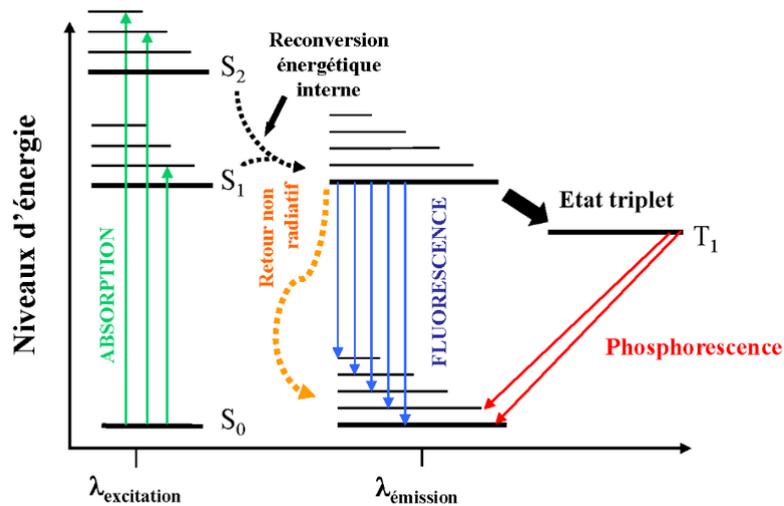


Figure 13 : Diagramme de Jablonski simplifié illustrant les mécanismes d'absorption, de fluorescence et de phosphorescence.[50]

- *Spectroscopie de dichroïsme circulaire*

La spectroscopie de dichroïsme circulaire électronique est une technique qui repose sur l'utilisation d'une lumière polarisée circulairement pour obtenir des informations sur la structure d'une (supra)molécule chirale ou pour investiguer l'effet de l'environnement (pH, température, concentration et interaction intermoléculaire) sur la structure d'une (supra)molécule.[51-54]

Selon la théorie ondulatoire de la lumière, une onde lumineuse est composée d'un champ électrique et d'un champ magnétique oscillant perpendiculairement entre eux et qui sont orthogonaux à la direction de propagation du faisceau (Figure 14). Le champ électrique peut être scindé en deux composantes : une composante selon la direction X notée  $E_x$  et une composante selon la direction Y notée  $E_y$ . Une onde électromagnétique polarisée circulairement est produite si les deux composantes du champ électrique,  $E_x$  et  $E_y$ , ont une amplitude similaire et sont déphasées de  $\pi/2$  (Figure 15).[47,52] Selon le sens de rotation, la lumière est polarisée circulairement dans le sens horaire (pas droit) ou anti-horaire (pas gauche). Les molécules chirales, optiquement actives, absorbent différemment la lumière polarisée de pas droit et de pas gauche contrairement aux molécules achirales. Cette différence d'absorption est à l'origine des signaux chiroptiques.[47,52] Ceci explique l'absence de signal CD pour les molécules achirales, optiquement inactives. Une entité chirale est définie comme

une molécule qui n'est pas superposable à son image dans un miroir. Une molécule chirale est dépourvue de tout plan de réflexion et le réarrangement de ses électrons à la suite d'une transition électronique diffère selon le sens de polarisation de la lumière. Il est possible de distinguer la chiralité moléculaire, de la chiralité supramoléculaire.[55] Le caractère chiral d'un composé moléculaire peut s'expliquer par la présence d'un centre stéréogénique, d'un axe chiral, d'un plan chiral ou d'une hélicité.[55] Ce dernier cas nous intéresse particulièrement puisque c'est ce type de chiralité qui est retrouvé pour l'ADN. En effet, l'ADN peut adopter une structure hélicoïdale de pas droit ou de pas gauche. Isolés, les sucres désoxyriboses possèdent une asymétrie intrinsèque contrairement aux nucléobases et aux groupements phosphates qui sont achiraux. Cependant, au sein d'une chaîne polynucléotidique, les bases adoptent une organisation chirale. Au niveau supramoléculaire, une chiralité peut émerger lors du processus d'auto-assemblage entre un ligand et un récepteur. C'est ce type de chiralité qui est observé lors de la formation du complexe supramoléculaire ADN/oligothiophène par auto-assemblage.

Le dichroïsme circulaire reflète la capacité d'une molécule chirale à absorber différemment la lumière polarisée circulairement dans le sens horlogique et dans le sens anti-horlogique.[47,52] La spectroscopie de dichroïsme circulaire mesure donc la différence d'absorption ( $\Delta A$ ) pour une molécule chirale de la lumière polarisée circulairement dans le sens horaire et dans le sens anti-horaire. À partir de la loi empirique de Beer-Lambert, on peut établir la relation suivante :

$$CD = \Delta A = A_{Ah} - A_h = \Delta \epsilon C l$$

Avec  $A_{Ah}$  et  $A_h$  = l'absorption de la lumière polarisée circulairement dans le sens anti-horaire et dans le sens horaire,  $\Delta A$  = la différence d'absorption et  $CD$  = le signal de dichroïsme circulaire.

Par convention, la grandeur mesurée expérimentalement n'est pas la différence d'absorption mais l'ellipticité molaire. L'ellipticité ( $\theta$ ) est une mesure angulaire exprimée en millidegré et est liée à  $\Delta A$  par la relation suivante.

$$\Delta A = \frac{\theta}{32982}$$

Un spectre dichroïque exprime donc l'évolution de l'ellipticité ( $\theta$ ) en fonction de la longueur d'onde ( $\lambda$ ).

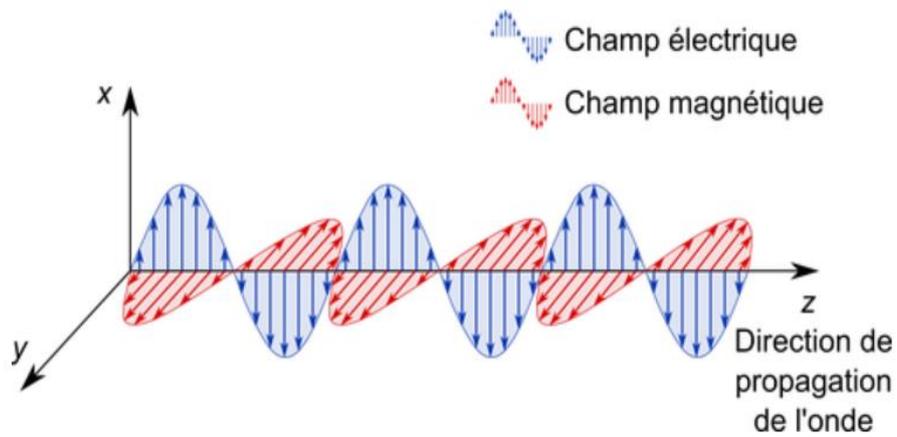


Figure 14 : Représentation d'une onde électromagnétique.[56]

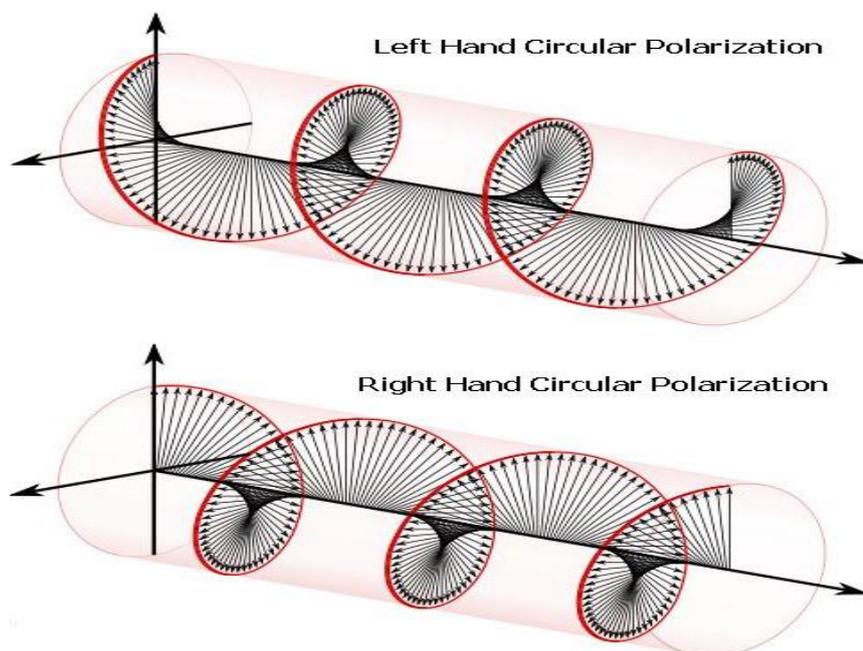


Figure 15 : Représentation d'une onde lumineuse polarisée circulairement.[56]

La spectroscopie de dichroïsme circulaire est une technique fortement exploitée dans le domaine biologique pour sonder les changements de conformation de biomacromolécules comme les protéines et les acides nucléiques ou pour étudier les interactions entre une biomacromolécule et un ligand.[51-54]

Le signal CD caractéristique de la forme B de l'ADN est constitué d'une bande positive suivie d'une bande négative de même intensité, appelé effet Cotton qui résulte d'un couplage excitonique. Les oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques étudiés sont des composés achiraux, optiquement inactifs qui ne présentent donc pas de signature CD lorsqu'ils sont purs en solution. Lorsque l'oligothiophène se complexe à l'ADN en solution, un transfert de chiralité de l'ADN à l'oligothiophène se déroule et se manifeste par l'apparition d'un signal ICD dans la région spectrale de l'oligomère.

La spectroscopie d'absorption UV-Vis, d'émission et de dichroïsme circulaire sont des techniques complémentaires capable de fournir de nombreuses informations sur les interactions ADN/oligothiophène, le mode de liaison prédominant et la structure des complexes ADN/oligothiophène permettant ainsi d'élargir la connaissance et la compréhension de ces systèmes.

## II.1.2 Microscopie

- *Microscopie à force atomique*

La microscopie à force atomique (AFM) est une des techniques de microscopie à sonde locale (SPM) qui permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon en 3 dimensions avec une résolution nanométrique à sub-nanométrique et de mesurer des propriétés à l'échelle locale grâce à une sonde qui balaye la surface de l'échantillon.[57,58] Parmi les techniques de microscopie à sonde locale, l'AFM présente de nombreux avantages pour étudier la morphologie d'échantillons d'ADN à l'échelle nanométrique comme la possibilité de travailler à température ambiante dans nombreux environnements : à l'air libre ou en solution, y compris en condition physiologique.[58,59]

Un microscope à force atomique typique se compose d'une pointe sur un levier, d'un capteur de déflexion, d'un scanner piézoélectrique et d'un système de contrôle par rétroaction.[57-60] Le capteur de force est une sonde constituée d'une pointe métallique nanoscopique située à l'extrémité d'un cantilever. Le cantilever est un bras de levier flexible capable de se défléchir lorsque la pointe interagit avec la surface de l'échantillon. Le rôle du capteur de force est de mesurer la force entre la pointe et la surface de l'échantillon. En AFM, les forces d'interactions régnant entre les atomes de

la pointe et les atomes de la surface sont principalement les forces attractives de van der Waals (VDW) et les forces répulsives coulombiennes.[57,58] La force d'interaction entre la pointe et l'échantillon est mesurée pendant le balayage en suivant la déflexion du cantilever. Dans l'immense majorité des cas, la déflexion du cantilever, correspondant au déplacement vertical de la pointe, est enregistrée par le biais d'un système optique. Un faisceau laser est focalisé à l'extrémité de la face réfléchissante du cantilever. Après réflexion, le faisceau laser est détecté par un photodétecteur sensible à la position.[58,59] En effet, selon le relief de la surface de l'échantillon, le cantilever se défléchit vers le bas ou vers le haut. Ce mouvement de déflexion modifie le trajet du faisceau laser réfléchi qui atteindra le photodétecteur à une position différente. Ainsi, la position du faisceau laser est corrélée à la déflexion du cantilever et permet ainsi d'obtenir un retour d'information sur la topographie de la surface. Dans l'immense majorité des cas, la déflexion du cantilever est maintenue à une valeur constante durant le balayage de la surface et on réalise une mesure de hauteur.[58,59] Pour ce faire, un système de contrôle par rétroaction est utilisé pour maintenir la distance entre la pointe et la surface et donc la force d'interaction à une valeur constante (Figure 16).[58,59] Concrètement, au cours du scan, un changement dans la force d'interaction entre la pointe et la surface enregistré par le senseur de détection traduit une modification de la hauteur de l'échantillon. Cette modification de hauteur détectée via la déflexion du cantilever provoque l'actionnement de l'élément piézoélectrique qui ajuste la distance entre la pointe et la surface afin de rétablir la force d'interaction à la valeur fixée initialement (Figure 17). L'échantillon à sonder est quant à lui disposé sur un scanner piézoélectrique permettant un déplacement verticalement et horizontalement de ce dernier sous la pointe.[58]

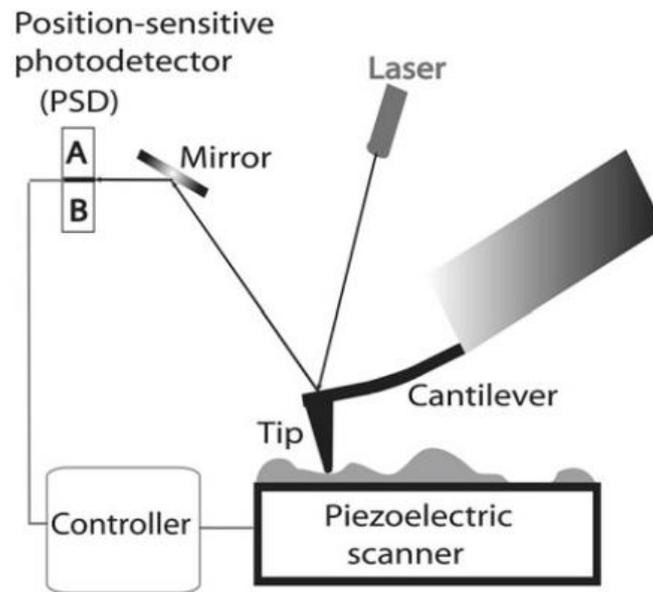


Figure 16 : Représentation du principe de fonctionnement de l'AFM.[60]

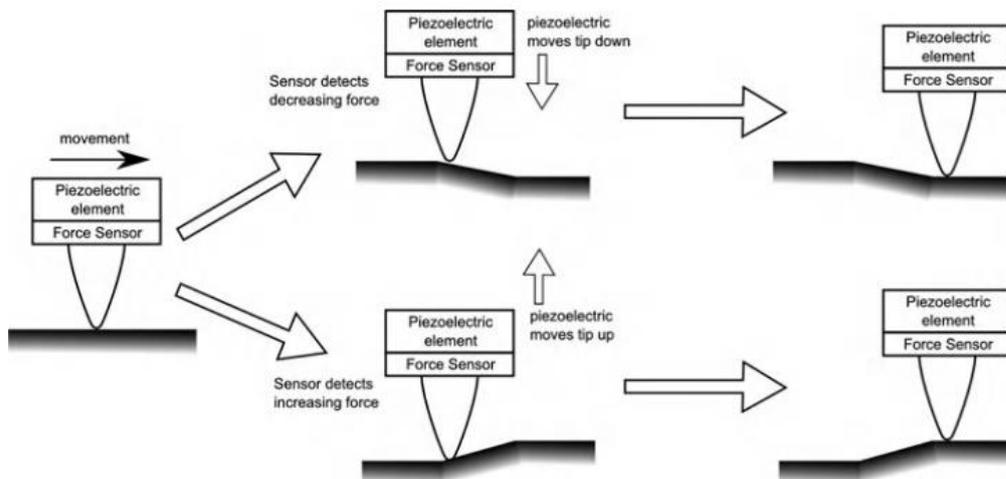


Figure 17 : Représentation schématique du mode de fonctionnement du système de contrôle par rétroaction.[58]

Pour générer un profil de la surface de l'échantillon, le microscope à force atomique peut opérer selon trois modes : le mode contact, le mode tapping et le mode non-contact.

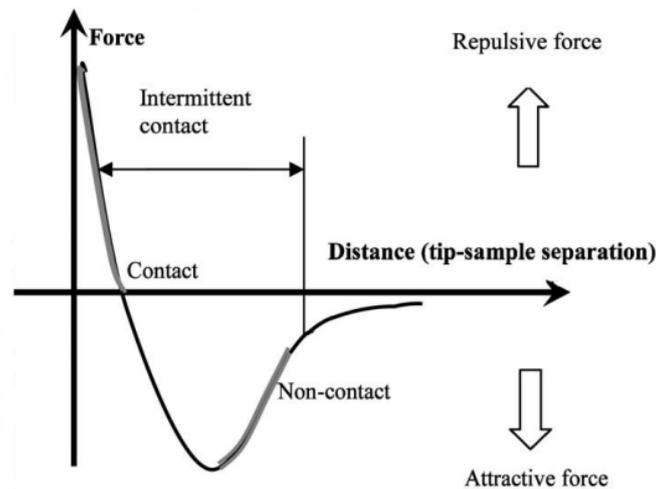
En mode contact, la pointe est en contact étroit avec l'échantillon lors du scan et ce sont les forces répulsives qui prédominent entre la pointe et la surface (Figure 18).[58-

60] L'AFM en mode contact n'est pas adapté pour imager des échantillons biologiques en raison du contact prolongé entre la pointe et la surface. Par conséquent, lors de la mesure, de tels échantillons peuvent être endommagés à cause de la forte interaction entre la pointe et la surface. Pour surmonter ce problème, deux autres modes de fonctionnement de l'AFM basés sur l'oscillation du cantilever ont été développés : le mode non-contact et le mode tapping.[58-59]

En mode non-contact, la sonde est maintenue à une distance très proche de la surface (entre 5-10 nm) de manière à rester dans le régime d'attraction. Ce sont donc les forces attractives de van der Waals qui prédominent entre la pointe et la surface (Figure 18).[57-59] À cause de la faible sensibilité de ce mode, les forces attractives de van der Waals étant plus faibles que les forces répulsives coulombiennes, l'AFM en mode non-contact opère sous vide avec une oscillation du cantilever de sorte que les forces attractives entre la pointe et la surface soient détectées en mesurant les variations de la fréquence d'oscillation.[58] Cependant, ce mode présente également des désavantages comme une faible stabilité et une faible sensibilité (la pente de la « droite » correspondant au mode non-contact est faible, voir Figure 18).[57-59]

Enfin, l'AFM en mode tapping utilisé dans le cadre de ce mémoire repose sur un contact intermittent et très court, de l'ordre de la microseconde, entre la pointe et la surface.[57,58] De la même manière que le mode non-contact, le cantilever oscille délibérément à une fréquence et une amplitude bien définies et fixées initialement par le système de contrôle par rétroaction. Généralement, le mouvement de vibration du bras de levier est généré par un élément piézoélectrique sur lequel est montée la sonde.[58] Au cours du scan, lorsque la pointe interagit momentanément avec la surface, l'amplitude d'oscillation varie en fonction de la topographie de la surface. En effet, si la pointe rencontre une protubérance, l'amplitude d'oscillation diminue. À l'inverse, si la pointe rencontre une dépression, l'amplitude d'oscillation augmente. Cette variation d'amplitude est détectée par le biais d'un système optique et est comparée à la valeur de référence pour générer un signal d'erreur.[58,59] Ce signal d'erreur déclenche l'actionneur piézoélectrique qui ajuste la distance verticale entre la pointe et la surface afin de conserver l'amplitude d'oscillation à la valeur qui a été fixée au départ de la mesure.[58,59] Finalement, l'ensemble de ce processus permet d'obtenir une information topographique de la surface de l'échantillon. Le mode tapping est le principal mode de fonctionnement utilisé pour imager des échantillons

biologiques en raison de ses nombreux avantages par rapport aux deux autres modes AFM. Les principaux avantages de ce mode de fonctionnement sont : la capacité d'imager des échantillons fragiles avec une haute résolution et la nature non destructive de ce mode.[57,58]



**Figure 18** : Evolution de la force en fonction de la distance pointe-surface de l'échantillon et représentation des 3 modes AFM.[59]

Généralement, une caméra est connectée à un microscope à force atomique afin de visualiser la pointe sur la surface de l'échantillon et déterminer la région à analyser.

Deux paramètres majeurs peuvent affecter la résolution lors de l'acquisition des images. Premièrement, la taille de la pointe (rayon de courbure) affecte la qualité de la mesure. La pointe utilisée doit être la plus effilée possible (réduire le rayon de courbure) tout en étant suffisamment robuste pour avoir la meilleure résolution possible. Deuxièmement, la position de l'échantillon par rapport à la sonde qui est contrôlée par le scanner piézoélectrique avec une précision inférieure à 1 nm.[57] Il est important de préciser que lors d'une mesure AFM, en raison de la forme de la pointe, un effet de convolution peut apparaître en particulier pour des objets dont la dimension est inférieure à celle de la pointe.[57,61] C'est notamment le cas pour l'ADN. La trajectoire de la pointe que l'on mesure est différente de la largeur réelle de l'objet (Figure 19). Par conséquent, cet effet d'élargissement par la pointe entraîne une surestimation de la largeur réelle de l'objet. En utilisant la formule mathématique ci-dessous, il est possible de corriger la déformation latérale d'un objet dû à cet effet.[61]

$$W = 4(R_c + R_m) \frac{\sqrt{R_m(R_c - R_m)}}{R_c}, R_c > R_m$$

Avec  $W$  = la largeur apparente de l'objet,  $R_c$  = le rayon de courbure de la pointe et  $R_m$  = le rayon de l'objet.

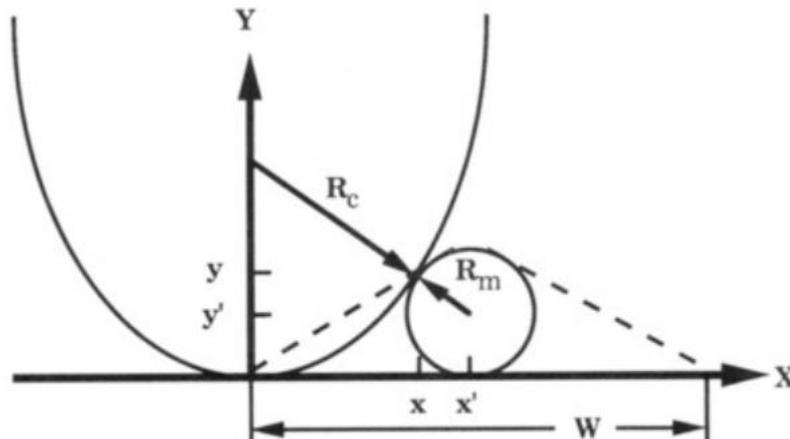


Figure 19 : Effet de convolution par la pointe sur un objet avec un rayon inférieur à celui de la pointe.[61]

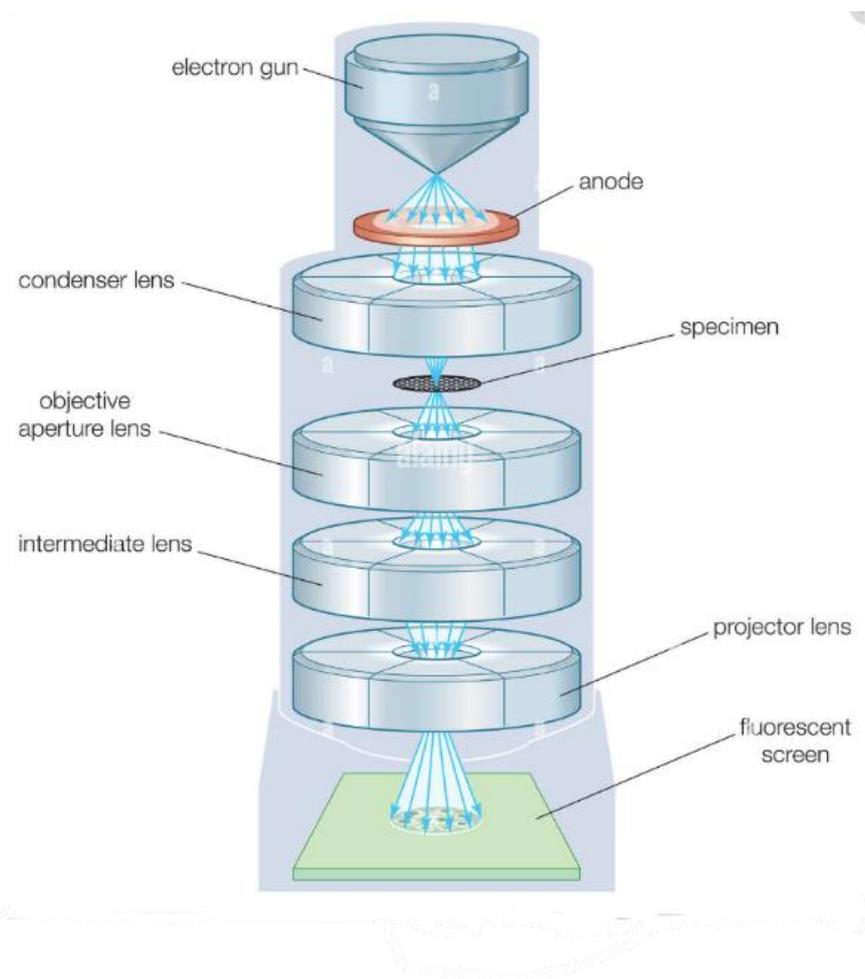
- *Microscopie électronique à transmission et cryo-microscopie électronique à transmission*

La microscopie électronique à transmission (TEM) est une technique qui repose sur l'utilisation d'un faisceau d'électrons pour imager et caractériser finement un échantillon avec une résolution atomique. Cette technique peut fournir des informations sur la topographie, la morphologie (taille et forme des particules), la composition et la structure interne et/ou cristallographique d'un matériau.[62]

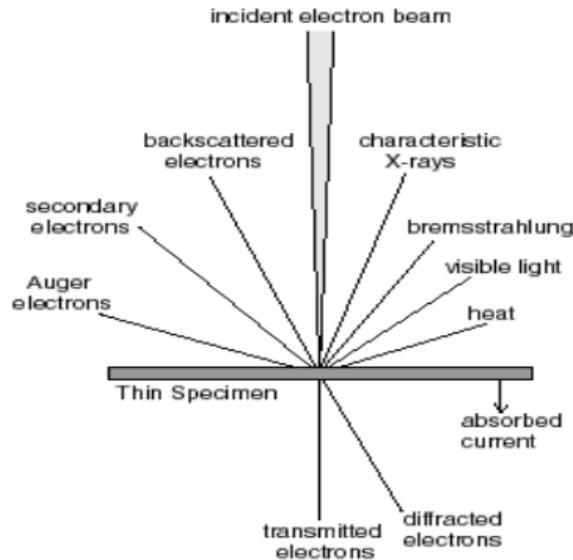
Un microscope électronique à transmission est composé de différents éléments. Le premier élément du microscope est la source d'électrons (Figure 20). Deux types de sources à électrons fondamentalement différentes sont utilisées en TEM : une source thermoïonique ou une source à émission de champ. Les sources thermoïoniques sont constituées d'une cathode, un filament de tungstène ou un cristal d'hexaborure de lanthane ( $\text{LaB}_6$ ) entouré d'un cylindre Wehnelt et d'une anode avec un trou en son centre.[62,63] Le filament de tungstène ou le cristal d'hexaborure de lanthane ( $\text{LaB}_6$ )

est chauffé à très haute température ce qui a pour conséquence l'émission d'électrons par effet joule. Le flux d'électrons est ensuite accéléré suite à l'application d'une très grande différence de potentiel entre les deux électrodes. Les sources à émission de champ sont constituées d'une cathode, une pointe en tungstène acérée recouverte d'oxyde de zirconium et de deux anodes.[63] Ce type de source fonctionne selon un principe différent des sources thermoïoniques. En effet, une très grande différence de potentiel électrique est appliquée entre la pointe de tungstène et la première anode ce qui génère un champ électrique intense ayant pour conséquence l'émission d'électrons à partir de la cathode par effet tunnel. Ce flux d'électrons est ensuite accéléré très rapidement par une très grande tension positive appliquée à la seconde anode. Il est important de souligner que les sources à émission de champ offrent une meilleure résolution, une brillance significativement plus élevée et une meilleure cohérence que les sources thermoïoniques.[62,63] Une fois que les électrons ont été émis par la source et ont été accélérés par une tension de plusieurs kilovolts, ils se propagent à travers la colonne du microscope en direction de l'échantillon en passant par un système de lentilles électromagnétiques (Figure 20). Premièrement, un système de lentilles condensateurs est employé pour focaliser le faisceau d'électrons sur l'échantillon et contrôler son intensité.[62,63] Lorsqu'un échantillon est bombardé par des électrons, l'interaction entre les électrons et la matière mène à de nombreux phénomènes secondaires. Ces phénomènes sont repris en Figure 21. Parmi ces phénomènes secondaires, les électrons transmis et diffractés sont les signaux les plus importants en TEM.[57,62,63] Différentes images peuvent être obtenues selon le type d'électrons collectés (électrons transmis ou diffusés) en raison de leurs propriétés distinctes. Si ce sont les électrons transmis qui sont collectés, une image en champ clair est obtenue.[57,62,63] Les objets sont foncés et l'arrière-plan de l'image est clair. À l'inverse, si ce sont les électrons diffusés qui sont collectés, une image en champ foncé est obtenue.[57,62,63] Les objets sont clairs et l'arrière-plan de l'image est foncé. Dans notre cas, ce sont les électrons transmis qui sont détectés pour construire une image en champ clair de la structure interne de l'échantillon. Des lentilles objectives situées en aval de l'échantillon sont utilisées pour focaliser les électrons transmis ou diffusés et produire une première image réelle.[62,63] Une fente est également employée pour sélectionner les électrons qui seront détectés et contribueront donc à la formation de l'image TEM.[62,63] Enfin, Le faisceau d'électrons est défocalisé par des lentilles projecteurs et projeté sur un écran de visualisation pour

construire l'image TEM. Les lentilles du système de projection assurent uniquement l'agrandissement de l'image finale qui peut être visualisée sur un écran fluorescent ou avec une caméra CDD.[63] L'ensemble du système doit opérer sous très haut vide pour éviter les collisions entre les électrons et les molécules de gaz. De plus, en raison de la grande probabilité d'interaction des électrons avec la matière, il est indispensable de travailler avec des échantillons ayant une épaisseur maximale de l'ordre d'une centaine de nanomètre. Dans le cas contraire, aucun électron ne sera transmis. Par conséquent, les échantillons sont déposés sur une grille en cuivre ou en or percée de trous et recouverte d'un fin film de carbone poreux et 'transparent' aux électrons.



**Figure 20** : Représentation schématique d'un microscope électronique à transmission.[64]



**Figure 21** : Différents phénomènes secondaires qui se produisent lorsqu'un faisceau d'électrons interagit avec un échantillon.[62]

La microscopie électronique à transmission présente certaines limites, en particulier pour imager des échantillons biologiques. Tout d'abord, les molécules biologiques sont constituées principalement d'atomes de carbone, d'oxygène, d'hydrogène et d'azote qui sont des éléments très sensibles aux électrons. Par conséquent, ces échantillons peuvent facilement être endommagés.[57] Deuxièmement, les molécules biologiques dans leur état natif sont présentes dans un environnement aqueux ce qui pose deux problèmes. D'une part, l'eau liquide se vaporise dans le microscope lors des analyses empêchant de conserver les biomolécules dans leur structure native. D'autre part, la congélation de solution aqueuse mène à la cristallisation de l'eau engendrant de nombreux phénomènes de diffraction des électrons.[57] Pour surmonter ces problèmes et pouvoir imager des échantillons biologiques, la cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-TEM) est la solution. Cette technique repose sur le même principe que la TEM à l'exception de la préparation des échantillons. En effet, en cryo-TEM, les échantillons biologiques en solution aqueuse sont refroidis très rapidement dans de l'éthane liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  de sorte que les molécules d'eau se solidifient aux alentours de l'échantillons biologiques sans cristalliser.[65] L'eau est vitrifiée. Cette méthode empêche la cristallisation de l'eau et *in fine* une très forte diffusion des électrons permettant ainsi d'imager des molécules biologiques hydratées à l'état congelé.

Jacques Dubochet, Joachim Frank et Richard Henderson ont reçu le prix Nobel de Chimie en 2017 pour « le développement de la microscopie électronique cryogénique pour la détermination à haute résolution de la structure de biomolécules en solution ».[66]

Il est important de souligner que contrairement à l'AFM qui fournit une vue topographique en 3D de la surface d'un échantillon, une image TEM ou cryo-TEM correspond à une projection en 2D d'un objet en 3D. Il est donc intéressant de combiner l'AFM et la cryo-TEM pour caractériser d'une part la morphologie des assemblages ADN/oligomère sur une surface et d'autre part pour étudier finement la structure interne et la morphologie de ces assemblages en solution aqueuse.

## II.2 Aspects pratiques

### II.2.1 Préparation des échantillons

**T3Im** a été solubilisé dans l'eau MilliQ (H<sub>2</sub>O MQ) et **ETE.TMA** a été solubilisé dans un mélange DMSO/H<sub>2</sub>O MQ. La concentration des solutions stocks de **T3Im** et de **ETE.TMA** était comprise entre 1mM et 2 mM. L'utilisation du DMSO s'explique par la faible solubilité de **ETE.TMA** dans l'eau pure. Malheureusement, ce solvant présente un inconvénient majeur. En effet, son maximum d'absorption est situé à environ 265 nm qui est compris dans la région d'absorption de l'ADN. Autrement dit, le DMSO peut interférer dans les mesures chiroptiques de l'ADN. De ce fait, les propriétés chiroptiques des complexes supramoléculaires ADN/**ETE.TMA** sont étudiées en solution aqueuse tamponnée avec un pourcentage de DMSO qui n'excède jamais 5%. Cette valeur est considérée comme la limite acceptable en-deca de laquelle le DMSO n'influence pas les mesures spectroscopiques des complexes ADN/**ETE.TMA**. Deux ADN double brin ont également été utilisés : l'ADN de saumon (stDNA) et l'ADN d'hareng (htDNA). Des échantillons de ces ADN ont été achetés purifiés à l'état sec auprès de Sigma Aldrich. Les échantillons d'ADN d'hareng et de saumon ont été dissous dans une solution aqueuse tamponnée. Le tampon TE (pH = 7.4, 10 mM Tris

et 1mM EDTA) est utilisé pour stabiliser les ADN. Les caractéristiques de ces deux ADN double brin sont respectivement :

- 2000 paires de bases et un coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) de 26400000 l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour stDNA.
- 20000 paires de bases et un coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) de 264000000 l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> pour htDNA.

La concentration exacte des solutions stocks d'ADN a été déterminée par absorption UV-Vis à 25°C via la loi de Beer-Lambert en utilisant le coefficient d'extinction molaire spécifique à 260 nm ( $\epsilon_{260}$ ). La concentration des solutions stocks d'ADN était comprise entre 0.4  $\mu$ M et 1  $\mu$ M pour stDNA et entre 0.04  $\mu$ M et 0.1  $\mu$ M pour htDNA. Les complexes supramoléculaires ADN/oligothiophène ont également été étudiés en solution aqueuse tamponnée.

## II.2.2 Spectroscopie chiroptique

Les mesures d'absorption, de fluorescence et de dichroïsme circulaire ont été enregistrées en solution à l'aide d'un Chirascan™ Plus CD Spectrometer from Applied Photophysics en utilisant des cuvettes en quartz Suprasil d'Hellma Analytics de 2 mm et de 10 mm. Durant l'enregistrement des spectres CD et d'absorption, les paramètres du Chirascan™ Plus CD Spectrometer d'Applied Photophysics ont été fixés comme suit : une largeur de fente de 1 nm, un temps par point de 1 seconde, une répétition par spectre et une température de 20°C. Les spectres de référence du solvant ont été utilisés comme blanc et ont été automatiquement soustraits des spectres des échantillons respectifs. Les mesures de fluorescence ont été menées avec une longueur d'onde d'excitation de 370 nm pour **T3Im** pur et en interaction avec l'ADN. Les autres paramètres du Chirascan™ Plus CD Spectrometer d'Applied Photophysics sont identiques à ceux fixés pour les mesures de CD et d'absorption.

### II.2.3 Microscopie

Les échantillons AFM d'ADN, d'oligothiophène et des complexes ADN/oligothiophène ont été préparés selon la méthode de trempage.[60] Après plusieurs clivages successifs pour obtenir un substrat de mica atomiquement plat, un morceau de mica (un carré d'environ 1cm de côté) est immergé pendant environ 10 minutes dans la solution pour permettre à l'analyte de s'adsorber à la surface. Les dépôts sont ensuite lavés avec un fin filet d'eau MilliQ et séchés avec un léger flux d'azote. Afin de permettre l'évaporation du solvant, les échantillons doivent être préparés idéalement 24 heures avant d'être imagés par AFM. Les analyses d'AFM ont été menées dans l'air, à température ambiante à l'aide d'un Nanoscope III de chez Bruker en mode tapping en utilisant des pointes NCHV ( $f_0=320\text{Khz}$ ) de chez Bruker. Les images AFM brutes ont été traitées et analysées avec le logiciel Gwyddion.

Les différents échantillons qui ont été analysés par cryo-TEM sont les deux oligothiophènes purs (**T3Im** et **ETE.TMA**) et les complexes ADN/oligothiophène. Les échantillons des deux oligothiophènes purs et des mélanges ADN/oligothiophène ont été préparés comme suit :

- **Solutions de T3Im pure** : première solution avec  $[\text{T3Im}] = 500\mu\text{M}$  et deuxième solution  $[\text{T3Im}] = 120\mu\text{M}$  dans un tampon TE ( $\text{pH} = 7.4, 10\text{mM}$  Tris et  $1\text{mM}$  EDTA)
- **Solutions ETE.TMA pure** : première solution avec  $[\text{ETE.TMA}] = 500\mu\text{M}$  et deuxième solution  $[\text{ETE.TMA}] = 120\mu\text{M}$  dans un tampon TE ( $\text{pH} = 7.4, 10\text{mM}$  Tris et  $1\text{mM}$  EDTA)
- **Solutions stDNA/T3Im** : première solution  $[\text{stDNA}] = 0.25\mu\text{M}$  /  $[\text{T3Im}] = 500\mu\text{M}$  et seconde solution  $[\text{stDNA}] = 0.06\mu\text{M}$  /  $[\text{T3Im}] = 120\mu\text{M}$
- **Solutions htDNA/T3Im** : première solution  $[\text{htDNA}] = 0.025\mu\text{M}$  /  $[\text{T3Im}] = 500\mu\text{M}$  et seconde solution  $[\text{htDNA}] = 0.006\mu\text{M}$  /  $[\text{T3Im}] = 120\mu\text{M}$
- **Solutions stDNA/ETE.TMA** : première solution  $[\text{stDNA}] = 0.25\mu\text{M}$  /  $[\text{ETE.TMA}] = 500\mu\text{M}$  et seconde solution  $[\text{stDNA}] = 0.06\mu\text{M}$  /  $[\text{ETE.TMA}] = 120\mu\text{M}$
- **Solutions htDNA/ETE.TMA** : première solution  $[\text{htDNA}] = 0.025\mu\text{M}$  /  $[\text{ETE.TMA}] = 500\mu\text{M}$  et seconde solution  $[\text{htDNA}] = 0.006\mu\text{M}$  /  $[\text{ETE.TMA}] = 120\mu\text{M}$

Typiquement 2  $\mu$ l de chacune de ces solutions ont été déposées sur une grille en cuivre percée de trous et recouverte d'un fin film de carbone 'transparent' aux électrons. L'ensemble a ensuite été plongé très rapidement dans de l'éthane liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  pour congeler les solutions aqueuses des différents échantillons à l'état vitreux et ainsi observer les assemblages ADN/oligothiophène en solution aqueuse congelée. Les analyses de cryo-TEM ont été menées en utilisant un microscope Jeol 2200 fs FEG 200Kv/filtre Omega caméra Gatan K3 avec l'aide du Dr. Hisham Idriss et de Aurélie Ancelin. L'échantillon a été refroidi par de l'azote liquide durant les analyses de cryo-TEM. Les images de cryo-TEM ont été traitées et analysées avec le logiciel ImageJ.

### III. Résultats et discussion

---

#### III.1 Oligothiophènes $\pi$ -conjugués cationiques et ADN double brin étudiés

Dans le cadre de ce mémoire, deux courts oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques achiraux solubles dans l'eau ont été étudiés : un terthiophène imidazolium avec deux groupements terminaux imidazolium (**T3Im**) et un terthiophène basé sur deux unités ethylènedioxythiophènes (EDOTs) et une unité thiophène centrale substituée par une chaîne alkyle-éther portant à son extrémité un groupement triméthylammonium (**ETE.TMA**) (Figure 22). **T3Im** et **ETE.TMA** présentent un cœur  $\pi$ -conjugué similaire basé sur des unités thiophènes mais des substituants cationiques de nature différentes. Par ailleurs, pour **T3Im**, les deux groupements imidazolium sont conjugués au squelette terthiophène tandis que pour **ETE.TMA**, le groupement triméthylammonium est situé à l'extrémité de la chaîne alkyle-éther latérale. Ces différences pourraient potentiellement influencer les modes de liaison et le processus d'auto-assemblage avec l'ADN.

Purs en solution aqueuse, ces deux oligothiophènes ne présentent aucune signature CD car ils sont achiraux. Après complexation avec l'ADN, un transfert de chiralité de l'ADN à l'oligothiophène peut se dérouler et se manifeste par l'apparition d'un signal ICD dans la région d'absorbance de l'oligomère. Ces deux courts oligothiophènes ont donc été étudiés seuls et en interaction avec deux longs ADN double brin (dsDNA) : l'ADN de saumon (stDNA) et l'ADN hareng (htDNA). Ces deux stDNA diffèrent au niveau de la longueur de la séquence. En effet stDNA possède environ 2000 paires de bases (bp) alors que htDNA possède environ 20000 paires de bases (bp).

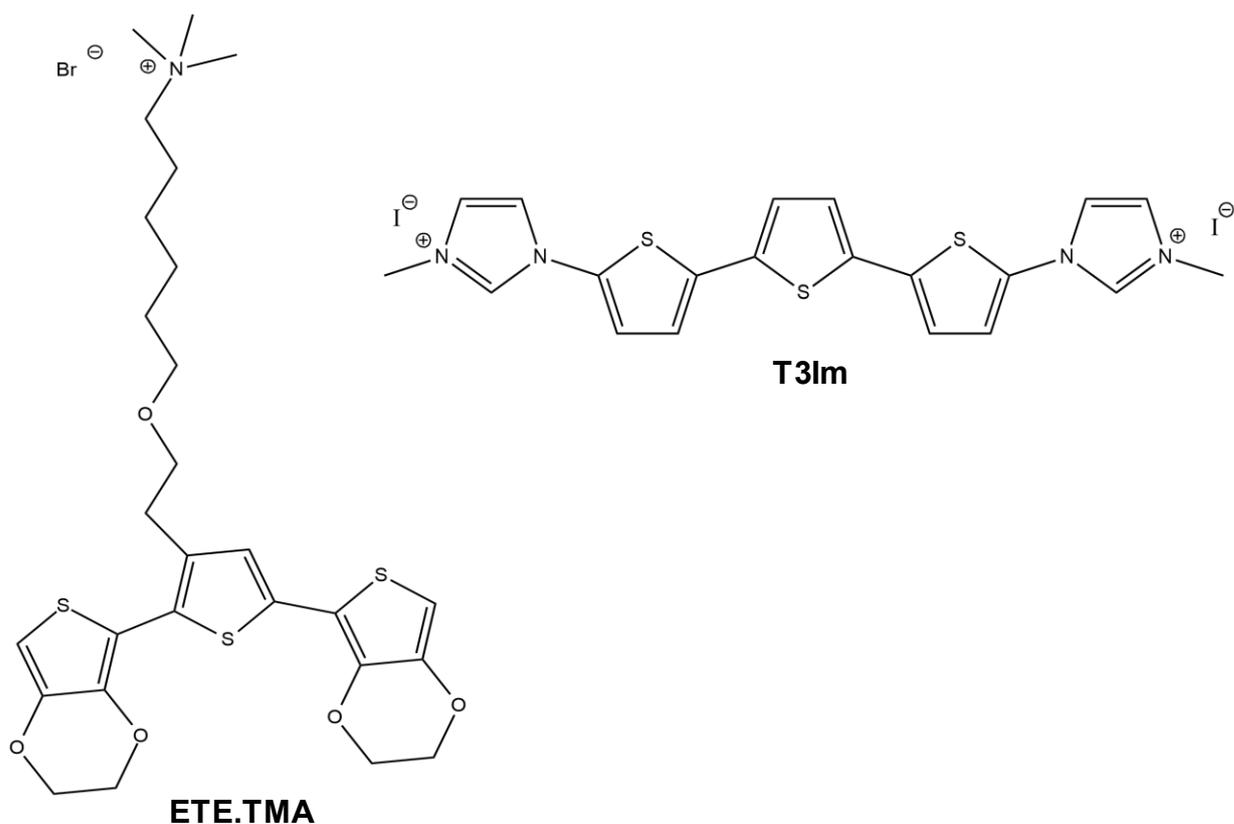


Figure 22 : Structures chimiques des oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques étudiés.

### III.2 Propriétés chiroptiques des assemblages oligothiophène $\pi$ -conjugué cationique/ADN

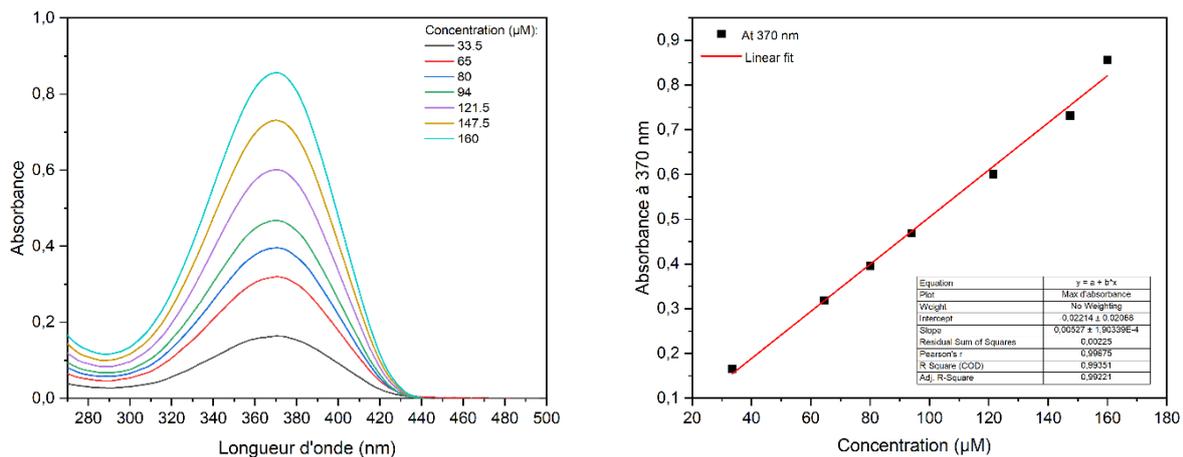
L'intérêt de cette première partie est double. D'une part, il est important d'évaluer et de comprendre l'effet de la nature et de la localisation des substituants cationiques sur le processus d'auto-assemblage oligothiophène  $\pi$ -conjugué cationique/ADN en solution et sur les propriétés chiroptiques des oligomères. D'autre part, il est intéressant d'étudier la complexation de chaque oligothiophène cationique avec deux dsDNA, stDNA (2000 bp) et htDNA (20000 bp) afin de sonder et de comprendre l'effet de la longueur de l'ADN sur les propriétés chiroptiques des deux oligomères lorsqu'ils interagissent avec l'ADN.

### III.2.1 Estimation des coefficients d'extinction molaire par spectroscopie UV-Vis

Premièrement, le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) des deux courts oligomères étudiés (**T3Im** et **ETE.TMA**) a été estimé par absorption UV-Vis via la loi de Beer-Lambert (Figures 23 et 24).

$$\epsilon = \frac{A}{l.C}$$

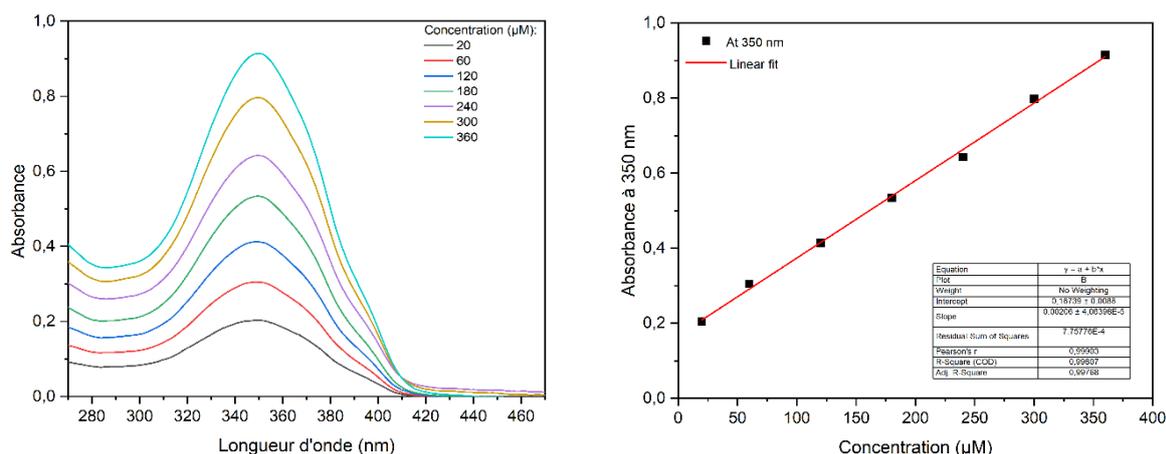
Pour chaque oligothiophène, en suivant l'évolution du maximum d'absorption en fonction de la concentration, il est possible d'extraire le  $\epsilon$  qui correspond à la pente de la droite (Figure 23 et 24). Pour les deux oligothiophènes, les mesures d'absorption UV-Vis ont été enregistrées avec des cuvettes de 2 mm et les concentrations sont exprimées en  $\mu\text{M}$ . Par conséquent, la valeur de la pente de la droite doit être divisée par les facteurs  $10^{-6}$  et 0.2 afin d'obtenir un  $\epsilon$  pour chaque oligothiophène qui s'exprime en  $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Après ces transformations<sup>1</sup>, le  $\epsilon$  de **T3Im** est de  $26350 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  et le  $\epsilon$  de **ETE.TMA** est de  $10400 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .



**Figure 23** : Spectres d'absorption UV-Vis de T3Im à différentes concentrations dans H<sub>2</sub>O MQ à 20°C (à gauche). Evolution du maximum d'absorption de T3Im en fonction de la concentration (à droite).

$$^1 \text{ T3Im} : \frac{0.00527}{10^{-6} \times 0.2} = 26350 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

$$\text{ETE.TMA} : \frac{0.00208}{10^{-6} \times 0.2} = 10400 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$



**Figure 24** : Spectres d'absorption de ETE.TMA à différentes concentrations dans un mélange H<sub>2</sub>O MQ/DMSO (1% DMSO environ) à 25 °C (à gauche). Evolution du maximum d'absorption de ETE.TMA en fonction de la concentration (à droite).

### III.2.2 Titrage spectroscopique

Les titrages d'absorption UV-Vis et de dichroïsme circulaire sont intéressants pour obtenir des informations sur les interactions ADN/oligothiophène et mieux comprendre le processus d'auto-assemblage en solution. Il est possible de suivre l'évolution des signaux chiroptiques en fonction du rapport molaire et/ou du rapport de charge ADN/oligothiophène.

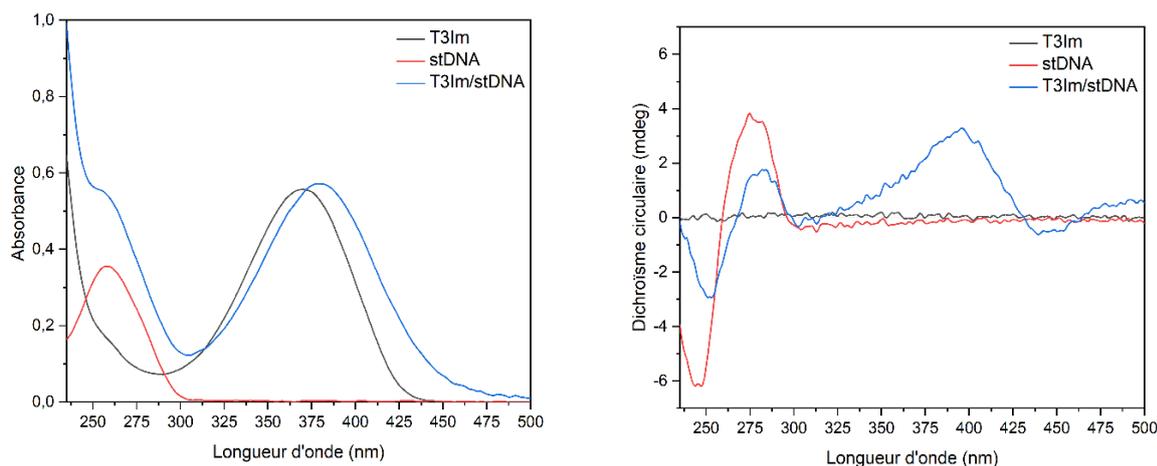
L'ADN de saumon (stDNA) et l'ADN d'hareng (htDNA) sont deux longs ADN double brin qui possèdent respectivement, 2000 paires de bases et 20000 paires de bases. À pH physiologique, le squelette phosphodiester de l'ADN est polyanionique puisque chaque groupement phosphate porte une charge négative (ion phosphonium). Pour rappel, un nucléotide est constitué d'un groupement phosphate, d'un désoxyribose et d'une base. Autrement dit, le nombre total de charges négatives est égal au nombre de nucléobases de l'ADN considéré. Dès lors, l'ADN de saumon possède 4000 charges négatives et l'ADN d'hareng possède 40000 charges négatives. Les deux courts oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques, **T3Im** et **ETE.TMA**, possèdent respectivement deux charges positives (les deux groupements imidazolium terminaux) et une charge positive (le groupement triméthylammonium localisé à l'extrémité de la chaîne latérale alkyle-éther). À noter que l'effet de dilution a été pris en compte pour

l'ensemble des titrages spectroscopiques qui ont été réalisés afin de maintenir la concentration en titré constante durant l'ensemble de l'expérience.

- *Titration spectroscopique de stDNA par T3Im*

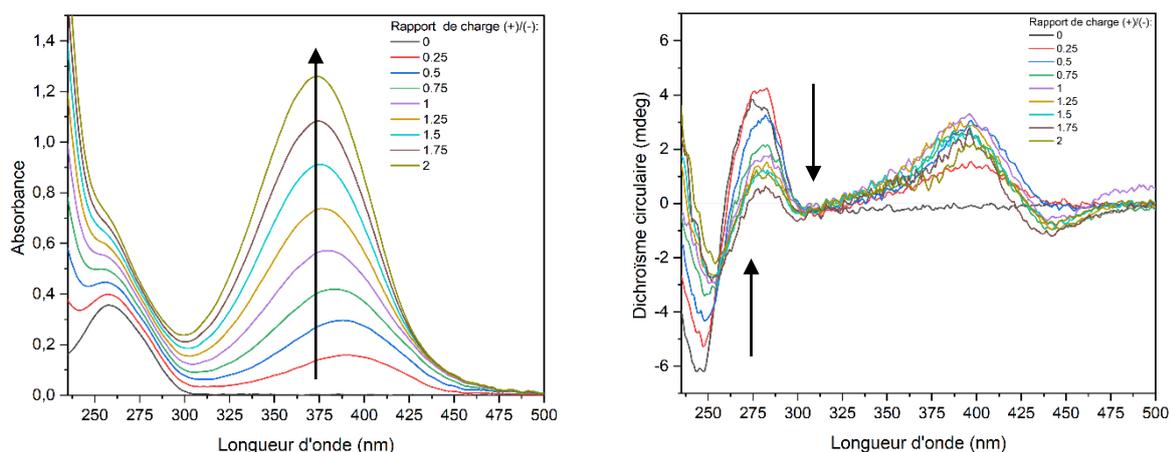
Premièrement, **T3Im** a été étudié seul et en interaction avec l'ADN de saumon. Comme montré en Figure 25, le spectre UV-Vis de stDNA pur indique une bande d'absorption entre 235 nm et 300 nm avec un maximum d'absorption ( $\lambda_{\max}$ ) situé à 260 nm. Le spectre UV-Vis de **T3Im** pur montre une bande d'absorption principale entre 310 nm et 460 nm avec un  $\lambda_{\max}$  situé à 370 nm, correspondant probablement à la transition  $\pi-\pi^*$ . Il est important de souligner que **T3Im** absorbe en dessous de 300 nm, dans la région de l'ADN. Par rapport au spectre UV-Vis de **T3Im** pur, un large décalage vers le rouge de la bande d'absorption principale de l'oligomère est observé lorsque **T3Im** est mélangé en solution avec stDNA à un rapport de charge de 1. De plus, le spectre UV-Vis du complexe **T3Im**/stDNA montre une augmentation de l'intensité de la bande d'absorption en dessous de 300 nm comparé au spectre UV-Vis de stDNA pur.

En figure 25, sur le spectre CD, stDNA pur présente un signal CD, composé d'une bande positive centrée autour de 275 nm et d'une bande négative centrée autour de 248 nm, caractéristique de la forme B de l'ADN double brin.[51,52] En revanche, pur en solution, **T3Im** ne présente pas de signature CD intrinsèque car il est achiral. Pour le mélange **T3Im**/stDNA à un rapport de charge de 1, un décalage vers le rouge et une diminution de l'intensité du signal CD de l'ADN (235-300 nm) sont observés par rapport au spectre CD de stDNA pure. De plus, un signal CD induit (ICD) avec un pic négatif de faible intensité à 445 nm et un pic positif beaucoup plus intense et large à 397 nm, est visible dans la région où seul l'oligothiophène absorbe (310-460 nm).



**Figure 25 :** Spectres UV-Vis et CD de T3Im (en noir), de stDNA (en rouge) et d'un mélange T3Im/stDNA à un rapport de charge de 1 à 20°C à un pH de 7.4 dans un tampon TE.

Un titrage spectroscopique (UV-Vis et CD) de stDNA par **T3Im** a été réalisé pour mieux comprendre le processus d'auto-assemblage et en particulier pour suivre l'évolution des signaux chiroptiques en fonction du rapport de charge **T3Im/stDNA**. La concentration de l'ADN a été maintenue constante durant l'expérience et les résultats sont montrés en Figure 26.



**Figure 26 :** Spectres UV-Vis (à gauche) et CD (à droite) du titrage de stDNA par T3Im obtenus à différents rapports de charge T3Im/stDNA. Les spectres ont été enregistrés en solution aqueuse tamponnée (H<sub>2</sub>O MQ/TE). [stDNA] = 0.076 μM, T = 20°C, pH = 7.4.

Sur les spectres UV-Vis (Figure 26), l'évolution de la bande d'absorption principale de l'oligomère (310-460 nm) montre un décalage vers le rouge et un gain d'intensité au

cours de l'expérience. Plus précisément, un décalage maximal vers le rouge ( $\Delta\lambda_{\max} = 19 \text{ nm}$ ) de la bande d'absorption principale de l'oligothiophène apparaît pour un rapport de charge **T3Im**/stDNA 0.25. Au-delà de ce rapport de charge, le décalage vers le rouge de  $\lambda_{\max}$  à 370 nm décroît progressivement jusqu'à atteindre une valeur minimale ( $\Delta\lambda_{\max} = 3 \text{ nm}$ ) à la fin du titrage. L'amplitude du shift vers le rouge dépend fortement du rapport de charge **T3Im**/stDNA (Figure S1). Une augmentation progressive de l'intensité de la bande d'absorption de **T3Im** est également observée lorsque le rapport de charge augmente.

Sur les spectres CD enregistrés au cours du titrage, deux effets sont observés pour le signal CD de stDNA (235-300 nm). D'une part, le signal tend à perdre en intensité progressivement au cours du titrage. D'autre part, à partir d'un rapport de charge 0.25, un décalage vers le rouge à la fois du pic positif et du pic négatif du signal CD est observé. Néanmoins, il est difficile de relever une tendance générale dans l'évolution de la position de  $\lambda_{\max}$  du pic positif et du pic négatif en fonction du rapport de charge **T3Im**/stDNA en raison d'un bruit de fond important. L'apparition d'agrégats en solution à haut rapport de charge pourrait être à l'origine du bruit de fond. Comme vu précédemment, un signal ICD apparaît dans la région où seul **T3Im** absorbe (310-460 nm). Ce signal ICD est sujet à de nombreux changements au cours du titrage. En effet, à faible rapport de charge, seule une bande positive large et intense centrée autour de 397 nm est observée. À partir d'un rapport de charge de 0.75, en plus de la bande positive, une bande négative de faible intensité apparaît à 445 nm. Le pic positif du signal ICD tend à gagner en intensité jusqu'à ce qu'un rapport de charge de 1 soit atteint. En revanche, aucune corrélation ne peut être établie entre de l'intensité du pic négatif du signal ICD et le rapport de charge oligomère/ADN. Enfin, même s'il est difficile de déterminer avec précision le  $\lambda_{\max}$  du pic positif et négatif du signal ICD en raison d'un bruit de fond important, il semble qu'aucun décalage vers de plus grandes ou plus petites longueurs d'ondes soit observé pour le signal ICD.

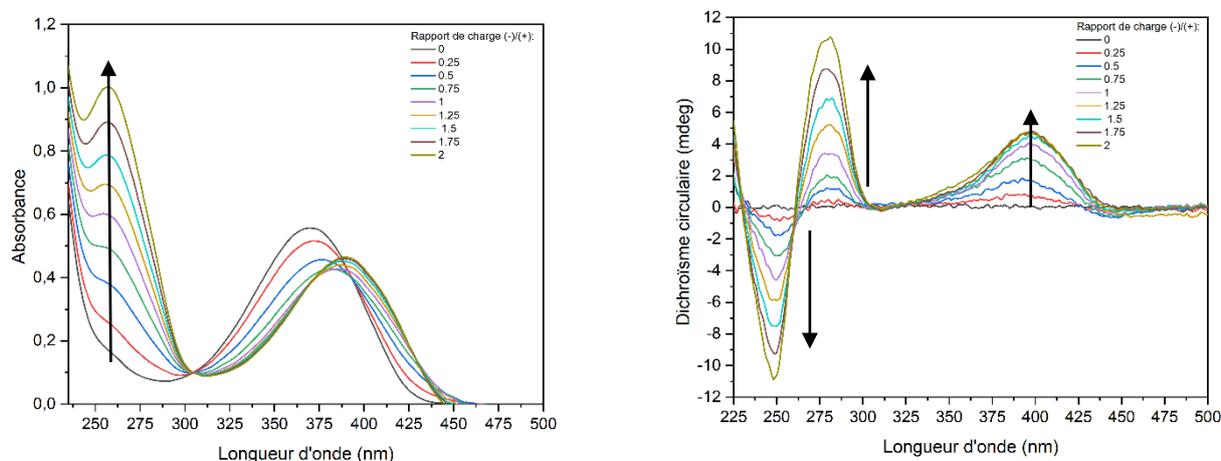
Les différents changements observés dans les spectres UV-Vis et CD attestent d'une interaction avec stDNA. Le shift vers de plus grandes longueurs d'ondes de la bande d'absorption principale de **T3Im** pourrait être attribué à une conformation planaire et hautement conjuguée adoptée par **T3Im** lorsqu'il interagit avec stDNA. Cette hypothèse est cohérente avec l'étude théorique menée sur la complexation entre **T3Im** et dsDNA qui révèle que les ligands **T3Im** qui se lient au sillon mineur de l'ADN sont

orientés préférentiellement en syn- par rapport aux angles diédraux entre les trois unités thiophènes (voir partie théorique ci-dessous). Cet effet est bien connu pour les CPTs et a été expliqué dans le premier chapitre.[3] Notons toutefois qu'ici **T3Im** est un court oligomère relativement rigide comparé aux CPTs pour lesquels, cet effet a été observé.[3,11] L'hypothèse d'une interaction avec stDNA est renforcée par les changements observés dans la bande CD de l'ADN (shift vers le rouge et diminution de l'intensité du pic positif et négatif) qui suggèrent que la conformation native de l'ADN est perturbée suite à la complexation avec **T3Im**. Il est important de souligner que **T3Im** absorbe aussi entre 235-300 nm. Dès lors, l'interaction avec l'ADN pourrait également mener à un signal ICD de T3Im dans cette région spectrale. Par conséquent, des modifications dans les spectres CD en-dessous de 300 nm ne peuvent pas être attribuées avec certitude à des changements dans la bande CD de l'ADN. Le signal ICD observé dans la région d'absorbance de **T3Im** lorsqu'il est mélangé avec l'ADN de saumon en solution démontre une interaction entre stDNA et **T3Im** menant à une induction chirale de l'ADN à l'oligothiophène.[40] Ainsi, une organisation chirale préférentielle du ligand achiral est induite suite à la liaison à l'ADN. En outre, l'intensité et la forme du signal ICD diffère en fonction du rapport de charge **T3Im**/stDNA considéré. L'origine du signal ICD de **T3Im** à la suite de l'interaction avec l'ADN est difficile à élucider uniquement sur base d'une étude expérimentale. Différents facteurs peuvent potentiellement contribuer à l'apparition d'un tel signal ICD. Ceci a été mis en évidence par *N.H. List et al.* dans une étude basée sur l'interaction d'un ligand achiral, le 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), avec l'ADN.[67] Il est bien établi que le DAPI se lie dans le sillon mineur de l'ADN double brin, probablement comme **T3Im** (voir partie théorique ci-dessous). En exploitant une approche expérimentale et théorique conjointe, ces chercheurs ont révélé que la combinaison de divers phénomènes est à l'origine du signal ICD positif du DAPI lié à l'ADN. Ces mécanismes sont : un couplage excitonique dégénéré entre les molécules de DAPI, une empreinte chirale induite structurellement par l'ADN sur le DAPI, une interaction par transfert de charge et un couplage excitonique non-dégénéré entre le DAPI et les nucléobases de l'ADN.[55,67] Cette étude fournit des indices qui permettent de mieux comprendre l'origine du signal ICD d'un ligand achiral suite à son interaction avec l'ADN. Néanmoins, le DAPI est connu pour se lier uniquement au sillon mineur de l'ADN tandis que **T3Im** présente trois modes de liaison possibles vis-à-vis d'un oligonucléotide double brin (voir partie théorique ci-dessous). De plus, la conformation

de **T3Im** dépend fortement du mode de liaison ce qui pourrait *in fine* modifier la réponse ICD. En ce sens, il serait intéressant d'adopter une approche similaire pour déchiffrer les différents mécanismes qui contribuent au signal ICD de **T3Im** lié à l'ADN.

- *Titration spectroscopique de T3Im par stDNA*

Un titrage spectroscopique (UV-Vis et CD) dans le sens inverse a été réalisé dans les mêmes conditions afin d'obtenir plus d'informations sur l'évolution des signaux chiroptiques en fonction du rapport de charge et sur les interactions entre **T3Im** et stDNA. Dans ce cas, la concentration de **T3Im** en solution est maintenue constante durant le titrage.



**Figure 27 :** Spectres UV-Vis (à gauche) et CD (à droite) du titrage de **T3Im** par stDNA obtenus à différents rapports de charge stDNA/**T3Im**. Les spectres ont été enregistrés en solution aqueuse tamponnée (H<sub>2</sub>O MQ/TE). [**T3Im**] = 120 μM, T = 20 °C, pH = 7.4.

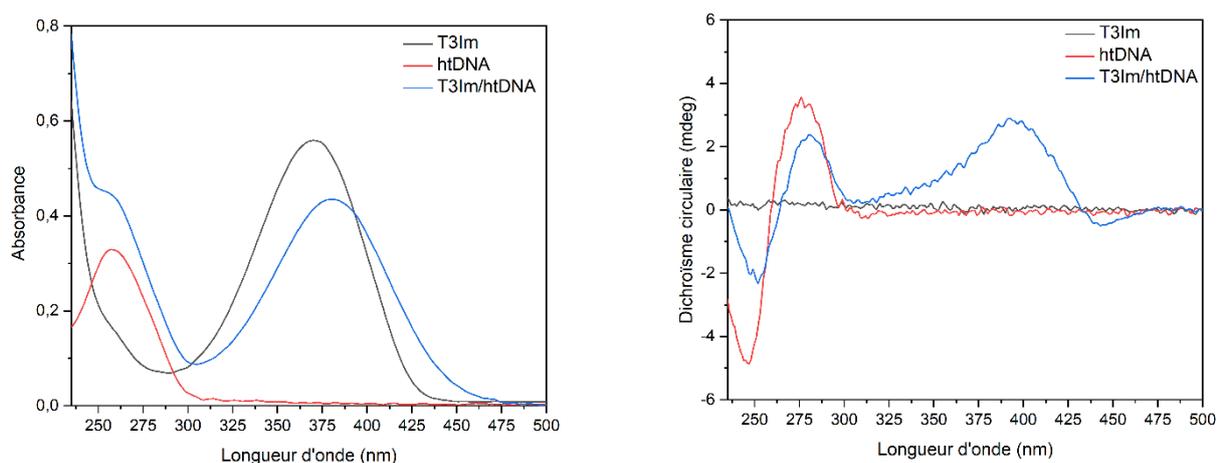
Les spectres UV-Vis des complexes stDNA/**T3Im** montrent trois effets importants (Figure 27). Premièrement, la bande d'absorption principale de **T3Im** (310-460 nm) subit un shift vers de plus grandes longueurs d'ondes en présence de stDNA. Le shift vers le rouge apparaît à un rapport de charge de 0.25 ( $\Delta\lambda_{\max} = 3$  nm) et augmente avec l'ajout d'une quantité croissante en stDNA ( $\Delta\lambda_{\max} = 19$  nm), bien que la position de  $\lambda_{\max}$  de **T3Im** ne soit pas linéairement corrélée à la concentration en stDNA (Figure S1). L'évolution de la position  $\lambda_{\max}$  de **T3Im** en présence de stDNA en fonction du rapport de charge (-/+ ) est semblable pour les deux titrages spectroscopiques. Deuxièmement, des changements dans l'intensité de l'absorbance de **T3Im** sont détectés. Au départ,

un effet hypochromique est observé avec l'augmentation de la concentration en stDNA. Au-delà d'un rapport de charge de 1, l'effet inverse se produit. Troisièmement, un accroissement drastique et progressif de la bande d'absorption entre 225 nm et 300 nm apparaît lorsque le rapport de charge stDNA/**T3Im** croit. Dans les spectres CD (Figure 27), une augmentation progressive de l'intensité du signal CD entre 225 nm et 300 nm sans modification de la forme est visualisée au cours du titrage. Les changements d'intensité à la fois de la bande d'absorption en dessous de 300 nm et de la bande CD de l'ADN sont attribués à l'augmentation de la concentration en stDNA au cours du titrage. Contrairement au titrage de stDNA par **T3Im**, aucun déplacement vers des plus grandes longueurs d'ondes du signal CD de l'ADN n'est observé. De nouveau, un signal ICD (-/+) apparaît dans la région où seul l'oligothiophène absorbe (310-460 nm). À faible rapport de charge, le signal ICD est constitué d'un large pic positif centré autour de 397 nm et d'un pic négatif difficilement distinguable à 445 nm. Quand le rapport de charge augmente, le pic positif gagne en intensité tandis que le pic négatif perd en intensité. Au-delà d'un rapport de charge de 1, le pic négatif disparaît et par conséquent le signal ICD présente une large bande positive centrée autour de 397 nm. Le signal ICD semble être similaire à celui observé lors du titrage précédent. Il est important de mentionner que pour un même rapport de charge, l'intensité du pic positif est légèrement supérieure dans le cas du titrage de **T3Im** par stDNA tandis que l'intensité du pic négatif est légèrement supérieure dans le cas du titrage de stDNA par **T3Im**.

Finalement, ces deux titrages révèlent que l'intensité et la forme du signal ICD dépendent fortement du rapport de charge (-)/(+). En effet, lorsque le nombre de charges positives (**T3Im**) prédomine par rapport au nombre de charges négatives (stDNA), le signal ICD (-/+) tend à être composé d'une bande négative très peu intense centrée autour de 445 nm et d'une bande positive large et intense centrée autour de 397 nm. À l'inverse, lorsque le nombre de charges négatives prédomine sur le nombre de charges positives, le signal ICD (+) est constitué d'une unique bande positive centrée autour de 397 nm.

- *Titration spectroscopique de htDNA par T3Im*

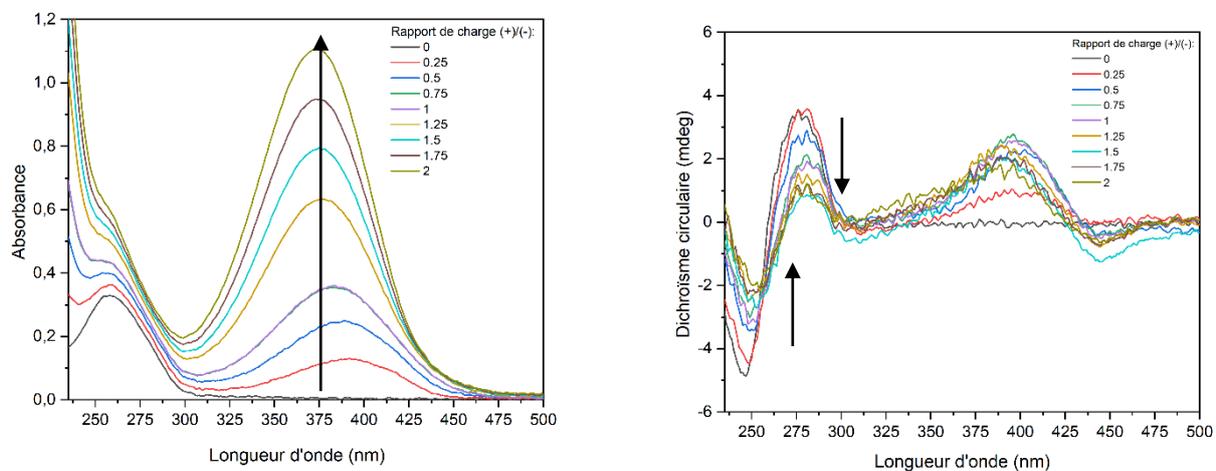
Toujours dans le but d'étudier la complexation de **T3Im** avec de longs ADN génomiques, un second ADN a été utilisé : l'ADN d'hareng (htDNA). htDNA est 10 fois plus long que stDNA. L'intérêt est donc d'évaluer si la longueur de l'ADN a une influence sur les propriétés chiroptiques ainsi que sur le processus d'auto-assemblage **T3Im/htDNA**.



**Figure 28** : Spectres UV-Vis et CD de T3Im (en noir), de htDNA (en rouge) et d'un mélange T3Im/htDNA à un rapport de charge de 1 à 20°C à un pH de 7.4 dans un tampon TE.

La Figure 28 montre le spectre UV-Vis et CD d'un mélange **T3Im/htDNA** à un rapport de charge oligomère/DNA de 1. Similairement à ce qui a été observé lors de la complexation entre **T3Im** et stDNA, un large décalage vers le rouge de la bande d'absorption principale de l'oligomère apparaît lorsque **T3Im** est mélangé avec htDNA à un rapport de charge de 1. De manière identique à stDNA, le spectre CD de htDNA pur montre un signal CD composé d'une bande positive centrée autour de 275 nm et d'une bande négative centrée autour de 248 nm, caractéristique de la forme B de l'ADN. Comparé aux spectres CD des composés purs, deux effets importants sont observés sur le spectre CD de **T3Im/htDNA** à un rapport de charge de 1. Premièrement, un déplacement vers de plus grandes longueurs d'ondes et une diminution de l'intensité du signal CD de l'ADN (225-300 nm) sont observés, sans changement dans la forme du signal. Deuxièmement, l'apparition d'un signal ICD présentant un pic négatif très peu intense à 445 nm et un pic positif beaucoup plus intense et large à 397 nm dans la région d'absorbance de l'oligomère (310-460 nm).

De nouveau, afin de suivre l'évolution des propriétés chiroptiques en fonction du rapport de charge oligomère/DNA et en apprendre davantage sur la complexation entre **T3Im** et htDNA, un titrage spectroscopique de htDNA par **T3Im** a été mené. Dans ce cas, la concentration de htDNA en solution est maintenue constante durant le titrage



**Figure 29** : Spectres UV-Vis (à gauche) et CD (à droite) du titrage de htDNA par **T3Im** obtenus à différents rapports de charge **T3Im**/stDNA. Les spectres ont été enregistrés en solution aqueuse tamponnée ( $H_2O$  MQ/TE).  $[htDNA] = 0.0076 \mu M$ ,  $T = 20^\circ C$ ,  $pH = 7.4$ .

Le titrage UV-Vis de htDNA par **T3Im** révèle l'apparition d'un décalage maximal vers le rouge ( $\Delta\lambda_{max} = 22$  nm) de la bande d'absorption principale de l'oligothiophène pour un rapport de charge **T3Im**/stDNA 0.25. Au-delà de ce rapport de charge, le déplacement de  $\lambda_{max}$  à 370 nm décroît progressivement jusqu'à atteindre une valeur minimale ( $\Delta\lambda_{max} = 3$  nm) à la fin du titrage (Figure S2). Lorsque le rapport de charge oligothiophène/htDNA croît, la bande d'absorption principale de l'oligomère (310-460 nm) tend à gagner en intensité. Il est important de souligner que les mêmes tendances ont été constatées avec stDNA même si l'étendue du redshift était légèrement inférieure ( $\Delta\lambda_{max} = 22$  nm avec htDNA contre  $\Delta\lambda_{max} = 19$  nm avec stDNA) (Figures S1 et S2).

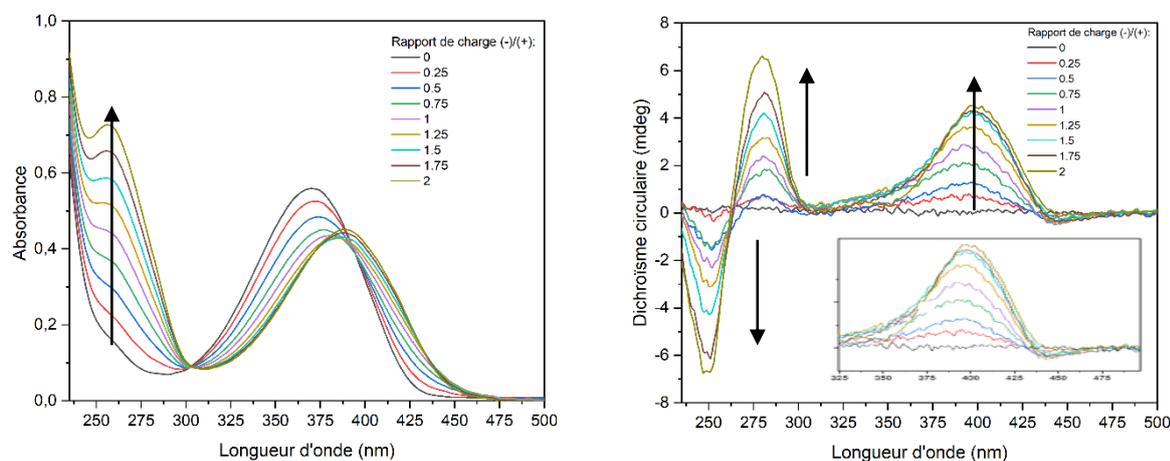
En figure 29, sur les spectres CD obtenus au cours du titrage, nous pouvons observer que le signal CD de l'ADN (225-300 nm) perd en intensité avec l'addition d'une quantité croissante en **T3Im** et présente un shift à la fois du pic positif et du pic négatif à partir d'un rapport de charge de 0,25. En outre, un signal ICD apparaît dans la région où **T3Im** absorbe entre 310 nm et 460 nm. De nouveau, ce signal ICD est sujet à de

nombreux changements au cours du titrage. En effet, à faible rapport de charge, seule une bande positive large et intense à 397nm est observée. À partir d'un rapport de charge de 0.5, en plus de la bande positive, une bande négative de faible intensité apparaît à 445 nm. La bande positive du signal ICD tend à gagner en intensité jusqu'à ce qu'un rapport de charge de 1 soit atteint. En revanche, aucune tendance ne peut être établie entre l'intensité du pic négatif et le rapport de charge **T3Im**/htDNA. Toutefois, pour un rapport de charge de 1.5, un signal plus intense est détecté.

Finalement, les titrages spectroscopiques de stDNA par **T3Im** et de htDNA par **T3Im** fournissent des résultats similaires. Autrement dit, les signaux chiroptiques varient peu en fonction de la longueur de l'ADN double brin. En particulier la forme, la position et l'intensité du signal ICD sont très semblables dans les deux cas. Néanmoins, l'évolution de la forme du signal en fonction du rapport de charge **T3Im**/ADN diffère légèrement selon la nature de l'ADN. En effet, dans le cas du titrage de stDNA par **T3Im**, le signal ICD est composé d'une unique bande positive en dessous d'un rapport de charge de 1 et d'une bande négative et positive au-delà d'un rapport de charge de 1. En revanche, lors du titrage de htDNA par **T3Im**, déjà à un rapport de charge de 0.5, le signal ICD est composé d'une bande positive et d'une bande négative. De nouveau, l'interaction entre **T3Im** et htDNA se manifeste à travers le déplacement vers de plus grandes longueurs d'ondes de la bande d'absorption de **T3Im**, par les changements détectés dans la bande CD de htDNA, suggérant que la complexation entre **T3Im** et htDNA perturbe la structure hélicoïdale de htDNA et enfin par l'apparition d'un signal ICD dans région où **T3Im** absorbe indiquant que l'oligomère achiral après liaison avec l'ADN adopte au sein du complexe supramoléculaire une conformation chirale préférentielle.

- *Titration spectroscopique de T3Im par htDNA*

Une fois de plus, afin de mieux comprendre le processus d'auto-assemblage et de suivre l'évolution des signaux chiroptiques en fonction du rapport charge htDNA/T3Im, un titrage dans le sens inverse a été mené. La concentration de **T3Im** a été maintenue constante durant tout le titrage.



**Figure 30 :** Spectres UV-Vis (à gauche) et CD (à droite) du titrage de T3Im par htDNA obtenus à différents rapports de charge T3Im/htDNA. Les spectres ont été enregistrés en solution aqueuse tamponnée (H<sub>2</sub>O MQ/TE). [T3Im] = 120 μM, T = 20°C, pH = 7.4.

En Figure 30, les spectres UV-Vis enregistrés au cours de l'expérience indiquent un déplacement significatif vers le rouge et des changements dans l'intensité de la bande d'absorption principale de **T3Im** (310-460 nm) en présence de htDNA. Plus précisément, l'intensité de  $\lambda_{\max}$  de **T3Im** diminue graduellement avec l'augmentation de la concentration en htDNA. Au-delà d'un rapport de charge 1.25, le comportement inverse est observé. Un shift vers de plus grande longueur d'onde apparaît à un rapport de charge de 0.25 ( $\lambda_{\max} = 2$  nm) et augmente progressivement avec l'addition d'une quantité croissante en htDNA jusqu'à la fin du titrage ( $\lambda_{\max} = 18$  nm) (Figure S2). De même, l'intensité de la bande d'absorption entre 235 nm et 300 nm croît progressivement au cours du titrage. Le titrage UV-Vis de **T3Im** par stDNA a fourni des résultats semblables.

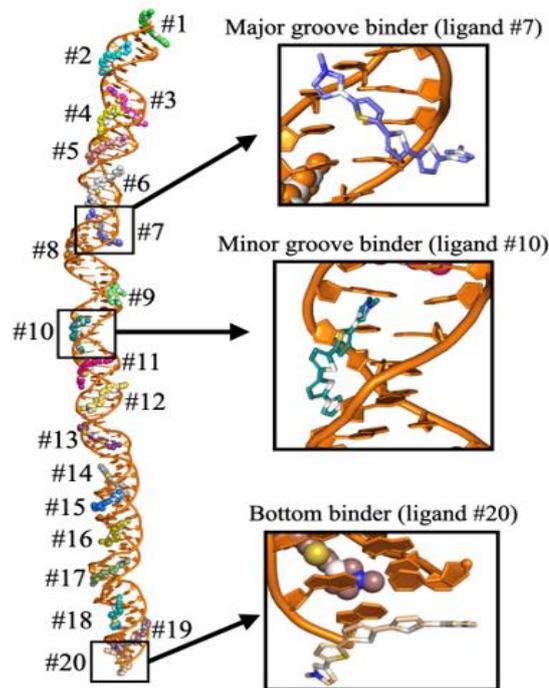
En Figure 30, sur les spectres CD, une augmentation progressive de l'intensité du signal CD de l'ADN (235-500 nm) sans modification dans la forme et la position de la

bande est visualisée. Même si **T3Im** absorbe dans cette région spectrale, l'addition d'une quantité croissante en htDNA à chaque étape du titrage est à l'origine de l'augmentation du signal CD de l'ADN et de la bande d'absorption en dessous de 300 nm. De nouveau, un signal ICD est observé dans la région où seul l'oligothiophène absorbe (310-460 nm). À faible rapport de charge, le signal ICD présente un large pic positif à 397 nm et un pic négatif de faible intensité à 445 nm. Quand le rapport de charge augmente, le pic positif gagne en intensité tandis que le pic négatif perd en intensité. À partir d'un rapport de charge de 1.5, le pic négatif disparaît et le signal ICD présente un pic positif unique. Ces résultats sont analogues à ceux obtenus lors du titrage de **T3Im** par stDNA ce qui renforce davantage l'hypothèse selon laquelle, la longueur de l'ADN influence peu les propriétés chiroptiques.

### **Etude théorique de la complexation de T3Im avec un ADN double brin**

Récemment, le Dr. Mathieu Fossépré a étudié la complexation entre **T3Im** et un ADN double brin, dsR<sub>81</sub>, de manière théorique. D'une part, des calculs de docking moléculaire ont été réalisés afin d'obtenir des informations sur les modes de liaison entre **T3Im** et dsDNA à l'échelle atomique. D'autre part, des simulations de dynamique moléculaire ont été menées pour évaluer la stabilité et la dynamique des complexes **T3Im**/dsR<sub>81</sub> à un rapport de charge de 0.25. Les calculs de docking moléculaires ont révélé trois modes de liaison possibles pour **T3Im** : un mode de liaison au sillon mineur, un mode de liaison au sillon majeur ainsi qu'un mode de liaison en haut et en bas le long de la double hélice de dsR<sub>81</sub> (Figure 31). Parmi les trois modes de liaison, le mode de liaison au sillon mineur est le plus stable et implique principalement une stabilisation par interactions électrostatiques et de van der Waals tandis que des interactions par  $\pi$ -stacking sont favorisées dans le cas du mode de liaison le moins stable, le mode de liaison en haut et en bas de la double hélice de dsR<sub>81</sub>. De plus, des calculs de RMSD indiquent clairement que la dynamique des ligands **T3Im** est dépendante du mode de liaison. En effet, les ligands **T3Im** localisés dans le sillon majeur de l'ADN présentent une mobilité accrue comparé à ceux situés dans le sillon mineur de l'ADN. La conformation adoptée par les ligands **T3Im** est également fortement dépendante de leur mode de liaison. Ainsi, les deux angles diédraux entre les unités thiophènes peuvent varier entre 20° et 90° selon le mode de liaison. Cette étude théorique a

également montré que les interactions entre les ligands **T3Im** et dsR<sub>81</sub> affectent la structure hélicoïdale de l'ADN double brin (réduction de la taille du sillon majeur et diminution de la flexibilité).



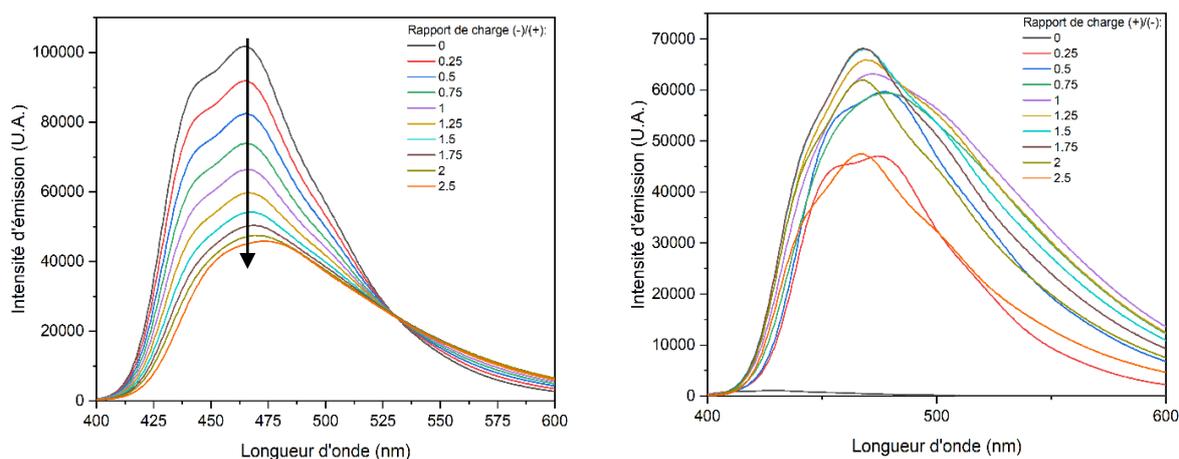
*Figure 31 : Résultat de docking moléculaire : interactions entre 20 ligands T3Im le long de dsR<sub>81</sub> avec un zoom sur les trois modes de liaison : au sillon mineur, au sillon majeur et de stacking à l'extrémité de la structure hélicoïdale de dsR<sub>81</sub>.*

Cette étude théorique permet de mieux comprendre la complexation entre **T3Im** et un ADN double brin et fournit de nombreux indices sur les modes de liaison. Il est important de mentionner que l'ADN double brin utilisé lors de cette étude théorique est beaucoup plus court que l'ADN de saumon (environ 200 fois plus court) et l'ADN d'hareng (environ 2000 fois plus court). Cependant, d'un point de vue de la modélisation, le complexe T3Im/dsR<sub>81</sub> est déjà un système conséquent qui nécessite un temps de calcul élevé. Par conséquent, il est difficile d'étudier théoriquement des assemblages T3Im/dsDNA avec des ADN plus longs que dsR<sub>81</sub>.

Par ailleurs, les systèmes **T3Im**/dsR<sub>81</sub> ont été étudiés de manière théorique uniquement à un faible rapport de charge (0.25). En ce sens, augmenter le nombre de ligand pouvant interagir avec dsDNA serait pertinent pour investiguer l'effet du rapport de charge sur les modes de liaison, la stabilité et la dynamique des complexes **T3Im**/dsDNA.

- *Titration de fluorescence de T3Im par stDNA*

Dans le cadre de sa thèse, Maxime Leclercq a montré que **T3Im** présente des propriétés de fluorescence intéressantes (émission de fluorescence élevée, signal de fluorescence stable, absence de photoblanchiment) lorsqu'il interagit avec un oligonucléotide double brin, dsR<sub>81</sub>. [43] En particulier, **T3Im** a été exploité en tant que sonde optique pour la détection de la méthylation de l'ADN par *HpaII*. [43] Cependant, l'évolution des propriétés de fluorescence de **T3Im** en présence d'ADN et l'activité enzymatique de *HpaII* ont été étudiés uniquement en utilisant un court oligonucléotide. Dès lors, il est intéressant d'investiguer les propriétés optiques de **T3Im** lors de son interaction avec un ADN génomique tel que stDNA et/ou htDNA afin de comprendre l'influence de la séquence et de la longueur sur les propriétés de fluorescence. Dans ce contexte, des titrages de fluorescence de **T3Im** par stDNA et de stDNA par **T3Im** ont été réalisés. Les résultats sont montrés en Figure 32.

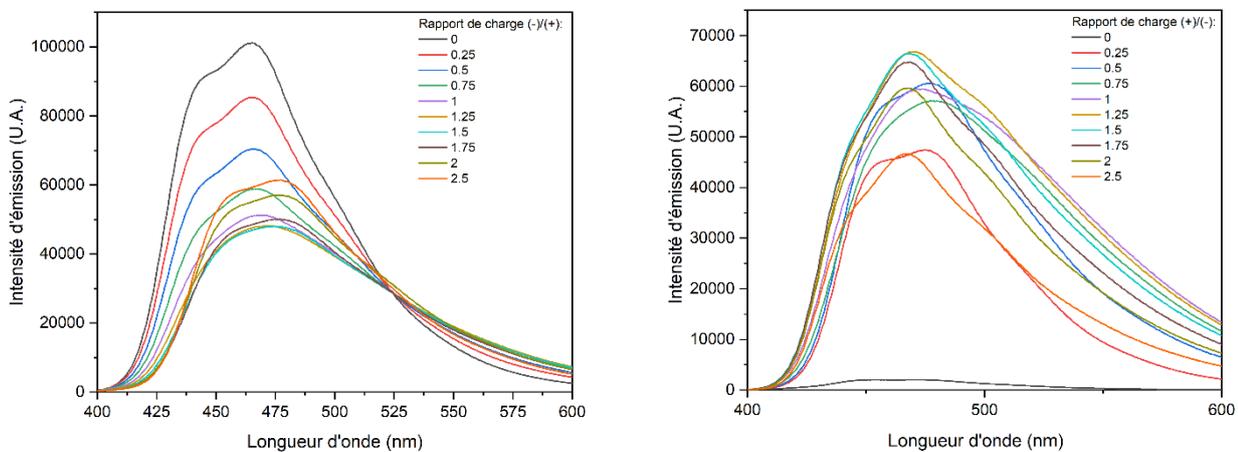


**Figure 32** : Spectres de fluorescence du titrage de T3Im par stDNA (à gauche) et de stDNA par T3Im (à droite). Les expériences ont été menées en solution aqueuse tamponnée (H<sub>2</sub>OMQ/TE), T = 20°C, pH = 7.4. [T3Im] = 120 μM (à gauche) et [stDNA] = 0.076 μM (à droite), λ<sub>exc</sub> = 370 nm.

**T3Im** pur montre deux pics d'émission caractéristiques. Un λ<sub>max</sub> 465 nm et un épaulement à 445 nm. Lors du titrage de **T3Im** par stDNA (Figure 32 à gauche), l'intensité des deux signaux de fluorescence décroît graduellement avec l'ajout de quantité croissante en stDNA. À partir d'un rapport de charge de 1.5, le pic situé à 445 nm n'est pratiquement plus distinguable et un faible redshift apparaît pour le pic à 465

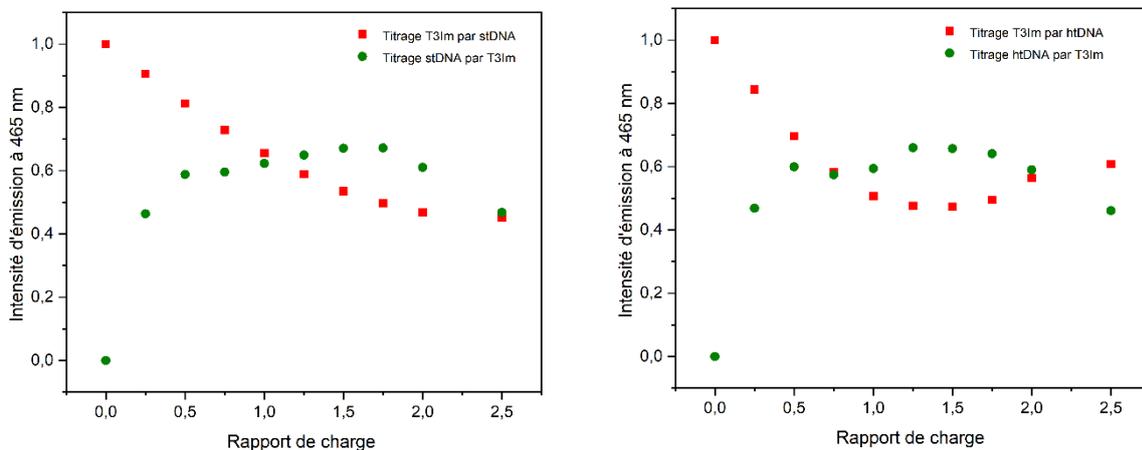
nm ( $\Delta\lambda_{\max} = 2$  nm). Ce déplacement vers le rouge augmente jusqu'à la fin du titrage ( $\Delta\lambda_{\max} = 7$  nm). Pour le titrage inverse, lorsque stDNA est titré par **T3Im** (Figure 32 à droite), deux effets sont observés. Premièrement, l'intensité de fluorescence augmente avec l'addition de la concentration en stDNA jusqu'à un rapport de charge de 1.5. À partir d'un rapport de charge de 1.75, l'effet inverse se manifeste. Deuxièmement, la forme du signal de fluorescence change fortement au-delà d'un rapport de charge de 0.5. Les deux pics se confondent et mènent ainsi à la formation d'une bande de fluorescence plus large.

Les titrages de **T3Im** par htDNA et de htDNA par **T3Im** ont également été réalisés dans les mêmes conditions afin d'étudier l'effet de la longueur de l'ADN sur les propriétés de fluorescence. Les résultats sont montrés en Figure 33.



**Figure 33** : Spectres de fluorescence du titrage de **T3Im** par htDNA (à gauche) et de htDNA par **T3Im** (à droite). Les expériences ont été menées en solution aqueuse tamponnée ( $H_2O$  MQ/TE),  $T = 20^\circ C$ ,  $pH = 7.4$ .  $[T3Im] = 120 \mu M$  (à gauche) et  $[htDNA] = 0.0076 \mu M$  (à droite),  $\lambda_{exc} = 370$  nm.

Le titrage de **T3Im** par htDNA (Figure 33 à gauche) présente une tendance similaire (au niveau de la forme, de l'intensité et de la position des pics de fluorescence) à ce qui a été observé avec stDNA jusqu'à un rapport de charge de 1.5. En revanche, la situation est différente au-delà de ce rapport de charge : l'effet inverse est observé et l'intensité du signal de fluorescence augmente jusqu'à la fin du titrage. Notons également que l'étendue du redshift est plus importante comparée à stDNA ( $\Delta\lambda_{\max} = 12$  nm pour htDNA comparé  $\Delta\lambda_{\max} = 7$  nm pour stDNA). De nouveau, les titrages de stDNA par **T3Im** et de htDNA par **T3Im** fournissent des résultats semblables. L'évolution de l'intensité du pic de fluorescence à 465 nm en fonction du rapport de charge est représentée pour l'ensemble des titrages en Figure 34.



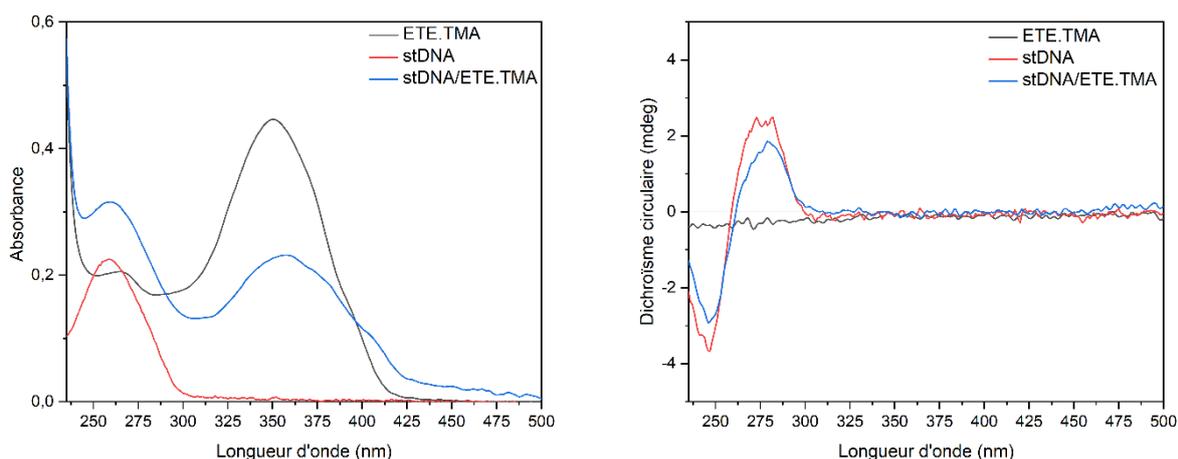
**Figure 34** : Evolution de l'intensité du signal de fluorescence à 465 nm normalisée en fonction du rapport de charge pour les titrages de fluorescence de **T3Im** par stDNA et de stDNA par **T3Im** (à gauche) et pour les titrages de fluorescence de **T3Im** par htDNA et de htDNA par **T3Im** (à droite).

L'évolution de l'intensité du pic à 465 nm en fonction du rapport de charge suggère que lors de la complexation entre **T3Im** et dsDNA (stDNA et htDNA), le signal de fluorescence de **T3Im** perd en intensité si le nombre de charges positives (concentration en oligothiophène) prédomine sur le nombre de charges négatives en solution (concentration en ADN). À l'inverse, si le nombre de charges négatives prédomine sur le nombre de charges positives, l'intensité du signal de fluorescence gagne en intensité (surtout pour htDNA). Cet effet « turn-on » a déjà été observé lors de l'étude des propriétés de fluorescence de **T3Im** en interaction avec un court oligonucléotide double brin, dsR<sub>81</sub>. [43]

Finalement, l'ensemble des résultats obtenus par spectroscopie de fluorescence sont cohérents avec ce qui a été observé lors des titrages UV-Vis et CD en suggérant que la longueur de l'ADN (entre stDNA et htDNA) influence peu les propriétés chiroptiques de **T3Im** (absorption, émission et dichroïsme circulaire). Malheureusement par manque de produit, aucun titrage de fluorescence avec **ETE.TMA** n'a pu être réalisé. Il serait également intéressant dans le futur d'étudier les propriétés de fluorescence de **ETE.TMA** seul et en interaction avec dsDNA (stDNA et htDNA) pour avoir un point de comparaison.

- *Titration spectroscopie de ETE.TMA par stDNA*

De manière similaire à **T3Im**, le second court oligothiophène, **ETE.TMA**, a été étudié seul et en interaction avec stDNA dans un premier temps et avec htDNA dans un second temps pour étudier si la nature et la localisation des substituants cationiques influencent le processus d'auto-assemblage en solution et les propriétés chiroptiques des assemblages oligothiophène/ADN.

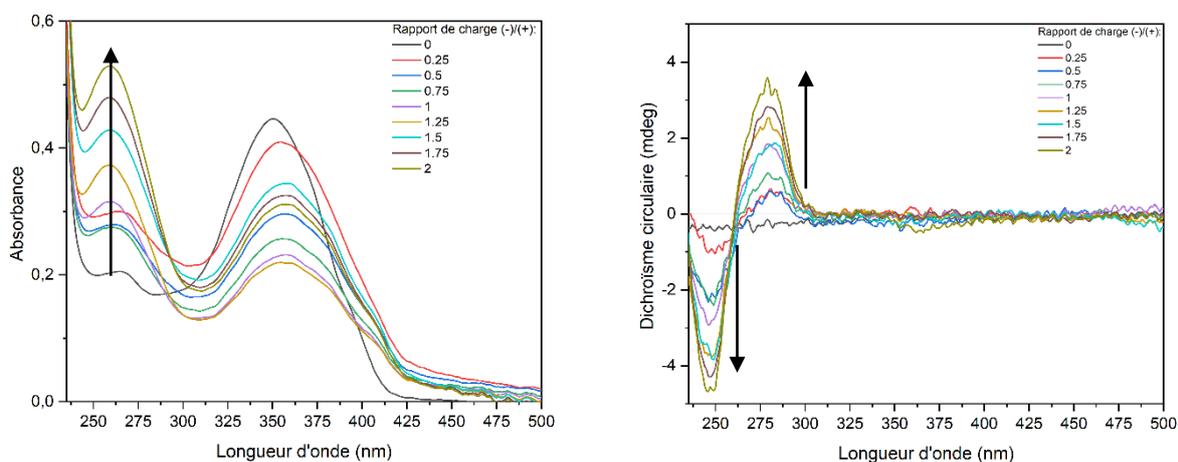


**Figure 35** : Spectres UV-Vis et CD de ETE.TMA (en noir), de stDNA (en rouge) et d'un mélange stDNA/ETE.TMA à un rapport de charge de 1 à 20°C et à un pH de 7.4 dans un tampon TE.

En Figure 35, le spectre UV-Vis de **ETE.TMA** présente une bande d'absorption principale entre 300 nm et 425 nm avec  $\lambda_{\max}$  situé à 350 nm attribuée à la transition  $\pi$ - $\pi^*$ . **ETE.TMA** absorbe également en dessous de 300 nm, dans la région spectrale de stDNA. Ce second oligothiophène cationique absorbe plus fortement que **T3Im** dans cette gamme de longueur d'onde. Un déplacement vers le rouge et une diminution de

l'intensité de la bande d'absorption de **ETE.TMA** apparaissent lorsque **T3Im** est mélangé avec stDNA à un rapport de charge de 1. De manière similaire à **T3Im**, **ETE.TMA** est un court oligothiophène achiral qui ne montre par conséquent aucune signature CD intrinsèque lorsqu'il est pur. Contrairement aux complexes **T3Im/stDNA** et **T3Im/htDNA**, aucun signal ICD n'est observé dans la région visible où l'oligomère conjugué absorbe (300-425 nm) lorsqu'il est mélangé en solution avec stDNA à un rapport de charge de 1.

Similairement à ce qui a été fait précédemment avec **T3Im**, un titrage spectroscopique (UV-Vis et CD) de **ETE.TMA** par stDNA a été mené pour étudier et mieux comprendre l'évolution des signaux chiroptiques en fonction du rapport de charge ADN/oligomère. Durant le titrage, la concentration de **ETE.TMA** a été maintenue à une valeur constante. Le titrage spectroscopique a été réalisé uniquement dans un sens en raison de la faible quantité de **ETE.TMA** à notre disposition.



**Figure 36** : Spectres UV-Vis (à gauche) et CD (à droite) du titrage de **ETE.TMA** par stDNA obtenus à différents rapports de charge stDNA/**ETE.TMA**. Les spectres ont été enregistrés en solution aqueuse tamponnée (H<sub>2</sub>O MQ/TE). [**ETE.TMA**] = 120 µM, T = 20°C, pH = 7.4.

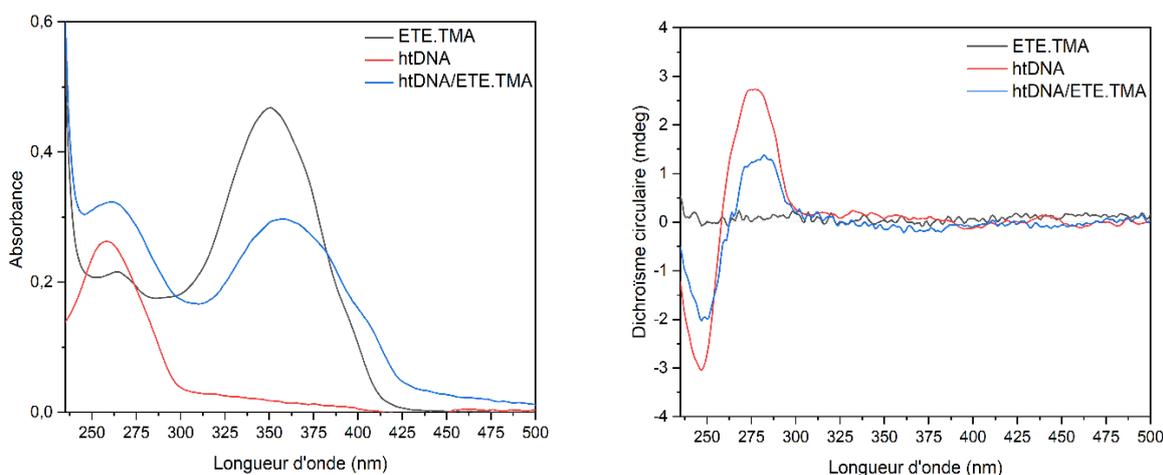
En Figure 36, les spectres UV-Vis obtenus lors du titrage montrent différents effets. Premièrement, un shift vers la rouge de  $\lambda_{\max}$  de **ETE.TMA** apparaît ( $\Delta\lambda_{\max} = 4$  nm) à un rapport de charge 0.25. L'évolution de la position  $\lambda_{\max}$  de **T3Im** en fonction du rapport de charge ne montre aucune tendance générale.

Néanmoins, en présence de stDNA, le déplacement maximal de la bande d'absorption de **ETE.TMA** est plus faible comparé au même cas avec **T3Im**. ( $\Delta\lambda_{\max} = 8$  nm pour **ETE.TMA** contre  $\Delta\lambda_{\max} = 19$  nm pour **T3Im**) (Figures S1 et S3). Le shift observé témoigne d'une probable interaction entre **ETE.TMA** et htDNA. La bande d'absorption de **ETE.TMA** tend à perdre en intensité lorsque la concentration en stDNA augmente au cours du titrage. Cette tendance diffère de celle observée lors du titrage de **T3Im** par stDNA où une augmentation de l'intensité apparaissait à partir d'un rapport de charge de 1.25 (Figures S1 et S3). En outre, la bande d'absorption en dessous de 300 nm gagne en intensité sans qu'aucune modification dans la forme et la position des bandes ne soit observée.

Les spectres CD indiquent que l'intensité du signal CD de l'ADN (225-300 nm) croît sans qu'aucun changement dans la forme et dans la position de la bande CD ne soit détecté avec le rapport de charge. De nouveau, la concentration croissante en stDNA au cours du titrage spectroscopique est probablement à l'origine de l'augmentation du signal CD de l'ADN et de la bande d'absorption en dessous de 300 nm. L'absence de shift dans le signal CD de l'ADN suggère que **ETE.TMA** influence moins la conformation native de ADN de saumon comparé à **T3Im**. Dans les deux cas, les perturbations sont mineures et la forme B de l'ADN est probablement conservée. Contrairement à ce qui a été observé lors de la complexation de **T3Im** avec stDNA, aucune nouvelle bande ICD n'apparaît dans la région où l'oligothiophène conjugué absorbe (300-425 nm) quel que soit le rapport de charge considéré. L'absence de signal ICD suggère qu'il n'y a aucun transfert de chiralité de l'ADN à **ETE.TMA**. Autrement dit, la complexation entre **ETE.TMA** et stDNA ne mène pas à une organisation chirale de l'oligothiophène. Néanmoins, il est clair que **ETE.TMA** interagit avec stDNA en raison des changements observés dans la bande d'absorption de l'oligothiophène (redshift et diminution de l'intensité au cours du titrage). Afin d'obtenir plus d'informations sur l'interaction entre **ETE.TMA** et le processus de d'auto-assemblage (mode de liaison, stabilité et dynamique du complexe **ETE.TMA**/DNA, origine de l'absence de ICD), il serait intéressant de réaliser une étude théorique approfondie.

- *Titration spectroscopique de ETE.TMA par htDNA*

De la même manière que **T3Im**, **ETE.TMA** a été étudié en interaction avec l'ADN d'hareng (20000 paires de bases), dans le but de comprendre l'effet de la longueur d'ADN sur le processus d'auto-assemblage et sur les propriétés chiroptiques des complexes ADN/**ETE.TMA**.

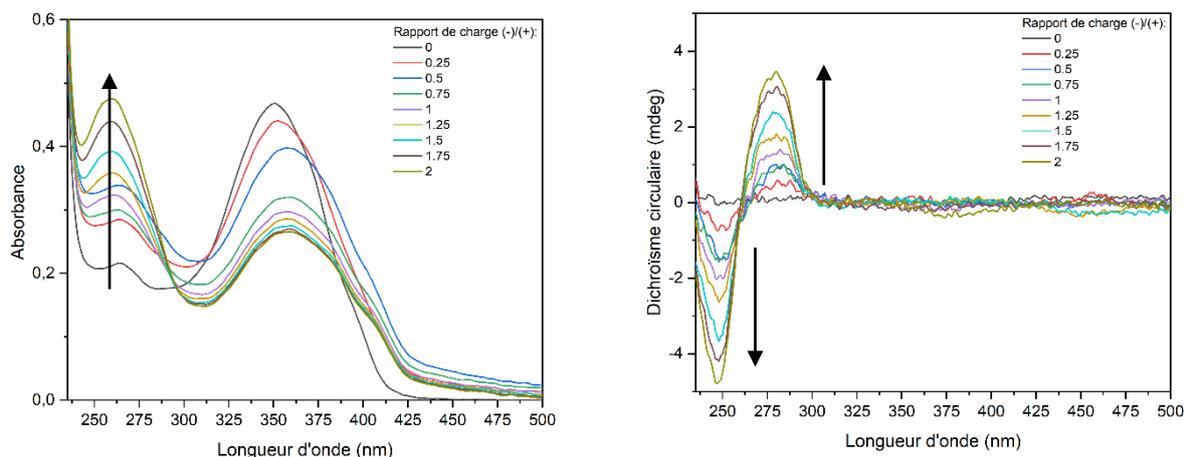


**Figure 37** : Spectres UV-Vis et CD de **ETE.TMA** (en noir), de htDNA (en rouge) et d'un mélange **ETE.TMA**/htDNA à un rapport de charge de 1 à 20°C et à un pH de 7.4 dans un tampon TE.

Les résultats obtenus sont très similaires à ceux observés lors de l'interaction entre **ETE.TMA** et stDNA (Figure 37). Le même constat avait été fait précédemment lors de l'étude de l'interaction de **T3Im** avec stDNA et htDNA. Comparé au spectre UV-Vis des composés purs, deux principaux effets sont observés en présence de htDNA. Premièrement, un déplacement vers de plus grandes longueurs d'ondes et une diminution de l'intensité de la bande d'absorption principale de **ETE.TMA**. Deuxièmement, une augmentation de l'intensité de la bande d'absorption dans une gamme de longueur d'onde allant de 235 nm à 300 nm. Comme observé précédemment lors de la complexation entre **ETE.TMA** et stDNA, aucun signal ICD n'apparaît dans la région d'absorbance de l'oligomère (300-425 nm) lorsque **ETE.TMA** est mélangé en solution avec htDNA à un rapport de charge de 1.

Un titrage spectroscopique de **ETE.TMA** par htDNA a été mené pour suivre l'évolution des signaux chiroptiques en fonction du rapport de charge ADN/oligothiophène afin

d'obtenir plus d'informations sur l'auto-assemblage et sur les interactions **ADN/ETE.TMA**.



**Figure 38** : Spectres UV-Vis (à gauche) et CD (à droite) du titrage de ETE.TMA par htDNA obtenus à différents rapports de charge ETE.TMA /htDNA. Les spectres ont été enregistrés en solution aqueuse tamponnée ( $H_2O$  MQ/TE).  $[ETE.TMA] = 120 \mu M$ ,  $T = 20^\circ C$ ,  $pH = 7.4$ .

En Figure 38, sur les spectres UV-Vis, un déplacement vers le rouge de la bande d'absorption principale de l'oligomère (300-425 nm) apparaît à un rapport de charge de 0.25 ( $\Delta\lambda_{max} = 3$  nm) et augmente légèrement jusqu'à un rapport de charge de 0.75 ( $\Delta\lambda_{max} = 10$  nm). Cette tendance est semblable à ce qui a été observé lors du titrage spectroscopique de **T3Im** par htDNA (Figures S2 et S4). De nouveau, le décalage vers le rouge observé témoigne d'une probable interaction entre htDNA et **ETE.TMA**. En outre, au cours du titrage, la bande d'absorption en dessous de 300 nm gagne en intensité sans qu'aucun changement dans la forme et dans la position du  $\lambda_{max}$  ne soit constaté.

Comme montré par la Figure 38, lorsque le rapport de charge htDNA/**ETE.TMA** augmente, l'intensité du signal CD de l'ADN (225-300 nm) gagne en intensité. De plus, quel que soit le rapport de charge considéré, aucun shift vers de plus petites ou plus grandes longueurs d'ondes du signal CD n'apparaît. Le même constat a été fait lors de la complexation entre **ETE.TMA** et stDNA. Comme lors de ce titrage, le gain d'intensité du signal CD de l'ADN et de la bande d'absorption entre 300 nm et 425 nm est attribué à l'augmentation de la concentration en htDNA. Enfin, comme constaté lors du titrage précédent et contrairement à ce qui a été observé lors de la

complexation de **T3Im** avec stDNA, aucune nouvelle bande ICD n'apparaît dans la région où l'oligothiophène conjugué absorbe (300-425 nm) quel que soit le rapport de charge considéré. Ces résultats sont analogues avec ceux obtenus lors de l'interaction de **ETE.TMA** avec stDNA. Dans le cas de **ETE.TMA**, l'interaction avec les deux ADN double brin ne semble pas conduire à la formation de structures hybrides chirales.

- *Comparaison entre les titrages spectroscopiques*

Pour l'ensemble des complexes supramoléculaires oligothiophène/dsDNA, l'interaction entre le court oligothiophène  $\pi$ -conjugué cationique et dsDNA se manifeste à travers : un redshift de la bande d'absorption de l'oligomère, des changements dans le signal CD de l'ADN (perte d'intensité et redshift uniquement pour l'interaction avec **T3Im**) et l'apparition d'un signal ICD dans la région d'absorbance de l'oligomère conjugué uniquement dans le cas de **T3Im**. Le redshift observé dans la bande d'absorbance principale de **T3Im** et **ETE.TMA** pourrait être attribué à un réarrangement conformationnel de l'oligothiophène suite à l'interaction avec l'ADN témoignant d'une conformation planaire et conjuguée adoptée par l'oligomère au sein des complexes.[12,40] Il est important de mentionner que pour un même dsDNA, le redshift est plus important dans le cas de **T3Im**. En outre, **ETE.TMA** semble moins perturber la conformation native de dsDNA (stDNA et htDNA) comparé à **T3Im** comme le signal CD caractéristique de l'ADN est moins sujet à des changements au cours du titrage (absence de redshift). Dans les deux cas, les perturbations sont mineures et la forme B de l'ADN est probablement conservée. La diminution de l'intensité du signal CD de l'ADN observée lors des titrages de stDNA et htDNA par les oligomères pourrait indiquer un couplage réduit entre les nucléobases suite à l'interaction avec l'oligomère.[12,68] Pour un même oligothiophène  $\pi$ -conjugué cationique, les analyses UV-Vis et CD ont fourni des résultats similaires avec stDNA et htDNA. Autrement dit, les propriétés chiroptiques varient peu avec la longueur de l'ADN. Par conséquent, les signaux chiroptiques ne semblent pas être spécifiques aux dsDNA utilisés lors de ce mémoire. En revanche, la nature et la localisation des substituants cationiques semblent jouer un rôle important dans le processus d'auto-assemblage et dans l'interaction avec dsDNA (stDNA et htDNA). En effet, pour un même dsDNA (stDNA ou htDNA), l'interaction avec **T3Im** mène à la formation d'un signal ICD dans la région de

l'oligomère contrairement à **ETE.TMA** ou aucun signal ICD apparait. Ces différences pourraient résulter d'un mode interaction différent en raison de différences structurales. **T3Im** et **ETE.TMA** ont un cœur terthiophène semblable mais des groupements cationiques différents. Dans le cas de **T3Im**, les deux groupements imidazolium terminaux sont conjugués au cœur terthiophène tandis que dans le cas de **ETE.TMA**, le groupement triméthylammonium est situé à l'extrémité de la chaîne alkyle-éther sur le thiophène central. Le groupement triméthylammonium est plus petit (charge positive est plus localisée) comparé au groupement imidazolium. Ainsi, les interactions électrostatiques entre **ETE.TMA**-dsDNA et **T3Im**-dsDNA sont différentes. Dans ce contexte, il serait intéressant de réaliser une étude théorique, basée sur une approche similaire à celle utilisée pour **T3Im** (voir partie théorique), des complexes **ETE.TMA**/dsDNA afin d'obtenir plus d'informations sur le processus d'auto-assemblage et leur interaction au niveau atomistique. De plus, la forme du signal ICD de **T3Im** dépend fortement du rapport de charge considéré. Ainsi, si le nombre de charges négatives prédomine en solution, le signal ICD tend à être composé d'une bande positive large et intense à 397 nm. Généralement, une bande ICD positive est caractéristique de ligands qui se lient au sillon mineur de l'ADN. En revanche, si le nombre de charges positives prédomine en solution, le signal ICD (-/+ ) tend à être composé d'une bande positive large et intense à 397 nm et d'une bande négative peu intense à 445 nm. Un signal ICD bi-signé (-/+) est typique d'un couplage excitonique. De plus, le signe de ce signal ICD bi-signé (-/+) pourrait suggérer que **T3Im** adopte une conformation chirale de pas gauche suite à son interaction avec dsDNA (stDNA ou htDNA).[12,40] Cependant, l'apparition du signal ICD pour **T3Im** pourrait résulter de la combinaison de différents facteurs : un réarrangement conformationnel suite à la liaison au sillon mineur de l'ADN, une empreinte chirale induite sur la structure électronique, une contribution de transfert de charge à la transition électronique, un couplage excitonique non-dégénéré entre l'ADN et **T3Im** et enfin un couplage excitonique dégénéré entre les ligands **T3Im** proches.[55,67]

### III.3 Estimation de la constante d'association des complexes oligothiophène $\pi$ -conjugué cationique/DNA

En vue de caractériser les interactions oligomère/ADN en solution, nous avons évalué l'affinité entre chacun des oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques et chacun des deux ADN double brin (stDNA et htDNA). À cette fin, des expériences de compétition d'association entre les ADN et une petite molécule, le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) versus l'oligothiophène (**T3Im** et **ETE.TMA**) ont été menées par spectroscopie de fluorescence. Le DAPI est un marqueur fluorescent spécifique à l'ADN couramment employé pour des applications biologiques.[69,70] La structure chimique de ce fluorochrome est représentée en Figure 39.

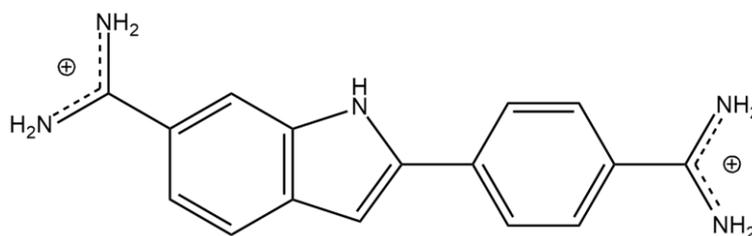


Figure 39 : structure chimique du DAPI.

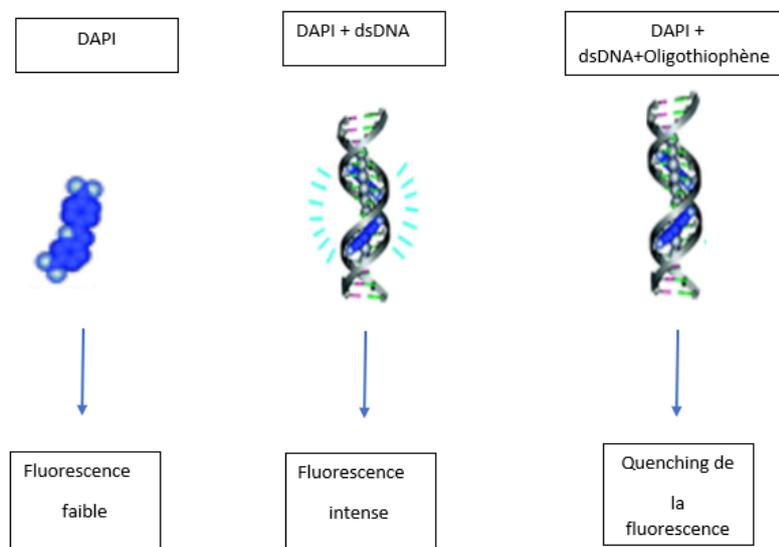
Le DAPI se lie préférentiellement dans le sillon mineur de l'ADN double brin dans des régions riches en séquence A-T. Un second mode de liaison par intercalation a également été mis en évidence dans le cas d'ADN double brin riche en séquence G-C.[67,69,70] L'interaction entre le DAPI et l'ADN modifie grandement les propriétés chiroptiques de ce fluorochrome. Parmi ces changements, une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du DAPI apparait suite à la liaison au sillon mineur de l'ADN. La présence d'un second ligand susceptible de se lier au sillon mineur de l'ADN peut mener progressivement à un quenching de la fluorescence du système DAPI/dsDNA. Ce phénomène de quenching de la fluorescence est dû à la compétition entre le DAPI et le ligand pour se lier à l'ADN. Ainsi, suite de l'addition de quantité croissante de ligand en solution, ces derniers remplacent progressivement les

molécules de DAPI, causant une diminution progressive de l'intensité de fluorescence du système DAPI/dsDNA. Les données de fluorescence peuvent fournir des informations sur le mode de liaison et sur l'affinité du ligand envers l'ADN. À partir de l'équation de Stern-Volmer (voir-ci-dessous), la constante de liaison ( $K_a$ ) entre le ligand et l'ADN peut être estimée en représentant l'évolution du rapport entre l'intensité de fluorescence en absence d'ADN ( $I_0$ ) et en présence d'ADN ( $I$ ) en fonction de la concentration en ligand en solution ( $[L]$ ). La pente de la régression linéaire correspond à la valeur de la constante d'association  $K_a$ . [71]

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv} \cdot [L]$$

$I_0$  et  $I$  représente respectivement l'intensité de fluorescence en absence du ligand et en présence du ligand,  $[L]$  correspond à la concentration en ligand et  $K_{sv}$  est la constante de Stern-Volmer.

Les expériences de liaison compétitive entre le DAPI et les oligothiophènes pour l'ADN (stDNA et htDNA) sont basées sur ce phénomène de quenching de la fluorescence du système DAPI/dsDNA par l'oligothiophène. Pour rappel, l'étude théorique sur le complexe **T3Im**/dsR<sub>81</sub> a révélé que **T3Im** se lie principalement au sillon mineur de l'ADN. Le même mode de liaison à l'ADN a été envisagé pour **ETE.TMA** en raison des ressemblances structurales.

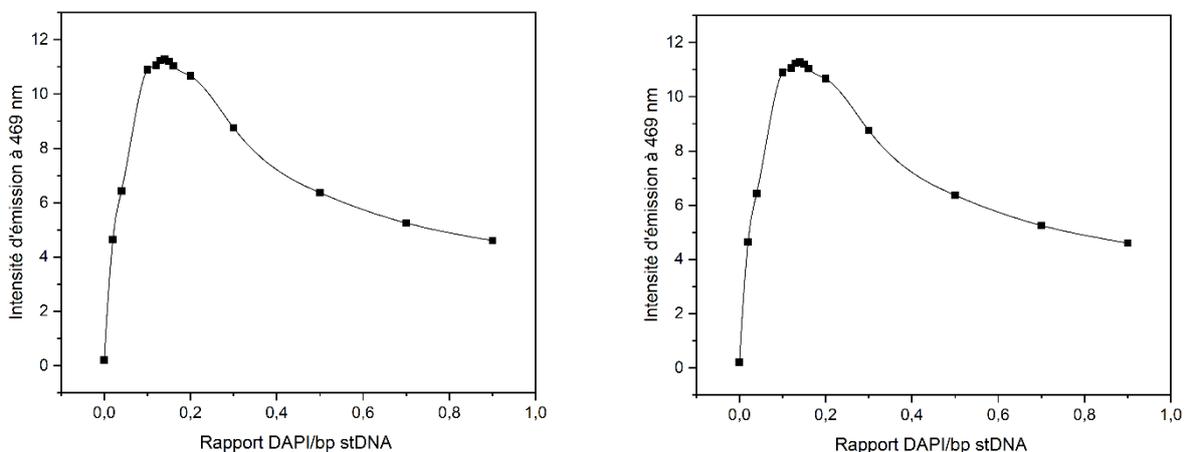


**Figure 40** : schéma représentant le principe des expériences de compétition d'association entre les ADN et le DAPI versus les oligothiophènes.

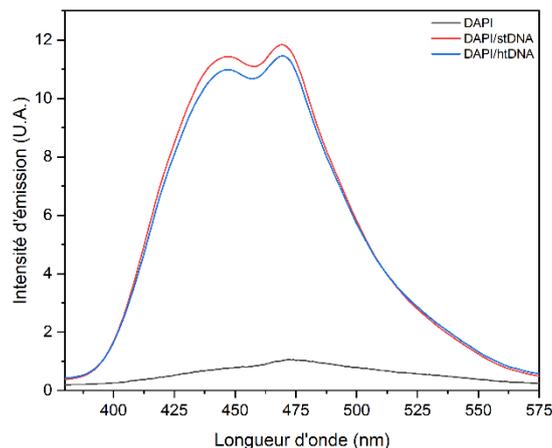
### III.3.1 Fluorescence des complexes DAPI/ADN

La stœchiométrie de complexation DAPI/dsDNA a été estimée via un « Job plot ». L'analyse du « Job plot » révèle qu'une intensité de fluorescence maximale est atteinte à un rapport DAPI/bp de 0.14 pour stDNA et htDNA indiquant clairement qu'un remplissage du sillon mineur de l'ADN se déroule à ce rapport DAPI/bp (Figure 41). Il est à souligner que *N.H. List et al* ont également obtenu une valeur similaire lors de la complexation entre le DAPI et un court oligonucléotide (dA.dT) double brin.[67] Pour l'ensemble des expériences de déplacement, la concentration en dsDNA (stDNA htDNA) et en DAPI a donc été ajustée pour respecter la stœchiométrie de complexation de 0.14 DAPI/bp afin d'obtenir une intensité de fluorescence du DAPI maximale au début du titrage de fluorescence.

La figure 42 montre le spectre du DAPI pur ainsi que des complexes DAPI/stDNA et DAPI/htDNA à un rapport DAPI/bp DNA de 0.14. La fluorescence du DAPI augmente considérablement en présence de dsDNA (stDNA et htDNA), environ d'un facteur 10 par rapport à la fluorescence du DAPI en absence d'ADN. Selon *A. Biancardi et al.*, une flexibilité géométrique réduite et une polarisation moindre du DAPI lorsqu'il est lié à dsDNA (stDNA et htDNA) peuvent être à l'origine de l'amélioration de la fluorescence.[72]



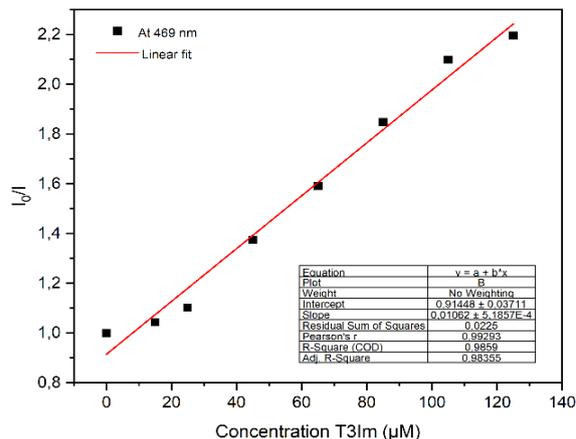
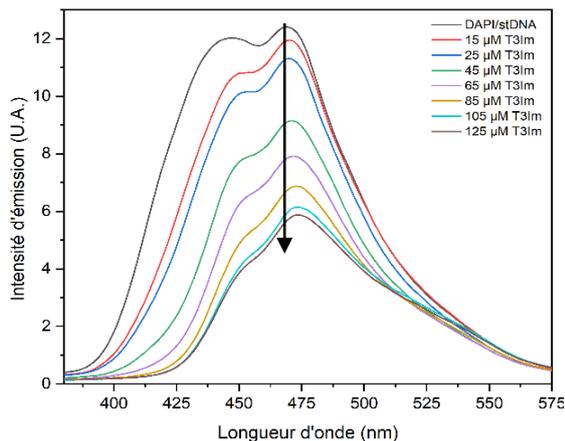
**Figure 41** : « Job plot » de l'intensité d'émission de fluorescence à 469 nm en fonction du rapport DAPI/bp stDNA (à gauche) et DAPI/bp htDNA (à droite).



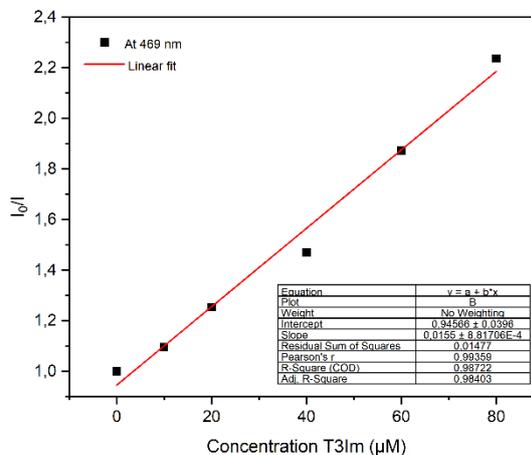
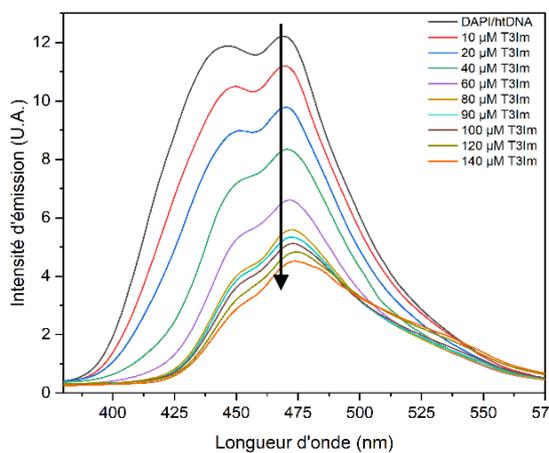
**Figure 42** : Spectre d'émission du DAPI seul (courbe en noir), du complexe DAPI/stDNA (courbe en rouge) et du complexe DAPI/htDNA (courbe en bleue).  $[T3Im] = 28 \mu M$ ,  $[stDNA] = 0.1 \mu M$ ,  $[htDNA] = 0.01 \mu M$ .

### III.3.2 Estimation de la constante d'association des complexes T3Im/dsDNA

Les Figures 43 et 44 représentent respectivement le spectre d'émission de fluorescence du DAPI lié à stDNA et htDNA en absence de **T3Im** (courbe noire) et en présence de **T3Im**. Dans les deux cas, en absence de **T3Im**, l'intensité du signal de fluorescence du système DAPI/dsDNA (stDNA et htDNA) est maximale à un rapport DAPI/DNA de 0.14. Suite à l'addition de quantité croissante en **T3Im**, l'intensité de fluorescence du système DAPI/dsDNA décroît graduellement puisque les ligands **T3Im** entrent en compétition et remplacement progressivement les molécules de DAPI liées au sillon mineur de l'ADN (stDNA et htDNA). À partir d'une concentration précise en **T3Im** en solution, la fluorescence du système DAPI/stDNA ne diminue plus malgré l'ajout d'une nouvelle quantité d'oligothiophène du probablement à l'occupation de la majorité des sites de liaison du sillon mineur de l'ADN (stDNA et htDNA) par **T3Im**.



**Figure 43** : Spectres de fluorescence du DAPI lié à stDNA en absence de T3Im (courbe en noir) et en présence de quantité croissante de T3Im. Les spectres ont été enregistrés dans une solution tampon (H<sub>2</sub>O MQ/TE). [DAPI] = 28 μM, [stDNA] = 0.1 μM, λ<sub>exc</sub> = 364 nm, pH = 7.4, T = 20°C. L'expérience a été répétée trois fois dans les mêmes conditions.



**Figure 44** : Spectres de fluorescence du DAPI lié à htDNA en absence de T3Im (courbe en noir) et en présence de quantité croissante de T3Im. Les spectres ont été enregistrés dans solution tampon (H<sub>2</sub>O MQ/TE). [DAPI] = 28 μM, [htDNA] = 0.1 μM, λ<sub>exc</sub> = 364 nm, pH = 7.4, T = 20°C. L'expérience a été répétée trois fois dans les mêmes conditions.

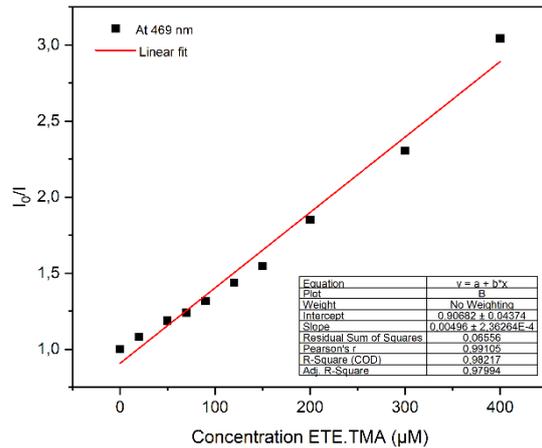
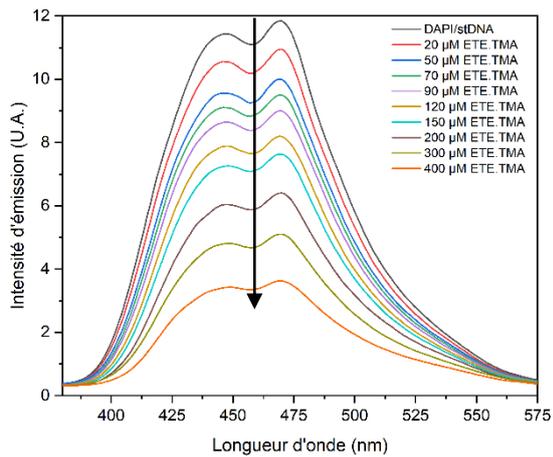
Les résultats obtenus lors des expériences de liaison compétitive entre le DAPI et **T3Im** envers stDNA et htDNA sont une preuve de la liaison de **T3Im** au sillon mineur de l'ADN double brin (stDNA et htDNA). Afin d'estimer l'affinité entre **T3Im** et dsDNA (stDNA et htDNA) via l'équation de Stern-Volmer, l'évolution du rapport entre l'intensité de fluorescence du système DAPI/dsDNA en absence de **T3Im** ( $I_0$ ) et en présence de **T3Im** ( $I$ ) en fonction de la concentration a été représentée graphiquement (Figures 43 et 44). La pente de la droite de la régression linéaire de  $I_0/I$  en fonction de  $[T3Im]$

correspond à la constante d'association entre **T3Im** et stDNA (Figure 43 à droite) et entre **T3Im** et htDNA (Figure 44 à droite). Les expériences de liaison compétitive ont été répétées trois fois et sont reproductibles. Les constantes d'association reportées sont des valeurs moyennes des expériences pour chaque complexe. À noter que la concentration en **T3Im** est exprimée en  $\mu\text{M}$ . Par conséquent, la valeur de la pente doit être multipliée par un facteur  $10^6$  pour obtenir une  $K_a$  qui s'exprime en  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ . L'affinité de liaison est respectivement de  $K_a = 1.26 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$  pour le complexe **T3Im/stDNA** et de  $K_a = 1.54 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$  pour le complexe **T3Im/htDNA**. Ces données révèlent que la longueur de l'ADN influence peu l'affinité de liaison de **T3Im** envers dsDNA.

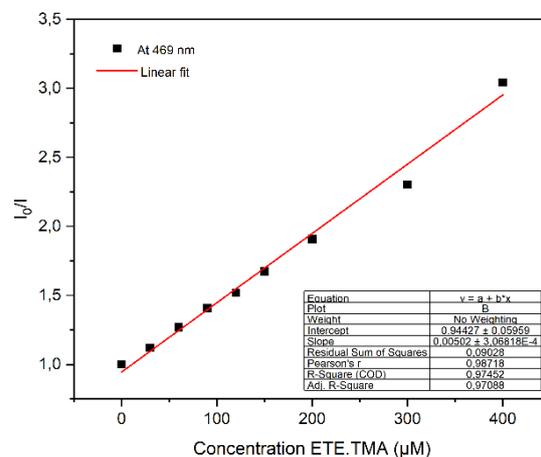
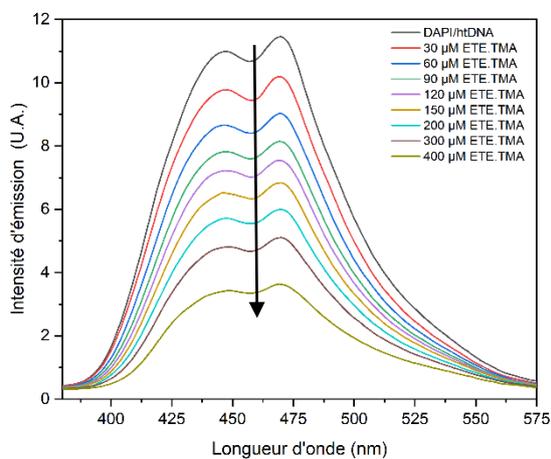
### III.3.3 Estimation de la constante d'association des complexes **ETE.TMA/dsDNA**

Les spectres d'émission du DAPI lié à stDNA et htDNA en absence de **ETE.TMA** (courbe noire) et en présence de **ETE.TMA** sont représentés en Figure 45 et 46. Les expériences de déplacement en utilisant le DAPI avec **T3Im** et **ETE.TMA** ont fourni des tendances similaires. De nouveau, l'intensité de fluorescence maximale du système DAPI/dsDNA (stDNA et htDNA) est obtenu en absence de **ETE.TMA** à un rapport DAPI/bp DNA de 0.14. Le signal de fluorescence du système DAPI/dsDNA perd en intensité suite à l'addition de quantité croissante en **ETE.TMA**. De nouveau, les ligands **ETE.TMA** entrent en compétition et remplacent peu à peu les molécules de DAPI liées à l'ADN, menant ainsi à un quenching progressif de la fluorescence du système DAPI. Ces résultats révèlent que **ETE.TMA** se lie probablement au sillon mineur de l'ADN. Cependant, pour une même concentration en oligothiophène, les expériences de déplacement du DAPI avec **ETE.TMA** montrent un signal de fluorescence du système DAPI/dsDNA plus intense comparé aux expériences de déplacement du DAPI avec **T3Im** ce qui atteste d'une affinité de **ETE.TMA** plus faible envers l'ADN. Une fois de plus, à partir de l'équation de Stern-Volmer, la constante d'association des complexes **ETE.TMA/stDNA** et **ETE.TMA/htDNA** a été estimée en représentant l'évolution du rapport entre  $I/I_0$  en fonction de  $[\text{ETE.TMA}]$  (Figure 45 et 46). La pente de la régression linéaire correspond à la valeur de  $K_a$ . L'affinité de **ETE.TMA** pour les deux dsDNA est respectivement de  $K_a = 3.86 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$  pour stDNA et de  $K_a = 4.67 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$  pour htDNA. Ces données confirment d'une part que **ETE.TMA** se lie plus faiblement au sillon mineur de l'ADN et d'autre part que la

longueur de l'ADN double brin affecte peu l'affinité ce qui est en cohérent avec les résultats obtenus lors des titrages spectroscopiques (UV-Vis, CD). Par ailleurs, la différence d'affinité entre les complexes **T3Im**/dsDNA et **ETE.TMA**/dsDNA s'explique probablement par la nature, la localisation et le nombre de groupements cationiques qui diffèrent entre les deux oligothiophènes menant à des interactions différentes avec l'ADN. En effet, **T3Im** possède deux charges positives, tandis que **ETE.TMA** n'en possède qu'une. Dès lors, les interactions électrostatiques entre l'ADN et **T3Im** sont plus fortes que pour **ETE.TMA**, ce qui explique en partie les différences de  $K_a$ . Dans le cas de **T3Im**, les groupements imidazolium terminaux sont conjugués au squelette terthiophène tandis que pour **ETE.TMA**, le groupement triméthylammonium est situé à l'extrémité de la chaîne alkyle-éther sur le thiophène central. Les ligands **T3Im** ont donc une longueur de conjugaison supérieure par rapport aux ligands **ETE.TMA**, ce qui pourrait mener à des interactions  $\pi$ -stacking plus fortes entre les unités thiophènes et les groupements aromatiques des nucléobases de l'ADN. De plus, les ligands **T3Im** qui se lient au sillon mineur de l'ADN sont principalement stabilisés par des interactions électrostatiques entre les groupements imidazolium et les groupements phosphodiester de l'ADN ainsi que par des contacts de van der Waals entre les bases de l'ADN et les atomes de soufre des unités thiophènes (voir partie théorique). Ces ligands sont orientés préférentiellement en syn- par rapport aux angles diédraux entre les trois unités thiophènes (voir partie théorique ci-dessous). En revanche, dans le cas de **ETE.TMA**, il est possible que seule la chaîne alkyle-éther latérale portant le substituant cationique soit localisée dans le sillon mineur de l'ADN et les ligands pourraient préférentiellement être orientés en anti- par rapport aux angles diédraux entre les trois unités thiophènes afin de maximiser les interactions par ponts hydrogène entre les groupements éther de **ETE.TMA** et les nucléobases de l'ADN. Ces hypothèses pourraient être vérifiées en réalisant des simulations de dynamique moléculaire et des calculs de docking moléculaire sur un système **ETE.TMA**/dsDNA.



**Figure 45 :** Spectres de fluorescence du DAPI lié à stDNA en absence de ETE.TMA (courbe en noir) et en présence de quantité croissante de ETE.TMA. Les spectres ont été enregistrés dans une solution tampon (H<sub>2</sub>O MQ/TE). [DAPI] = 28 μM, [stDNA] = 0.1 μM, λ<sub>exc</sub> = 364 nm, pH = 7.4, T = 20°C. L'expérience a été répétée trois fois dans les mêmes conditions.



**Figure 46 :** Spectres de fluorescence du DAPI lié à htDNA en absence de ETE.TMA (courbe en noir) et en présence de quantité croissante de ETE.TMA. Les spectres ont été enregistrés dans une solution tampon (H<sub>2</sub>O MQ/TE). [DAPI] = 26 μM, [htDNA] = 0.1 μM, λ<sub>exc</sub> = 364 nm, pH = 7.4, T = 20°C. L'expérience a été répétée trois fois dans les mêmes conditions.

**Tableau 1 :** Table reprenant les valeurs de K<sub>a</sub> des différents complexes oligothiophène π-conjugué cationique/dsDNA.

	T3Im/stDNA	T3Im/htDNA	ETE.TMA/stDNA	ETE.TMA/htDNA
K <sub>a</sub> (L.mol <sup>-1</sup> )	1.26 X 10 <sup>4</sup>	1.54 X 10 <sup>4</sup>	3.86 X 10 <sup>3</sup>	4.67 X 10 <sup>3</sup>

Il serait intéressant de comparer l'affinité des complexes oligothiophènes/ADN à celle d'autres assemblages ligand/ADN rapportée dans la littérature. Récemment, M. Coste et al. ont synthétisé un nouveau ligand, un tétraphénylène cationique conjugué à

l'acylhydrazone (TPE-Gir) susceptible d'interagir avec des acides nucléiques, en l'occurrence de l'ADN monobrin. Par expérience de titrage isotherme calorimétrique (ITC), ces chercheurs ont montré que l'affinité de TPE-Gir envers stDNA est indépendante de la nature du sel (NaCl ou KCl) et vaut  $K_a = 6.5 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$ . [73]

### III.4 Morphologie d'assemblages supramoléculaires oligothiophène $\pi$ -conjugué cationique /DNA

Après avoir étudié les interactions oligothiophène-ADN par spectroscopie chiroptique, des mesures d'AFM et de cryo-TEM ont été menées sur les composés purs et les complexes oligothiophène/ADN pour caractériser l'évolution de la morphologie de l'état solide à l'état hydraté.

#### III.4.1 Microscopie à force atomique

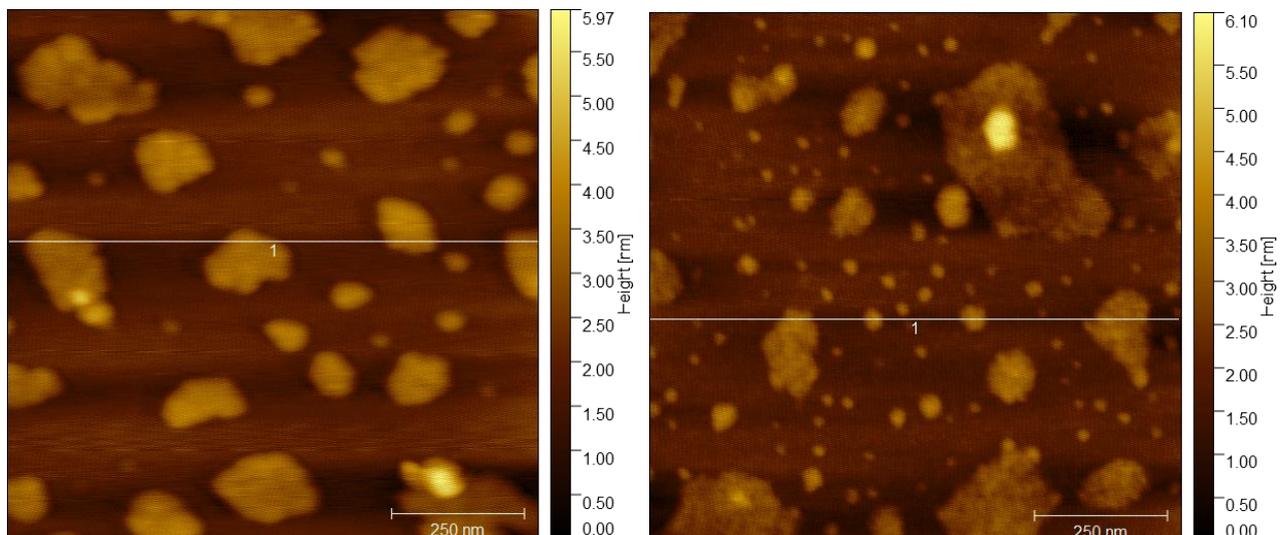
La morphologie microscopique des dépôts des composés purs (stDNA, htDNA, **T3Im** et **ETE.TMA**) et de leur mélange sur un substrat de mica a été caractérisée par AFM dans le but d'investiguer le processus d'auto-assemblage à l'état solide.

- *Morphologie des oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques purs*

La Figure 47 montre les images AFM d'un dépôt de **T3Im** pur (à gauche) et de **ETE.TMA** pur (à droite) sur un substrat de mica. Les deux oligomères ont tendance à former une morphologie de grains dont les couches ont une hauteur moyenne de  $2.5 \pm 0.3 \text{ nm}$  dans le cas du dépôt de **T3Im** et une hauteur moyenne de  $2.3 \pm 0.4 \text{ nm}$  dans le cas du dépôt de **ETE.TMA** (Figures 47, S5 et S6). La longueur de **T3Im** (distance entre les deux groupements imidazolium terminaux) est d'environ de 2 nm et celle de **ETE.TMA** (distance entre le groupement EDOT et le groupement triméthylammonium) est d'environ de 1.7 nm (Figures S7 et S8). Par conséquent, les oligothiophènes

tendent à former des couches monomoléculaires au sein desquelles les oligomères sont orientés perpendiculairement à la surface du substrat. Une telle organisation moléculaire à l'état solide est bien connue pour les oligothiophènes.[74,75]

La largeur et la forme des grains en particulier dans le cas **ETE.TMA** sont très hétérogènes. Ainsi pour les deux oligomères, la largeur des objets varie entre quelques dizaines de nanomètres jusqu'à des centaines de nanomètres. Les îlots de plus grandes tailles visibles sur les images AFM du dépôt de **T3Im** et de **ETE.TMA** résultent probablement de l'agrégation entre les grains de plus petites tailles lors de l'évaporation du solvant. Les dépôts minces de **T3Im** et **ETE.TMA** purs révèlent donc une topographie relativement similaire.

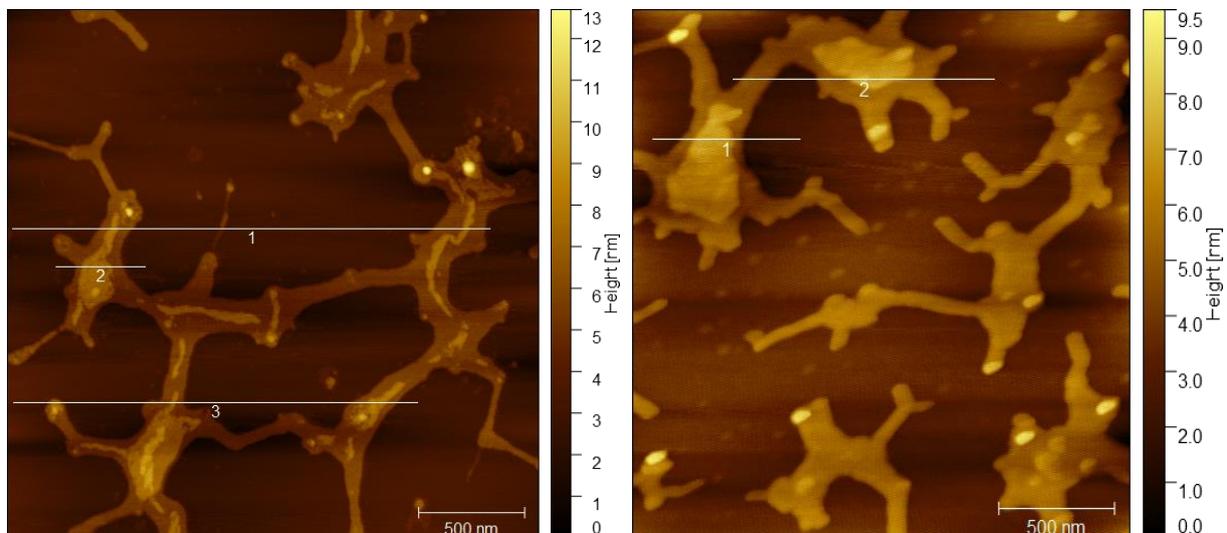


**Figure 47** : Images AFM de hauteur en mode tapping d'un dépôt mince de T3Im pur (à gauche) et de ETE.TMA pur (à droite) sur un substrat de mica. [T3Im] = 120  $\mu\text{M}$  et [ETE.TMA] = 120  $\mu\text{M}$ . Images AFM de 1 x 1  $\mu\text{m}^2$ .

- *Morphologie des ADN double brin*

Les images AFM de stDNA et htDNA (Figure 48) montre une structure en réseau constituée de branches larges et irrégulières avec différentes couches distinguables à la surface du mica. La hauteur de chaque couche, environ  $2.5 \pm 0.5$  nm, est comparable au diamètre de la structure en double hélice de l'ADN qui est d'environ 2 nm (Figures S9 et S10). Dès lors, les molécules d'ADN double brin sont orientées parallèlement à la surface de mica. Les ADN de saumon et d'hareng sont de longs

ADN double brin qui possèdent respectivement 2000 paires (stDNA) et 20000 paires de bases (htDNA). La distance entre deux paires de bases est d'environ 0.34 nm. Par conséquent, la longueur de l'ADN de saumon est estimée à environ 680 nm et celle de l'ADN d'hareng vaut environ 6.8  $\mu\text{M}$ . Ces valeurs sont largement supérieures à la largeur des branches du réseau correspondant. Par conséquent, l'ensemble de ces données indiquent que la formation de la structure en réseau résulte de l'agrégation d'un grand nombre de molécules d'ADN (stDNA et htDNA). Un effet de démouillage sur la surface du substrat de mica lors de l'évaporation du solvant pourrait être à l'origine de la formation de cette morphologie en couches dendritiques. Une structure similaire constituée d'une monocouche d'ADN avec une hauteur d'environ 2 nm a été rapportée.[76]

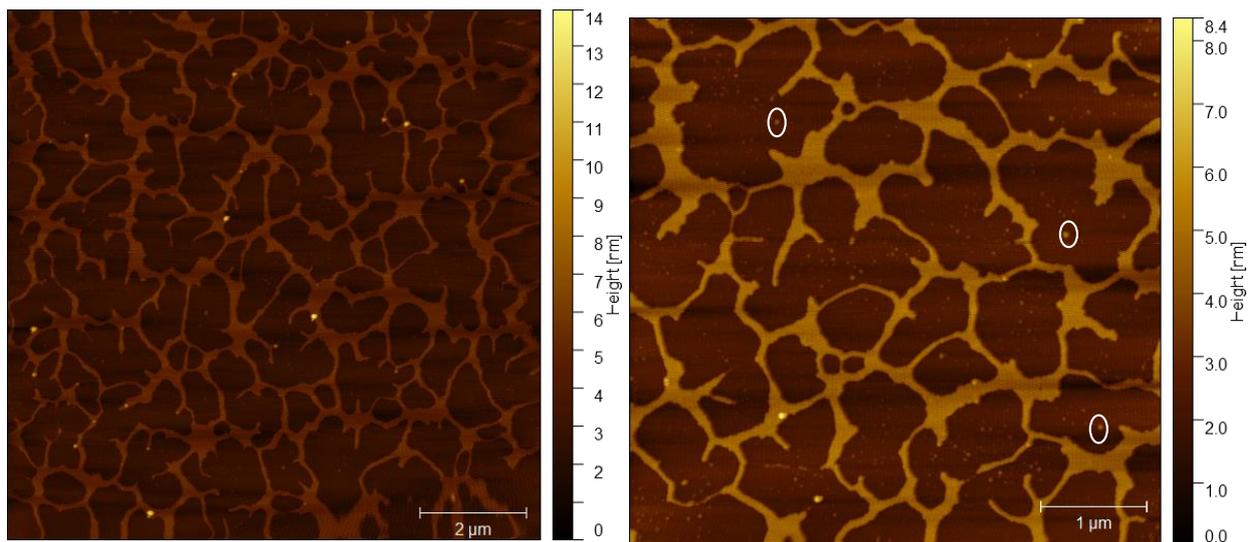


**Figure 48** : Images AFM de hauteur en mode tapping d'un dépôt mince de stDNA (à gauche) et de htDNA (à droite) sur un substrat de mica. [stDNA] = 0.06  $\mu\text{M}$  et [htDNA] = 0.006  $\mu\text{M}$ . Images AFM de 2.5  $\mu\text{m}$ /2.5  $\mu\text{m}$  (à gauche) et de 2.25 X 2.25  $\mu\text{m}^2$  (à droite).

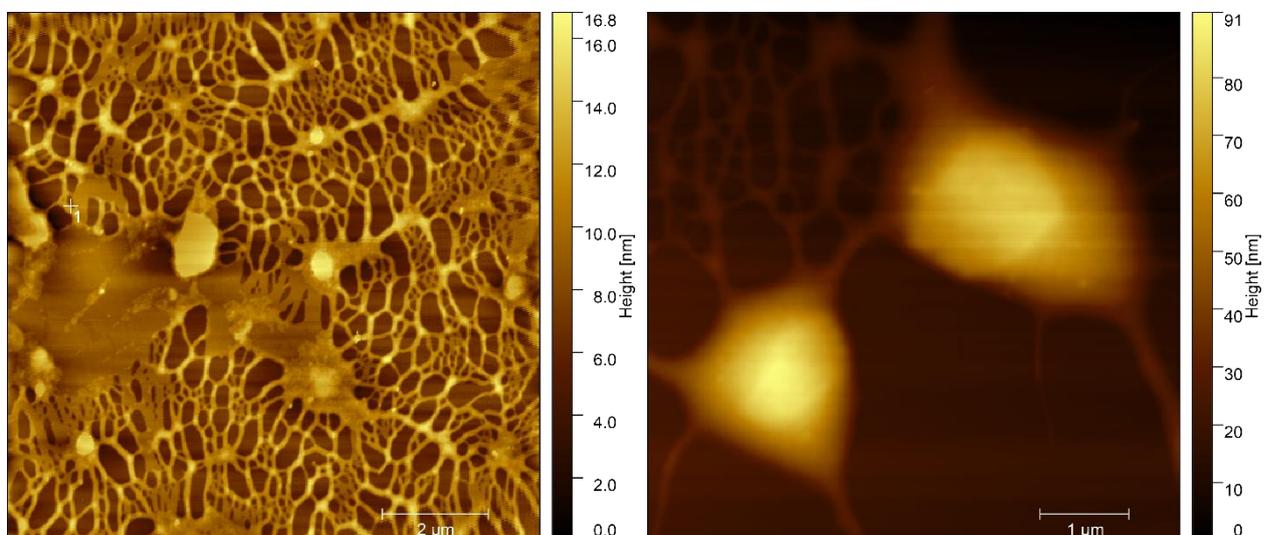
- *Morphologie des assemblages T3Im/stDNA et T3Im/htDNA*

Le dépôt des complexes **T3Im/stDNA** et **T3Im/htDNA** sur une surface solide mène à une morphologie de fibres en réseau (Figures 49, 50, S11 et S12). Néanmoins, certaines caractéristiques du réseau de fibres diffèrent selon la nature du complexe. Les branches de l'assemblage **T3Im/stDNA** sont caractérisées par une hauteur d'environ 2-3 nm tandis que pour l'assemblage avec un ADN plus long (**T3Im/htDNA**), les branches ont une hauteur plus élevée comprise entre 4-10 nm (Figures 49, 50, S11

et S12). Le complexe **T3Im**/htDNA tend à former une structure de fibres en réseau plus compacte et dense avec la présence de larges agrégats pouvant atteindre une hauteur maximale d'environ 60 nm comparé au cas avec stDNA (Figures 49 et S12). De plus, dans le cas de l'assemblage entre **T3Im** et stDNA, des grains caractérisés par une hauteur moyenne d'environ 2 nm sont visibles entre la structure en réseau et correspondent probablement aux ligands **T3Im** non complexés avec stDNA, comme observé lors du dépôt des oligomères purs (plusieurs grains ont été entourés en blanc) (Figure 49).

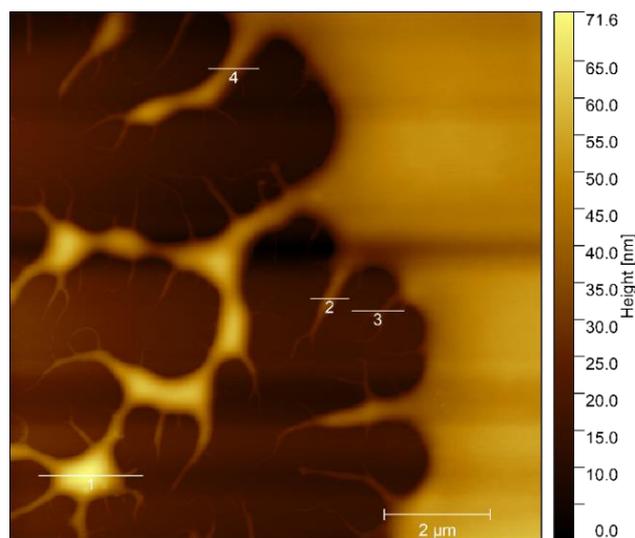


**Figure 49** : Images AFM de hauteur en mode tapping d'un dépôt mince du complexe T3Im/stDNA sur un substrat de mica. [stDNA] = 0.06 μM et [T3Im] = 120 μM. Images AFM de 10 x 10 μm<sup>2</sup> (à gauche) et de 2.5 x 2.5 μm<sup>2</sup> (à droite).



**Figure 50** : Images AFM de hauteur en mode tapping d'un dépôt mince du complexe T3Im/htDNA sur un substrat de mica. [htDNA] = 0.006 μM et [T3Im] = 120 μM. Images AFM de 10 x 10 μm<sup>2</sup> (à gauche) et de 5 x 5 μm<sup>2</sup> (à droite).

En outre, le complexe **T3Im**/htDNA a également fourni une structure dendritique constituée de branches principales ressemblant à des fibres qui s'étendent sur plusieurs micromètres et qui ont une hauteur comprise entre 15 et 50 nm (Figures 51 et S13). Des branches plus fines (dendrites) sont situées en périphérie des tiges principales et sont caractérisées par une hauteur inférieure à 10 nm (Figures 51 et S13). Un large agrégat caractérisé par une hauteur moyenne de  $40 \pm 10$  nm est présent sur la droite de l'image et résulte probablement de l'agglomération de structures de plus petites tailles suite à l'évaporation du solvant (Figures 51 et S13).

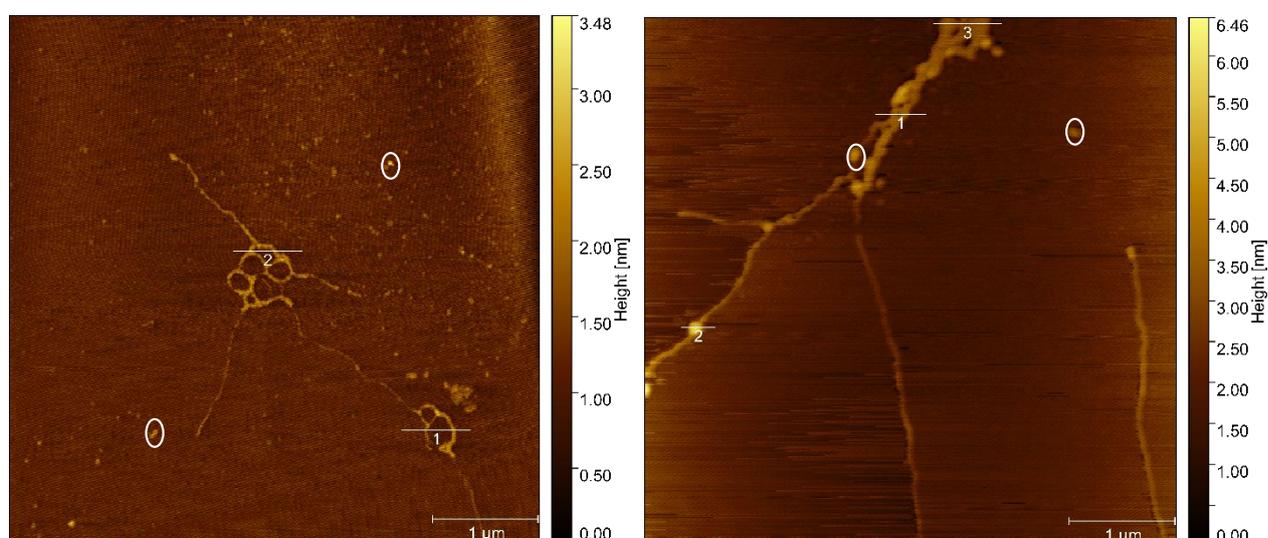


**Figure 51** : Image AFM de hauteur en mode tapping d'un dépôt mince du complexe T3Im/htDNA sur un substrat de mica.  $[htDNA] = 0.006 \mu M$  et  $[T3Im] = 120 \mu M$ . Image AFM de  $10 \times 10 \mu m^2$ .

L'auto-assemblage entre **T3Im** et dsDNA (stDNA htDNA) sur une surface mène donc à une structure en réseau de fibres. Nous pouvons faire le lien avec la morphologie dendritique observée par *Maxime Leclercq et al.* lors de la complexation entre stDNA et un polythiophène cationique. Ces chercheurs ont montré que l'ADN est probablement compacté en agrégats PSI (polymer-salt-induced) au sein des fibres dendritiques.[77,78]

- *Morphologie des assemblages ETE.TMA/stDNA et ETE.TMA/htDNA*

Les dépôts des complexes **ETE.TMA**/stDNA et **ETE.TMA**/htDNA tendent à former de longues fibres qui s'étendent sur plusieurs microns avec des agrégats sphériques caractérisés par une hauteur moyenne de 2 nm (Figures 52 et S14). Nous observons des fibres isolées et d'autres entrelacées. Cette morphologie est différente de la structure en réseau compacte observée lors de la complexation de **T3Im** avec dsDNA (stDNA et htDNA). Similairement au cas de **T3Im**, les grains observés (plusieurs grains ont été entourés en blanc) ont une épaisseur d'environ 2 nm et sont probablement les ligands **ETE.TMA** non complexés avec dsDNA (stDNA et htDNA) (Figure 52).



**Figure 52** : Images AFM de hauteur en mode tapping d'un dépôt mince du complexe ETE.TMA/stDNA (à gauche) et ETE.TMA/htDNA (à droite) sur un substrat de mica. [stDNA] = 0.03  $\mu$ M, [htDNA] = 0.003  $\mu$ M et [ETE.TMA] = 120  $\mu$ M. Images AFM de 5 x 5  $\mu$ m<sup>2</sup> (à gauche et à droite).

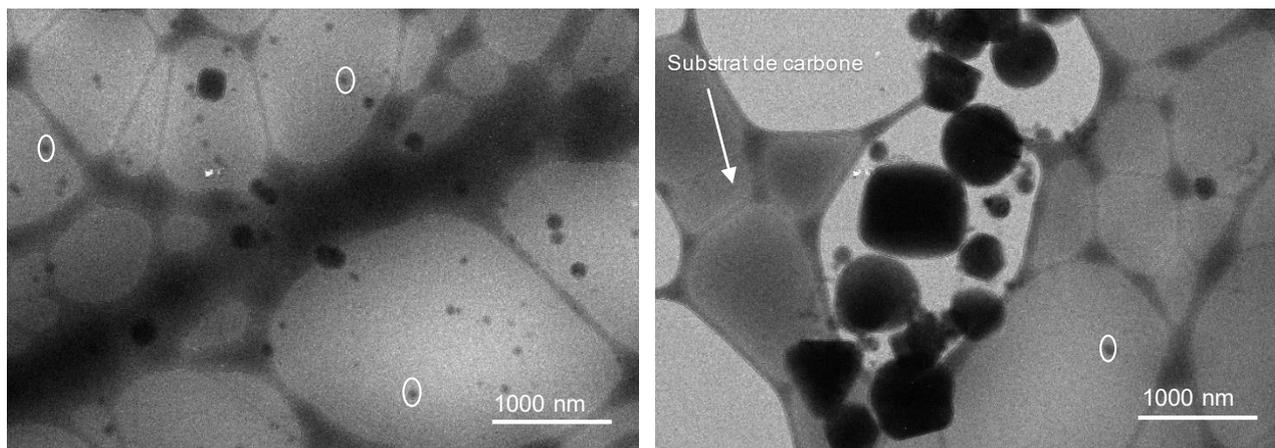
Finalement, les différences au niveau de la nature, de la localisation et du nombre de substituants cationiques entre les deux oligothiophènes impliquent probablement des interactions différentes avec dsDNA (stDNA et htDNA) et mènent par conséquent à des morphologies microscopiques différentes à l'état solide.

### III.4.2 Cryo-microscopie électronique à transmission

Pour compléter les résultats d'AFM, la morphologie et la structure interne des assemblages oligothiophène  $\pi$ -conjugué cationique/dsDNA en solution aqueuse ont été examinées par Cryo-TEM dans le cadre d'un stage à l'Institut Charles Gerhardt, à l'Université de Montpellier (ICGM) sous la supervision du Prof. Sébastien Clément. La Cryo-TEM permet d'obtenir des images des complexes oligothiophène/dsDNA avec une meilleure résolution et à une plus grande échelle par rapport à l'AFM. À noter que, **ETE.TMA** pur et les complexes **ETE.TMA**/dsDNA n'ont pas pu être analysés par cette technique en raison d'un manque de produit.

- *Morphologie microscopique de T3Im*

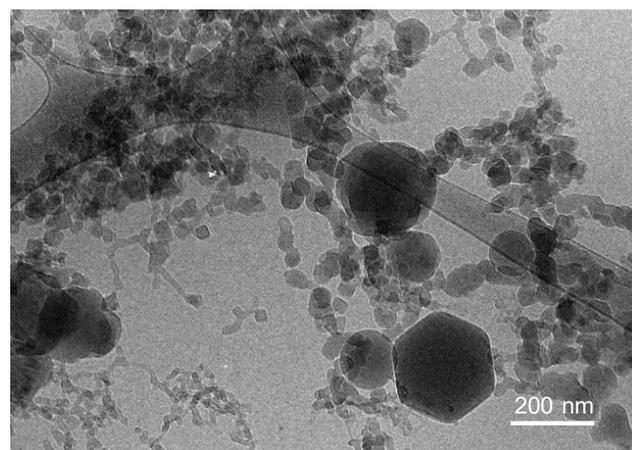
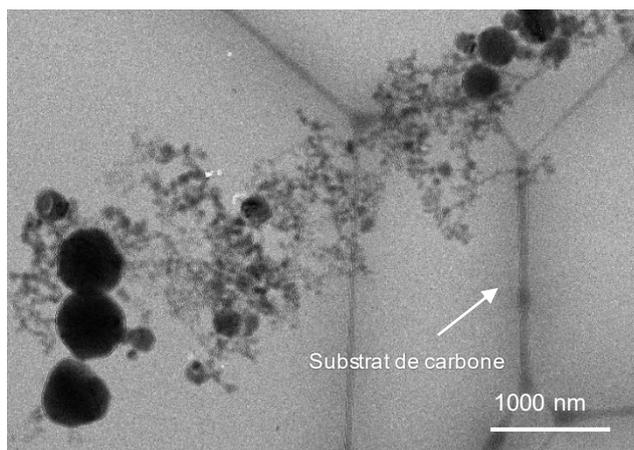
La Figure 53 montre les images de cryo-TEM de **T3Im** pur déposé sur une grille en cuivre recouverte d'un film de carbone à l'état hydraté. **T3Im** apparaît sous forme de nanoparticules sphériques (plusieurs particules ont été entourées en blanc) qui ont tendance à fusionner pour donner lieu à de larges agrégats de forme et de taille variables, avec un diamètre compris entre quelques dizaines et quelques centaines de nanomètres. Ces larges structures sont issues probablement de l'agrégation de **T3Im** en solution aqueuse. Outre des structures ressemblant à des sphères, d'autres types de morphologies ont été observés telles qu'une morphologie carré, triangulaire et hexagonale (Figure 53). La diversité morphologique pourrait témoigner d'une structure cristalline des ligands **T3Im**. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Maxime Leclercq réalisés durant sa thèse. En effet, les analyses de **T3Im** par microscopie optique confocale ont révélé la présence de cristaux.[43]



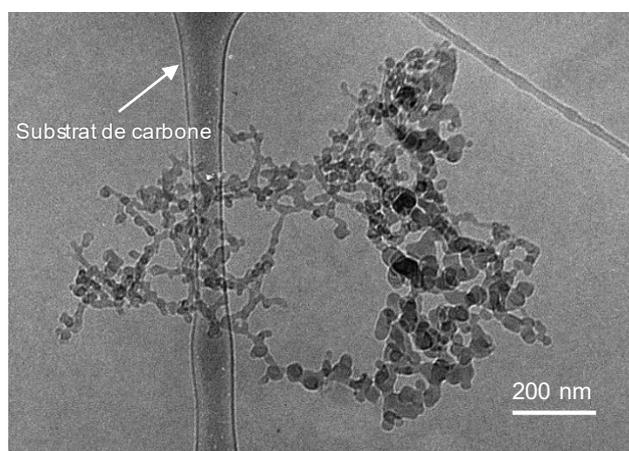
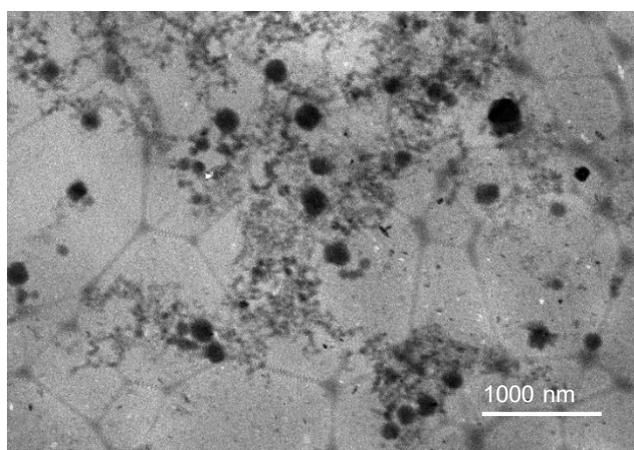
**Figure 53** : Images de Cryo-TEM de T3Im en solution aqueuse tamponnée (TE, pH = 7.4). [T3Im] = 120  $\mu$ M

- *Morphologie microscopique des complexes T3Im/stDNA et T3Im/htDNA*

Les images de cryo-TEM des complexes **T3Im**/stDNA et **T3Im**/htDNA à un rapport de charge de 1 à l'état hydraté montrent des agrégats de taille et de forme différentes (Figures 54 et 55). Ces structures ont été observées précédemment et sont attribuées à l'agrégation de **T3Im** en solution. Contrairement au cas de **T3Im** pur, des structures en réseau de quelques micromètres de long apparaissent sur les images de cryo-TEM (Figures 54 et 55). Des nanoparticules sphériques sont également observées comme dans le cas de **T3Im** pur. La formation de réseaux fibreux pourrait être issue de la complexation entre **T3Im** et dsDNA (stDNA et htDNA). Cette hypothèse est renforcée par les travaux de *M. Knaapila et al.*, qui ont mis en évidence la formation d'une structure similaire lors de l'auto-assemblage entre un copolymère conjugué cationique et de l'ADN.[79] Finalement, ces résultats nous rappellent la structure en réseau constituée de branches et d'agrégats observée lors des mesures AFM (Figures 48 et 49).



**Figure 54** : Images Cryo-TEM du complexe T3Im/stDNA à un rapport de charge de 1 à l'état hydraté.  $[T3Im] = 120 \mu M$  et  $[stDNA] = 0.06 \mu M$ .



**Figure 55** : Images Cryo-TEM du complexe T3Im/htDNA à un rapport de charge de 1 à l'état hydraté.  $[T3Im] = 120 \mu M$  et  $[htDNA] = 0.006 \mu M$ .

## IV. Conclusion et perspectives

---

Le projet de recherche de ce mémoire vise à étudier les complexes supramoléculaires formés par auto-assemblage entre divers ADN double brin (de différentes longueurs) et différents oligothiophènes  $\pi$ -conjugués cationiques, dans le but d'évaluer leur potentiel en tant que sonde à ADN pour des biocapteurs optiques et pour l'imagerie.

Dans la première partie du mémoire, nous avons étudié les interactions entre des oligothiophènes cationiques (**T3Im** et **ETE.TMA**) et deux ADN double brin (stDNA et htDNA) par spectroscopie chiroptique (absorption UV-Vis, dichroïsme circulaire et fluorescence). Pour l'ensemble des complexes supramoléculaires oligothiophène/dsDNA, le déplacement vers le rouge de la bande d'absorption de l'oligomère, les changements dans le signal CD en dessous de 300 nm (perte d'intensité et red-shift uniquement pour la complexation avec **T3Im**) et l'apparition d'un signal ICD dans la région spectrale de l'oligomère (dans le cas de **T3Im**) attestent d'une interaction entre l'ADN et l'oligothiophène  $\pi$ -conjugué cationique. En outre, nous avons observé que la longueur d'ADN influence peu les propriétés chiroptiques. Par contre, la nature de l'oligothiophène joue un rôle important dans le processus d'auto-assemblage et dans l'interaction avec dsDNA. En effet, suite à la complexation entre l'oligothiophène et l'ADN (stDNA et htDNA), un signal ICD apparaît dans la région d'absorbance de **T3Im** contrairement à **ETE.TMA** qui ne présente aucun signal ICD. Les différences structurales entre les deux oligothiophènes, en particulier la nature, la localisation et le nombre de substituants cationiques mènent à des interactions différentes avec l'ADN. De plus, la forme du signal ICD de **T3Im** varie en fonction du rapport de charge. En effet, le signal ICD est composé d'une bande positive large et intense à 397 nm lorsque le nombre de charges négatives prédominent en solution. La présence d'une bande ICD positive est caractéristique d'un mode de liaison au sillon mineur de l'ADN. Les calculs de docking moléculaire réalisés par Dr. Mathieu Fossépré ont également révélé que les ligands **T3Im** se lient préférentiellement dans le sillon mineur de l'ADN. Toutefois, lorsque le nombre de charges positives prédominent en solution, le signal ICD présente à la fois une bande positive large et intense à 397 nm et une bande négative très peu intense à 445 nm. Un signal ICD bi-

signé (-)/(+) est caractéristique d'un couplage excitonique. Une étude théorique des systèmes **T3Im**/dsDNA serait judicieuse pour déterminer les différents facteurs à l'origine du signal ICD de **T3Im**.

Les titrages de fluorescence ont révélé l'existence d'un effet « turn-on » dans l'intensité du signal de fluorescence de **T3Im** en fonction du rapport de charge oligomère/ADN. En effet, lorsque le nombre de charges positives de l'oligothiophène prédomine (par rapport au nombre de charges négatives de l'ADN), l'intensité de fluorescence de **T3Im** décroît. À l'inverse, l'intensité de fluorescence de **T3Im** croît lorsque le nombre de charges négatives de l'ADN prédomine. Afin d'évaluer l'influence de la structure et de la topologie de l'ADN, il serait intéressant d'étudier l'évolution des propriétés de fluorescence de **T3Im** lorsqu'il interagit avec d'autres types ADN (structure, topologie), par exemple des G-quadruplexes d'ADN ou un ADN monobrin.

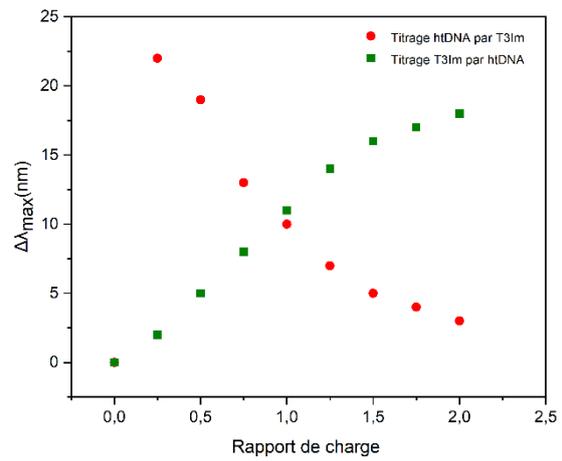
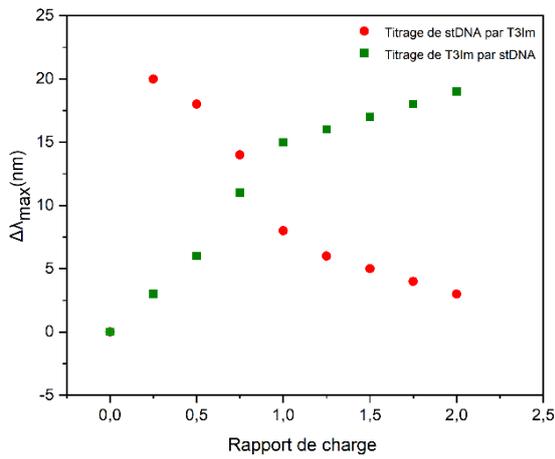
Dans la deuxième du mémoire, nous avons évalué l'affinité de chaque oligothiophène  $\pi$ -conjugué cationique envers chaque ADN double brin, par des mesures de constante d'équilibre d'association. Les expériences de compétition d'association entre les ADN et le DAPI versus l'oligothiophène (**T3Im** et **ETE.TMA**) ont révélé que les deux oligothiophènes se lient probablement au sillon mineur de l'ADN. La liaison de **T3Im** au sillon mineur de l'ADN (dsR81) a également été confirmée par les calculs de docking moléculaire et par les titrages CD. En outre, **T3Im** a une affinité plus élevée envers dsDNA (stDNA et htDNA) par rapport à **ETE.TMA**. La nature, la localisation et le nombre de substituants cationiques qui diffèrent entre les deux oligothiophènes pourraient expliquer ces différences de constante d'association. En effet, **T3Im** possède deux charges positives tandis que **ETE.TMA** n'en possède qu'une. Dès lors, les interactions électrostatiques entre l'ADN et **T3Im** sont plus fortes que pour **ETE.TMA**. Par ailleurs, **T3Im** possède deux groupements imidazolium terminaux conjugués au cœur terthiophène alors que **ETE.TMA** possède un groupement triméthylammonium à l'extrémité de la chaîne alkylé-éther latérale de l'unité thiophène centrale. Les calculs de docking moléculaire et les simulations de dynamique moléculaire réalisés par le Dr. Fossépré au sein de notre laboratoire ont montré que les ligands **T3Im** se lient préférentiellement au sillon mineur de l'ADN et sont stabilisés par des interactions électrostatiques entre les groupements imidazolium et les groupements phosphodiester de l'ADN, ainsi que par des contacts de van Der Waals

entre les atomes de soufre des unités thiophènes et les bases d'ADN. Les unités thiophènes sont orientées préférentiellement en syn- avec les atomes de soufre pointant vers le sillon mineur de l'ADN. À l'inverse, il se pourrait que les ligands **ETE.TMA** soient orientés préférentiellement en anti- par rapport aux angles diédraux entre les unités thiophènes de sorte à maximiser les interactions par ponts hydrogène entre les groupements éther de **ETE.TMA** et les bases de l'ADN. Afin d'obtenir plus d'informations sur les modes de liaison et la dynamique des complexes **ETE.TMA**/DNA, il serait judicieux de réaliser des calculs de docking moléculaire et des simulations de dynamique moléculaire sur les complexes **ETE.TMA**/dsDNA. Les expériences de compétition d'association entre les ADN et le DAPI versus l'oligothiophène pourraient aussi être élargies à d'autres ADN comme des G-quadruplexes, dans le contexte des ligands à ADN télomérique.

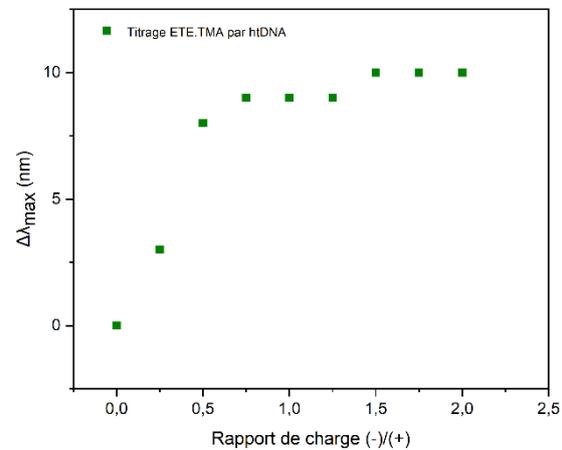
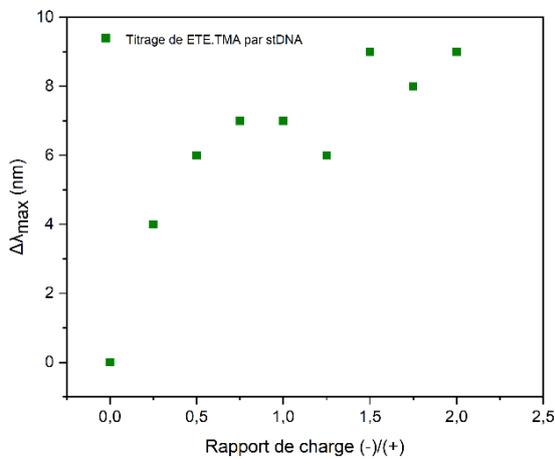
La dernière partie a trait à la caractérisation de la morphologie microscopique des assemblages oligothiophène/ADN, à l'état solide par AFM et à l'état hydraté par cryo-TEM. Les études par AFM ont montré que les complexes **T3Im**/dsDNA (stDNA et htDNA) tendent à former une structure en réseau de fibres tandis que les complexes **ETE.TMA**/dsDNA forment à la fois des fibres isolées et des fibres entrelacées. Les mesures de cryo-TEM ont également montré la présence d'un réseau fibreux pour les complexes **T3Im**/dsDNA. Les différences dans la nature, la localisation et le nombre de substituants cationiques entre les deux oligothiophènes mènent à des morphologies microscopiques différentes à l'état solide. Une étude microscopique par cryo-TEM des complexes **ETE.TMA**/dsDNA devra être réalisée pour obtenir des informations sur la morphologie des complexes à l'état hydraté. La composition et le rapport de charges oligomère/ADN pourraient influencer la morphologie et la taille des assemblages supramoléculaires et il serait intéressant de réaliser des études microscopiques en variant ces deux facteurs.

En conclusion, l'oligomère **T3Im**, pourrait être exploité pour un système de détection optique, par exemple pour sonder la méthylation de l'ADN par des méthodes chiroptiques. En vue de développer des sondes pour l'imagerie d'ADN, il serait important d'étudier les variations de fluorescence en fonction de la séquence d'ADN et d'estimer si ces oligothiophènes peuvent interagir avec l'ADN de noyaux au sein de cellules épithéliales humaines.

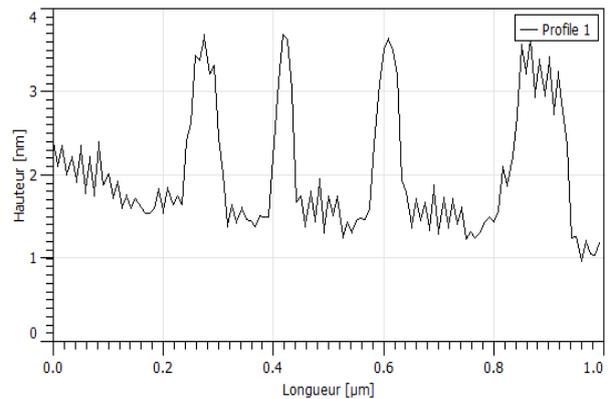
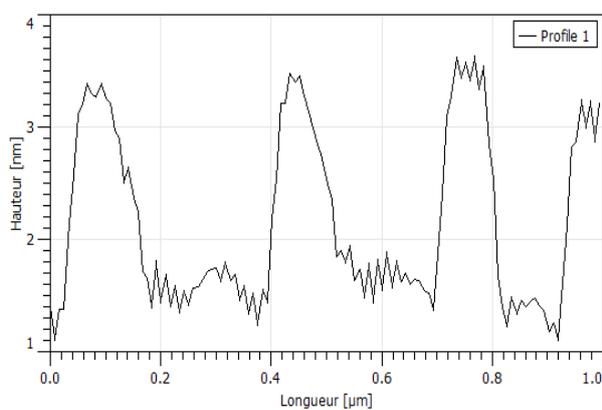
## V. Annexes



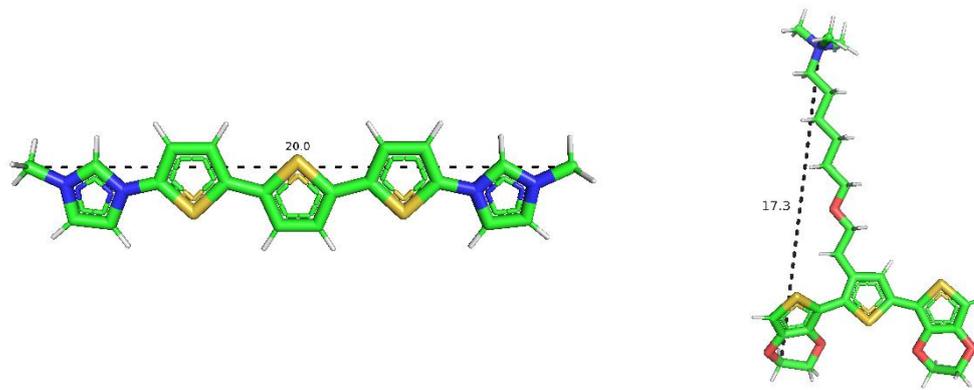
**Figures S1 et S2 :** Evolution du  $\Delta\lambda_{\max}$  de la bande d'absorption UV-Vis de T3Im (à gauche) et de ETE.TMA (à droite) en fonction du rapport de charge.  $\lambda_{\max}$  T3Im = 370 nm.



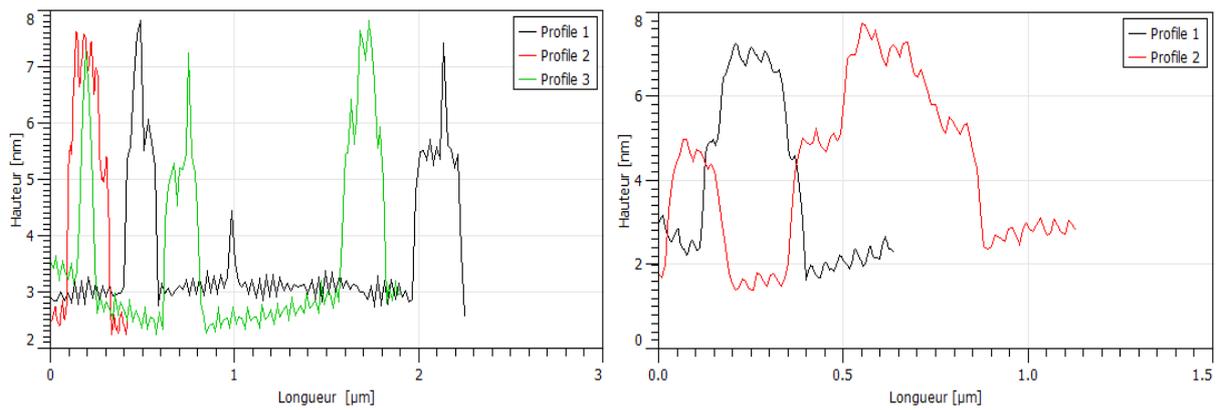
**Figures S3 et S4 :** Evolution du  $\Delta\lambda_{\max}$  de la bande d'absorption UV-Vis de T3Im (à gauche) et de ETE.TMA (à droite) en fonction du rapport de charge.  $\lambda_{\max}$  ETE.TMA = 350 nm.



**Figures S5 et S6 :** Distribution de la hauteur en fonction de de la longueur de section pour T3Im pur (à gauche) et pour ETE.TMA pur (à droite).



Figures S7 et S8 : Structure optimisée de T3Im (à gauche) et de ETE.TMA (à droite). Les distances s'expriment en angström.



Figures S9 et S10 : Distribution de la hauteur en fonction de de la longueur de section pour stDNA pur (à gauche) et pour htDNA pur (à droite).

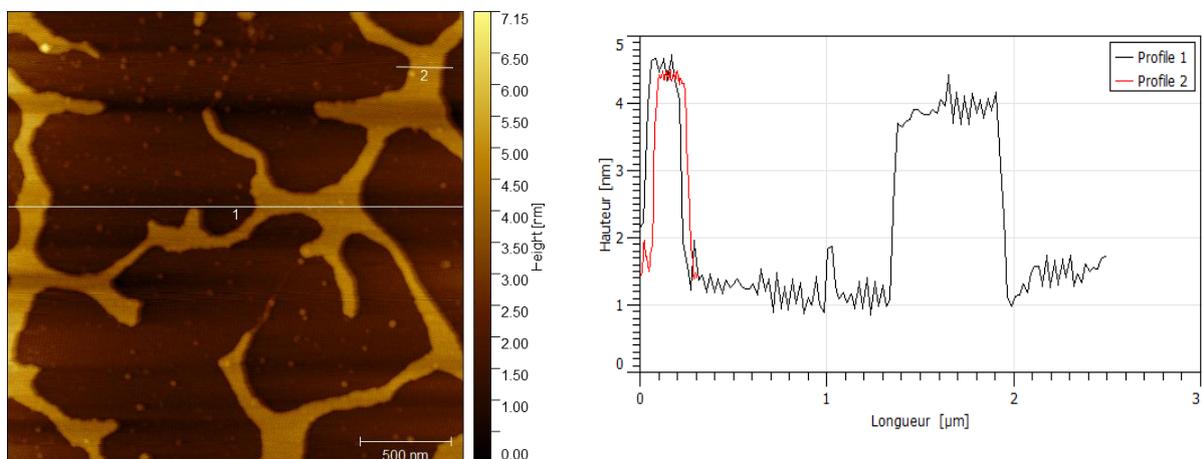
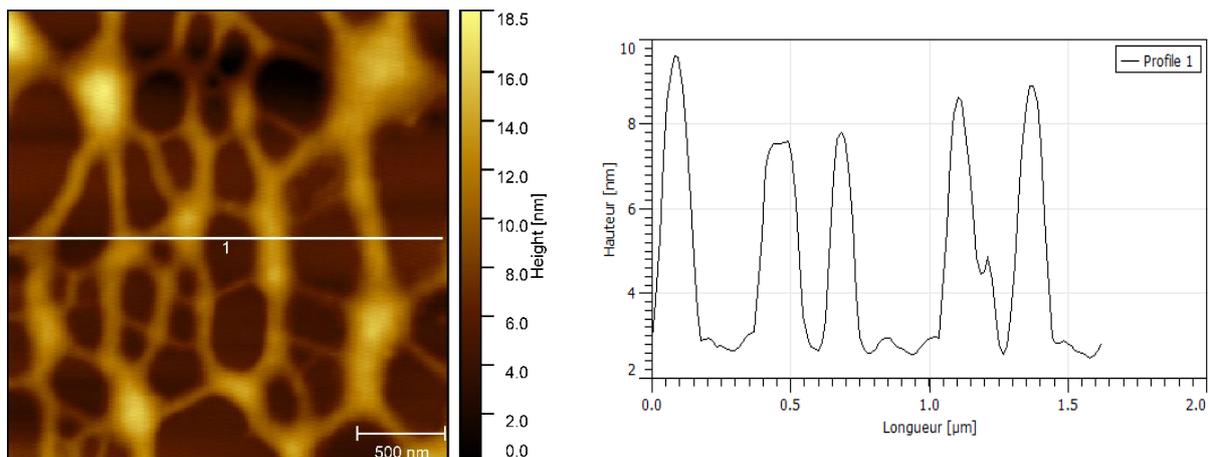
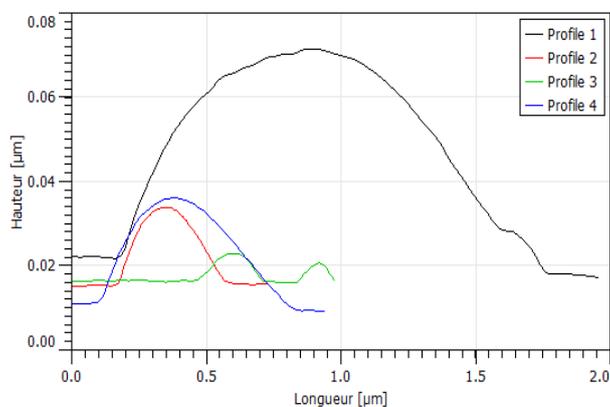


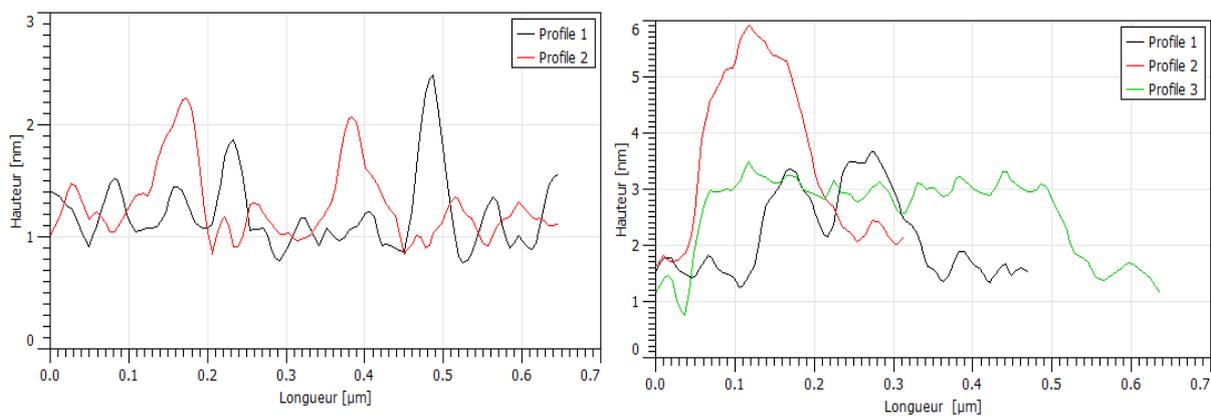
Figure S11 : Image AFM de hauteur en mode tapping d'un dépôt mince du complexe T3Im/stDNA sur un substrat de mica. [stDNA] = 0.06  $\mu\text{M}$  et [T3Im] = 120  $\mu\text{M}$ . Image AFM de 2.5 x 2.5  $\mu\text{m}^2$  (à gauche). Distribution de la hauteur en fonction de de la longueur de section pour le complexe T3Im/stDNA (à droite).



**Figure S12** : Image AFM de hauteur en mode tapping d'un dépôt mince du complexe T3Im/htDNA sur un substrat de mica. [htDNA] = 0.006  $\mu\text{M}$  et [T3Im] = 120  $\mu\text{M}$ . Image AFM de  $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$  (à gauche). Distribution de la hauteur en fonction de de la longueur de section pour le complexe T3Im/htDNA (à droite).



**Figure S13** : Distribution de la hauteur en fonction de de la longueur de section pour le complexe T3Im/htDNA.



**Figure S14** : Distribution de la hauteur en fonction de la longueur de section pour le complexe ETE.TMA/stDNA (à gauche) et pour le complexe ETE.TMA/htDNA (à droite).

## VI. Bibliographie

---

- [1] Mishra, A. et al., *Chem. Rev.* **2009**, 109, 1141-1176.
- [2] Kaloni, T. P. et al., *Chem. Mater.* **2017**, 29, 10248-10283.
- [3] Conjugated Polyelectrolytes : Fundamentals and Applications, edited by Liu, B. & Bazan, G. C., *Wiley-VCH*, **2013**.
- [4] So, R.C. & Carreon-Asok, A.C., *Chem. Rev.* **2019**, 119, 11442-11509.
- [5] Jiang, H. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4300-4316.
- [6] Duarte, A. et al., *Chem. Mater.* **2011**, 23, 501-515.
- [7] Liang, J. et al., *Chem. Sci.* **2013**, 4, 1377-1394.
- [8] Ho, H-A. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1548-1551.
- [9] Barbarella, G. et al., *Adv. Mater.* **2005**, 17, 1581-1593.
- [10] Liu, B. & Bazan, G.C., *Chem. Mater.* **2004**, 16, 4467-4476.
- [11] Ho, H-A. et al., *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 168-178.
- [12] Rubio-Magnieto, J. et al., *Soft Matter.* **2015**, 11, 6460-6471.
- [13] Peterhans, L. et al., *Chem. Mater.* **2020**, 32, 7347-7362.
- [14] Cours de « Biologie moléculaire » donné par Lionel Tafforeau durant l'année **2022-2023** à l'Université de Mons.
- [15] Introduction à l'analyse génétique edited by Suzuki, T. et al., *De Boeck Université*, **1991**.
- [16] Avery, O. et al., *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137-158.
- [17] Chargaff, E., *Experientia* **1950**, 6, 201-209
- [18] Watson, J. & Crick, F., *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [19] Cours « Chimie supramoléculaire bio-inspirée » donné par Mathieu Surin durant l'année **2021-2022** à l'Université de Mons.
- [20] DNA Nanotechnology for Bioanalysis : from hybrid DNA Nanostructures to Functional Devices, edited by Arrabito, G. & Wang, L., *World Scientific*, 2018.
- [21] Cours de « Chimie Supramoléculaire » donné par Mathieu Surin durant l'année **2022-2023** à l'Université de Mons.
- [22] Pray, L., *Nature Education* **2008**, 1, 100.
- [23] McLaughli, C.K. et al., *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5647-5656.
- [24] Seeman, N.S. & Sleiman, H.F., *Nat. Rev. Mater.* **2018**, 3, 17068.
- [25] Xia, K. et al., *ACS nano* **2020**, 14, 1319-1337.
- [26] Surin, M. & Ulrich, S., *Chem. Open* **2020**, 9, 480-498.
- [27] Surin, M., *Polym. Chem.* **2016**, 7, 4137-4150.

- [28] Lichon, L. et al., *Nanomaterials* **2020**, 10, 1432.
- [29] Kotras, C. et al., *Front. Chem.* **2019**, 7, 493.
- [30] Bouillon, C. et al., *Chem. - Eur. J.* **2014**, 20, 14705-14714.
- [31] Chen, C. & Wang, J., *Analyst* **2020**, 145, 1605-1628.
- [32] Bhalla, N. et al., *Essays Biochem.* **2016**, 60, 1-8.
- [33] Liu, X. et al., *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, 26, 2154-2164.
- [34] Duan, X. et al., *Acc. Chem. Res.* **2009**, 43, 260-270.
- [35] DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance, edited by Jost, J.P. & Saluz, H.P., *Birkhäuser Verlag*, **1993**.
- [36] Chemosensors : Principles, Strategies, and Applications edited by Wang, B. & Anslyn, E. *John Wiley and Sons, Ltd*, **2011**.
- [37] Wang, J. et al., *Coordination Chemistry Reviews* **2018**, 354, 135-154.
- [38] Turner, A., *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 3184-3196.
- [39] Ho, H.A. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12673-12676.
- [40] Rubio-Magnieto, J. et al., *Chem. Commun.* **2013**, 49, 5483-5485.
- [41] Fossépré, M. et al., *Chem. Phys. Chem.* **2020**, 21, 2543-2552.
- [42] Fossépré, M. et al., *ACS Appl. Bio. Mater.* **2019**, 2, 2125-2136.
- [43] Leclercq, M. Thèse : Supramolecular assemblies of DNA and  $\pi$ -conjugated probes for optical biosensing, Université de Mons, **2021**.
- [44] Zhang, C. et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, 10, 4519-4529.
- [45] Tang, H. et al., *Chem. Commun.* **2009**, 6, 641-643.
- [46] [http://www.lumipy.fr/couleurs\\_dans\\_le\\_spectre.html](http://www.lumipy.fr/couleurs_dans_le_spectre.html) consulté 04/04/23 à 20h40.
- [47] Cours « Spectroscopie moléculaire » donné par Jérôme Cornil durant l'année **2021-2022** à l'Université de Mons.
- [48] Principles of Fluorescence Spectroscopy edited by Lakowicz, J.R., *Springer*, **2006**.
- [49] Invitation à la fluorescence moléculaire, edited by Valeur, B., *D.B. Université, Ed. De Boeck et Larcier*, 1st edition, **2004**.
- [50] <https://www.materianova.be/fr/nos-solutions/materiaux-et-surfacesmultifonctionnels/proprietes-optiques/proprietes-optoelectroniques/> consulté le 20/05/23 à 16h20.
- [51] Ranjbar, B. & Gill, P., *Chem. Biol. Drug. Des.* **2009**, 74, 101-120.
- [52] Circular Dichroism and Linear Dichroism edited by Rodger, A. & Nordén, B., *Oxford University Press*, **1997**.
- [53] Eriksson, M. & Nordén, B., *Methods in Enzymol.* **2001**, 340, 68-98.
- [54] Nordén, B. & Kurucsev, T., *Journal of molecular recognition* **1994**, 7, 141-155.
- [55] Nizar, N.S.S. et al., *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 11208-11226.
- [56] <https://science.maignuet.org/optique/polarisation.htm> consulté le 12/04/23 à 17h25.

- [57] Cours « Microscopie à sonde locale » donné par Roberto Lazzaroni durant l'année **2022-2023**.
- [58] Atomic Force Microscopy, edited by Eaton, P. & West, P., *Oxford University Press*, **2010**.
- [59] Jalili, N. & Laxminarayana, K., *Mechatronics* **2004**, 14, 907-945.
- [60] Lyubchenko, Y.L. et al., *Methods Mol. Biol.* **2014**, 1117, 367-384.
- [61] Bustamente, C. et al., *Biochemistry* **1992**, 31, 22-26.
- [62] Voutou, B. & Stefanaki E-C., *Physics of Advanced Materials Winter School* **2008**, 1-11.
- [63] Transmission Electron Microscopy, edited by Williams, D.B. & Barry Carter, C., Springer, **2009**.
- [64] <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope> consulté le 28/05/23 à 10h40.
- [65] Dubochet, J. et al., *Q. Rev. Biophys.* **1988**, 21, 129-228.
- [66] <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2017/press-release/> consulté le 14/05/23 à 13h20.
- [67] List, N.H. et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 14947-14957.
- [68] Qiu, H. et al., *Chem. Commun.* **2013**, 49, 42-44.
- [69] Kapuscinski, J., *Biotechnic & Histochemistry* **1995**, 70, 220-233.
- [70] Small Molecule DNA and RNA Binders : From Synthesis to Nucleic Acid Complexes edited by Demeunynck, M. et al., *Wiley-VCH*, **2003**.
- [71] Munteanu, A-C. et al., *Molecules* **2016**, 21, 1737.
- [72] Biancardi, A. et al., *Phys. Chem. Chem.* **2013**, 15, 4596-4603.
- [73] Coste, M. et al., *Eur. J. Org. Chem.* **2021**, 7, 1123-1135.
- [74] Leclère, P. et al., *Chem. Mater.* **2004**, 16, 4452-4466.
- [75] Surin, M. et al., *Synthetic Metals* **2004**, 147, 67-72.
- [76] Iwaura, R., *Soft Matter* **2017**, 13, 8293-8299.
- [77] Leclercq, M. et al., *Chem. Nano. Mat.* **2019**, 5, 703-709.
- [78] Bloomfield, V. A., *Biopolymers* **1997**, 44, 269-282.
- [79] Knaapila, M. et al., *Macromolecules* **2014**, 47, 4017-4027.