

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

N° d'ordre : 2547

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Discipline : CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE

Présentée et soutenue publiquement le 14/09/1999

Par

LAMOUR Eric

**SYNTHESE ET ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE
DE METALLOSALENES A ACTIVITE NUCLEASIQUE**

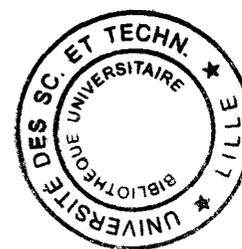
Directeur de thèse : Pr. BERNIER J.-L.

Jury

Président : M. J.-P. CATTEAU

Rapporteurs : M. B. MEUNIER
M. J.-L. PIERRE

Examineurs : M. C. BAILLY
M. J.-L. BERNIER
M. H. VEZIN



Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Chimie Organique Physique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, dirigé par Monsieur le **Professeur Alain Lablache-Combier**. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à Monsieur le **Professeur Jean-Luc Bernier**, qui a dirigé ce travail.

Je remercie tout particulièrement Monsieur le **Professeur Jean-Pierre Catteau**, pour ses nombreux conseils et encouragements durant ce travail et pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

A **Monsieur Christian Bailly**, Chargé de Recherches INSERM U 124 à l'Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, j'adresse mes respectueux remerciements pour toutes les études biochimiques qu'il a réalisées.

Je suis très honoré de la présence de **Monsieur Bernard Meunier**, directeur de recherches CNRS au Laboratoire de Chimie de Coordination UPR 8241 de Toulouse ainsi que de **Monsieur Jean-Louis Pierre**, professeur au Laboratoire d'Etudes Dynamiques et Structurales de la Sélectivité de Grenoble UMR-CNRS 5616. Je leur suis reconnaissant d'avoir bien voulu juger ce travail.

Je tiens également à associer à cette étude **Monsieur Hervé Vezin**. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements pour sa précieuse collaboration.

Enfin, mes remerciements vont à tous mes camarades de laboratoire et en particulier **Vincent Zoete**. Qu'ils trouvent ici mention du plaisir que j'ai eu à travailler avec eux.

**A mes parents,
A mes frères.**

« Horloge, Dieu sinistre, effrayant, impassible,
Dont le doigt nous menace et nous dit Souviens-toi. »

BAUDELAIRE

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	12
Chapitre 1 : LES ACIDES NUCLEIQUES ET LA COUPURE OXYDANTE	
1. Les acides nucléiques	15
1.1. Structure primaire des acides nucléiques	15
1.2. Structures secondaires et tertiaires des acides nucléiques	17
1.2.1. L'ADN et ses différentes formes	17
1.2.2. Les ARN	19
1.3. Coupure des acides nucléiques	20
2. La coupure hydrolytique des acides nucléiques	21
2.1. Hydrolyse par une nucléase enzymatique	21
2.2. Hydrolyse par une nucléase chimique	23
3. La coupure oxydante des acides nucléiques	26
3.1. Coupure oxydante directe	26
3.2. Coupure oxydante indirecte	27
4. Nucléases chimiques oxydantes et interaction avec les acides nucléiques	34
4.1. Molécules non vectorisées	34
4.1.1. La liaison externe (squelette polyphosphate)	35
4.1.2. La liaison de surface (petit et grand sillon)	35
4.1.3. L'intercalation (plans de bases des hélices)	36
4.1.4. La coordination (bases nucléiques)	36
4.2. Molécules hybrides	37
5. Nucléases chimiques oxydantes et activation	38
5.1. Activation chimique	38
5.2. Activation photochimique	40
5.3. Activation électrochimique	41
6. Nucléases chimiques oxydantes et production d'agents oxydants	43
6.1. Les radicaux oxyle	43
6.2. Les radicaux sulfoxyle	44
6.3. Les états excités des photonucléases	45
6.4. Les radicaux organiques	45
6.5. L'oxygène singulet	47
6.6. Les métaux de transition	47
6.7. Conclusion	47

7. Nucléases chimiques oxydantes et applications pratiques	49
7.1. Thérapeutique	49
7.2. Footprinting	49
7.3. Sondes structurales	51
7.4. Affinité de coupure	52

Chapitre 2 : PRINCIPALES FAMILLES DE NUCLEASES CHIMIQUES OXYDANTES

1. Les agents organiques	54
1.1. Les ènediynes	54
1.2. Les « photocleavers »	54
2. Les métallobléomycines	55
2.1. Interaction avec les acides nucléiques	56
2.2. Activation	56
2.3. Coupure des acides nucléiques	57
3. Les métalldiaminopolycarboxylates	60
3.1. Interaction avec les acides nucléiques	60
3.2. Activation	60
3.3. Coupure des acides nucléiques	61
4. Les métallophénanthrolines	62
4.1. Les phénanthrolines à cuivre	62
4.1.1. Interaction avec les acides nucléiques	62
4.1.2. Activation	63
4.1.3. Coupure des acides nucléiques	64
4.2. Les phénanthrolines à ruthénium	65
4.2.1. Interaction avec les acides nucléiques	67
4.2.2. Activation	67
4.2.3. Coupure des acides nucléiques	68
4.3. Les phénanthrolines à cobalt	68
4.3.1. Interaction avec les acides nucléiques	68
4.3.2. Activation	69
4.4. Les phénanthrolines à rhodium	69
4.4.1. Interaction avec les acides nucléiques	69
4.4.2. Activation	69
4.4.3. Coupure des acides nucléiques	70
5. Les métalloporphyrines	72
5.1. Interaction avec les acides nucléiques	72
5.2. Activation	73
5.3. Coupure des acides nucléiques	74

6. Les métallotripeptides	76
7. Les métallomacrocycles	77
7.1. Interaction avec les acides nucléiques	77
7.2. Activation	77
7.3. Coupure des acides nucléiques	78
8. Les métallosalènes	79
8.1. Interaction avec les acides nucléiques	79
8.2. Activation	80
9. Nucléases diverses	82

Chapitre 3 : SALENES POLYHYDROXYLES ET SYNTHESSES

1. Synthèses des métallosalènes polyhydroxylés	84
2. Synthèses des ligands saléniques polyhydroxylés	87
3. Synthèses des salènes polyhydroxylés à cuivre	88
4. Synthèses des salènes polyhydroxylés à fer	89

Chapitre 4 : SALENES POLYHYDROXYLES ET ETUDE DE L'ACTIVITE NUCLEASIQUE

1. Principe de la détection de l'activité nucléasique	91
1.1. Coupure de plasmide	91
1.2. Coupure d'oligonucléotides marqués	92
2. Salènes polyhydroxylés à cuivre	95
2.1. Etude de l'activité nucléasique en présence d'un agent réducteur	95
2.2. Etude de l'activité nucléasique en absence d'agent activateur	97
3. Salènes polyhydroxylés à fer	102
3.1. Etude de la liaison à l'ADN	102
3.2. Coupure de plasmide	103
3.3. Coupure de fragments de restriction marqués	105

Chapitre 5 : SALENES POLYHYDROXYLES ET ETUDE PAR RESONANCE PARAMAGNETIQUE ELECTRONIQUE

1. Principe de la RPE	111
1.1. L'Hamiltonien	112
1.2. La structure fine des spectres RPE	113

1.3. La structure hyperfine des spectres RPE	118
1.4. La structure superhyperfine des spectres RPE	119
1.5. Observation d'un signal RPE	119
2. Salènes polyhydroxylés à cuivre	121
2.1. Spectres RPE suivant le degré d'oxydation du cuivre	121
2.2. Spectres RPE des salènes polyhydroxylés à cuivre	123
2.2.1. Configuration électronique fondamentale et géométrie des complexes	123
2.2.2. Activation du système hydroquinonique	128
2.2.3. Mesure du caractère covalent de la liaison métal-ligand	129
2.2.4. Conclusion	131
3. Salènes polyhydroxylés à fer	132
3.1. Spectres RPE suivant le degré d'oxydation du fer	132
3.2. Spectres RPE des salènes polyhydroxylés à fer	133

Chapitre 6 : SALENES POLYHYDROXYLES ET ETUDE PAR VOLTAMMETRIE CYCLIQUE

1. Principe de la voltammétrie cyclique	138
1.1. Description d'un voltammogramme type	138
1.2. Systèmes lents et systèmes rapides	140
1.3. Systèmes accompagnés de réactions chimiques	140
1.4. Conditions opératoires	142
2. Ligands saléniques polyhydroxylés	144
3. Salènes polyhydroxylés à cuivre	151
3.2. Ensemble de pics à - 1,4 V	152
3.2.1. Détermination du couple associé	152
3.2.2. Discussion	156
3.2.3. Conclusion	158
3.3. Ensemble de pics à - 0,1 V	159
3.3.1. Hypothèse du cuivre III	159
3.3.2. Hypothèse du cuivre II/centre radicalaire sur le ligand	161
3.3.3. Conclusion	164
4. Salènes polyhydroxylés à fer	167

Chapitre 7 : SALENES POLYHYDROXYLES ET ETUDE PAR SPIN-TRAPPING

1. Principe du spin-trapping	170
-------------------------------------	------------

2. Salènes polyhydroxylés à cuivre	176
2.1. Etude à l'état d'oxydation naturel	177
2.2. Etude en milieu réducteur	181
2.3. Etude en milieu oxydant	183
2.4. Conclusion	184
3. Salènes polyhydroxylés à fer	186
CONCLUSION	189
PARTIE EXPERIMENTALE	193
BIBLIOGRAPHIE	210
TRAVAUX SCIENTIFIQUES	235

ABREVIATIONS

BLM	Bléomycines
bpy	2,2'-bipyridine
CR	2,12-diméthyl-3,7,11,17-tétraazabicyclo[11,3,1]heptadéca-1(17),2,11,13,15-pentaène
cyclam	1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane
DIP	4,7-diphényl-1,10-phénanthroline
dmop	2,9-diméthyl-1,10-phénanthroline
dppz	Dipyrido[3,2-a : 2',3'-c]phénazine
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylènediaminetétraacétate
en	Ethylènediamine
LMCT	Transfert de charge ligand-métal
MMPP	Magnésium monoperoxyphthalate
MPA	Acide 3-mercaptopropionique
MPE	Méthidium-propyl-éthylènediaminetétraacétate
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NHE	Electrode normale à hydrogène
phen	1,10-phénanthroline et dérivés
phi	9,10-phénanthrènequinonediimine
pop	Pyrophosphite
Q, HQ°, H ₂ Q	Quinone, radical semi-quinonique, hydroquinone
salen	Salène ou N,N'-bis(salicylidène)-éthylènediamine et dérivés
salphen	Hybride salène-phénanthroline
SCE	Electrode au calomel saturé
SOD	Superoxyde dismutase (enzyme)
TMP	3,4,7,8-tétraméthyl-1,10-phénanthroline
TMPyP	Méso-tétrakis(4-N-méthylpyridiniumyl)porphyrine
tpy	2,2' : 6',2''-terpyridine
g, A, A'	Tenseurs de structure fine, hyperfine et superhyperfine

INTRODUCTION

Les radicaux libres de l'oxygène comme l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ et le radical hydroxyle HO° sont connus pour leurs effets délétères sur les organismes vivants. Ils sont en effet responsables du stress oxydatif, de la peroxydation lipidique et de mutations de l'ADN par oxydation des constituants cellulaires (ADN, protéines et lipides).

Ces radicaux libres de l'oxygène, générés par radiations ionisantes ou par activation de l'oxygène par des métaux de transition, représentent un danger potentiel pour l'organisme. Ce dernier a alors mis en place plusieurs systèmes efficaces de défense (schéma 0.1) contre ces espèces comprenant des mécanismes enzymatiques de piégeage (SOD, catalase...) ou de réparation des dégâts (système SOS, excisions des bases endommagées...) ainsi que des « scavengers » (vitamine A, C, E...).

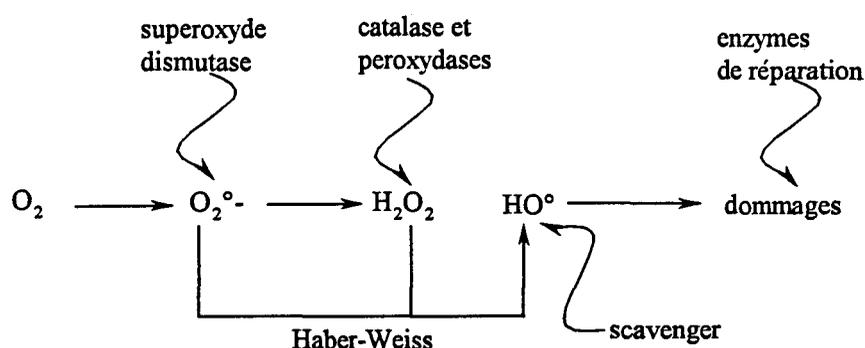


Schéma 0.1 : espèces réduites de l'oxygène et mécanismes de défense

Durant ces vingt dernières années, les chercheurs ont étudié une classe particulière de molécules qu'ils appellent nucléases chimiques à activité oxydante.

Ce sont des molécules capables de mimer les dégâts causés sur les acides nucléiques par les radicaux libres de l'oxygène. Ces nucléases chimiques sont principalement des complexes de métaux de transition où le ou les ligands chélateurs modulent, d'une part, les propriétés rédox responsables du mécanisme de dégradation de l'ADN (charge du métal, nature des ligands et intensité du champ de ligands) et d'autre part les propriétés d'affinité pour l'ADN du complexe (encombrement stérique, charge globale, groupements donneurs et accepteurs de liaison hydrogène).

Les potentialités de telles molécules sont énormes comme le souligne le nombre en augmentation constante de publications relatives à ces molécules (tableau 0.1). Les nucléases chimiques à activité oxydante peuvent en effet être utilisées comme agents anticancéreux en

médecine ou comme outils en biologie moléculaire (agents de footprinting dans l'étude de l'interaction entre l'ADN et son ligand ou sondes pour étudier les conformations de l'ADN).

<i>Familles de nucléases</i>	<i>Equipes d'étude</i>
métallobléomycines	Stubbe J., Kozarich J. W., Hecht S. M. ...
métallophénanthrolines	Sigman D. S., Barton J. K. ...
métalلودiaminopolycarboxylates	Tullius T. D., Dervan P. B. ...
métalloporphyrines	Meunier B., Pasternack R. F., Dabrowiak J. C. ...
métallopeptides	Kawanishi S., Dervan P. B., Mack D. P., Burrows C. J. et Rokita S. E., Long E.C. et Eason P. D. ...
métallomacrocycles	Burrows C. J. et Rokita S. E. ...
métallosalènes	Bailly C. et Bernier J. L., Burrows C. J. et Rokita S. E., Gravert J. D. et Griffin J. H., Bhattacharya S. et Mandal S.S. ...
Complexes métalliques diverses	Thorp H. H., Nielsen P. E. ...

Tableau 0.1 : principales familles de nucléases étudiées

Ce travail présente l'étude d'une nouvelle famille de métallosalènes : les salènes polyhydroxylés complexés par le cuivre et le fer (schéma 0.2). L'activité nucléasique de cette famille de métallosalènes a été révélée, dans un premier temps, par des expériences de coupure de plasmide puis, dans un deuxième temps, nous avons réalisé des études physico-chimiques (voltammétrie et RPE) afin de mettre en exergue leurs mécanismes d'action.

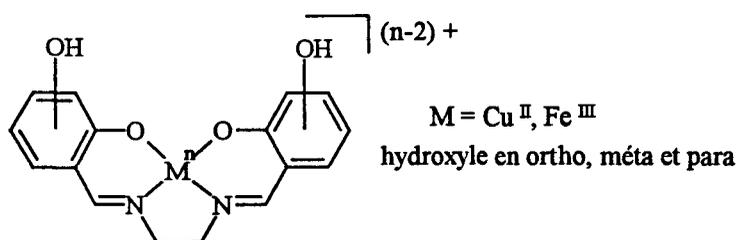


Schéma 0.2 : salènes polyhydroxylés complexés par le cuivre II ou le fer III

Chapitre 1 :
LES ACIDES NUCLEIQUES
ET
LA COUPURE OXYDANTE

1. LES ACIDES NUCLEIQUES

Les acides nucléiques¹⁻³ sont des macromolécules présentes dans toutes les cellules eucaryotes et procaryotes ainsi que chez certains virus. Ils ont une importance fondamentale car ils sont, soit le support de l'information génétique pour les ADN (support du génome), soit les agents permettant l'expression de cette information pour les ARN (outils pour la synthèse protéique).

Il existe deux types d'acides nucléiques : les ADN ou acides désoxyribonucléiques et les ARN ou acides ribonucléiques.

L'ADN se trouve essentiellement dans le noyau des cellules végétales et animales au niveau des chromosomes. Chez les procaryotes (bactéries et algues bleues), c'est également de l'ADN qui constitue les chromosomes. Certains virus, comme les bactériophages, ont un génome constitué d'ADN. On trouve en outre de l'ADN dans les mitochondries des cellules animales et dans les chloroplastes des organismes photosynthétiques.

L'ARN se trouve essentiellement dans le cytoplasme des cellules. En outre, certains virus comme les virus végétaux ont un génome constitué de molécules d'ARN. Les ARN sont classés selon leur fonction dans la cellule : l'ARN messager ou ARNm transporte l'information génétique de l'ADN du noyau aux ribosomes du cytoplasme, l'ARN ribosomal ou ARNr est un des constituants des ribosomes et l'ARN de transfert ou ARNt lie les acides aminés à leur extrémité 3' et les transportent sur le ribosome où ils seront transférés sur la chaîne protéique en cours d'élongation. Ce sont les ARNr (82%) qui sont de loin les ARN les plus abondants de la cellule, viennent ensuite les ARNt (16%) et les ARNm (2%).

1.1. Structure primaire des acides nucléiques

Les acides nucléiques³ sont donc des polymères de ribonucléotides pour les ARN ou de désoxyribonucléotides pour les ADN. L'unité formée seulement d'un sucre et d'une base

nucléique est appelée nucléoside. Les nucléotides contiennent en plus un ou plusieurs groupements phosphates en 5' ou 3'.

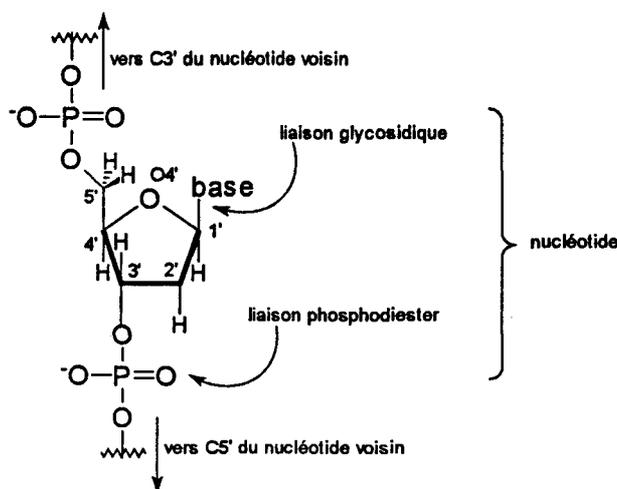


Schéma 1.1 : enchaînement de nucléotides

Les nucléotides sont reliés entre eux par des liaisons 3' et 5' phosphodiester pour former un squelette polymérique sucre-phosphate (schéma 1.1) : un groupement phosphate est estérifié sur l'hydroxyle 3' d'un pentose et sur l'hydroxyle 5' du pentose suivant. Cet enchaînement sucre-phosphate est absolument identique pour tous les acides nucléiques, seuls la longueur et l'ordre dans lequel les bases se suivent le long de la chaîne (séquence des bases) est caractéristique d'un acide nucléique : chacune des quatre bases nucléiques (schéma 1.2), les purines (adénine et guanine) et les pyrimidines (cytosine/uracile et thymine), est attachée aux sucres par une liaison glycosidique dans un ordre bien établi.

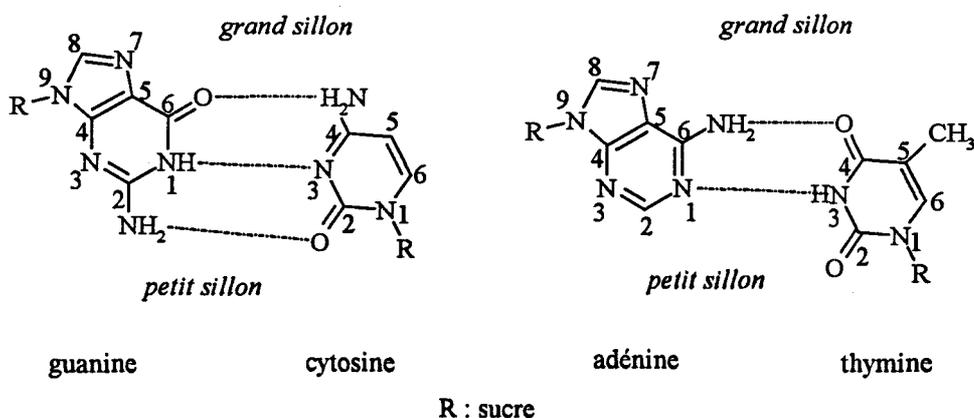


Schéma 1.2 : bases nucléiques et plans de bases AT et GC

1.2. Structures secondaires et tertiaires des acides nucléiques

1.2.1. L'ADN et ses différentes formes

Les formes¹ sous lesquelles on rencontre les ADN dans le monde vivant sont très variées. L'ADN peut ainsi être circulaire simple brin (bactériophage M13), circulaire double brin (virus SV40), circulaire double brin avec des interruptions (virus de l'hépatite B) ou même en quadruple hélice (au niveau des télomères).

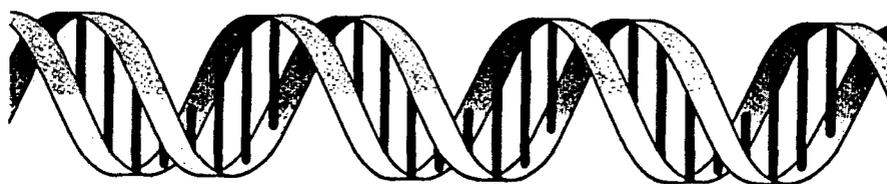


Schéma 1.3 : double hélice B de l'ADN³

Les molécules d'ADN double brin adoptent une configuration hélicoïdale (modèle de Watson et Crick)⁴⁻⁵. Cette double hélice (schéma 1.3) est constituée de deux chaînes enroulées de polydésoxyribonucléotides : les bases de chaque chaîne, projetées vers le centre c'est-à-dire l'axe de l'hélice, sont liées l'une à l'autre par des liaisons hydrogène (schéma 1.2). La configuration de l'hélice est telle qu'un appariement stable ne peut avoir lieu qu'entre l'adénine et la thymine d'une part (deux liaisons hydrogène) et entre la guanine et la cytosine d'autre part (trois liaisons hydrogène).

Si l'ADN ressemble à une échelle dont les montants sont des alternances de sucre et de phosphate et les barreaux les paires de bases, on remarque que les sites de fixation des barreaux c'est à dire les liaisons glycosidiques (schéma 1.4) sont dans le plan de la paire de bases mais par sur le même axe : elles sont situées du même côté par rapport à cet axe. Au lieu d'avoir une structure régulière, la double hélice présentera deux dépressions, une large et une étroite respectivement dénommées grand et petit sillon. Le grand sillon est riche en groupements qui peuvent établir des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales des acides aminés des protéines. Le petit sillon, bien qu'également profond, est moins accessible³.

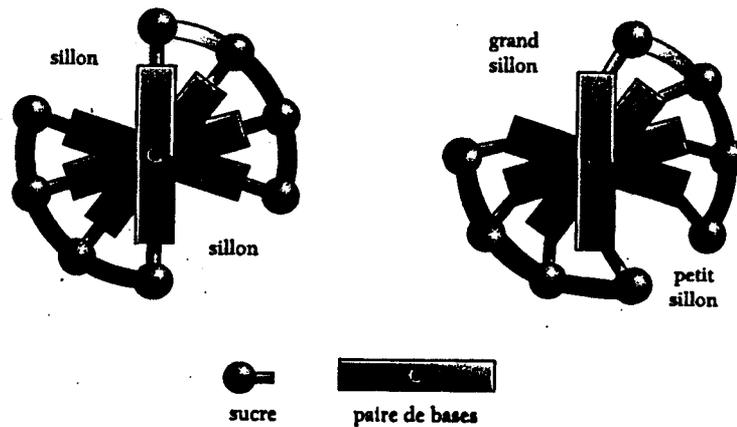


Schéma 1.4 : formation des deux sillons de l'ADN³

Il existe différentes formes d'hélices (tableau 1.1).

L'ADN B, la forme biologique la plus répandue, est une double hélice droite caractérisée par la présence d'un grand sillon et d'un petit sillon bien marqués.

L'ADN A, qui correspond à la structure des hybrides ADN/ARN ou à la structure secondaire des ARN (les ARN ne peuvent pas adopter la conformation d'hélice B car la présence du 2'OH du ribose crée un encombrement stérique), est encore une double hélice droite mais elle est plus large et le petit sillon est pratiquement inexistant.

L'ADN Z est en revanche une double hélice gauche dont le nom vient de la forme en « zigzag » de l'enchaînement des phosphates. Cette forme ne possède qu'un seul sillon profond. La structure en ADN Z est favorisée par des séquences alternantes de bases puriques avec des bases pyrimidiques, par de fortes concentrations salines et par la méthylation du carbone C5 de la cytosine.

Il est fort probable que des variations locales de structure dues à la séquence existent dans toutes les molécules d'ADN. Ces variations locales de conformation sont déterminantes dans les mécanismes de reconnaissance de l'ADN par des protéines ou des complexes métalliques.

	ADN A	ADN B	ADN Z
Caractéristiques générales			
Aspect général	Courte et large droite	Longue et fine droite	Allongée et étroite gauche
Sens de rotation	Grand sillon	Dans la paire de bases	Petit sillon
Localisation de l'axe de l'hélice	C3' endo	C2' endo	C3' endo
Conformation du sucre	Anti	Anti	Anti pour les C
Conformation liaison glycosidique			Syn pour les G
Taux d'hydratation	faible	forte	très faible
Quelques chiffres			
Distance entre paires de bases	2,30 Å	3,32 Å	3,80 Å
Diamètre de l'hélice	25,5 Å	35,9 Å	18,4 Å
Paires de bases par tour	11	10,4	12
Rotation moyenne par paire de bases	33,6°	35,9°	- 60° pour 2 paires
Valeur moyenne du pas d'hélice	24,6 Å	33,2 Å	45,6 Å
Proportions des sillons			
Grand sillon	Très étroit et très profond	Large et de profondeur intermédiaire	Aplati à la surface de l'hélice
Petit sillon	Très large et plat	Étroit et de profondeur intermédiaire	Très étroit mais très profond

Tableau 1.1 : comparaison des conformations A, B, Z des ADN³

1.2.2. Les ARN

Les ARN¹ sont généralement des molécules linéaires simples brins, mais elles peuvent être circulaires simples brins (viroïdes) et même linéaires double brin (réovirus, responsables des désordres intestinaux).

Les ARN monobrin peuvent adopter des structures locales de double hélice. En effet, diverses liaisons hydrogène peuvent s'établir localement entre adénine et uracile d'une part et entre guanine et cytosine d'autre part. Mais ces liaisons n'ont pas le caractère de régularité qui est le propre des ADN.

En fait, les ARN adoptent une grande variété de conformations tridimensionnelles⁶. Ils peuvent, par exemple, être plus ou moins linéaires pour les ARNm, en forme de trèfle ou de L pour les ARNt ou localement en forme de pseudo-hélice pour les ARNr. La structure tertiaire des ARN, comme celles des protéines, est donc caractéristique de la molécule et est fonctionnellement très importante surtout pour les ARN à activité enzymatique (les ribozymes).

1.3. Coupure des acides nucléiques

Ce travail présente l'étude d'une nouvelle famille de molécules à activité nucléasique c'est à dire capables d'induire des coupures au sein des acides nucléiques.

Cette coupure, induite par une nucléase chimique, peut ainsi être (schéma 1.5) :

- Nucléophile (hydrolyse de la liaison phosphodiester).
- Oxydante (oxydation des liaisons CH du sucre).
- Par addition d'électrophile (modifications des bases nucléiques qui conduisent à la rupture des liaisons phosphodiester en milieu basique).

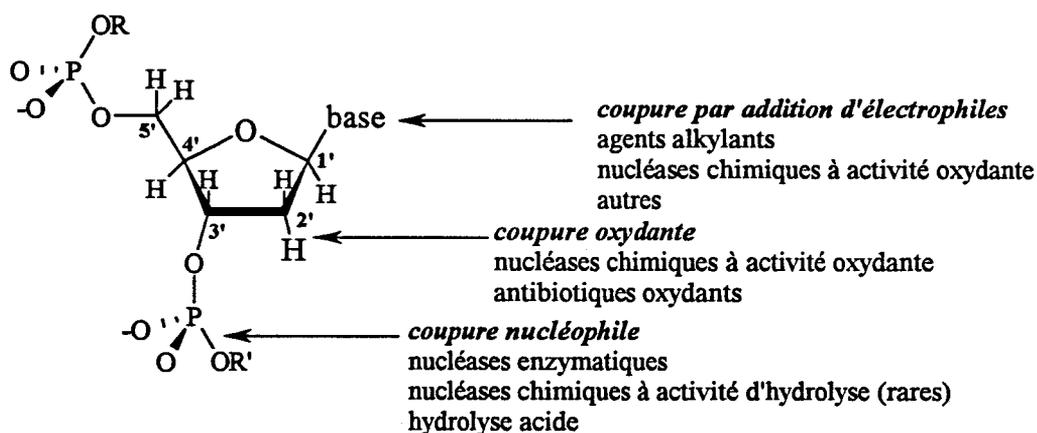


Schéma 1.5 : principales voies de coupure des acides nucléiques par une nucléase

2. LA COUPURE HYDROLYTIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES

La liaison phosphodiester est très stable (cinétique lente) devant l'hydrolyse. Mais catalysée par une base, une enzyme ou un complexe métallique, l'hydrolyse peut être très rapide.

L'hydrolyse (schéma 2.1) d'une fonction phosphodiester est une S_N2 avec inversion de configuration de l'atome de phosphore⁷. Dans le cas des ARN⁸, l'hydrolyse est plus facile que dans le cas des ADN. L'hydrolyse alcaline a peu d'effet sur les ADN (elle provoque seulement la rupture des liaisons hydrogène entre les deux brins d'ADN) alors qu'elle entraîne l'hydrolyse de la liaison phosphodiester et donc la coupure des ARN : l'hydroxyle en 2' est un nucléophile intramolécule qui peut attaquer la liaison 3'-phosphodiester adjacente.

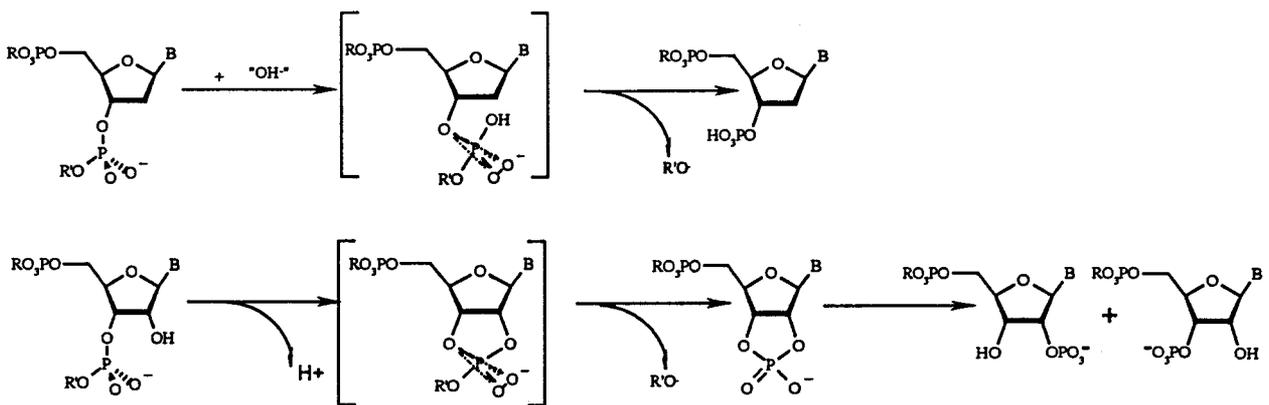


Schéma 2.1 : hydrolyse d'un acide nucléique

2.1. Hydrolyse par une nucléase enzymatique

Les enzymes appelées nucléases⁹ catalysent l'hydrolyse de la fonction phosphodiester des acides nucléiques. On les trouve dans les cellules de tous les êtres vivants : chez les mammifères, le pancréas produit une quantité particulièrement importante de nucléases sécrétées dans l'intestin où elles contribuent à digérer les acides nucléiques d'origine alimentaire.

On dénombre deux types de nucléases enzymatiques : les endonucléases et les exonucléases.

Les endonucléases à ARN (ribonucléases) ou à ADN (désoxyribonucléases) hydrolysent les fonctions phosphodiester à l'intérieur d'une chaîne d'ADN ou d'ARN.

Parmi les ribonucléases, on trouve par exemple la ribonucléase T1 qui coupe après une guanine ou la ribonucléase pancréatique qui coupe après une pyrimidine.

Parmi les désoxyribonucléases, on distingue, les endonucléases peu spécifiques qui induisent des coupures monobrins comme l'ADNase I (isolée du pancréas de bœuf) et les endonucléases spécifiques appelées enzymes de restriction¹⁰. Ces dernières sont des enzymes bactériennes qui dégradent les ADN viraux étrangers et donc protègent la bactérie de toute infection virale. Chaque bactérie possède son propre jeu d'enzymes de restriction spécifiques d'une séquence particulière (généralement en palindrome).

Contrairement aux endonucléases, les exonucléases à ARN (ribonucléases) et à ADN (désoxyribonucléases) hydrolysent les fonctions phosphodiester aux extrémités 3' ou 5' (suivant l'exonucléase) des ADN et des ARN et en élaguent un par un les résidus de nucléotides. A titre d'exemple, la phosphodiesterase de venin de serpent libère des nucléosides 5'-monophosphate et ce progressivement à partir de l'extrémité 3'.

On commence à comprendre le mécanisme d'action des nucléases enzymatiques¹¹. Suivant la nature de la nucléase, l'attaque de la molécule d'eau sur la liaison phosphodiester est catalysée soit par des acides aminés, comme par exemple pour l'ARNase A¹² (imidazole), soit par des cations, comme par exemple pour l'ADNase I¹¹ (Ca^{2+}), la nucléase S¹¹ (Ca^{2+}), les enzymes de restriction *Eco* RI¹¹ (un ou deux Mg^{2+}) et *Eco* RV¹¹ (Mg^{2+}).

Pour le fragment Klenow de l'ADN polymérase I de *E. Coli*¹³ (à activité exonucléasique), et pour la nucléase P1¹³, deux sites métalliques (2 Mn^{2+} pour la polymérase et 2 Zn^{2+} pour la nucléase P1) ont été identifiés dans le site actif de ces enzymes. Un mécanisme de coupure catalysée par deux métaux est ainsi proposé pour de nombreuses nucléases enzymatiques : l'un des cations forme le nucléophile hydroxyde et l'oriente vers la fonction phosphodiester alors que l'autre cation stabilise l'état de transition pentacoordonné et/ou le nucléofuge¹⁴⁻¹⁵.

A coté des ARNases, on trouve les ribozymes¹⁶⁻¹⁷, ARN catalysant l'hydrolyse des ARN au moyen de cations métalliques.

2.2. Hydrolyse par une nucléase chimique

Contrairement à la coupure des acides nucléiques par les enzymes de restriction qui forme des oligonucléotides 5'-phosphate et 3'-hydroxyle « ressoudables » par les ligases, la coupure par les nucléases chimiques oxydantes produit des brins d'ADN non « ressoudables » par les ligases. Les nucléases chimiques oxydantes ne peuvent donc pas être utilisées dans la technologie de l'ADN recombinant¹.

Une coupure hydrolytique sur les liaisons phosphodiester (attaque nucléophile d'une molécule d'eau) préserve la fonctionnalité des sucres et des bases nucléiques et libère des extrémités 5'-phosphate et 3'-hydroxyle sur les oligonucléotides. Les nucléases chimiques à activité hydrolytique ont donc une potentialité très intéressante. Cependant les résultats actuels pour obtenir des nucléases chimiques avec une telle activité se sont révélés très modestes. Des coupures hydrolytiques sont certes observées sur les modèles de phosphodiester mais l'efficacité de ces coupures sur les acides nucléiques reste très limitée¹⁸⁻²⁴.

Le mécanisme d'action des nucléases chimiques hydrolytiques s'explique par le rôle catalytique du métal (schéma 2.2). Il peut ainsi^{25-26, 240} :

- Faire écran des charges négatives de la chaîne polyanionique des phosphates et ainsi diminuer les répulsions électrostatiques entre le nucléophile (HO⁻) et sa cible (liaison phosphodiester).
- Apporter et/ou situer le nucléophile.
- Induire ou au contraire limiter des tensions dans l'état de transition (par exemple, l'angle O-P-O passe de 109° à 90° pour un groupe apical et de 109° à 120° pour un groupe équatorial) en se coordonnant à l'oxygène de la liaison P=O.
- Polariser la fonction P=O en se coordonnant à l'oxygène de la liaison (activation électrophile).
- Stabiliser un groupe anionique partant, attaquant ou faisant partie de l'état de transition (stabilisation de la charge par un acide de Lewis).

- Ioniser les molécules d'eau de sa sphère de coordination en baissant leur pK_a (catalyse acide).

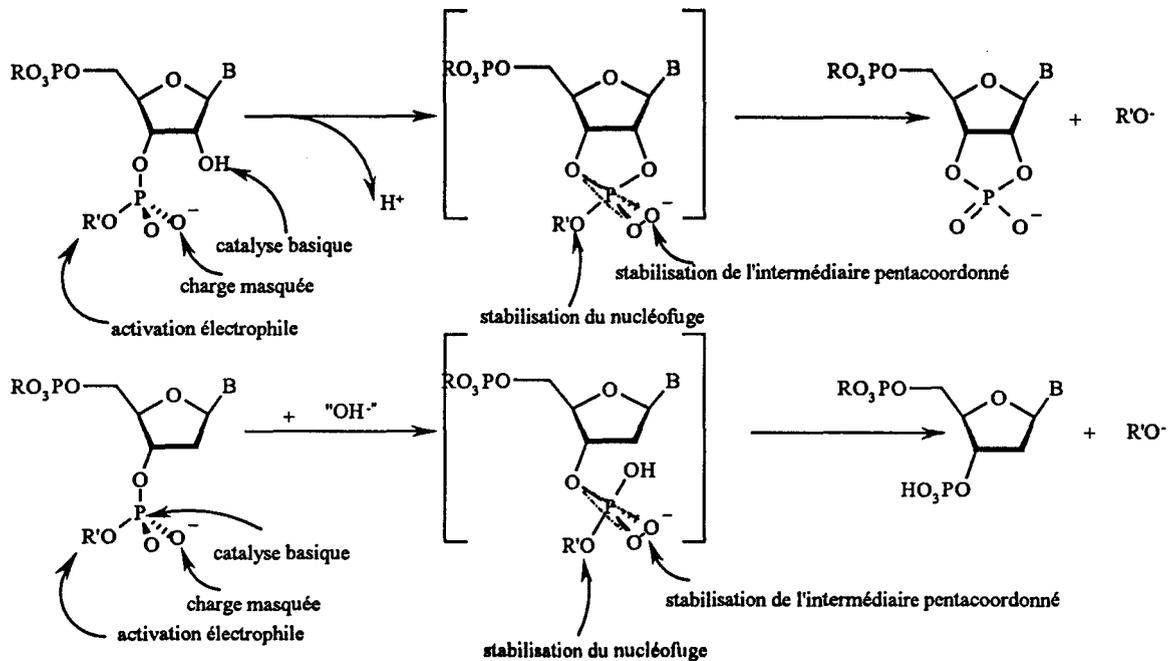


Schéma 2.2 : hydrolyse et complexes métalliques

Il est évident qu'un complexe métallique peut jouer différents rôles en même temps.

La première génération de nucléases chimiques à activité hydrolytique¹⁴ comprend des complexes monocationiques (schéma 2.3). Cependant, la coupure des acides nucléiques induite par de telles nucléases chimiques reste faible.

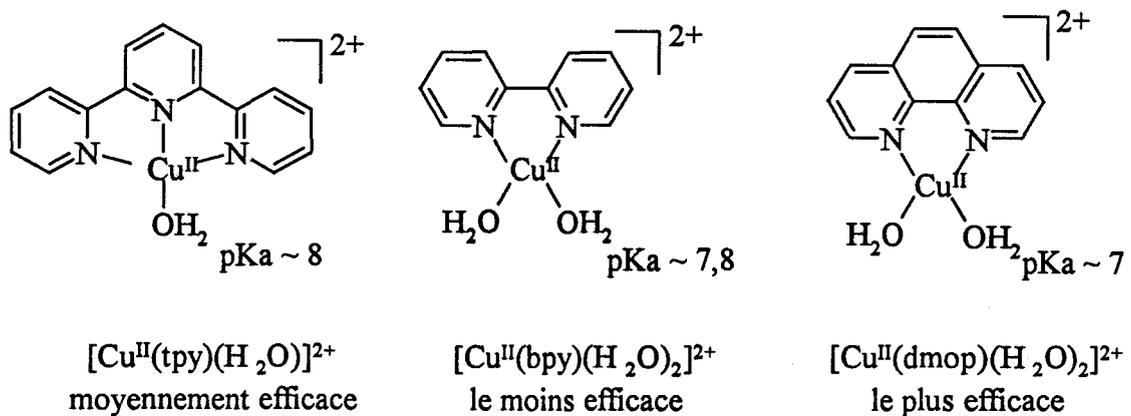


Schéma 2.3: exemple de nucléases chimiques à activité hydrolytique de première génération.

La deuxième génération¹⁴ (schéma 2.4) prend en compte les observations des sites bimétalliques de certaines nucléases enzymatiques et comprend donc des complexes bicationiques. Toutefois les succès restent limités surtout en ce qui concerne la coupure des ADN et des progrès considérables restent à faire avant de disposer de véritables nucléases chimiques à activité hydrolytique efficace.

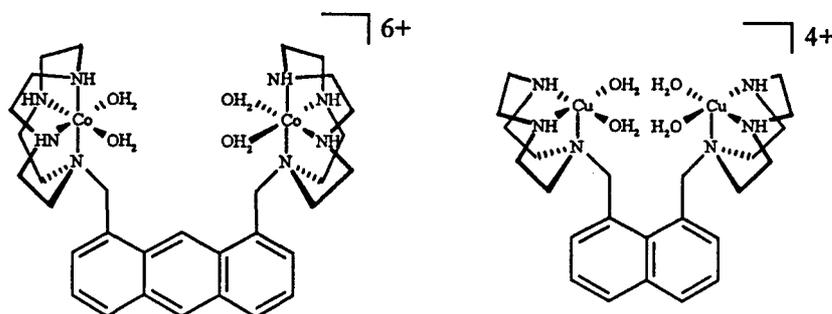


Schéma 2.4 : exemples de nucléases chimiques hydrolytiques de deuxième génération

La recherche s'est donc axée principalement sur la coupure oxydante qui donnent des rendements de coupure bien plus intéressants.

3. LA COUPURE OXYDANTE DES ACIDES NUCLEIQUES

Le principe d'une nucléase chimique à activité oxydante est représenté dans le schéma 3.1 : l'espèce oxydante (voir partie 6) formée près de l'ADN (voir partie 4) suite à l'activation de la nucléase (voir partie 5) oxyde les sucres (coupure directe et aléatoire) et/ou les bases nucléiques (coupure indirecte et sélective).

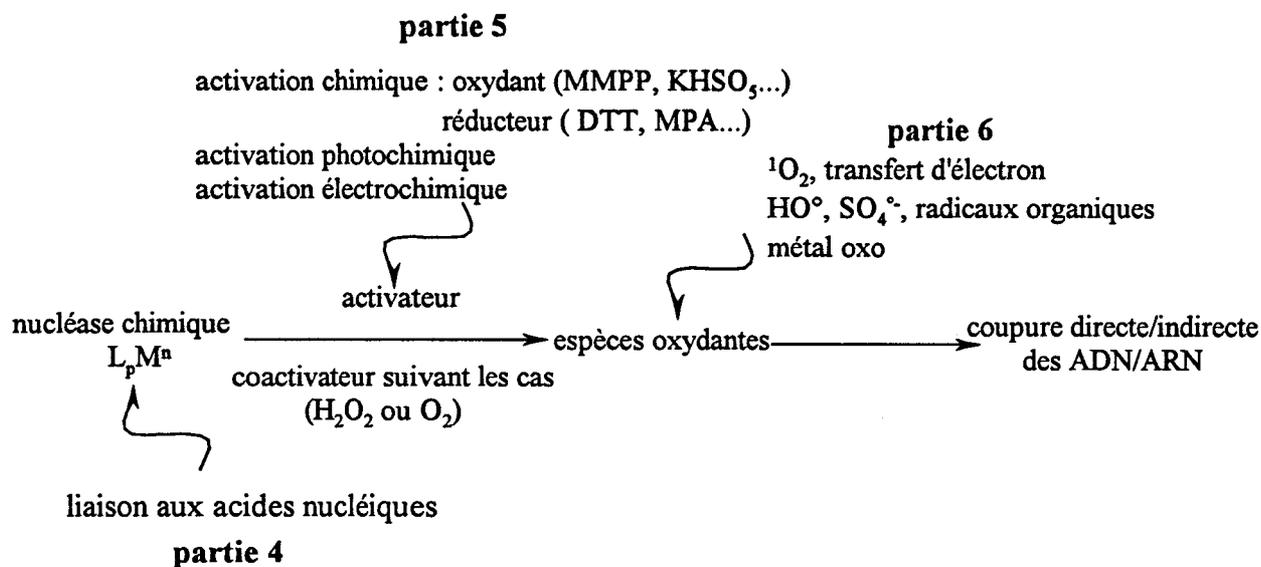


Schéma 3.1 : Principe d'une nucléase chimique à activité oxydante

3.1. Coupure oxydante directe

L'étape commune à tous les mécanismes d'oxydation du sucre passe par l'arrachement d'un radical H° pour former un radical carboné C° sur le sucre²⁷⁻²⁸. Ce radical C° conduit généralement à une coupure monobrin après un réarrangement.

D'après des calculs ab-initio effectués sur des modèles de nucléotides²⁹, l'arrachement de l'hydrogène pour former un radical C° est corrélé à la force de la liaison C-H : l'oxydation des carbones C1', C3' et C4' nécessite des énergies comparables (radical stabilisé par effet mésomère avec l'oxygène adjacent) alors que les carbones C2' ont besoin de plus d'énergie (absence de stabilisation par effet mésomère). De plus, il ne faut pas oublier que les carbones C2' et C5' sont des carbones secondaires et que les carbones C1', C3' et C4' sont des carbones tertiaires donc plus facilement oxydables en radicaux C°.

Dans l'ADN double brin, il faut de plus tenir compte de l'accessibilité de l'espèce oxydante aux différents hydrogènes. D'après la structure en double hélice de l'ADN-B, seuls les hydrogènes H5', H4' et H1' sont accessibles du petit sillon et seuls les hydrogènes H3' et H2' le sont du grand sillon. De tous les hydrogènes des désoxyriboses, les hydrogènes H5' et H4' sont les plus accessibles^{27,30}.

Dès que le radical C° est formé, il peut évoluer (tableau 3.1) suivant différentes voies selon la présence ou l'absence de réducteur, d'oxydant, d'oxygène, de thiol et de la valeur du pH du milieu³⁰⁻³³. Ces transformations aboutissent généralement à une coupure des liaisons phosphodiester adjacentes et à la formation d'un résidu de sucre. Cependant, l'arrachement d'un hydrogène du désoxyribose ne conduit pas obligatoirement à une coupure mais peut conduire à la formation d'un résidu de sucre métastable susceptible d'être hydrolysé par la suite (coupure base-dépendante).

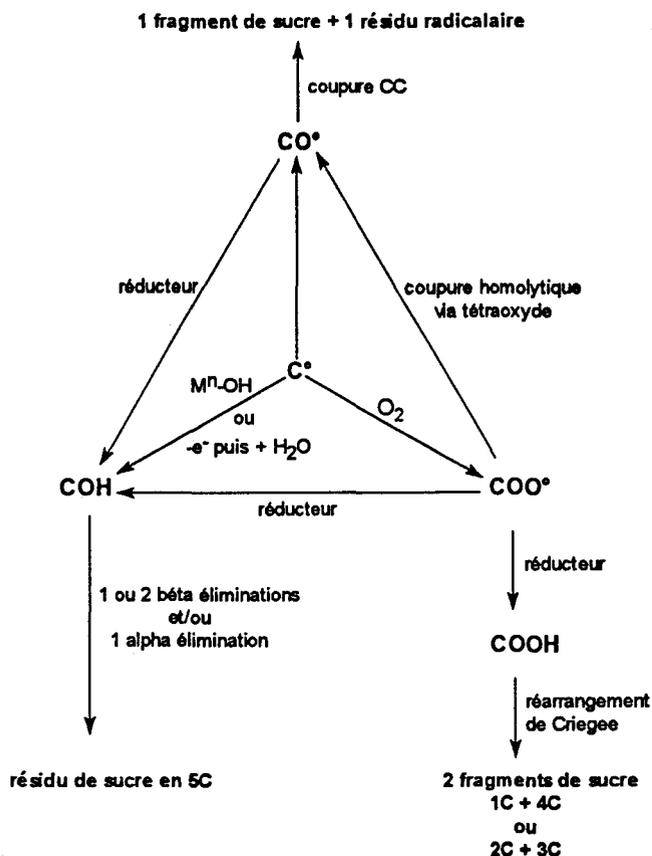
Le sucre possède plusieurs liaisons C-H susceptibles d'être oxydées en radical C°²⁷. Ainsi, le désoxyribose des ADN possède sept hydrogènes susceptibles d'être arrachés. A chaque type d'hydrogène correspond une voie de dégradation qui est caractérisée, soit par l'analyse des produits de coupure (par électrophorèse PAGE ou par GC/masse), soit par des mesures d'effets isotopiques (tableau 3.1)^{27,30}.

Les principales nucléases à oxydation directe sont regroupées dans le tableau 3.2.

3.2. Coupure oxydante indirecte

Les bases nucléiques peuvent être attaquées par quelques nucléophiles comme l'hydrazine mais surtout par divers électrophiles³⁴ (schéma 3.2) comme :

- les protons acides H⁺ : l'hydrolyse acide à chaud entraîne la coupure des liaisons base-sucre C1'-N1' (bases pyrimidique) et C1'-N9' (bases puriques) alors que l'hydrolyse acide ménagée entraîne une dépurination partielle.
- les alkylants R⁺ comme le diméthylsulfate ou le gaz moutarde.
- les oxydants comme HO°, SO₄°, ¹O₂, espèces métal-oxo.



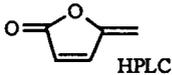
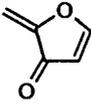
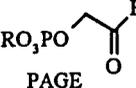
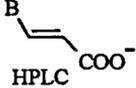
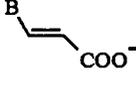
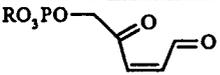
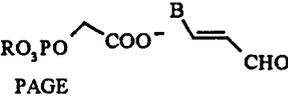
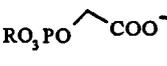
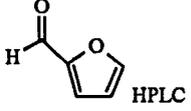
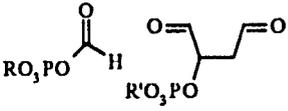
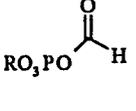
	Résidus de sucre constitués de 5 carbones via COH	Résidus de sucre constitués de 1 et 4 carbones constitués de 2 et 3 carbones via COOH	Résidus de sucre via CO°
C1'			
C3'		 	
C4'			
C5'			

Tableau 3.1 : principaux produits et voies de dégradation suivant la liaison CH oxydée (exemples détaillés dans le chapitre 2)

Nucléase	activation	cibles	espèce oxydante
Métallobléomycines Fe ^{II} (BLM) ou Fe ^{III} (BLM) Co ^{II} (BLM)	O ₂ /réd ou KHSO ₅ H ₂ O ₂ , hv	C4' C4' ?	Fe ^{III} OOH, Fe ^V =O Co ^{III} OOH ?, HO° ?
Métallopénéanthrolines [Cu ^{II} (phen) ₂] ²⁺ [Rh ^{III} (phen) ₂ (phi)] ³⁺ [Rh ^{III} (phi) ₂ (bpy)] ³⁺	O ₂ /réd ou H ₂ O ₂ /réd hv hv	C1' (80%) C4' (20%) C3' C3'	Cu ^{III} OH, Cu ^{III} =O, HO° ? phi ^{o+} phi ^{o+}
Métalloporphyrines [Mn ^{III} (TMPyP)] ⁵⁺	O ₂ /réd ou KHSO ₅	C1' (GC) et C5' (AT)	Mn ^V =O
Métallobis(oxalato)polycarboxylate [Fe ^{III} (EDTA)] Fe ^{II} (MPE)	O ₂ /réd ou φIO O ₂ /réd ou φIO	C4' et C5' C4' et C5'	HO° HO°
Divers [Ru ^{II} (tpy)(bpy)(OH ₂)] ²⁺ U ^{VI} O ₂ ²⁺ [Pt ^{II} ₂ (pop) ₄] ⁴⁺	électrochimie hv hv	C1' C1' ? C4' et C5'	Ru ^{IV} =O U ^{VI*} ? Pt ^{II*} ?

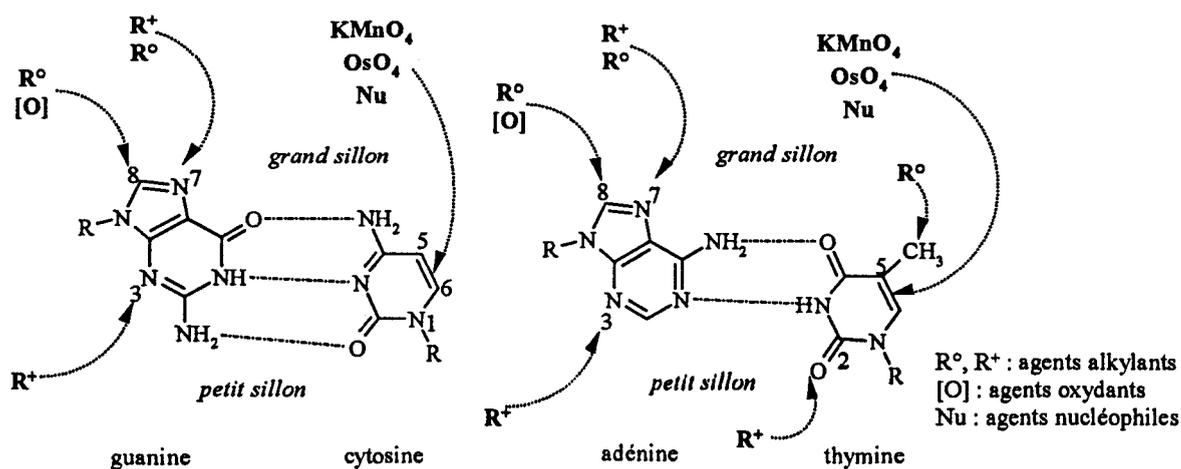
 Tableau 3.2 : exemples de nucléases chimiques à coupure directe³⁰ (détails dans le chapitre 2)


schéma 3.2 : principaux sites d'attaque des électrophiles sur les quatre bases nucléiques

Ces électrophiles conduisent rarement à une coupure directe de l'acide nucléique mais le rendent particulièrement sensible à un traitement basique/thermique ultérieur (schéma 3.3)

car ils modifient la densité électronique de l'hétérocycle (ce qui améliore le caractère nucléofuge de la base nucléique)³⁴.

Lors de ce traitement (pipéridine pour les ADN et aniline pour les ARN), la base nucléique modifiée par l'électrophile subit une déglycosylation et forme un site abasique. Les sites abasiques induisent ensuite une coupure des acides nucléiques en milieu basique via une succession de deux β -éliminations ($H_{2'}$ et $H_{5'}$ sont des protons basiques). Des oligonucléotides 3'- et 5'-phosphate sont ainsi formés.

Une telle coupure est beaucoup plus sélective qu'une coupure induite par oxydation du sucre puisque les électrophiles réagissent différemment suivant la nature de la base nucléique.

Parmi les quatre bases nucléiques, la guanine est la base la plus facile à oxyder (tableau 3.3)³⁴⁻³⁵. Une nucléase chimique oxydante agissant sur les bases provoque donc des coupures essentiellement au niveau des guanines. Généralement, une nucléase capable d'oxyder les sucres est aussi capable d'oxyder les guanines.

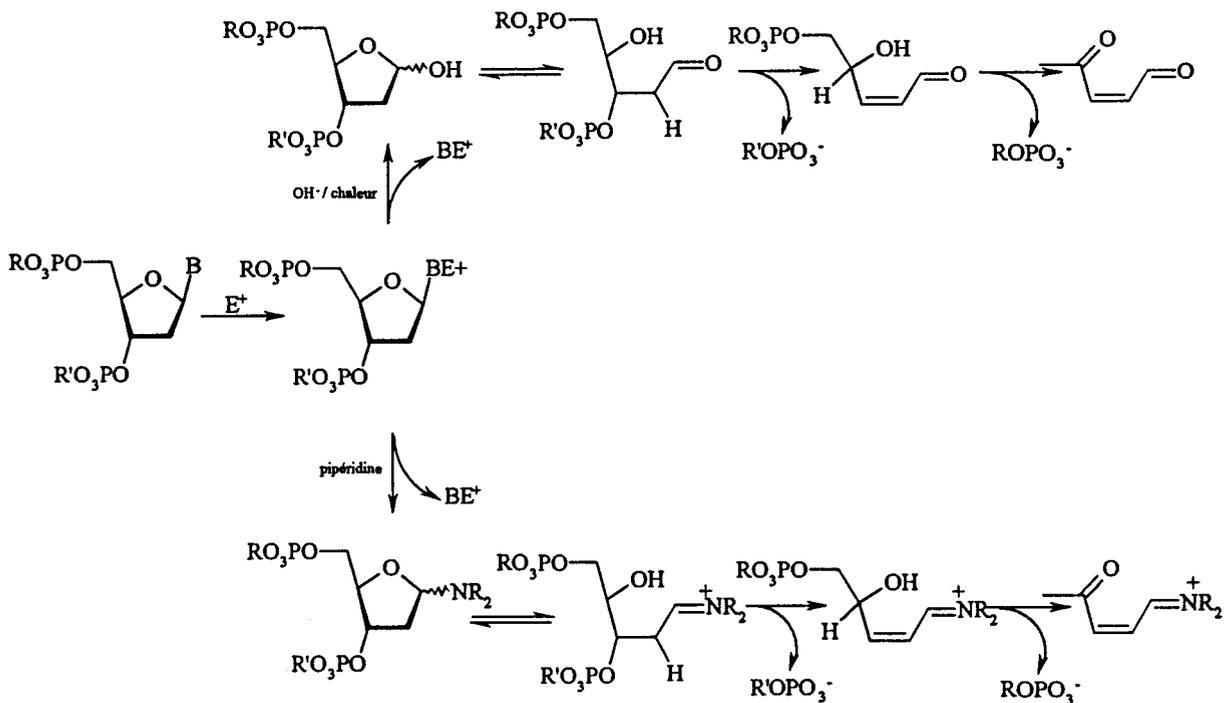


Schéma 3.3 : coupure indirecte via un électrophile (oxydant ou non)

Par ailleurs, l'oxydation des guanines est sensible aux nucléotides voisins de la guanine visée³⁶⁻³⁷. Généralement, on observe l'ordre de réactivité suivant dans les ADN-B³⁴

5'GGGG > 5'GGG > 5'GG > 5'GA > 5'GT ≈ 5' GC (où la guanine soulignée est la guanine oxydée). L'ordre de cette séquence s'explique par des variations locales du potentiel d'oxydation de la guanine suivant la nature des nucléotides voisins (tableau 3.3).

espèces		Potentiel d'oxydation (V vs NHE) à pH=7
Nucléotides hors ADN	rG	1,29
	rA	1,42
	rC	1,60
	rT	1,70
Séquences de l'ADN	GGG	0,64
	GG	0,82
	GA	1,00
	GC	1,15
	GT	1,16
	G	0,85

Tableau 3.3 : potentiels d'oxydation des guanines³⁴

La guanine peut être directement ou indirectement³⁸ oxydée : une base nucléique quelconque, oxydée en X^{o+}, peut accepter un électron d'une base adjacente et ce transfert d'électrons le long de l'hélice peut se propager jusqu'à une base de faible potentiel d'oxydation comme une guanine.

Le produit d'oxydation majeur de la guanine est 8-oxo-G (8-oxoguanine). Mais il existe de nombreux autres produits d'oxydation comme, par exemple, FAPy-G (2,6-diamino-5-formamido-4-hydroxypyrimidine).

L'espèce 8-oxo-G peut être formée de différentes manières (schéma 3.4)³⁴ :

- par une oxydation par HO^o.
- par une abstraction d'électron par un oxydant pour former un radical cation G^{o+} qui après hydratation et oxydation donne 8-oxo-G.
- par une cycloaddition [2+4] avec l'oxygène singulet pour produire un endoperoxyde qui après ouverture de cycle donne 8-oxo-G.
- par une oxydation de deux électrons et un oxo transfert avec un complexe de ruthénium IV.

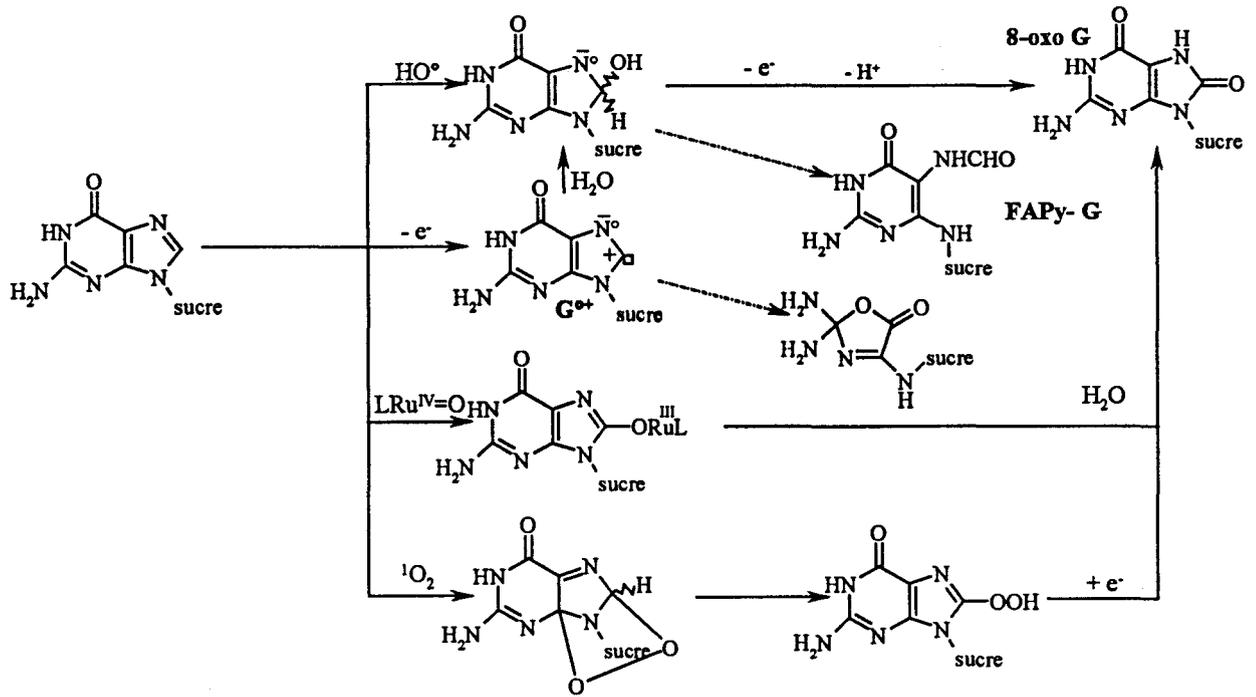


Schéma 3.4 : oxydation de la guanine³⁴

Les principales nucléases à coupure indirecte sont regroupées dans le tableau 3.4.

nucléases	activation	Cible	Espèce oxydante
Métaux libres			
CuCl ₂	O ₂ /réd ou H ₂ O ₂ KHSO ₅	G, T G	Cu ^{III} -OH ou Cu ^I OOH Cu ^{III} -OSO ₃ ^o , SO ₄ ^o , HO ^o
MnCl ₂	O ₂ /RNHNH ₂ O ₂ /Na ₂ SO ₃	G, T	HO ^o SO ₄ ^o , SO ₃ ^o , O ₂ ^o
CoCl ₂	H ₂ O ₂ KHSO ₅ ou Na ₂ SO ₃ /O ₂	G G	¹ O ₂ SO ₄ ^o
NiCl ₂	KHSO ₅	aucune	-
Métallobléomycines			
Ni ^{II} (BLM)	KHSO ₅ ou Ir ^{IV}	G	Ni ^{III}
Métallophénanthrolines			
[Fe ^{II} (5-Clphen) ₃] ²⁺	Oxydation électrochimique	GG	Fe ^{III} (e ⁻)
[Rh ^{III} (phi) ₂ (bpy)] ³⁺	Oxydation photochimique	GG	phi ^{o+} (e ⁻)
[Ru ^{II} (phen) ₃] ³⁺	Oxydation photochimique	G	Ru ^{II*} (¹ O ₂)
[Ru ^{II} (Me ₂ dppz)(phen)(bpy)] ²⁺	Oxydation photochimique	GG	Ru ^{II*} (e ⁻)
[Ru ^{II} (dppz)(phen) ₂] ²⁺	Oxydation photochimique	GG	Ru ^{II*} (e ⁻)
[Ru ^{II} (bpy) ₃] ²⁺	Oxydation photochimique K ₂ S ₂ O ₈ /hv	G GG	Ru ^{II*} (¹ O ₂) Ru ^{II*} (e ⁻)
Métalloporphyrines			
[Mn ^{III} (TMPyP)] ⁵⁺	KHSO ₅	G	Mn ^V =O
Métallopeptides			
Cu ^{II} (XXH) Ni ^{II} (XXH)	H ₂ O ₂ /asc KHSO ₅ ou Na ₂ SO ₃ /O ₂	G G	Cu ^{III} -OH? Ni ^{III} -OSO ₃ ^o
Métalldiaminopolycarboxylates			
Fe ^{II} (EDTA)	O ₂ /réd	G	HO ^o
Métallomacrocycles			
Ni ^{II} (cyclam), Ni ^{II} (CR) [Co ^{III} (cyclam)(CH ₃)(OH ₂)] ²⁺	KHSO ₅ Oxydation photochimique	G > C > T G ?	Ni ^{III} -OSO ₃ ^o CH ₃ ^o
Métallosalènes			
Ni ^{II} (salen) Mn ^{III} (salen)	KHSO ₅ ou MMPP KHSO ₅ ou MMPP	G G	salen ^{o+} ? Mn ^V =O
Divers			
[Ru ^{II} (tpy)(bpy)(OH ₂)] ²⁺ [Co ^{II} (bithiazole)] ²⁺	Oxydation électrochimique O ₂	G G	Ru ^{IV} =O, Ru ^{III} OH Co ^{III} OH

 Tableau 3.4 : exemples de nucléases chimiques à coupure indirecte³⁴ (détails au chapitre 2)

4. NUCLEASES CHIMIQUES OXYDANTES ET INTERACTION AVEC LES ACIDES NUCLEIQUES

Avant la coupure de l'ADN ou de l'ARN, il se forme un complexe d'interaction non covalente entre la nucléase et l'acide nucléique (schéma 3.1). Cette interaction dépend de la charge (elle est nulle pour un complexe chargé négativement), de la taille et de la forme du complexe qui peut être plus ou moins complémentaire à une région locale de l'acide nucléique. Si l'affinité avec ce dernier et le complexe est spécifique, cette nucléase peut servir de sonde structurelle. Si au contraire elle est totalement non spécifique, la nucléase chimique peut servir d'agent de footprinting. Il faut remarquer que l'affinité pour l'acide nucléique est importante pour l'activité nucléasique d'un composé : l'espèce oxydante doit être générée près de sa cible sinon elle est rapidement inactivée par le milieu (souvent le tampon) et ne peut donc pas oxyder l'ADN.



4.1. Molécules non vectorisées

L'affinité d'une nucléase³⁹⁻⁴⁴ avec les acides nucléiques dépend de la géométrie du complexe, de la nature des ligands (taille, possibilité de faire des liaisons hydrogène...) et de la charge globale du complexe (les complexes anioniques ne se lient pas aux acides nucléiques). A l'inverse, la réactivité de coupure est modulée par la nature du métal, son degré d'oxydation, et son champ de ligands.

Dans une liaison entre la nucléase et l'acide nucléique, il faut considérer d'une part les forces d'interaction entre la nucléase et la cible (facteur enthalpique) et d'autre part les effets de solvant et d'ions déplacés (facteur entropique)⁴³.

Les complexes métalliques à activité nucléasique interagissent (schéma 4.1) avec les acides nucléiques par :

- liaison externe (squelette polyphosphate)
- liaison de surface (petit et grand sillon)
- intercalation (plans de bases)
- coordination (bases nucléiques)

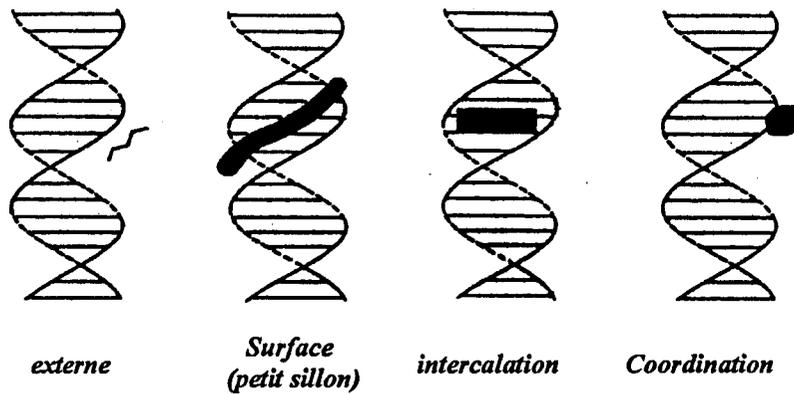


schéma 4.1 : différents modes de liaison pour les nucléases chimiques

4.1.1. La liaison externe (squelette polyphosphate)

La liaison externe est purement électrostatique⁴⁴. Le squelette polyphosphate des acides nucléiques est chargé négativement (une charge négative pour 1,7 Å). Il peut donc interagir avec de nombreux cations⁴⁵⁻⁴⁸ comme les cations alcalins, des groupements organiques cationiques comme les ammoniums et même des molécules polaires comme l'eau.

Ces liaisons externes avec les cations résiduels présents dans le milieu réduisent la charge effective négative des acides nucléiques (une charge négative pour 7 Å) en formant une couche de contre-ions positifs autour des acides nucléiques. Ils sont ainsi responsables de la stabilité de ces derniers en phase aqueuse.

4.1.2. La liaison de surface (petit et grand sillon)

Généralement, lorsque l'interaction électrostatique est prépondérante sur les autres interactions, les complexes se lient préférentiellement dans le petit sillon⁴⁴. En effet, dans le petit sillon, la proximité des groupements phosphate renforce cette interaction électrostatique avec les groupements cationiques du complexe.

Par ailleurs, le substituant amine des guanines est projeté dans le petit sillon et, comme ce substituant est partiellement chargé positivement, l'interaction électrostatique avec l'ADN est quelque peu atténuée dans les régions du petit sillon riches en paires GC. De plus, comme le petit sillon est plus étroit dans les zones riches en paires AT, les interactions de Van der Waals stabilisatrices y sont plus importantes⁴⁴.

4.1.3. L'intercalation (plans de bases des hélices)

Ce type d'interaction intervient lorsqu'un plan aromatique d'un ligand s'intercale entre deux paires de bases de l'ADN^{44, 241}. Dans ce cas, les interactions électrostatiques sont négligeables devant celles non électrostatiques.

On observe généralement une légère spécificité pour les paires de bases GC. Mais les agents intercalants sont peu spécifiques comparativement à ceux qui reconnaissent le petit sillon.

Une intercalation provoque l'allongement et la détorsion de la double hélice d'ADN, ce qui est utilisé pour caractériser une interaction par intercalation⁴⁹.

4.1.4. La coordination (bases nucléiques)

Les bases nucléiques peuvent se révéler de bons ligands pour les métaux de transition. Par exemple, l'azote N7 des guanines peut se lier de manière covalente avec le cis-platine⁴⁴.

Le tableau 4.1 résume les différents modes d'interaction rencontrés avec les nucléases chimiques :

Modes d'interaction avec les acides nucléiques	Exemples de nucléases
<i>Absence d'affinité</i>	$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})]^{2-}$, $[\text{Pt}^{\text{II}}_2(\text{pop})_4]^{4-}$
<i>Liaison externe</i>	$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$
<i>Interaction de surface</i> petit sillon grand sillon	$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$, $[\text{Mn}^{\text{III}}(\text{TMPyP})]^{5+}$, $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BLM})$ $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{3+}$, $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$
<i>Liaison avec les bases nucléiques</i>	Ni(CR), Ni(cyclam), ions métalliques libres

Tableau 4.1 : modes d'interaction des nucléases chimiques avec les acides nucléiques (détails dans le chapitre 2)

4.2. Molécules hybrides

Il est possible de renforcer l'affinité d'une nucléase chimique voire sa sélectivité ou même sa spécificité vis-à-vis d'une cible en la couplant à une molécule à haute affinité pour les acides nucléiques et de spécificité connue⁵². Ces molécules hybrides miment en quelque sorte les métallobléomycines. En effet, on greffe un vecteur⁵⁰⁻⁵¹ (partie responsable de la liaison) à la nucléase (partie responsable de la coupure). Sont utilisés comme vecteurs :

- Les **agents intercalants**⁵³ (acridines, bromure d'éthidium ...) qui sont généralement des molécules aromatiques ou polyaromatiques planes se liant à l'ADN de manière non covalente par insertion du plan aromatique entre deux paires de bases.
- Les **agents de reconnaissance du petit sillon**⁵⁴ (netropsine, distamycine, Hoechst 33258...) qui comportent généralement plusieurs cycles aromatiques (pyrrole, furanne, benzène) liés entre eux par des liaisons à grande liberté torsionnelle.
- Les **oligonucléotides de séquences complémentaires**⁵⁵⁻⁵⁷ qui forment des hélices double brin avec un acide nucléique cible monocaténaire et une triple hélice avec un acide nucléique cible bicaténaire.
- Les **protéines à affinité spécifique pour les acides nucléiques**⁵⁸ comme les facteurs de transcription, les promoteurs et les répresseurs. La reconnaissance se fait à partir du grand sillon par des motifs de fixation tels ceux à doigt de zinc ou leucines « zipper ».

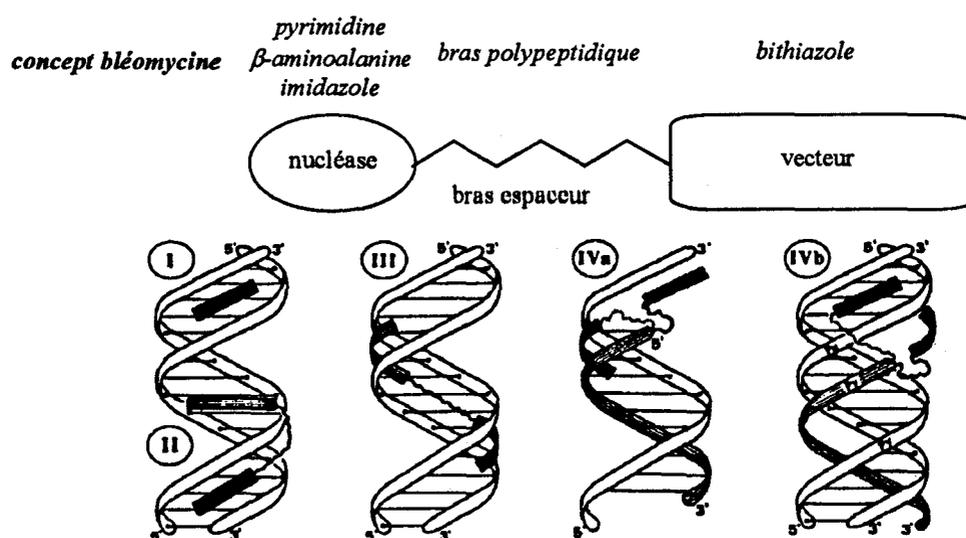


Schéma 4.2 : exemple de la vectorisation des métalloporphyrines
 1. absence de vecteur, 2. Intercalateur, 3. Agent du petit sillon, 4a. oligonucléotide antisens, 4b. antigène (copyright *Adv. Inorg. Chem.*, Meunier et al¹⁴)

5. NUCLEASES CHIMIQUES OXYDANTES ET ACTIVATION

Afin d'induire une coupure, les nucléases chimiques doivent au préalable, et la plupart du temps, être activées par un agent extérieur (schéma 3.1).

5.1. Activation chimique (Cu^{II} , Ni^{II} , Fe^{III} et Fe^{II} , Mn^{III} et Mn^{II} , Co^{II} , Ru^{III})

Les réducteurs permettent de réduire le métal afin d'amorcer la production d'espèces oxydantes mais aussi servant à le régénérer après oxydation pour induire un cycle catalytique.

On utilise ainsi :

- L'acide ascorbique (schéma 5.1)

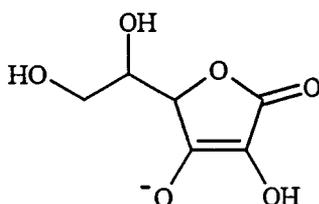


Schéma 5.1 : l'acide ascorbique

- Les thiols (schéma 5.2) : de faibles concentrations potentialisent la coupure (pouvoir réducteur des thiols prépondérant) alors que de fortes concentrations l'inhibent (pouvoir chélateur des thiols en compétition avec la chélation métal-ligand). Les thiols, comme la MPA, qui sont de pauvres chélates, sont ainsi souvent préférés.

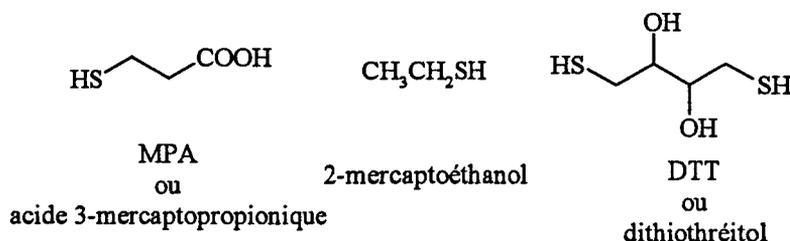


Schéma 5.2 : exemples de thiols

Les oxydants (schéma 5.3) sont des donneurs d'atome d'oxygène et servent à produire des espèces métal-oxo : $\text{L}_p\text{M}^n + \text{XO} \rightarrow \text{L}_p\text{M}^{n+2}=\text{O} + \text{X}$

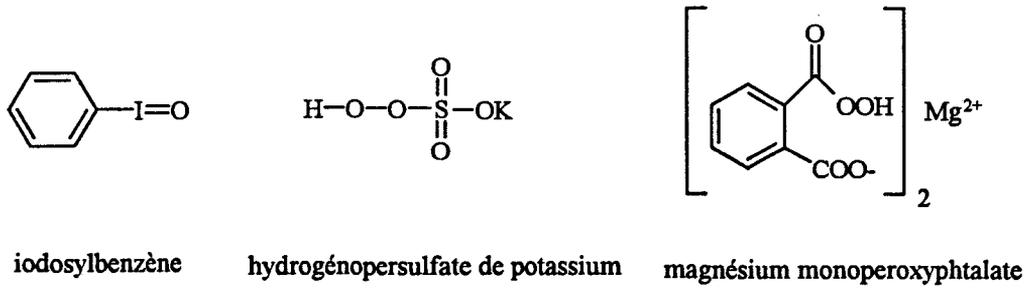
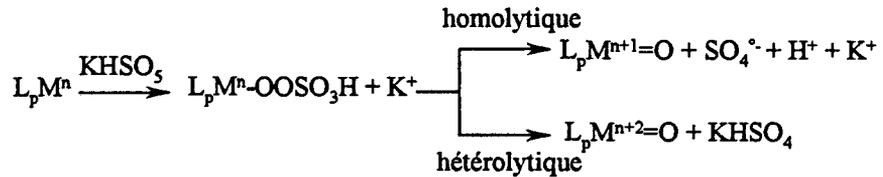


Schéma 5.3 : exemples d'oxydants

- KHSO_5 : l'hydrogénopersulfate de potassium est commercialisé sous la forme d'un mélange stable de 2KHSO_5 , K_2SO_4 , KHSO_4 (oxone[®]). Le potentiel rédox normal du couple $\text{HSO}_5^-/\text{HSO}_4^-$ dans l'eau est de 1,44 V vs NHE.



- ϕIO ou iodosylbenzène (non soluble dans l'eau)
- MMPP et PAA: le magnésium peroxyphthalate et l'acide peracétique sont des peracides solubles dans l'eau.

L'oxygène et les espèces activées de l'oxygène (O_2° , H_2O_2) participent souvent dans l'activation en milieu aérobie (schéma 5.5).

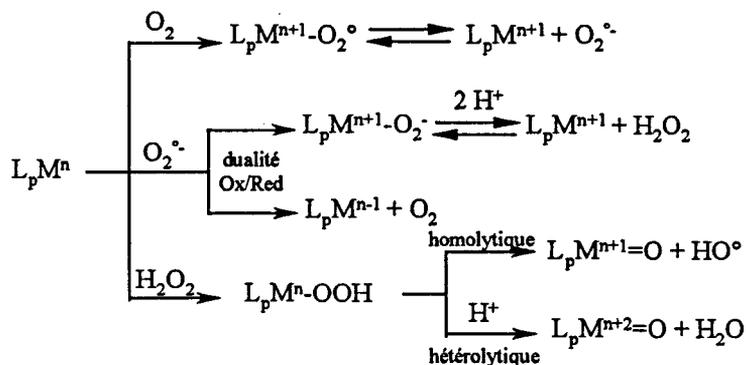


Schéma 5.5 : espèces activées de l'oxygène et nucléases chimiques

Les différents processus d'activation chimique utilisés sont classés par nature du métal dans le tableau 5.1.

Métaux	activation	Espèces oxydantes envisagées			
		Radicaux X°	Métal Crypto X°	Métal peroxy Métal superoxy	Métal oxo
Cu ^{II}	O ₂ /réd ou H ₂ O ₂ /réd KHSO ₅ RNHNH ₂ /O ₂	HO° SO ₄ °, HO° R°	Cu ^{III} OH Cu ^{III} -OSO ₃ °	Cu ^I OOH	Cu ^{III} =O ?
Ni ^{II}	KHSO ₅ , Na ₂ SO ₃ /O ₂ Ir ^V , O ₂	SO ₄ °	Ni ^{III} -OSO ₃ ° Ni ^{III}	Ni ^{III} OO°	Ni ^{IV} =O ?
Mn ^{II} Mn ^{III}	O ₂ /réd, RNHNH ₂ /O ₂ KHSO ₅ , Na ₂ SO ₃ /O ₂ KHSO ₅ , MMPP, φIO, H ₂ O ₂	HO° SO ₄ °, SO ₃ °			Mn ^V =O
Co ^{II}	O ₂ /réd KHSO ₅ , Na ₂ SO ₃ /O ₂	SO ₄ °, SO ₃ °	Co ^{III} OH	Co ^{III} OO°	
Fe ^{II} Fe ^{III}	H ₂ O ₂ / réd O ₂ /réd KHSO ₅ , MMPP, φIO, H ₂ O ₂	HO° HO°		Fe ^{III} OOH Fe ^{III} OOH	Fe ^{IV} =O (ferryl) Fe ^V =O (perferryl) Fe ^V =O (perferryl)
Ru ^{III}	H ₂ O ₂	HO°		Ru ^{III} OOH	Ru ^{IV} =O

Tableau 5.1 : principales activations chimiques rencontrées (détails dans chapitre 2)

5.2. Activation photochimique (Ru^{II}, Rh^{III}, Co^{III}, U^{VI}, Pt^{II})

Une photonucléase⁵⁹ est une molécule qui coupe les acides nucléiques via un état électronique excité suite à une irradiation. Le principal intérêt de ces nucléases activables par voie photochimique est que leur activation peut se faire *in vivo* par une source laser. Il faut toutefois s'assurer que la longueur d'onde λ du rayonnement exciteur soit supérieure à 300 nm afin d'éviter les dégâts directs par irradiation sur les acides nucléiques⁵⁹.

L'activation photochimique d'une nucléase chimique s'explique⁶⁰ (schéma 5.6) :

- par la production d'oxygène singulet par transfert d'énergie⁶¹.
- par l'oxydation des guanines (bases les plus facilement oxydables) par transfert d'électrons⁶².
- par le changement des propriétés rédox de celui-ci lorsqu'il se trouve dans un état excité⁶³.

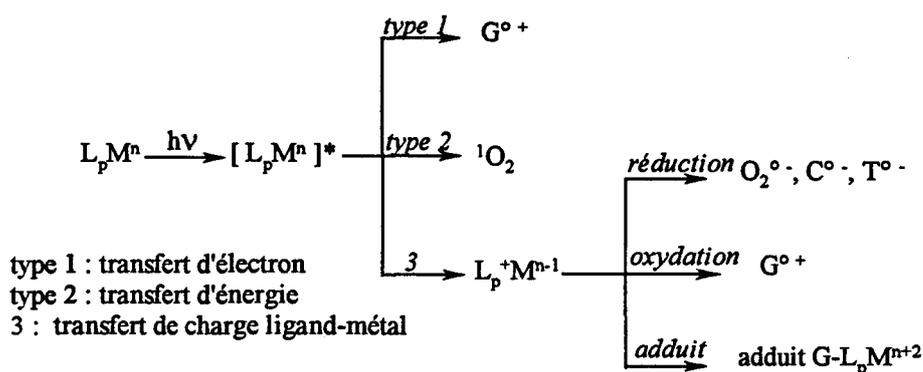


Schéma 5.6 : espèces oxydantes issues d'une photoactivation

Les principaux métaux activés photochimiquement sont résumés dans le tableau 5.2 :

<i>métal</i>	<i>Espèces oxydantes envisagées</i>
Ru^{II}	Ru^{II*} (1O_2 ou e^-)
Rh^{III}	$L^{\circ+}$ (LMCT)
Co^{III}	$L^{\circ+}$ (LMCT), CH_3°
U^{VI}, Pt^{II}	U^{VI*}, Pt^{II*}

Tableau 5.2 : principales activations photochimiques (détails dans le chapitre 2)

5.3. Activation électrochimique (Ru^{II} , Re^V , Mn^{III} , Fe^{III})

Les acides nucléiques peuvent être directement oxydés ou réduits quand ils sont adsorbés sur la surface de l'électrode (coefficient de diffusion faible)⁶⁴. Cependant il est plus facile d'utiliser un médiateur pour les oxyder ou les réduire.

Pour réaliser une activation électrochimique⁶⁴, il faut une nucléase chimique à faible affinité pour l'ADN : une forte affinité conduit à une faible formation d'espèces activées (la nucléase non activée se retrouve « emprisonnée » dans l'ADN). En effet, le complexe d'affinité L_pM^n/ADN est beaucoup moins diffusible que le complexe métallique libre L_pM^n . L'équilibre d'affinité nucléase/ADN est donc un facteur très important dans le processus d'activation électrochimique. Les proportions de nucléases libres (facilement électroactivables car mobiles) et liées (faiblement électroactivables car peu mobiles) dictent l'efficacité de la

coupure. L'électrode de travail est une électrode d'oxyde d'indium dopée au fer car l'ADN ne peut pas s'adsorber sur sa surface chargée négativement.

Les différentes électronucléases étudiées ont été répertoriées dans le tableau 5.3.

<i>Activation</i>	<i>Potentiel d'électrolyse</i>	<i>cibles</i>	<i>K_a</i>
REDUCTION (en présence d'oxygène) $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{BLM}) \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}(\text{BLM})$ puis $\text{Fe}^{\text{III}}\text{OO}^\circ \rightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{OOH}$ $\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TMPyP}) \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}(\text{TMPyP})$ $\text{Mn}^{\text{III}}(\text{TMPyP}) \rightarrow \text{Mn}^{\text{II}}(\text{TMPyP})$	- 0,10 V / SCE - -	sucre C4' - sucre C5'	10^5 M^{-1} 10^4 M^{-1} 10^4 M^{-1}
OXYDATION $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{tpy})(\text{bpy})(\text{OH}_2)]^{2+} \rightarrow [\text{Ru}^{\text{IV}}(\text{tpy})(\text{bpy})\text{O}]^{2+}$ $[\text{Fe}^{\text{II}}(5\text{Cl-phen})_3]^{2+} \rightarrow [\text{Fe}^{\text{III}}(5\text{Cl-phen})_3]^{3+}$ $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+} \rightarrow [\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bpy})_3]^{3+}$	0,80 V / SCE 1,02 V / SCE 1,10 V / SCE	Sucre C1' Oxydation G Oxydation G Oxydation G	- - aucune

Tableau 5.3 : principales électronucléases⁶⁴

6. NUCLEASES CHIMIQUES OXYDANTES ET PRODUCTION D'AGENTS OXYDANTS

Les espèces oxydantes, issues de l'activation des nucléases et responsables de la coupure des acides nucléiques sont⁶⁰ :

- les espèces radicalaires : radicaux oxyle, sulfoxyle, carbonés...
- l'oxygène singulet
- les états excités des photonucléases
- les métaux de transition à haut degré d'oxydation

6.1. Les radicaux oxyle (O_2° , HO° , RO° , ROO°)

L'oxygène, en raison de son état triplet à l'état fondamental, ne réagit pas sur les biomolécules⁶⁵.

Les anions superoxyde O_2° , malgré leur nom, ne sont pas de « super » oxydants⁶⁶. Il existe cependant un exemple d'oxydation du sucre au niveau du carbone C5' par HOO° (forme protonnée de O_2°)⁶⁷. Les anions superoxyde se dismutent surtout en peroxyde d'hydrogène et en oxygène ($k = 5.10^5 M^{-1}.s^{-1}$ à pH = 7). Par conséquent, une réaction d'oxydation par l'anion superoxyde est toujours en compétition avec la réaction de dismutation. En revanche, ils réduisent de très nombreux cations métalliques et sont donc souvent le point de départ d'une réaction de type Fenton.

Les radicaux hydroxyle, qui sont les agents de coupure des acides nucléiques les plus connus, sont de puissants oxydants⁶⁸. Ils oxydent autant les sucres (majoritairement les liaisons C4'H) que les bases (addition sur les systèmes π). Ils peuvent être produits de différentes manières (schéma 6.1) :

- par γ radiolyse (source ^{60}Co) ou par électrons accélérés (voie 1).
- par réaction de Fenton et Fenton-like (voie 2).
- par décomposition de peracides (voie 3).

Les radicaux alcoxyle RO° , générés par ouverture d'un cycle époxyde, peuvent induire une coupure de plasmide⁶⁹.

Couples rédox	Potentiel en V/NHE
$\text{SO}_4^{\circ}/\text{SO}_4^{2-}$	2,5 - 3,1
$\text{SO}_5^{\circ}/\text{SO}_5^{2-}$	1,1
$\text{SO}_3^{\circ}/\text{SO}_3^{2-}$	0,63

Tableau 6.1 : potentiel des radicaux sulfoxyde³⁴

Lui seul est capable d'oxyder les guanines (potentiel d'oxydoréduction supérieur à 1,29 V/NHE)³⁴. Les radicaux sulfate oxydent plutôt les bases que les sucres³⁴, alors que les radicaux hydroxyle oxydent indifféremment les bases nucléiques et les sucres (tableau 6.2).

Vitesse en $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 25°C	SO_3°	SO_4°	HO°
dA	$< 10^6$	$3,7 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^9$
dC	$< 10^6$	$2,5 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^9$
dG	$< 10^6$	$2,3 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^9$
dT	$< 10^6$	$2,0 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^9$
Desoxyribose	-	$3,8 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^9$
ribose	-	-	$1,5 \cdot 10^9$

Tableau 6.2 : vitesses d'oxydation comparées des radicaux sulfite, sulfate et hydroxyle³⁴

6.3. Les états excités des photonucléases

Ils induisent des oxydations/réductions des bases nucléiques^{34,71} :

- par transfert d'électrons (réaction photochimique de type I) : oxydation des guanines en radical-cation $\text{G}^{\circ+}$
- par photoionisation : réduction des cytosines, thymines et de l'oxygène, oxydation des adénines et guanines.

6.4. Les radicaux organiques

Des radicaux méthyle³⁴ peuvent être générés par décomposition des méthylhydrazines, par action des radicaux hydroxyle sur le DMSO ou par un complexe de cobalt (schéma 6.3). Ils forment majoritairement des 8- ou 7-méthylguanines (sensibles à un traitement basique).

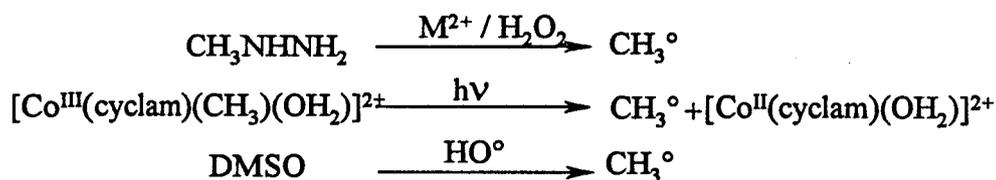


Schéma 6.3. : production de radicaux méthyle³⁴

Certains radicaux organiques^{34, 72} (schéma 6.4), générés à proximité des acides nucléiques, peuvent oxyder les bases (formation de sites sensibles à un traitement basique).

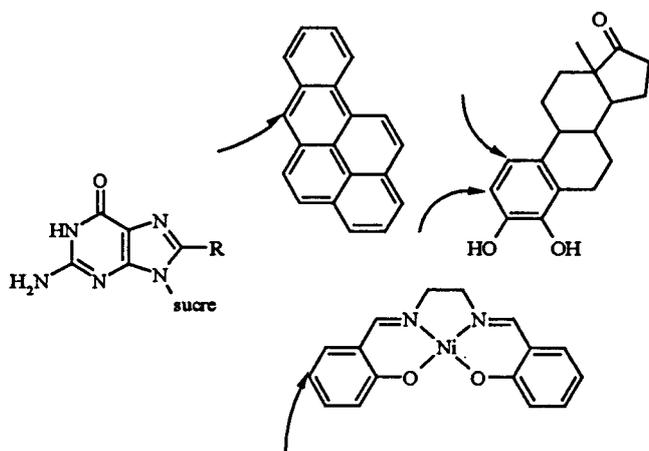


Schéma 6.4. : exemples d'adduits avec des radicaux organiques³⁴

D'autres radicaux organiques sont capables d'oxyder les sucres. Par exemple, les biradicaux formés après activation par un thiol ou un hydruure des ènediynes⁷³ (schéma 6.5).

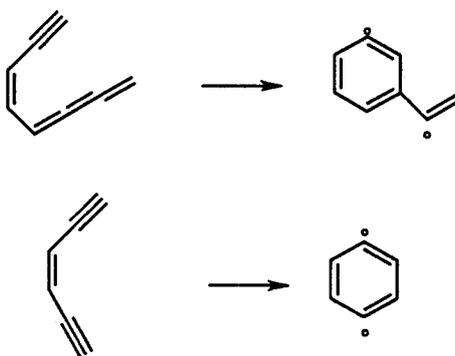


Schéma 6.5 : exemples d'espèces radicalaires organiques oxydant les sucres

6.5. L'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

La configuration électronique fondamentale de l'oxygène est l'état triplet ($^3\text{O}_2$) avec deux électrons non appariés⁷⁵⁻⁷⁶. L'état singulet ($^1\Delta_g$ $^1\text{O}_2$) est le premier état excité de l'oxygène. Il est produit par transfert d'énergie (réaction photochimique de type II) avec une molécule à l'état singulet (la photonucléase activée) : $^1\text{Nucl} + ^3\text{O}_2 \rightarrow ^3\text{Nucl} + ^1\text{O}_2$

Bon électrophile, il peut réagir sur les bases nucléiques et ces sites peuvent ensuite donner lieu à des coupures en milieu basique. La capacité de $^1\text{O}_2$ à oxyder directement les sucres des acides nucléiques est controversée⁷⁴.

6.6. Les métaux de transition

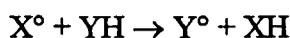
Les complexes métalliques à activité nucléasique (métallosalènes, métalloporphyrines, métallobléomycines) sont généralement connus pour leur activité catalytique dans l'oxydation des liaisons CH en présence d'oxydants⁷⁷⁻⁷⁸. Ils peuvent donc induire l'oxydation des acides nucléiques :

- soit indirectement (Fe, Cu, Ni, Mn) en catalysant la formation d'un radical libre (radicaux hydroxyle ou sulfate) ou lié (radicaux hydroxyle ou sulfate crypto)⁷⁹.
- soit directement en formant une espèce métal oxo ou peroxy (cas de Fe, Mn, Cu, Ru)⁸⁰⁻⁸².

6.7. Conclusion

La capacité à arracher les atomes d'hydrogène des carbones aliphatiques des sucres est illustrée dans le tableau 6.3⁸⁰. D'un point de vue thermodynamique simpliste, seuls les radicaux HO^\bullet , RO^\bullet , Cl^\bullet , Ar^\bullet et R^\bullet sont capables d'oxyder les sucres. Mais cette approche thermodynamique ne suffit pas, il faut aussi que l'espèce radicalaire soit formée près de l'acide nucléique pour éviter qu'elle ne soit piégée par le milieu extérieur (solvant, tampon).

Espèce X	Energie de la liaison XH en kcal.mol ⁻¹
HO°	119
RO°	105
ROO°	89
Cl°	103
Br°	87
I°	71
Ar°	110-112
R°	92-104
MnO ₄ ⁻	80



$$\Delta G \approx \Delta H = E_{YH} - E_{XH} = 104 - E_{XH} < 0 \Rightarrow E_{XH} > 104 \text{ kcal.mol}^{-1}$$

Tableau 6.3: aptitude à oxyder les acides nucléiques⁸⁰

Généralement, quelle que soit l'espèce oxydante produite, elle est très rarement isolée.

On utilise donc diverses méthodes qui permettent de détecter la nature de ces espèces:

- études spectroscopiques : RPE (degré d'oxydation du métal), UV-visible (longueur de la liaison M-O).
- études de « spin-trapping » : mise en évidence de radicaux libres de faible durée de vie.
- études de « scavenging » (alcools, thiols, DMSO) : distinction entre espèces diffusibles et accessibles (radicaux libres), espèces diffusibles non accessibles et espèces non diffusibles (métal-oxo et métal crypto HO°).
- études de modélisation avec divers substrats : comparaison de cinétiques et de profils de produits obtenus dans des réactions avec des substrats modèles.
- études enzymatiques : mise en évidence dans les mécanismes de coupure de la nécessité de peroxyde d'hydrogène (coupure inhibée par la catalase) ou d'anion superoxyde (coupure inhibée par SOD).

7. NUCLEASES CHIMIQUES OXYDANTES ET APPLICATIONS PRATIQUES

7.1. Thérapeutique

Chimistes et biologistes s'accordent à dire que la capacité de couper les acides nucléiques constitue un des modes d'action primordiaux des médicaments anticancéreux. La coupure oxydante peut donc s'avérer une stratégie intéressante pour le design de nouveaux agents antitumoraux.

7.2. Footprinting

Les nucléases chimiques permettent d'étudier les interactions entre protéines et acides nucléiques⁸³⁻⁸⁵. Elles remplacent ainsi les nucléases enzymatiques utilisées dans les laboratoires de biologie moléculaire pour identifier les sites d'interaction de la protéine avec les acides nucléiques. Les nucléases enzymatiques sont certes très utilisées mais leur taille imposante limite leur emploi.

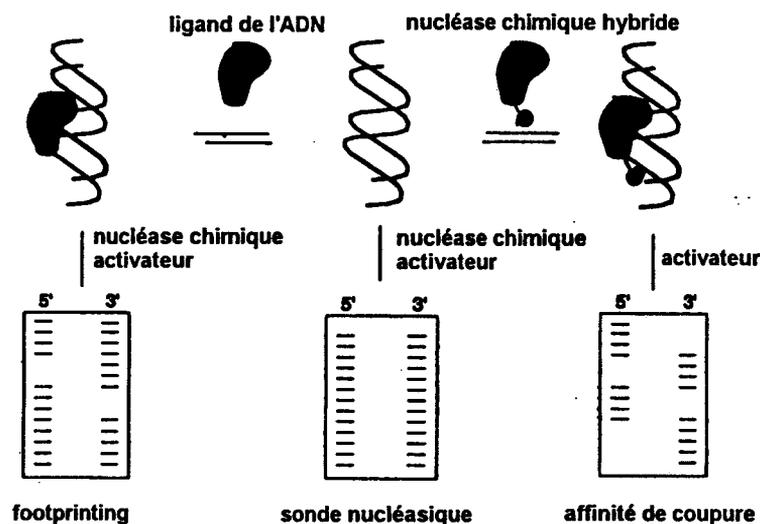


Schéma 7.1 : Footprinting, sonde nucléasique et affinité de coupure

Le principe du footprinting est simple : la présence d'une protéine liée à l'acide nucléique bloque l'accessibilité de ce site à la nucléase, chimique ou enzymatique, qui ne peut donc couper ce site. Ceci se visualisera par une empreinte c'est-à-dire une zone d'absence de

bandes lors de la migration électrophorétique. Pour être un bon agent de footprinting, une nucléase chimique ne doit donc avoir aucune spécificité de coupure. Sont ainsi utilisés $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})$, $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MPE})$, $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$, les sels d'uranium et les complexes de ruthénium.

$\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MPE})$: cette nucléase⁸⁶⁻⁸⁸, d'affinité pratiquement non spécifique, est très utilisée en footprinting. Néanmoins, elle est peu utilisée dans le footprinting des métalloprotéines car le métal endogène de la protéine peut être déplacé par la molécule de MPE. En effet, dans une expérience de footprinting avec $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MPE})$, le métal et le ligand sont ajoutés séparément. Par ailleurs, $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MPE})$ se lie à l'ADN par intercalation et provoque donc sur ce dernier une détorsion ce qui peut provoquer des artefacts d'interaction ou de non interaction.

$\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})$: cette nucléase⁸⁶⁻⁸⁸ est l'agent de footprinting le plus couramment utilisé. Elle permet la mise en évidence des zones accessibles au solvant puisque, vu sa charge négative, elle reste en solution d'où elle « bombarde » les acides nucléiques de radicaux hydroxyle HO^\bullet . De plus, puisqu'elle ne se lie pas à l'ADN, elle ne peut pas perturber l'interaction de la protéine avec l'acide nucléique. Cependant, puisque la nucléase $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})$ ne se lie pas aux acides nucléiques, elle doit être ajoutée au milieu en fort excès pour générer suffisamment de radicaux hydroxyle près de l'ADN ou l'ARN. Les probabilités de décomplexation du métal des métalloprotéines par l'EDTA sont donc très grandes !

$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$: cette nucléase⁸⁹⁻⁹⁰ est moyennement utilisée. En effet, elle se lie aux petits sillons des ADN et de ce fait est donc plutôt sélective. Par ailleurs, $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$ peut oxyder les thiols des cystéines et donc dénaturer les protéines. Cependant, son principal avantage est de pouvoir induire une coupure *in situ* car elle est capable de diffuser sur un gel. Elle permet donc d'étudier des interactions entre protéines et acides nucléiques peu stables car on évite dans ce cas d'isoler le complexe protéine/acide nucléique avant de procéder à la coupure.

$\text{U}^{\text{VI}}\text{O}_2^{2+}$: l'utilisation de cette nucléase chimique⁹¹ en tant qu'agent de footprinting est très prometteuse. En effet, elle n'a pas de sélectivité de coupure et sa photoactivation se fait dans le visible limitant ainsi les risques de dégâts directs au niveau des acides nucléiques. Cependant, elle doit être utilisée en milieu acide (pour éviter une précipitation des sels d'uranium) et en fortes concentrations (1 μM).

$[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$: l'utilisation de cette nucléase chimique⁹² est aussi très prometteuse. Comme celle précédemment décrite, elle est photoactivable (donc utilisable *in vivo*), induit une coupure aléatoire sur les acides nucléiques mais surtout est un agent du grand sillon, comme les protéines. Elle reconnaît donc facilement les grands sillons occupés par une protéine à affinité pour l'ADN.

7.3. Sonde structurelle

Il existe de nombreuses possibilités pour marquer un site sur un acide nucléique par un complexe de métal de transition à affinité spécifique⁹²⁻⁹⁵ :

- un marquage spectroscopique⁹² : un métal lourd lié covalamment à l'acide nucléique (OsO_4/Pyr ou $\text{cis-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$) peut être visualisé par microscopie électronique.
- un marquage chimique⁹² : une molécule, en réalisant une modification chimique observable sur son site de liaison, marque celui-ci pour l'expérimentateur. Les nucléases chimiques à activité oxydante et à affinité spécifique constituent donc des sondes de choix. En visualisant où se situent les coupures le long de la chaîne d'un acide nucléique, on situe le ou les sites de fixation.

Les nucléases chimiques, utilisées comme sonde structurelle, permettent donc d'examiner la topologie des hélices d'ADN c'est-à-dire les variations locales de structure qui sont généralement responsables de fonctions biologiques. Elles permettent de plus d'étudier les structures tertiaires compliquées des ARN (régions simples et doubles brins reliés par des boucles ou des nœuds, plus ou moins repliés).

$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})]^{2-}$: cette nucléase⁹⁶⁻⁹⁷ détecte les structures locales qui diminuent l'accessibilité du solvant au sucre. Par exemple, elle détecte les courbures de l'ADN ou une face d'ADN adsorbée sur une surface. Avec les ARN, elle coupe uniquement les régions accessibles au solvant et donc définit l'intérieur de l'extérieur des ARN.

$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MPE})]$: par son mode de liaison intercalatif, cette nucléase⁹⁶⁻⁹⁷ détecte les régions doubles brins des ARN.

$[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$: elle détecte⁸⁹⁻⁹⁰ les inhomogénéités (étroitesse accrue, encombrement stérique) du petit sillon de l'ADN-B. D'autre part, elle coupe préférentiellement les régions monobrins et les boucles des ARN.

$\Lambda\text{-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{TMP})_3]^{2+}$: ce complexe⁹⁸ détecte les régions de conformation A des ADN.

$\Lambda\text{-}[\text{Co}^{\text{III}}(\text{DIP})_3]^{3+}$: à l'inverse de $\Lambda\text{-}[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{TMP})_3]^{2+}$, cette nucléase⁹⁸ détecte spécifiquement les régions de conformation Z.

$\Delta\text{-}[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{3+}$: cette nucléase⁹⁸ reconnaît les ouvertures locales plus importantes du grand sillon dans les ADN-B. Par ailleurs, elle coupe les régions des ARN qui présentent des analogies avec un grand sillon ouvert.

$\text{U}^{\text{VI}}\text{O}_2^{2+}$: comme $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})$, cette nucléase coupe les régions accessibles au solvant.

$[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{CR})]^{2+}$ et $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{cyclam})]^{2+}$: ces nucléases⁹⁹ détectent les guanines accessibles dans les ADN doubles brins et les ARN (« mismatches, bulges, hairpins loops »).

7.4. Affinité de coupure

La nucléase est attachée à la molécule dont on veut étudier l'affinité¹⁰⁰⁻¹⁰¹. La coupure induite par le système permet de déterminer le site de reconnaissance ainsi que l'orientation de la fixation de l'ensemble vis à vis de la séquence de reconnaissance.

Cette méthode présente certains avantages sur les autres méthodes d'étude d'interaction acide nucléique/protéine. Une coupure unique sur un acide nucléique long de plusieurs kilobases est très facile à détecter en électrophorèse. A l'opposé, les petites régions de non coupure (footprinting) sont difficiles à observer sur de longs acides nucléiques. L'affinité de coupure est donc une méthode de choix pour détecter les sites de liaison d'une molécule avec les acides nucléiques. Cette méthode présente cependant des limites : la nucléase doit être condensée sur la molécule à étudier (généralement une protéine) sans que cette modification altère l'affinité de la molécule à sa cible.

Chapitre 2 :
PRINCIPALES FAMILLES
DE NUCLEASES
CHIMIQUES OXYDANTES

1. LES AGENTS ORGANIQUES

1.1. Les énediynes

Les énediynes¹⁰²⁻¹⁰⁶ sont des antibiotiques antitumoraux qui possèdent un motif énediynes. Ils sont activés par des thiols qui, après un réarrangement et une réaromatisation, conduisent à la formation d'un diradical (schéma 6.5). Ces agents naturels ont servis de modèles pour toute une classe de molécules nucléasiques¹⁰⁷.

1.2. Les « photocleaver »

Ces molécules organiques, après activation photochimique, induisent une coupure des acides nucléiques (tableau 1.1)^{59, 107}.

molécules	Espèces oxydantes
Générateurs de ¹ O ₂ (sélectivité G) porphyrines	¹ O ₂
Agents de transfert d'électrons (sélectivité 5'GG) Riboflavine Naphthalimide Benzotriazole Anthraquinones intercalantes	Nucl* (e ⁻) Nucl* (e ⁻) Nucl* (e ⁻) Nucl* (e ⁻)
Espèces radicalaires (sélectivité sucre) Hydroperoxydes Composés nitro ArX Anthraquinones sans affinité Anthraquinones à affinité petit sillon Enediynes-like	HO°, RO° NO ₂ * X° Cl° (via Cl ⁻ du tampon) AQ* R°°
Générateurs d'adduit (sélectivité diverse) Psoralène	adduit

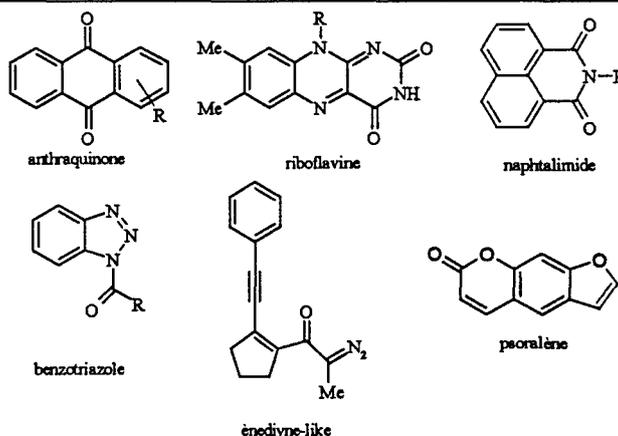


Tableau 1.1 : exemples de « photocleaver »

2. LES METALLOBLEOMYCINES

Les bléomycines¹⁰⁸⁻¹¹⁰ (schéma 2.1) sont une famille d'antibiotiques glycopeptidiques découverts par Umezawa en 1966 et isolés du *Streptomyces verticillus* : ils sont utilisés en chimiothérapie dans le traitement de la maladie de Hodgkin et du sarcome de Kaposi.

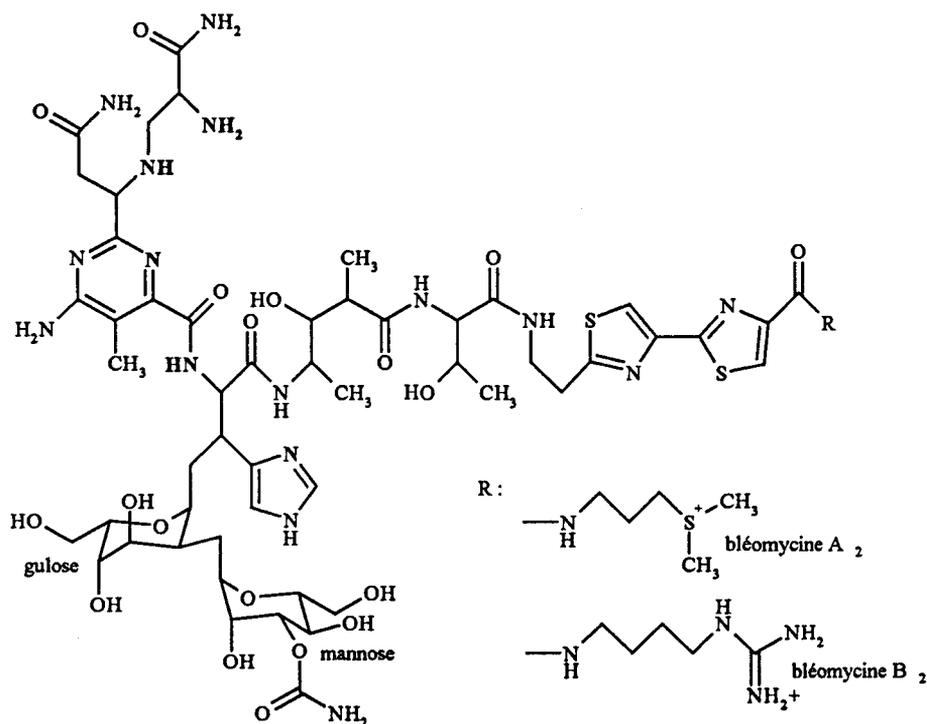


Schéma 2.1 : les bléomycines

Parmi les différentes métallobléomycines¹¹¹ (Cu^{II} , Co^{III} , Mn^{II} , Fe^{III}), les bléomycines complexées par le fer exercent l'activité nucléasique la plus importante (tableau 2.1).

On peut partager la molécule de bléomycine en quatre domaines :

- le bithiazole et l'amine terminal chargé positivement, responsables de la liaison avec l'acide nucléique.
- la pyrimidine, la β-aminoalanine et l'imidazole, responsables de la chélation du métal et donc de l'activation de l'oxygène.
- le disaccharide, responsable de la biodistribution dans l'organisme.
- un bras polypeptidique espaceur qui intervient dans l'orientation du site de chélation vers le petit sillon de l'ADN.

<i>Métallobléomycines</i>	<i>activation</i>	<i>Agent oxydant et coupure</i>
Fe^{III}(BLM) $E^{\circ} \text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}} = 0,13 \text{ V/NHE}$	H ₂ O ₂ , MMPP, ϕ IO, KHSO ₅ , O ₂ /réd	(BLM)Fe ^V =O 100% de coupure
Cu^{II}(BLM) $E^{\circ} \text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}} = -0,57 \text{ V/NHE}$	O ₂ /thiol avec 2 équivalents de thiol ajoutés avant l'incubation du métal avec BLM	HO° ?
Co^{III}(BLM) $E^{\circ} \text{Co}^{\text{III}}/\text{Co}^{\text{II}} < -1,5 \text{ V/NHE}$	Lumière UV (330-350 nm) où : Forme brune (H ₂ O ou AcO ⁻ en 6 ^{ème} ligand axial) : active Forme verte (HOO ⁻ en 6 ^{ème} ligand axial) : active Forme orange (BLM en 6 ^{ème} ligand axial) : inactive	Co ^{II} (BLM ^{o+})? HO° ? Co ^{II} OOH ?
Mn^{II}(BLM)	H ₂ O ₂ , lumière UV, O ₂ /MPA	HO° ? 1-3% de coupure
Ru^{II}(BLM)	Lumière UV	?
V^{IV}O(BLM)	H ₂ O ₂	HO° 2% de coupure

 Tableau 2.1 : exemples de métallobléomycines¹¹¹

2.1. Interaction avec les acides nucléiques

La liaison ($K_A = 10^5 \text{ M}^{-1}$) est dépendante de la présence du bithiazole mais le domaine de chélation et le dissaccharide participent aussi à la liaison. Il semblerait que le bithiazole se lie aux acides nucléiques par intercalation partielle dans le petit sillon et place le domaine chélateur dans le petit sillon de l'ADN double brin^{112,242}.

Les séquences 5'GPyr (5'GC \approx 5'GT > 5'GA >> 5'GG) sont des séquences de forte affinité vraisemblablement en raison d'une liaison hydrogène entre l'oxygène de la fonction amide près du bithiazole et le groupement 2-amino de la guanine¹¹³.

2.2. Activation

L'activité nucléasique est due à un complexe de fer II et à la présence d'oxygène. La coupure est plus importante si on ajoute du peroxyde d'hydrogène exogène et/ou un réducteur (ascorbate, DTT ou mercaptoéthanol)¹¹³.

Lors d'une première étape, le fer II est chélaté par la bléomycine pour former un complexe $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BLM})$ silencieux en RPE¹¹³. La coordination en position axial du complexe plan-carré d'un groupement amino contrôle l'activation de l'oxygène. Un sixième site de coordination du fer reste libre pour l'oxygène¹¹³. Le fer II, placé dans un fort champ de ligand, s'oxyde en fer III bas spin en donnant un électron au dioxygène chélaté (schéma 2.2) ce qui produit l'espèce $\text{BLMFe}^{\text{III}}\text{OO}^\circ$ (non mise en évidence). Une deuxième réduction de cet intermédiaire donne le complexe peroxy $\text{BLMFe}^{\text{III}}\text{OOH}$ (mis en évidence). Cette réduction peut être due à un réducteur extérieur (ascorbate...) ou à $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BLM})$ lui-même suivant la réaction :



En absence d'acides nucléiques, $\text{BLMFe}^{\text{III}}\text{OOH}$ s'auto-inactive rapidement en $\text{BLMFe}^{\text{III}}\text{OH}$ suivant la réaction suivante : $2 \text{BLMFe}^{\text{III}}\text{OOH} \rightarrow 2 \text{BLMFe}^{\text{III}}\text{OH} + \text{O}_2$

En présence d'acides nucléiques, le complexe, de forte affinité pour l'ADN, est protégé de cette auto-inactivation.

De nombreux auteurs¹⁰⁸ penchent pour une coupure hétérolytique de la liaison $\text{Fe}^{\text{III}}\text{O}-\text{OH}$ car les « scavengers » de radicaux hydroxyle n'inhibent pas la coupure et les donneurs d'atome d'oxygène comme l'oxone sont capables d'induire une coupure.

2.3. Coupure des acides nucléiques

$\text{BLMFe}^{\text{V}}=\text{O}$ oxyde principalement les carbones C4' (peu de bases oxydées)³⁰.

Les séquences 5'Gpyr sont coupées majoritairement au niveau de la pyrimidine.

Deux voies d'évolution pour le radical C4'° sont envisageables³⁰ (schéma 2.3).

La première voie ne nécessite pas d'oxygène et aboutit à la formation de base libre et d'un résidu de sucre qui, en milieu fortement basique, conduit à une coupure (formation d'oligonucléotides 5'- et 3'-phosphate). Le mécanisme passe par la formation de COH à partir de C°. Il a été montré que l'oxygène de l'hydroxyle formé au niveau du C° provenait du solvant.

La deuxième voie nécessite la présence d'oxygène et aboutit à une coupure spontanée (formation de base propénal, d'oligonucléotide 3'-phosphoglycolate et 5'-phosphate).

Les bléomycines à fer coupent aussi les ARN¹¹⁴ : on postule un mécanisme comparable à celui des ADN avec formation d'un radical C4'°.

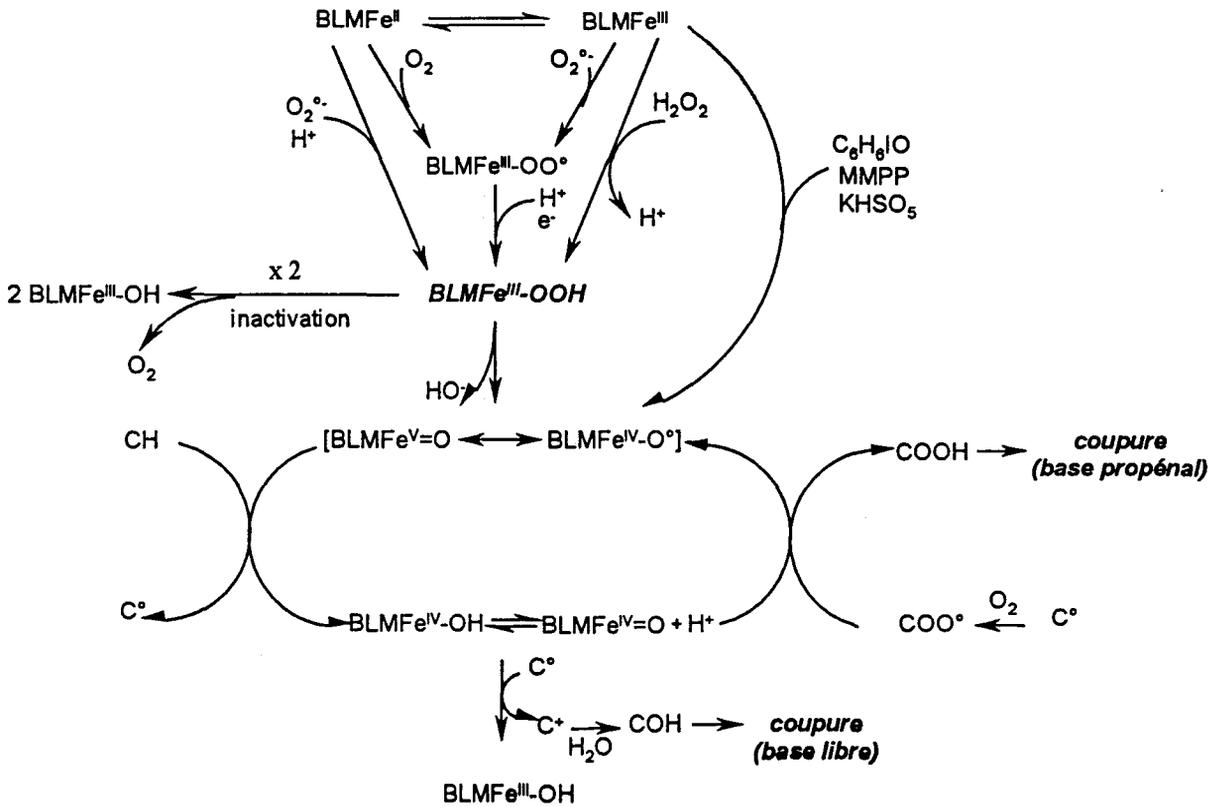


Schéma 2.2 : mécanisme d'activation des bléomycines à fer¹⁰⁸

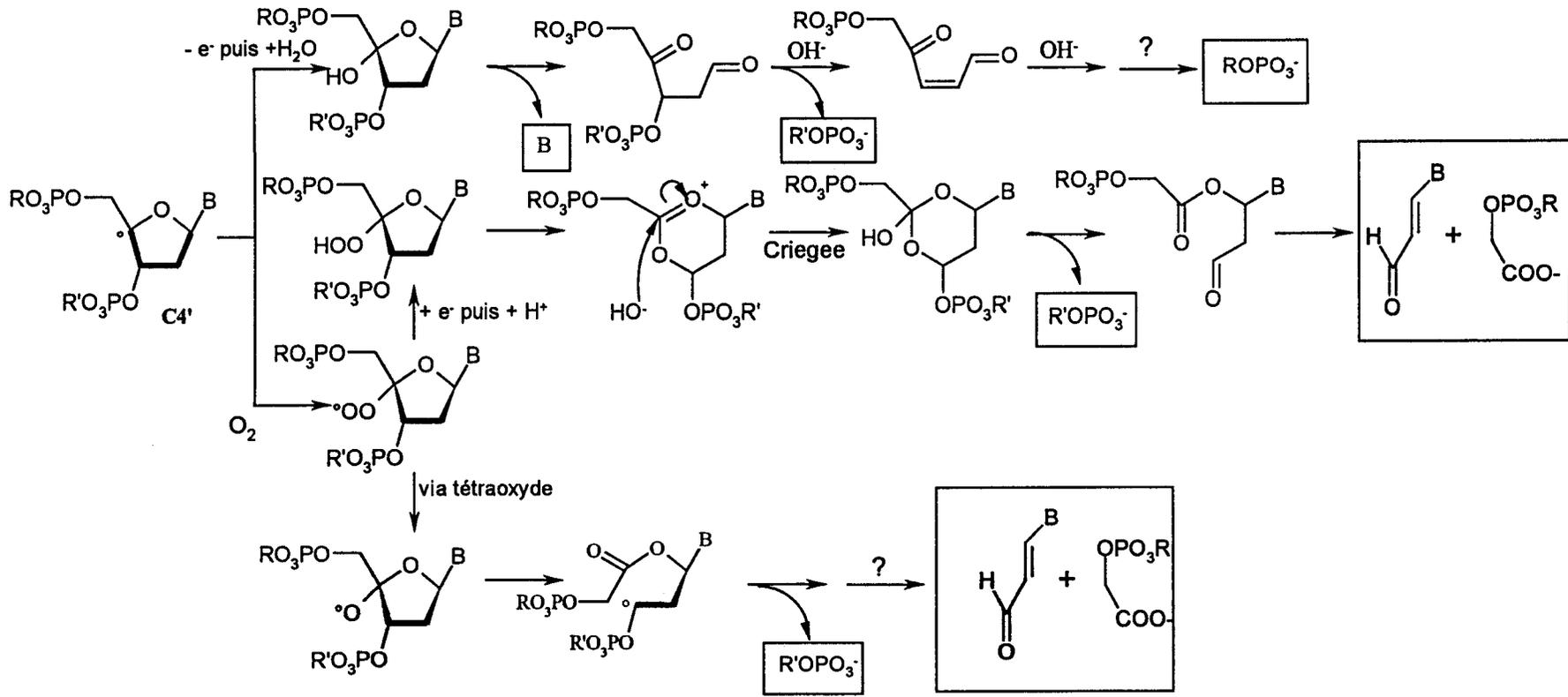


Schéma 2.3 : coupure des ADN par $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{BLM})^{30}$

Une charge négative a été omise sur les liaisons phosphodiester et les phosphates terminaux pour plus de clarté
 ROPO_3^- oligonucléotides 3'-phosphate et $\text{R}'\text{OPO}_3^-$ oligonucléotides 5'-phosphate

3. LES METALLODIAMINOPOLYCARBOXYLATES

Des systèmes M(EDTA)/réd (M = Cu^{II}, Ni^{II}, Co^{II}, Mn^{II}, Fe^{III}, Fe^{II}), seuls Fe^{II}(EDTA) et Fe^{III}(EDTA) exercent une activité nucléasique¹¹⁵.

Fe^{II}(EDTA) a été développé par Tullius depuis 1985¹¹⁶ alors que Fe^{II}(MPE) l'a été par Dervan depuis 1982¹¹⁷. Il a regroupé (schéma 3.1) un agent chélateur (EDTA) à un agent intercalant (méthidium) via un bras espaceur (courte chaîne hydrocarbonée).

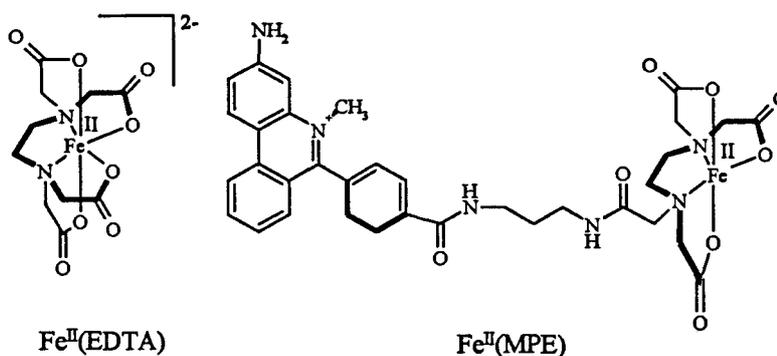


Schéma 3.1: Fe^{II}(EDTA) et Fe^{II}(MPE)

3.1. Interaction avec les acides nucléiques

[Fe^{III}(EDTA)]⁻ et [Fe^{II}(EDTA)]²⁻ ont une charge égale respectivement à -1 et -2. Cette charge négative empêche toute interaction avec les acides nucléiques (répulsion électrostatique due au squelette polyphosphate chargé négativement). La coupure est donc totalement non sélective et ne peut se faire qu'au niveau de sites accessibles au solvant¹¹⁸.

Fe^{II}(MPE) se lie aux acides nucléiques par intercalation ($K_a = 10^4$ à 10^5 M⁻¹). Une faible sélectivité de coupure a été observée pour cette nucléase¹¹³.

3.2. Activation

[Fe^{III}(EDTA)]⁻ possède sept sites de coordination : l'un de ces sites est particulièrement labile et peut être substitué par une molécule d'ascorbate ou par une molécule de peroxyde d'hydrogène. [Fe^{III}(EDTA)]⁻ (E^0 Fe^{III}/Fe^{II} = 0,12 V/NHE) et Fe^{II}(MPE) peuvent être facilement réduits par divers agents comme l'ascorbate, le DTT ou le NADH (ascorbate>DTT>NADH)¹¹³.

Une fois réduit, $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{EDTA})]^-$ active, dans un premier temps, l'oxygène (coupure inhibée par une absence d'oxygène) en peroxyde d'hydrogène et, dans un deuxième temps, produit à partir de ce peroxyde d'hydrogène (la catalase inhibe la coupure) des radicaux hydroxyle, diffusibles et de petite taille. La formation d'une espèce métal-oxo est aussi proposée (schéma 3.2)¹¹⁹.

Le mécanisme de coupure de $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})]^{2-}$ a été peu étudié comparativement à celui de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MPE})$. Par analogie, on suppose souvent que $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})]^{2-}$ et $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MPE})$ ont des mécanismes de coupure similaires (production de radicaux hydroxyle libres)¹¹³.

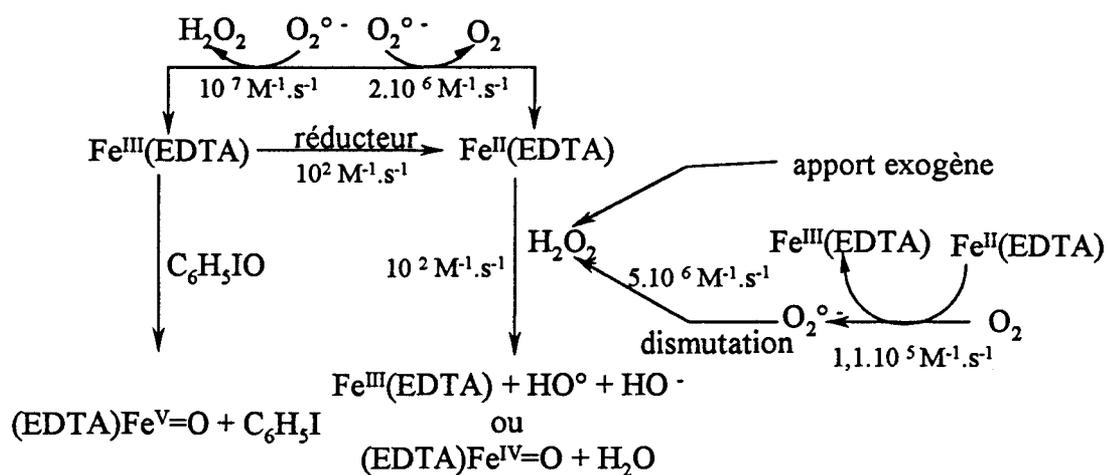


Schéma 3.2 : mécanisme d'activation de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})$ ¹¹³

3.3. Coupure des acides nucléiques

Une même intensité de coupure est obtenue pour³⁰ :

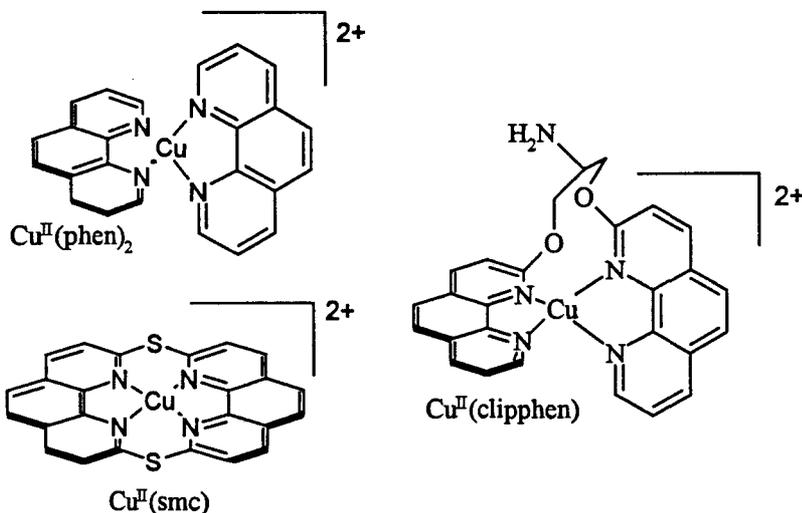
- 0,1 mM de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})$.
- 1,0 μM de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MPE})$ (affinité avec l'acide nucléique).
- 10 nM de $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{MPE})$ en présence de réducteur (cycle catalytique).

Les radicaux hydroxyle sont diffusibles : aucune sélectivité de coupure est observée pour cette nucléase. Ils oxydent principalement les sucres des acides nucléiques au niveau des carbones C4' (bases libres et oligonucléotides 5'-phosphate et 3'-phosphate, voir schéma 2.3) et C5' (bases libres et oligonucléotides 5'-phosphate et 3'-phosphoglycolate, voir schéma 4.3) ainsi que les bases nucléiques (8-oxo-G et 6-FAPy-G)³⁰.

4. LES METALLOPHENANTHROLINES

4.1. Les phénanthrolines à cuivre

Le représentant de cette famille¹²⁰⁻¹²³ est le complexe $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2]^{2+}$ dont l'activité nucléasique a été découverte¹²⁴ par D.S. Sigman en 1979. D'autres exemples de phénanthrolines à cuivre ont été étudiés (schéma 4.1)¹²⁵⁻¹²⁷.



<i>nucléases</i>	<i>constante d'association K_a</i>	<i>potentiel rédox dans l'eau</i>
$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$ ¹²⁰⁻¹²⁴	$5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	-0,05 V vs SCE
$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{smc})$ ¹²⁶	$4,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	non étudié
$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{clipphen})$ ¹²⁷	$4 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$	-0,085 V vs SCE

Schéma 4.1 : exemples de phénanthrolines à cuivre

Parmi les systèmes $\text{M}(\text{phen})_n/\text{asc}$ ($\text{M} = \text{Cu}^{\text{II}}, \text{Mn}^{\text{II}}, \text{Zn}^{\text{II}}, \text{Cr}^{\text{III}}, \text{Fe}^{\text{III}}$), les complexes de cuivre exercent l'activité nucléasique la plus efficace ($\text{Cu}^{\text{II}} > \text{Mn}^{\text{II}} > \text{Cr}^{\text{III}} > \text{Fe}^{\text{III}}$)¹¹¹.

4.1.1. Interaction avec les acides nucléiques

Une intercalation partielle de l'une des deux phénanthrolines de $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$ a été proposée¹²⁸. Sigman propose plutôt une interaction dans le petit sillon par liaisons hydrophobes et électrostatiques entre la charge positive du complexe et la charge négative du squelette phosphate¹²⁹.

4.1.2. Activation

L'activité nucléasique nécessite uniquement la présence d'un réducteur en milieu aérobie ou la présence simultanée d'un réducteur et de peroxyde d'hydrogène exogène en milieu anaérobie¹²².

Le potentiel rédox du complexe et son affinité pour les acides nucléiques sont modulés par la nature du ligand phénanthroline¹¹³ :

- Pour le complexe $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{bpy})_2$ ($E^0 \text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}} = 0,12 \text{ V vs NHE}$), aucune activité nucléasique n'est observée (pas d'affinité pour les acides nucléiques).
- Pour $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{dmop})_2$ ($E^0 \text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}} = 0,59 \text{ V vs NHE}$), aucune activité nucléasique n'est observée (potentiel rédox trop élevé).
- Pour $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$ ($E^0 \text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}} = 0,17 \text{ V vs NHE}$), une activité nucléasique est observée (affinité pour les acides nucléiques et potentiel rédox bas).

Certaines positions de la phénanthrolines peuvent être fonctionnalisées sans perturber l'activité nucléasique de l'ensemble (schéma 4.2)¹²³.

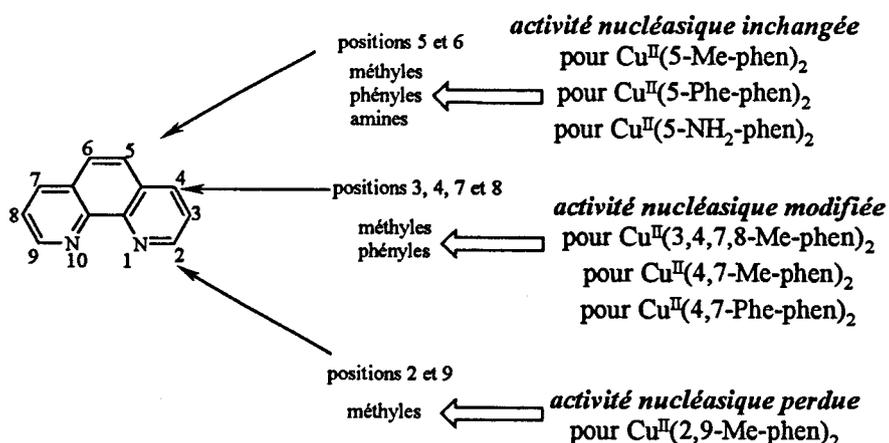
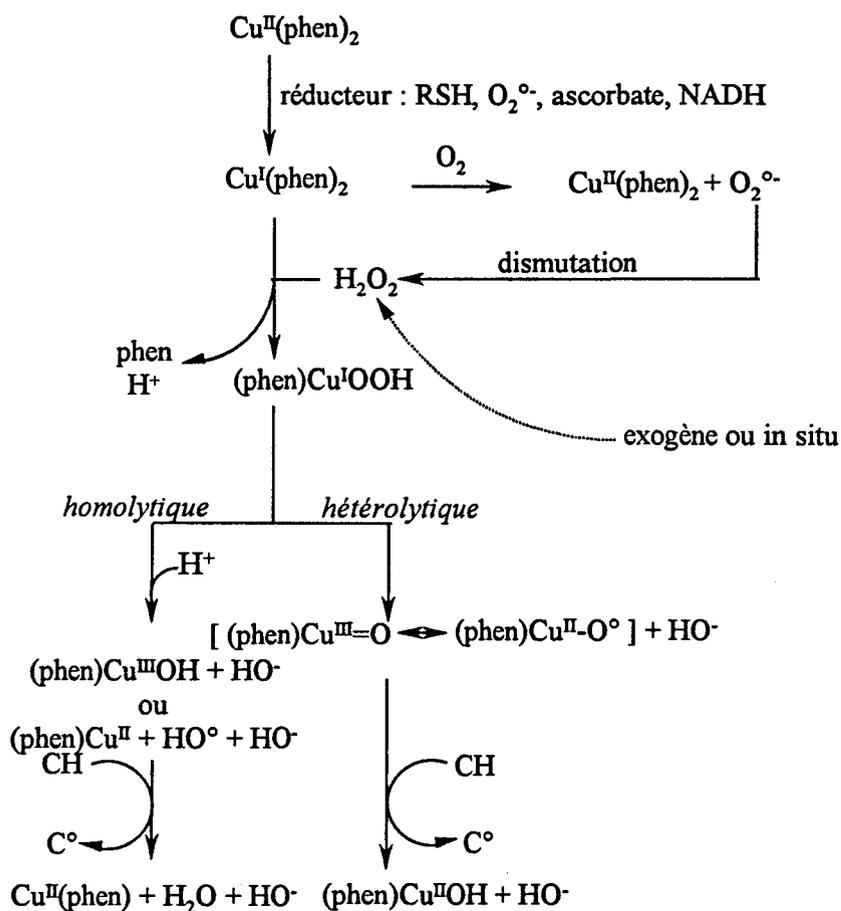


Schéma 4.2 : relations structure-activité des ligands phénanthrolines de $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$

$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$ est d'abord réduit par un réducteur extérieur (ascorbate, MPA, mercaptoéthanol, NADH ou anions superoxyde générés par un système xanthine/xanthine oxydase) en $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{phen})_2$ puis se lie à l'ADN. Le complexe $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{phen})_2/\text{ADN}$ est alors oxydé par le peroxyde d'hydrogène, endogène c'est-à-dire produit par dismutation d'anions superoxyde, ou exogène (la catalase inhibe l'activité nucléasique), pour générer une espèce oxydante responsable de la coupure des acides nucléiques (schéma 4.3). La nature de cette

espèce oxydante est encore sujet de débat : radicaux hydroxyle libres HO^\bullet , $\text{Cu}^{\text{III}}\text{OH}$ ou espèce métal-oxo $\text{Cu}^{\text{III}}=\text{O}$?¹²².



4.1.3. Coupure des acides nucléiques

En présence de peroxyde d'hydrogène et de réducteur, les acides nucléiques sont totalement dégradés en moins d'une minute par $1 \mu\text{M}$ de $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$ ¹²².

La coupure est « séquence sélective » mais non « nucléotide sélective » (oxydation du sucre)³⁰.

Les séquences les plus sensibles à la coupure sont 5'TAT mais aussi 5'TGT, 5'TAAT, 5'TAGPy, 5'CAGT tandis que les séquences 5'CAT, 5'TAC, 5'polyPyr et 5'polyPu le sont peu. Cette préférence pour les séquences 5'TAT pourrait s'expliquer par des changements locaux occasionnés par cette séquence sur la géométrie du petit sillon qui est plus ouvert dans les régions TAT et de ce fait plus accessible à la nucléase³⁰.

L'activité nucléasique de $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$ dépend de la structure de l'hélice des acides nucléiques : elle coupe intensément les formes B, moyennement les formes A et pratiquement pas les formes Z³⁰.

$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$ oxyde les sucres³⁰ (schéma 4.3) au niveau des carbones C1' (80%) et C4' (20%). Les produits de coupure identifiés sont majoritairement des bases libres, des oligonucléotides 5'- et 3'-phosphate ainsi que du 5-méthylène furanone.

$\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$ coupe aussi les ARN dans des conditions expérimentales plus drastiques¹²² (ajout de peroxyde d'hydrogène indispensable, même en milieu aérobie, pour déplacer l'équilibre d'affinité avec l'ARN). Contrairement aux ADN et ce, de manière inattendue, la nucléase coupe intensément les régions monobrins des ARN.

4.2. Les phénanthrolines à ruthénium

Ce sont des complexes octaédriques chiraux^{92, 98, 130} (schéma 4.4). Ils existent donc sous deux formes énantiomères, une forme Λ et une forme Δ qui interagissent avec les acides nucléiques par interaction de surface dans le petit sillon, intercalation via le grand sillon et interaction électrostatique extérieure.

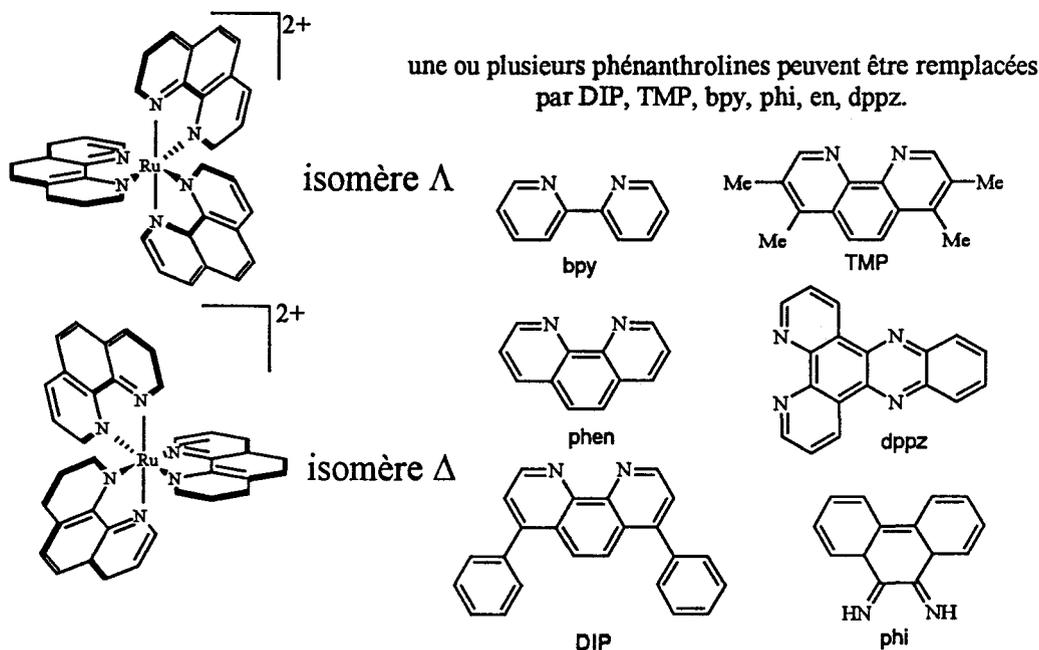


Schéma 4.4 : exemples de phénanthrolines à ruthénium

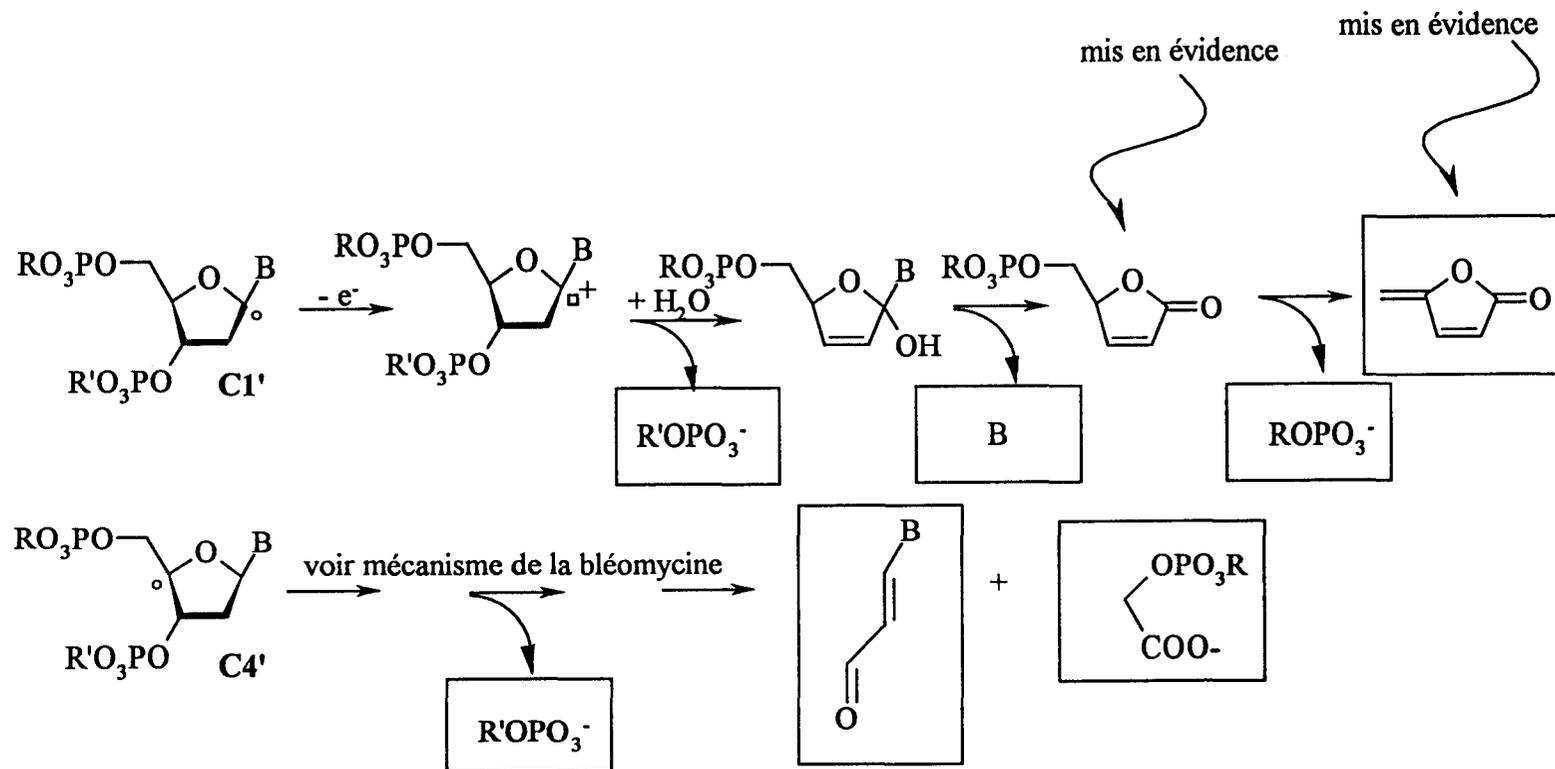


Schéma 4.3 : coupure de l'ADN par les phénanthrolines à cuivre³⁰
 Une charge négative a été omise sur les liaisons phosphodiester et les phosphates terminaux pour plus de clarté
 ROPO_3^- oligonucléotides 3'-phosphate et $\text{R}'\text{OPO}_3^-$ oligonucléotides 5'-phosphate

4.2.1. Interaction avec les acides nucléiques

L'affinité des complexes de ruthénium avec l'ADN est fonction de la taille, de la forme et de la nature des ligands⁹².

$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$: ils se lient aux acides nucléiques⁹² de manière externe (interaction purement électrostatique).

$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{phen})_3]^{2+}$: d'après J.K. Barton^{41, 92}, ils se lient à l'ADN-B ($K_A = 10^4 \text{ M}^{-1}$) suivant deux modes (ce qui est discuté par d'autres¹³¹) : un mode d'interaction de surface (surtout pour l'isomère Λ) et un mode d'intercalation (surtout pour l'isomère Δ). L'intercalation est favorisée pour l'énantiomère Δ : une des trois phénanthrolines s'intercale entre deux plans de bases et les deux autres sont rejetées dans le grand sillon de l'ADN (de géométrie adéquate pour l'énantiomère Δ).

$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{DIP})_3]^{2+}$: en remplaçant le ligand phen par le ligand encombrant DIP¹³², on augmente l'affinité du complexe pour l'ADN (DIP > phen > bpy) ainsi que la discrimination chirale du complexe. $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{DIP})_3]^{2+}$ se lie spécifiquement à l'ADN-Z⁹².

$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{TMP})_3]^{2+}$: l'introduction de substituants méthyle encombrants sur les ligands phénanthrolines augmente les interactions hydrophobes de surface et diminue fortement l'intercalation. La forme Λ se lie ainsi préférentiellement dans le petit sillon de l'ADN-A mais pas dans les sillons de l'ADN-B ou Z⁹².

$[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$: il se lie aux acides nucléiques par intercalation du ligand dppz. La liaison intercalative du complexe dépend essentiellement de la taille de la surface aromatique du ligand suivant la série phi, dppz >> DIP > phen >> bpy⁹².

4.2.2. Activation

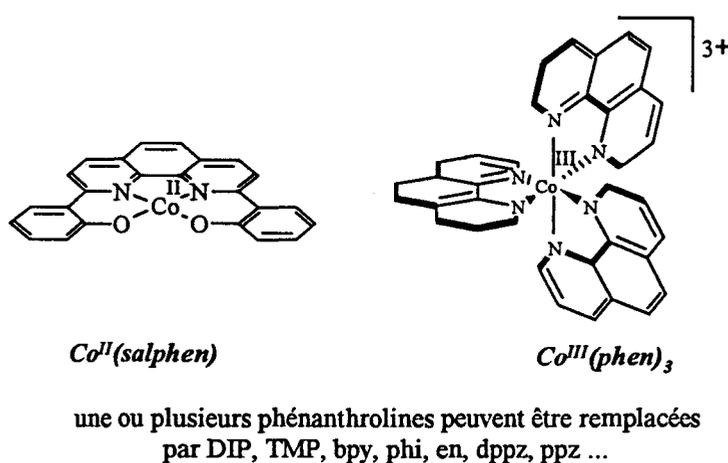
Les complexes de ruthénium, activés photochimiquement, produisent de l'oxygène singulet (par transfert d'énergie à l'oxygène triplet) qui agit à proximité du site de fixation de la nucléase. La coupure nécessite donc un milieu aérobie.

4.2.3. Coupure des acides nucléiques

L'oxygène singulet oxyde les bases et non les sucres. La coupure (« nucléotide dépendante ») nécessite un traitement à la pipéridine (30 minutes à 90°C). On observe l'ordre de réactivité $G > T > C, A$.

4.3. Les phénanthrolines à cobalt

Ce sont des complexes octaédriques chiraux ou $Co^{III}(phen)_3$ ^{92, 98, 130}. Il existe aussi une famille de complexes plans¹³³, les complexes $M(salphen)$, où seuls les complexes de cobalt II et de manganèse III possèdent des propriétés nucléasiques (schéma 4.4).



<i>métal</i>	<i>activateur</i>	<i>Espèce oxydante</i>
$Cu^{II}(salphen)$	O_2/MPA	Pas d'activité nucléasique
$Ni^{II}(salphen)$	$KHSO_5, MMPP$	Pas d'activité nucléasique
$Mn^{III}(salphen)$	$KHSO_5, MMPP$ ou O_2/asc	$Mn^V=O$ ou HO°
$Co^{II}(salphen)$	O_2/MPA	$Co^{III}OO^\circ ?$

Schéma 4.4 : exemples de phénanthrolines à cobalt

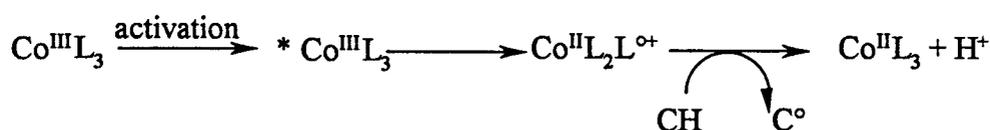
4.3.1. Interaction avec les acides nucléiques

Les complexes de cobalt $Co^{III}(phen)_3$, $Co^{III}(DIP)_3$ et $Co^{III}(TMP)_3$ ont la même spécificité de liaison que les complexes de ruthénium apparentés (ligands et structure

géométrique identiques) : la charge du complexe modifie seulement la proportion d'interaction de surface et d'intercalation⁹².

4.3.2. Activation

Ces complexes sont photoactivables. L'irradiation des complexes conduit à une photoréduction du métal par un transfert de charge métal-ligand (LMCT). Il se forme ainsi une espèce radical-cation sur le ligand qui serait responsable de l'oxydation des sucres des acides nucléiques :



4.4. Les phénanthrolines à rhodium

Ce sont des complexes octaédriques chiraux identiques à ceux du ruthénium ou du cobalt^{92, 98, 130}.

4.4.1. Interaction avec les acides nucléiques

$[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{3+}$ et $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$: le ligand phi se lie aux ADN-B par intercalation via le grand sillon⁹².

$[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{en})_2(\text{phi})]^{3+}$: ils se lient aux acides nucléiques par intercalation via le grand sillon entre deux paires de bases 5'GC pour Δ et deux paires de bases 5'AT pour Λ ⁹².

4.4.2. Activation

Les complexes de rhodium sont photoactivables. Comme les complexes de cobalt, le métal est réduit par transfert de charge du ligand au métal (LMCT) ce qui forme un ligand radical-cation (espèce oxydante non diffusible)

4.4.3. Coupure des acides nucléiques

Les complexes de rhodium III oxydent les sucres au niveau du carbone C3' : la coupure est donc « nucléotide indépendante » et la présence d'oxygène n'est pas indispensable³⁰.

La sélectivité de coupure est régie par les ligands non intercalants : $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$ induit une coupure non « séquence sélective », $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{3+}$ et $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{DIP})_3]^{3+}$ induisent une coupure « séquence sélective ». Δ - $[\text{Rh}(\text{en})_2(\text{phi})]$ coupe sélectivement les dinucléotides 5'GC (les azotes des ligands non intercalés participent à une reconnaissance par des liaisons hydrogène avec l'O⁶ des guanines pour la forme Δ mais pas pour la forme Λ)⁵⁹.

Le profil de coupure est différent suivant $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{3+}$ (bases libres, 2-méthylène-3-furanone et oligonucléotides 3'- et 5'-phosphate) et $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$ (bases libres, 2-méthylène-3-furanone, oligonucléotides 3'- et 5'-phosphate, 3'-phosphoglycaldéhyde et base propénoate) : l'oxygène peut accéder au radical C° quand une bipyridine remplace un ligand phi ou phen⁵⁹.

Deux voies de dégradation des acides nucléiques sont envisagées³⁰ (schéma 4.5). La première, qui ne nécessite pas l'intervention de l'oxygène, passe par la formation d'un composé COH à partir du radical C° et aboutit à la formation d'oligonucléotides 5'- et 3'-phosphate, de bases libres et du 2-méthylène-3-furanone. La deuxième, qui nécessite la présence d'oxygène, forme un hydroperoxyde à partir du radical C° et aboutit à la formation de base propénoate, d'oligonucléotide 5'-phosphate et 3'-phosphoglycaldéhyde.

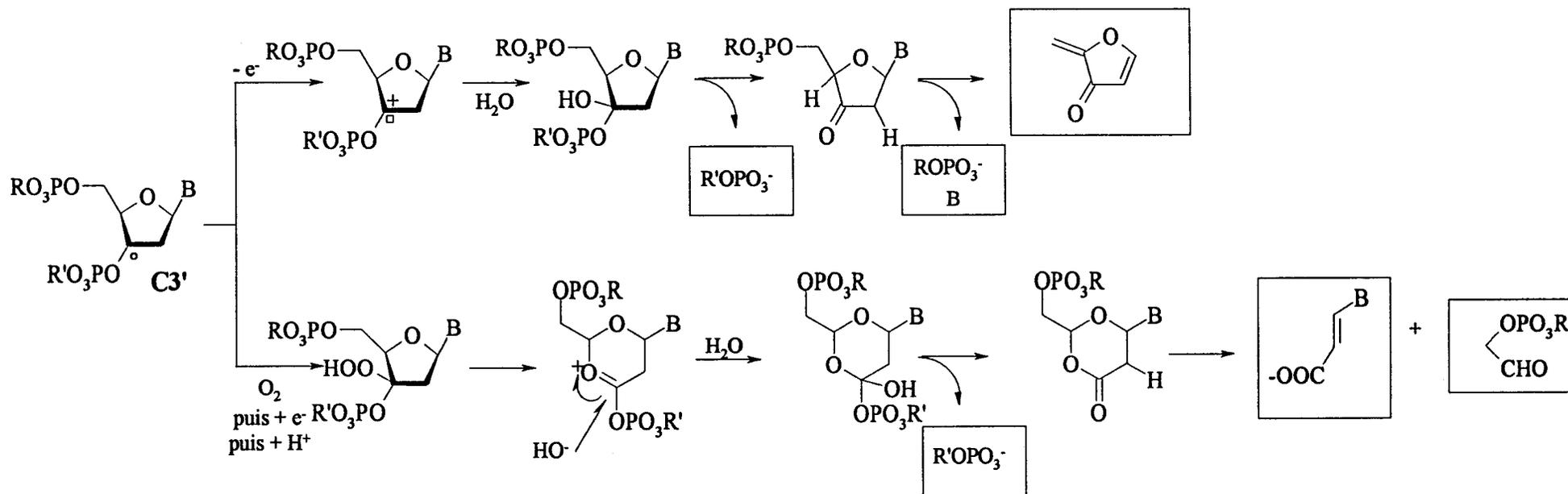


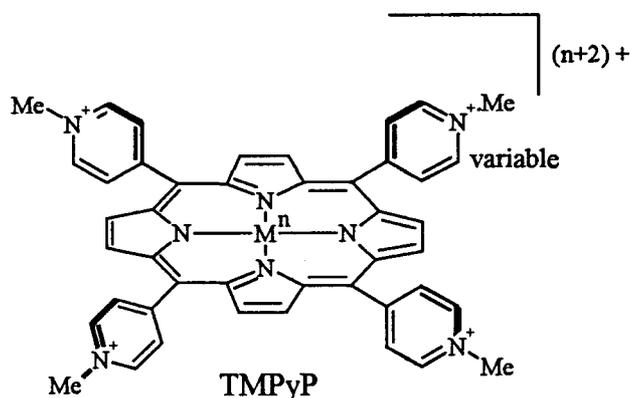
Schéma 4.5 : mécanisme de coupure des complexes de rhodium³⁰

Une charge négative a été omise sur les liaisons phosphodiester et les phosphates terminales pour plus de clarté

$ROPO_3^-$ oligonucléotides 3'-phosphate et $R'OPO_3^-$ oligonucléotides 5'-phosphate

5. LES METALLOPORPHYRINES

Les porphyrines possèdent un très fort pouvoir chélateur pour de nombreux métaux ce qui permet de moduler leur activité nucléasique^{14, 134} (Zn^{II} , Fe^{III} , Co^{III} , Mn^{III} , Ni^{II} , Cu^{II}). De plus, le système porphyrinique peut être fonctionnalisé par divers substituants hydrophobes, anioniques ou cationiques dont le plus étudié est H_2TMPyP (schéma 5.1).



M : Fe^{III} , Mn^{III} , Co^{III} , Cu^{II} , Ni^{II} , Zn^{II}

Schéma 5.1 : exemple de métalloporphyrine

5.1. Interaction avec les acides nucléiques

La liaison aux acides nucléiques dépend¹³⁵⁻¹³⁹ (tableau 5.1) :

- de la nature, de la taille et de la charge du métal : un ou deux substituants en position axiale par rapport au plan porphyrinique empêchent une interaction par intercalation.
- de la nature, de la taille et de la charge des substituants en position méso : des substituants encombrants empêchent l'intercalation et des substituants hydrophobes ou anioniques inhibent totalement la liaison.

$Mn^{III}(TMPyP)$ coupe l'ADN à partir du petit sillon¹³⁴ : l'interaction de surface est essentiellement électrostatique entre le squelette phosphate anionique et la métalloporphyrine cationique (interaction très sensible à la force ionique). Les triplets de paires de bases $5'XAAAY/3'XTTTY$ sont les séquences minimales pour obtenir une liaison¹³⁴. Ceci s'expliquerait par une plus forte liaison électrostatique avec le petit sillon présentant des régions riches en paires de bases AT ($K_A = 12.10^4 M^{-1}$).

métalloporphyrines	géométrie	Liaison
Type I (intercalation) H ₂ TMPyP Cu ^{II} (TMPyP) et Ni ^{II} (TMPyP)	- tétracoordiné (plan carré)	Intercalation avec poly(dGdC) ₂ Intercalation avec poly(dGdC) ₂ et liaison petit sillon avec poly(dAdT) ₂
Type II (« stacking » extérieur)		
Type III (liaison petit sillon) Zn ^{II} (TMPyP) Mn ^{III} (TMPyP), Fe ^{III} (TMPyP) et Co ^{III} (TMPyP)	Pentacoordiné (1 ligand axial : eau ?) Hexacoordiné (2 ligands axiaux : eau ?)	Interaction de surface près des régions AT Interaction de surface probablement dans le petit sillon.

Tableau 5.1 : interaction des métalloporphyrines avec les acides nucléiques¹⁴

5.2. Activation

Elle peut être photochimique ou oxydante. Les porphyrines non complexées par un cation métallique sont activées photochimiquement¹⁴⁰ et produisent de l'oxygène singulet : H₂TMPyP est activé à 436 nm.

métalloporphyrines	activateur	Sélectivité de coupure	Espèce oxydante
Fe ^{III} (TMPyP)	O ₂ /réd (ascorbate, thiol), H ₂ O ₂ φIO, MMPP, KHSO ₅	C1', C5' ?	HO° ou Fe ^V =O ? Fe ^V =O
Mn ^{III} (TMPyP)	O ₂ /réd (ascorbate, thiol), H ₂ O ₂ KHSO ₅ (le plus efficace)	C1' (régions GC) C5' (régions AT)	HO° ou Mn ^V =O ? Mn ^V =O
Co ^{III} (TMPyP)	O ₂ /réd (ascorbate, thiol)H ₂ O ₂ φIO, MMPP, KHSO ₅	?	HO°, Co ^V =O ?
Ni ^{II} (TMPyP)	KHSO ₅	Pas d'activité nucléasique	-

Tableau 5.2 : activation des métalloporphyrines¹³⁴

Certaines métalloporphyrines, comme Zn^{II}(TMPyP) sont photoactivées (436 nm) et produisent de l'oxygène singulet¹⁴¹.

Les autres métalloporphyrines (tableau 5.2) sont activées en espèce métal-oxo, soit par des donneurs d'atome d'oxygène comme φIO, KHSO₅ ou MMPP, soit par des réducteurs en

présence d'oxygène (schéma 5.2)^{14, 134, 142}. Une formation de radicaux hydroxyle est aussi proposée.

Le système nucléasique le plus efficace (et donc le plus étudié) est $Mn^{III}(TMPyP)$ activée par $KHSO_5$ (coupure induite en 1 min pour 2 à 200 nM de $Mn^{III}(TMPyP)$ et 10 μM de $KHSO_5$)¹³⁴.

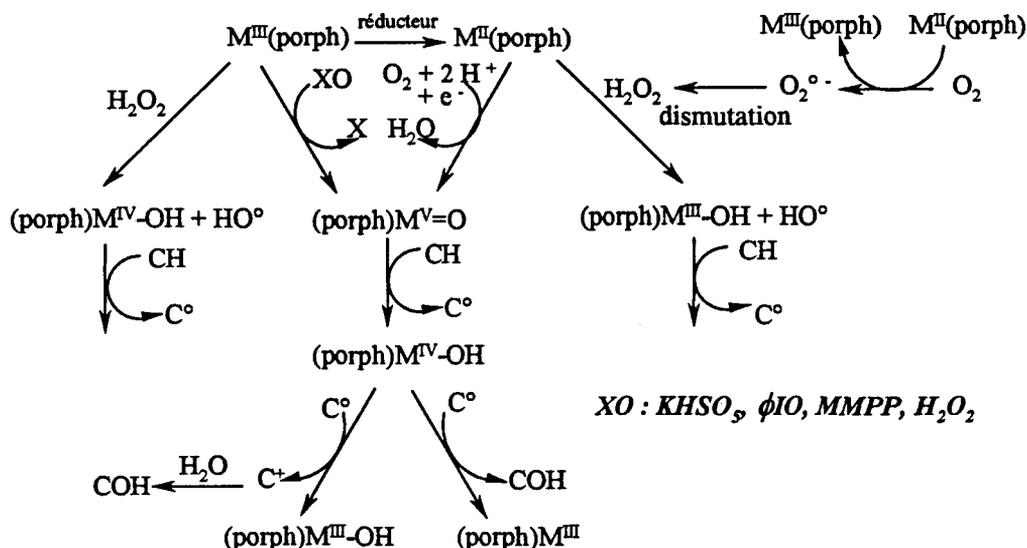


Schéma 5.2 : mécanisme d'activation des métalloporphyrines¹³⁴

5.3. Coupure des acides nucléiques

Le mécanisme de coupure des acides nucléiques est connu pour la métalloporphyrine $Mn^{III}(TMPyP)$ activée par $KHSO_5$ ¹³⁴. Elle est « séquence-sélective » mais non « nucléotide-sélective » (oxydation des sucres en C1' et C5').

Deux voies de coupure ont été mises en évidence (schéma 5.3)³⁰. L'oxydation en C1' dans les régions riches en paires de bases GC conduit à la formation de 5-méthylène-2 furanone et l'oxydation en C5' dans les régions riches en paires de bases AT conduit à la formation de furfural. Il n'a pas été déterminé si $M^{IV}OH$ oxyde le radical C^\bullet pour donner un carbocation qui serait ultérieurement piégé par le solvant, ou si $M^{IV}OH$ agit comme donneur de HO^\bullet pour donner directement COH .

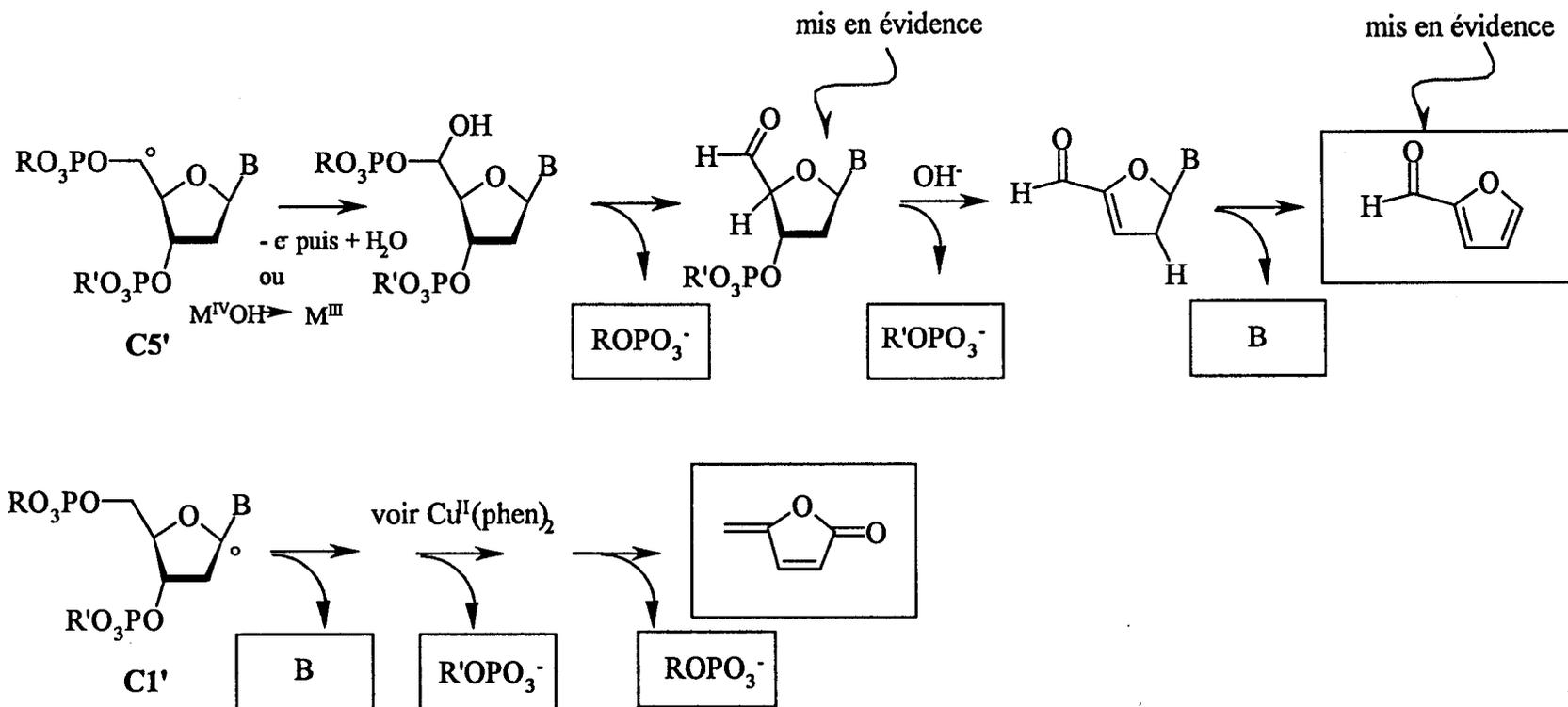


Schéma 5.3 : mécanisme de coupure des ADN par les porphyrines à manganèse³⁰

Une charge négative a été omise sur les liaisons phosphodiester et les phosphates terminaux pour plus de clarté

ROPO_3^- oligonucléotides 3'-phosphate et $\text{R}'\text{OPO}_3^-$ oligonucléotides 5'-phosphate

6. LES METALLOTRIPÉPTIDES XXH

Les tripeptides $\text{NH}_2\text{-XXH}$ (schéma 6.1) sont en général de bons ligands et forment des complexes plans carrés avec le cuivre II et le nickel II^{143} . Ils miment le domaine chélateur du cuivre présent dans les albumines ($\text{NH}_2\text{-DAH}$) dont la principale fonction est le transport des cations métalliques dans le plasma¹⁴³.

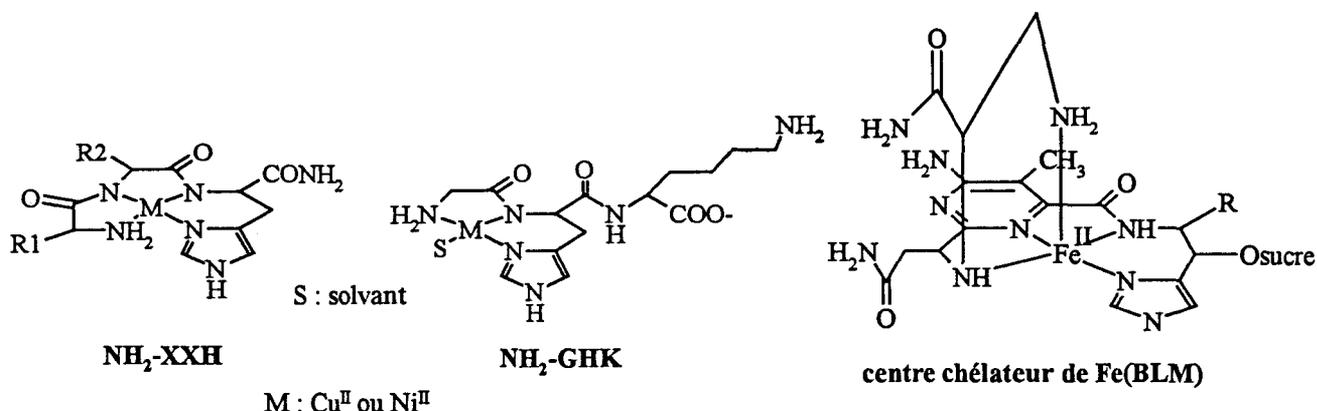


Schéma 6.1 : exemples de métallotripeptides et analogie avec le centre chélateur des bléomycines

Les principales caractéristiques structurales¹⁴³ des métallotripeptides XXH qui permettent la chélation du cuivre ou du nickel sont une fonction amino terminale, un groupement histidine en troisième position et deux azotes peptidiques déprotonables.

Les métallotripeptides, qui ont une charge globale négative, ont peu d'affinité avec les acides nucléiques. On incorpore donc des lysines ou des arginines en position 2 et 3 pour apporter des charges positives (tableau 6.1)^{57, 144-147}.

<i>tripeptides</i>	<i>activation</i>	<i>Affinité avec les acides nucléiques</i>	<i>Espèce oxydante</i>
$[\text{Ni}^{\text{II}}\text{GGH}]^+$	- O_2 , KHSO_5 , MMPP	Aucune	- Pas d'activité nucléasique ¹⁴⁶
$[\text{Ni}^{\text{II}}\text{XXH}]$ $[\text{Ni}^{\text{II}}\text{XXH-NH}_2]$	- O_2 - KHSO_5 , MMPP, H_2O_2 - KHSO_5 , MMPP, $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{O}_2$? Petit sillon (faible force ionique) Guanines (forte force ionique)	- N-acyl iminium ($\text{G} \gg \text{T}$, $\text{A} > \text{C}$) ¹⁴⁶ - $\text{Ni}^{\text{IV}}\text{OH}$ ou HO^\bullet ? (oxydation sucre ¹⁴⁷) - $\text{Ni}^{\text{III}}\text{-OSO}_3^\ominus$ (oxydation guanines)
$[\text{Cu}^{\text{II}}\text{GGH-NH}_2]$	- $\text{H}_2\text{O}_2/\text{asc}$	Petit sillon	- HO^\bullet ¹⁴³

Tableau 6.1 : exemples de métallotripeptides

7. LES METALLOMACROCYCLES

Les complexes $\text{Ni}^{\text{II}}(\text{CR})$ ($E^0 \text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{II}} = 0,98 \text{ V vs Ag/AgCl}$) ainsi que $\text{Ni}^{\text{II}}(\text{cyclam})$ ($E^0 \text{Ni}^{\text{III}}/\text{Ni}^{\text{II}} = 0,58 \text{ V vs Ag/AgCl}$) sont des complexes cationiques plan-carré hydrosolubles¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

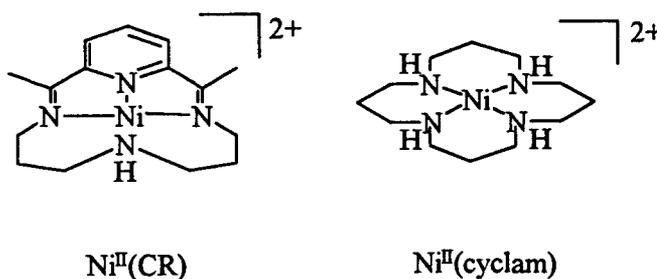


Schéma 7.1 : exemples de métallomacrocycles

7.1. Interaction avec les acides nucléiques

En absence d'oxydant, ils ont peu d'affinité pour les acides nucléiques.

En présence d'oxydants, ils forment des complexes de Ni^{III} octaédriques capables de se lier à l'azote N7 des guanines¹⁴⁹.

7.2. Activation

Après oxydation par MMPP (peu efficace) ou KHSO_5 (plus efficace), les complexes tétradentates de nickel II deviennent des complexes hexadentates de nickel III¹⁵⁰⁻¹⁵³. Leur sphère de coordination est complétée par deux molécules de solvant ou de tampon en position axiale. Ces ligands axiaux peuvent être échangés par d'autres ligands comme une guanine ou KHSO_5 (les oxydants incapables de se chélater au complexe sont inefficaces) : le nickel III apporte donc une molécule d'oxydant (radical sulfate crypto ?) près d'une guanine ce qui permet son oxydation (schéma 7.2).

La réactivité des métallomacrocycles¹⁵² est fortement influencée par la nature du ligand macrocyclique (importance de la taille du cycle, du degré d'insaturation, de son encombrement stérique), de la charge globale et de la géométrie tétraédrique du complexe (une géométrie octaédrique comme $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{phen})_3]^{2+}$ ou $[\text{Ni}^{\text{II}}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ supprime l'activité nucléasique). Il module l'intensité du champ de ligand (et donc le potentiel rédox) ainsi que la

flexibilité du complexe (pour l'affinité à l'acide nucléique). Les propriétés optimales sont un ligand pas trop rigide (cycle à 13 ou 14 atomes avec peu d'insaturation) et un fort champ de ligands dans le plan (ligands azotés et oxygénés).

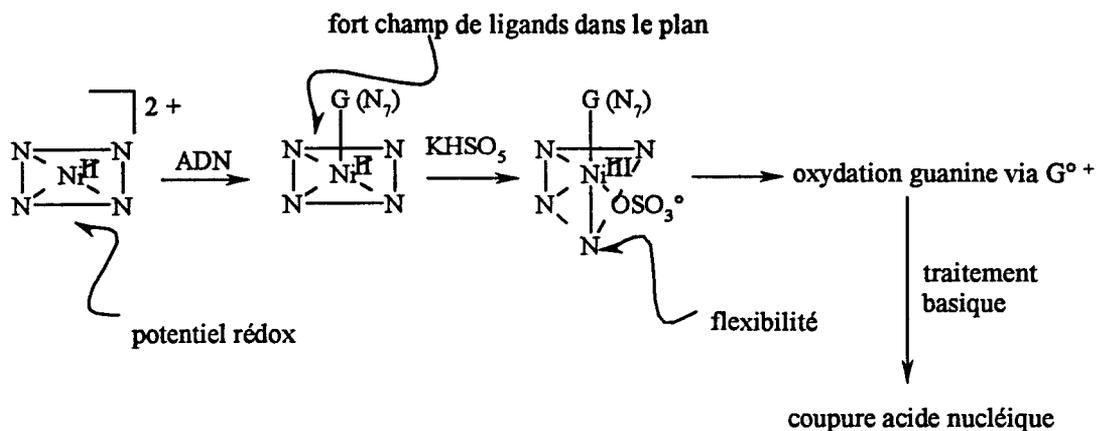


Schéma 7.2 : mécanisme d'activation des métallomacrocycles

7.3. Coupure des acides nucléiques

Ces complexes oxydent les guanines les plus accessibles c'est-à-dire les guanines non appariées (ADN monobrin, extrémités d'hélices, boucles...)⁹⁹ : le complexe de nickel III doit pouvoir se lier à l'azote N7 des guanines.

Ils n'induisent pas de coupures directes : la coupure des acides nucléiques nécessite un traitement basique.

8. LES METALLOSALENES

Les bases de Schiff communément nommées salènes sont surtout étudiées pour leurs propriétés catalytiques (par exemple, l'époxydation régiosélective des alcènes)¹⁵⁴.

Depuis quelques années, certains d'entre-eux sont étudiés pour leurs propriétés nucléasiques (schéma 8.1).

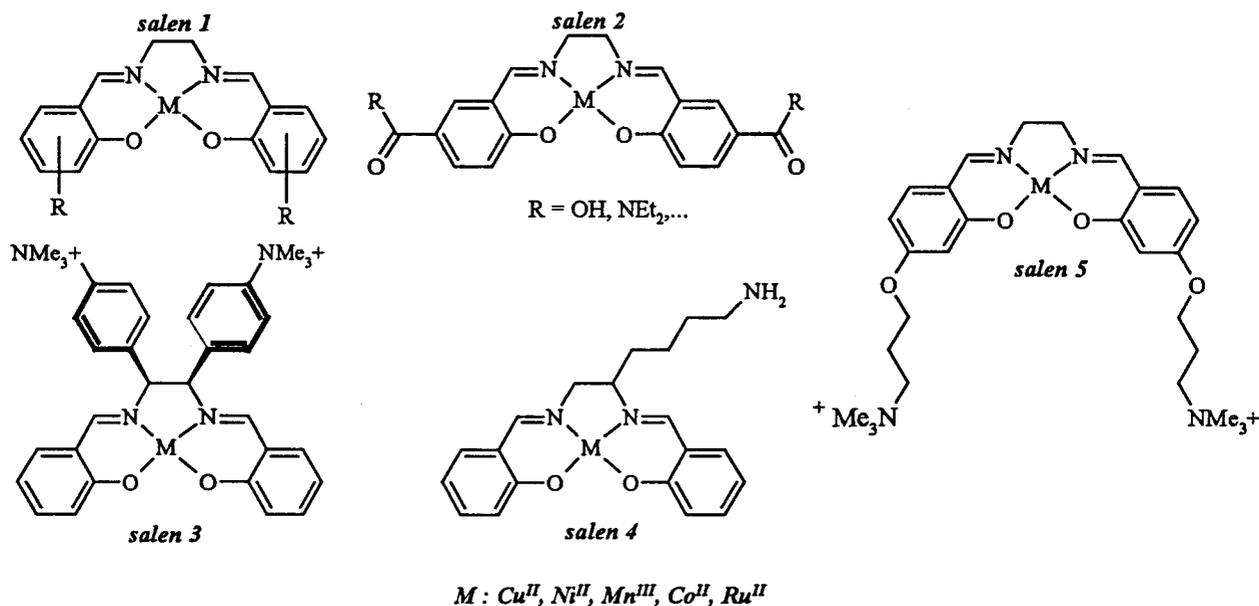


Schéma 8.1 : exemples de métallosalènes

8.1. Interaction avec les acides nucléiques²⁴³⁻²⁴⁴

Les métallosalènes à caractère anionique (charge négative sur le salicylaldéhyde ou sur l'éthylènediamine) ne se lient pas aux acides nucléiques¹⁵⁵⁻¹⁵⁶. L'interaction des métallosalènes serait donc due principalement à des liaisons électrostatiques. La présence de charge supplémentaire sur le centre métallique (M^{II} et M^{III}) modifie le mode de liaison. De plus, une augmentation de la force ionique du milieu (diminution des interactions électrostatiques avec le squelette phosphate anionique) fait chuter l'activité nucléasique¹⁵⁵⁻¹⁵⁶.

Il semblerait que Mn^{III} (salen 1) soit pris en « sandwich », pont diamino dirigé vers l'acide nucléique, dans le petit sillon des ADN riches en paires AT où il engage des liaisons de Van Der Waals stabilisatrices. Dans les petits sillons riches en paires GC, le groupe amino N^2 des guanines gêne l'interaction¹⁵⁷.

8.2. Activation

Pour les salènes à cuivre¹⁵⁸⁻¹⁶², l'activation oxydante n'a aucun effet. Un cas d'activation réductrice a été signalée : le mécanisme de coupure passe par la production de radicaux hydroxyle (produits vraisemblablement par une réaction de type Fenton).

Pour les salènes à nickel^{163-164, 245-247}, l'activation est de type oxydante. Suivant la nature du salène, la coupure est directe (oxydation des sucres pour salen 5) ou nécessite un traitement basique (oxydation des guanines pour salen 3 et salen 4). Avec Ni^{II}(salen 3), deux produits d'alkylation ont été détectés : l'un est alkali-labile (alkylation en C8 ou N7 ?) et l'autre ne l'est pas (alkylation en N3, O6 ou N² ?). La voltammétrie cyclique montre que le degré d'oxydation III du nickel est instable avec ce salène¹⁶⁵ ; le nickel III prend un électron au ligand salénate, ce qui donne un nickel II et un radical-cation sur le ligand. En absence d'ADN, Ni^{II}L^{o+} se polymérise par une réaction de couplage phénolique. En présence d'ADN, Ni^{II}L^{o+} aryle les guanines. Il a été montré que des ligands en position ortho ou para (méthyle ou chlore) réduisent l'arylation et des substitutions en position ortho et para l'inhibent totalement.

Pour les salènes à manganèse¹⁶⁶⁻¹⁶⁹, l'activation est aussi oxydante. Ils forment des espèces métal-oxo Mn^V=O. La coupure, non « oxygène dépendante », est directe (oxydation des sucres) mais un traitement basique augmente l'intensité de coupure (oxydation des bases). Les relations structure-activité de cette nucléase sont résumées dans le schéma 8.2 : les substitutions en position para des hydroxyles (celles qui affectent le plus le potentiel rédox) modifient grandement l'activité nucléasique de la molécule.

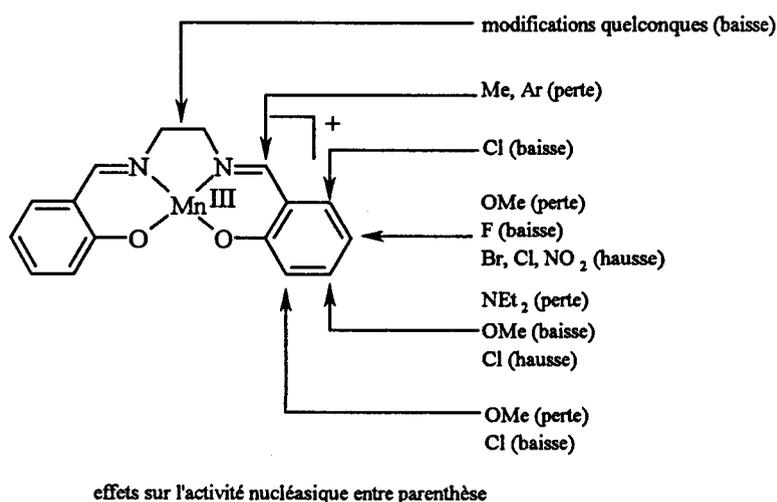


Schéma 8.2 : relations structure-activité des nucléases Mn^{III}(salen 1)¹⁶⁸

Pour les salènes à cobalt¹⁷⁰, la faible activité nucléasique, qui est observée en milieu aérobie en l'absence d'activateur, est fortement augmentée en présence d'un réducteur et elle est inhibée en présence d'un oxydant. Cette activité nucléasique pourrait être ainsi corrélée à la formation de l'espèce $\text{Co}^{\text{III}}\text{OO}^\circ$ (les oxydants inhibent sa formation en oxydant le cobalt II en cobalt III et les réducteurs catalysent sa production en réduisant le cobalt III formé après la coupure en cobalt II).

Pour les salènes à ruthénium¹⁷¹, l'activation se fait par le peroxyde d'hydrogène. Les espèces oxydantes proposées sont $\text{Ru}^{\text{III}}\text{OOH}$ et $\text{Ru}^{\text{IV}}=\text{O}$, HO° produits par rupture homolytique de la liaison $\text{Ru}^{\text{III}}\text{O}-\text{OH}$.

métallosalènes	activation	Affinité avec ADN	Coupure ADN et espèce oxydante
Salen 1			
Cu^{II}	Non étudié	-	-
Ni^{II}	- KHSO_5	?	- coupure G sélective après traitement basique
Mn^{III}	- MMPP, H_2O_2 , ϕIO , KHSO_5 - NaOCl , DTT/O_2	Liaison petit sillon	- Sélectivité régions AT, $\text{Mn}^{\text{V}}=\text{O}$ - pas de coupure
Salen 2			
Ru^{III}	- H_2O_2 - MMPP, KHSO_5	?	- Coupure aléatoire après traitement basique : HO° , $\text{Ru}^{\text{III}}\text{OOH}$, $\text{Ru}^{\text{IV}}=\text{O}$? - Pas de coupure
Salen 3			
Cu^{II}	KHSO_5	-	- Pas de coupure
Ni^{II}	MMPP, KHSO_5	Liaison G	- Coupure G spécifique après traitement basique : $\text{salen}^{\text{O}^\circ}$
Mn^{III}	Non étudié	-	-
Salen 4			
Cu^{II}	MPA/ O_2 ou DTT/O_2	Liaison grand sillon	- Coupure aléatoire : HO°
Ni^{II}	KHSO_5 , MMPP	Liaison grand sillon	- Coupure G sélective après traitement basique : $\text{Ni}^{\text{III}}-\text{OSO}_3^\circ$
Mn^{III}	Non étudié	-	-
Salen 5			
Cu^{II}	MMPP, KHSO_5 , H_2O_2	$K_a = 6.10^5 \text{ M}^{-1}$	- Pas de coupure
Ni^{II}	MMPP, KHSO_5	$K_a = 5,2.10^5 \text{ M}^{-1}$	- Sélectivité GC, oxydation sucre : Ni^{III} ou $\text{salen}^{\text{O}^\circ}$?
Mn^{III}	MMPP, KHSO_5	Non mesurable	- Sélectivité AT, oxydation sucre, $\text{Mn}^{\text{V}}=\text{O}$
Co^{II}	O_2 ou O_2/DTT	$K_a = 10.10^5 \text{ M}^{-1}$	- Coupure G sélectif, $\text{Co}^{\text{III}}\text{OO}^\circ$?

Tableau 8.1 : activation des métallosalènes

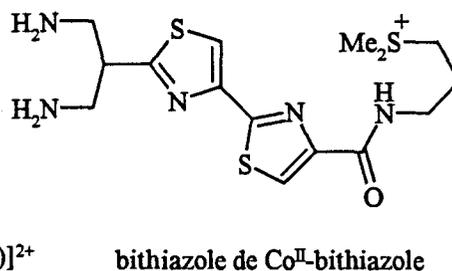
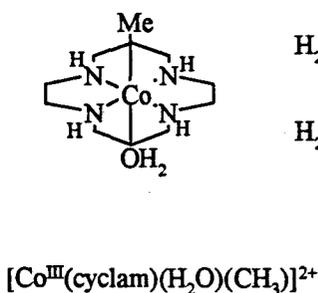
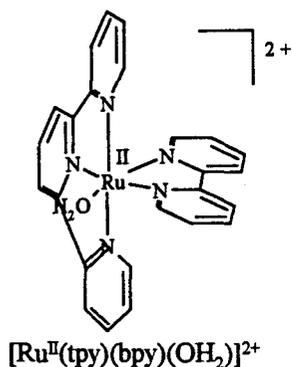
9. NUCLEASES DIVERSES

$U^{VI}O_2^{2+}$: l'activité nucléasique des sels d'uranium¹⁷² a été découverte par Nielsen en 1988. Ils se lient ($K_A = 10^{10} M^{-1}$) au squelette phosphate via le petit sillon. Leur activation est photochimique (420 nm). La nature de l'espèce oxydante n'a pas encore été mise en évidence. La coupure n'est pas oxygène dépendante et un traitement basique n'augmente pas le nombre de coupures. On postule une oxydation des sucres au niveau du carbone C1'.

$Pt^{II}_2(pop)_4^{4-}$: ce complexe dinucléaire¹⁷³ constitué d'une superposition de deux plans carrés d⁸ parallèles a été étudié par Thorp. Tétraaion, il n'a donc aucune affinité pour l'ADN. Son activation est photochimique (450 nm). L'état excité du complexe est un puissant agent de transfert d'électron et d'énergie : il est ainsi capable d'accepter des atomes d'hydrogènes. La coupure est totalement aléatoire. Une oxydation des sucres au niveau des carbones C4' et/ou C5' est envisagée.

$[Ru^{II}(tpy)(bpy)(OH_2)]^{2+}$: ce complexe^{44, 174-175} a une affinité faible pour les acides nucléiques ($K_A = 10^2 M^{-1}$). Elle est purement électrostatique comme c'est souvent le cas pour les complexes à ligands polypyridines. Son activation est électrochimique. Ce complexe peut être facilement oxydé en complexe oxo ($E^0 Ru^{III}/Ru^{II} = 0,49 V$ vs Ag/AgCl et $E^0 Ru^{IV}/Ru^{III} = 0,62$ vs Ag/AgCl), le ligand aqua coordonné se déprotonnant successivement en complexe hydroxo puis oxo. Comme les deux potentiels rédox sont assez proches, ce complexe peut se comporter comme un oxydant à un électron (oxydation $CH \rightarrow C^\bullet$) ou un oxydant à deux électrons (oxydation $CH \rightarrow C^+$). Il peut induire deux mécanismes de coupure : une coupure non « pipéridine-dépendante » par oxydation des sucres au niveau du carbone C1' (5-méthylène-furanone mis en évidence) et une coupure « pipéridine-dépendante » par oxydation des guanines (8-oxoguanine mis en évidence).

$[Co^{III}(cyclam)(H_2O)(CH_3)]^{2+176}$, $[Co^{II}bithiazole]^{177}$ etc



Chapitre 3 :
SALENES POLYHYDROXYLES
ET
SYNTHESES

1. SYNTHÈSES DE SALÈNES POLYHYDROXYLÉS

Afin de concevoir de nouvelles nucléases, nous avons retenu l'exemple de la famille des métallosalènes, sur laquelle le laboratoire travaille depuis quelques années^{159-162, 164}.

La famille des composés de la N,N'-bis(salicylidène)-éthylènediamine, plus connue sous le nom de salènes (schéma 1.1), est obtenue par condensation de dérivés de l'aldéhyde salicylique sur une diamine.

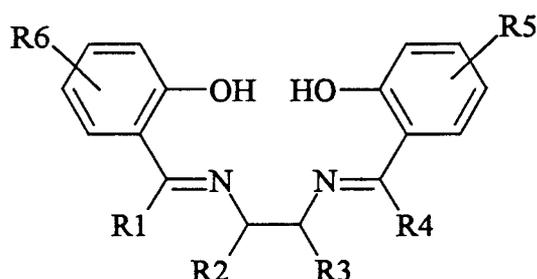


Schéma 1.1 : N,N'-bis(salicylidène)-éthylènediamine ou salène

Les salènes sont de bons chélateurs de métaux : la double charge négative des fonctions phénolates et les deux azotes du ligand du salène permettent d'obtenir des complexes avec des cations divalents comme le cuivre II, le nickel II, le manganèse II, le cobalt II ...

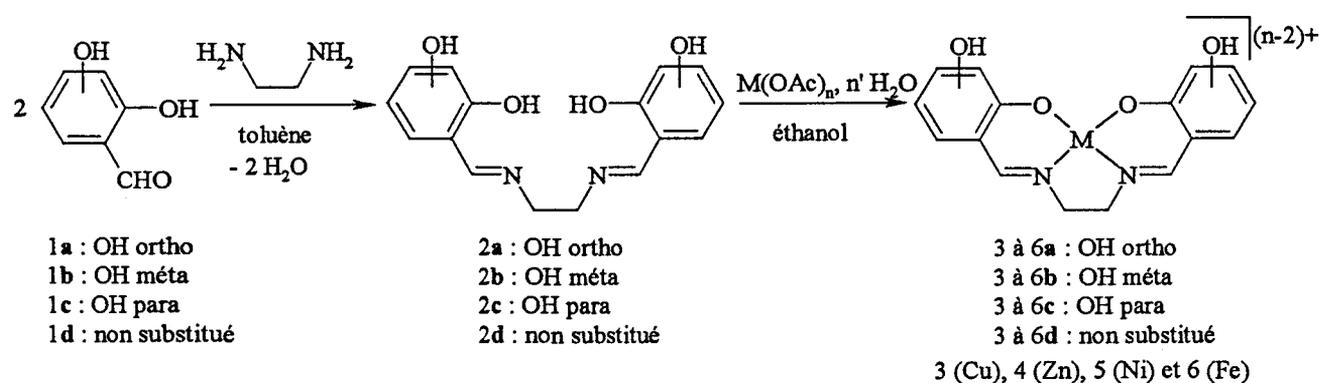


Schéma 1.2 : voie de synthèse des métallosalènes polyhydroxylés

Dans ce travail, nous avons choisi de réaliser des salènes complexés par le cuivre et le fer, à partir de la condensation de la 2,3-dihydroxybenzaldéhyde (1a), de la

2,4-dihydroxybenzaldéhyde (1b) ou de la 2,5-dihydroxybenzaldéhyde (1c) sur l'éthylène diamine (schéma 1.2) afin d'incorporer un système hydroquinone ou catéchol près du centre métallique pour les complexes a et c.

Nous pensons que l'incorporation de groupements hydroxyle en position ortho, méta ou para dans le cycle du salène activerait l'activité nucléasique de ces complexes en jouant sur leurs propriétés rédox.

En effet, l'introduction de fonctions hydroxyle augmente, d'une part, la densité électronique sur le métal et d'autre part, la présence d'un système hydroquinonique ou catéchol près du centre métallique (Cu ou Fe) permet en théorie la formation d'un radical semi-quinonique grâce à un équilibre de transfert d'électron intramoléculaire entre ligand et métal (schéma 1.3).

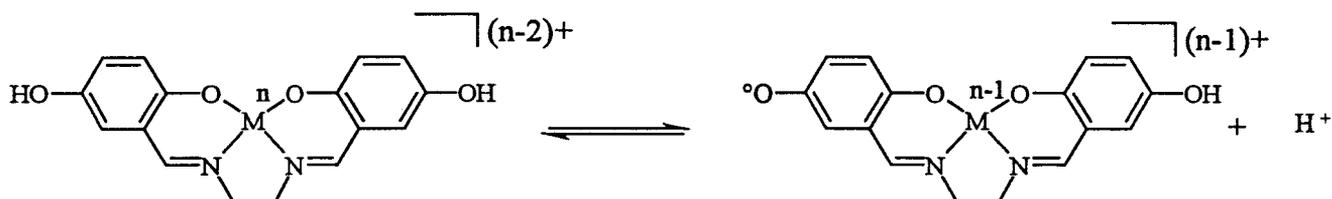


Schéma 1.3 : Transfert d'électron intramoléculaire entre le métal et le ligand

Deux voies principales permettent d'obtenir les métallosalènes :

- la première¹⁷⁸ s'effectue en une seule étape à partir de l'addition de l'éthylènediamine sur un dérivé de l'aldéhyde salicylique. Il se forme, *in situ*, le ligand qui n'est pas isolé. Il est directement complexé par le métal introduit dans le milieu réactionnel sous forme d'un sel d'acétate hydraté.
- la seconde¹⁷⁹⁻¹⁸² s'effectue en deux étapes. Lors d'une première étape, on isole le ligand, une diimine, obtenu par condensation en milieu neutre de l'éthylènediamine sur un dérivé de l'aldéhyde salicylique. Lors de cette réaction qui est en fait un équilibre, il y a formation d'une molécule d'eau. On peut déplacer cet équilibre en éliminant régulièrement l'eau formée, soit en ajoutant du tamis moléculaire 3 Å, soit en utilisant un montage de type Dean-Stark. Lors de la deuxième étape, on ajoute, sous

atmosphère ambiante ou sous atmosphère inerte suivant le métal à complexer, les sels d'acétate en milieu éthanolique pour former les complexes correspondants qui sont isolés par filtration.

C'est cette dernière méthode (montage de type Dean-Stark) que nous avons utilisée.

2. SYNTHÈSE DES LIGANDS SALÉNIQUES POLYHYDROXYLÉS

Les ligands saléniques polyhydroxylés (schéma 2.1) sont obtenus grâce à un montage de type Dean-Stark. Un reflux de deux heures dans le toluène suivi d'une simple filtration permet d'obtenir les ligands correspondants avec des rendements supérieurs à 95%.

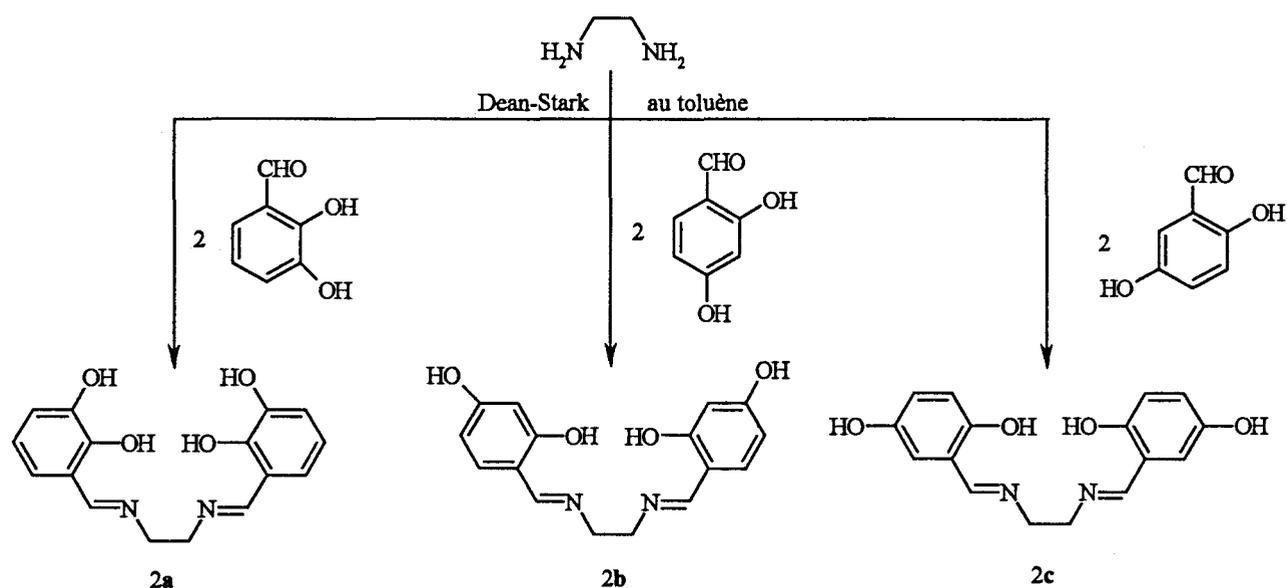


Schéma 2.1 : obtention des ligands saléniques polyhydroxylés 2a, 2b, 2c

3. SYNTHÈSE DES SALÈNES POLYHYDROXYLÉS À CUIVRE

Les réactions de complexation par l'acétate de cuivre (II) monohydraté sur les ligands saléniques polyhydroxylés (schéma 3.1) donnent les complexes cuivriques correspondants avec des rendements compris entre 70 et 80%.

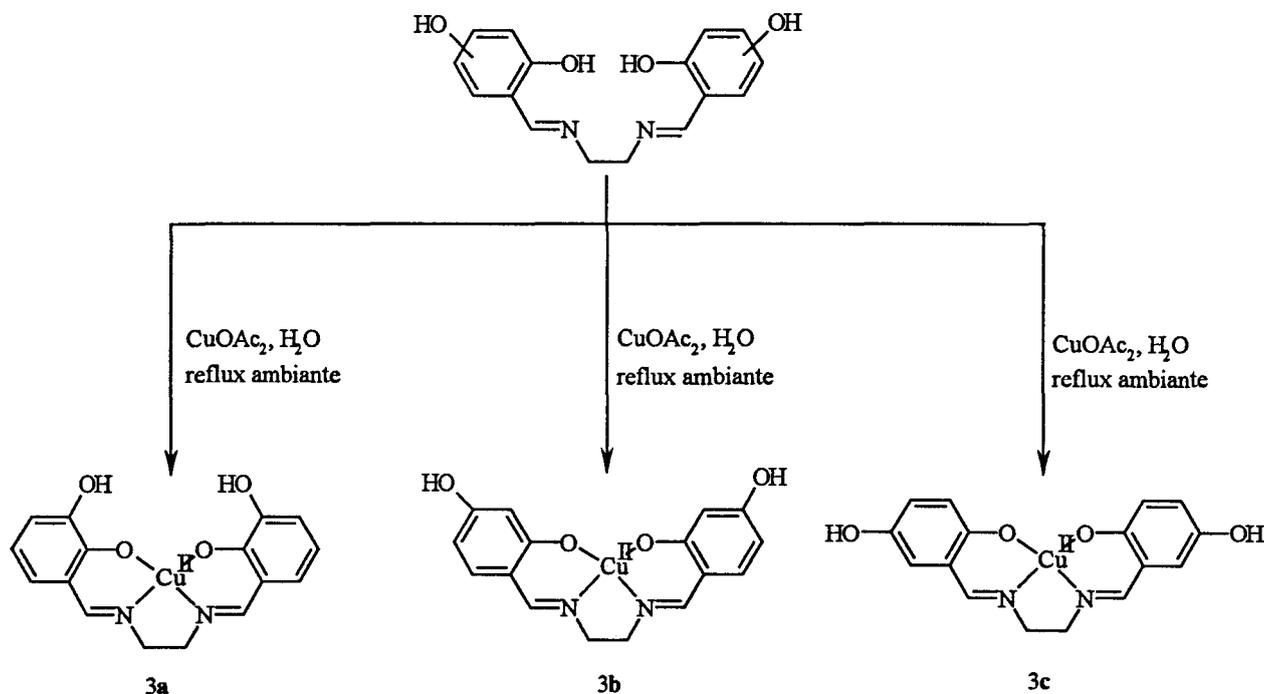


Schéma 3.1 : obtention des salènes polyhydroxylés à cuivre 3a, 3b et 3c

Des salènes polyhydroxylés complexés par le zinc II 4a, 4b et 4c ($\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ainsi que par le nickel II 5a, 5b et 5c ($\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ont été obtenus par des méthodes similaires.

4. SYNTHÈSE DES SALÈNES POLYHYDROXYLÉS A FER

Les réactions de complexation par le chlorure ferreux tétrahydraté sur les ligands saléniques polyhydroxylés suivi d'une oxydation par O_2 donnent les complexes de fer (schéma 4.1) correspondants avec des rendements compris entre 70 et 90%.

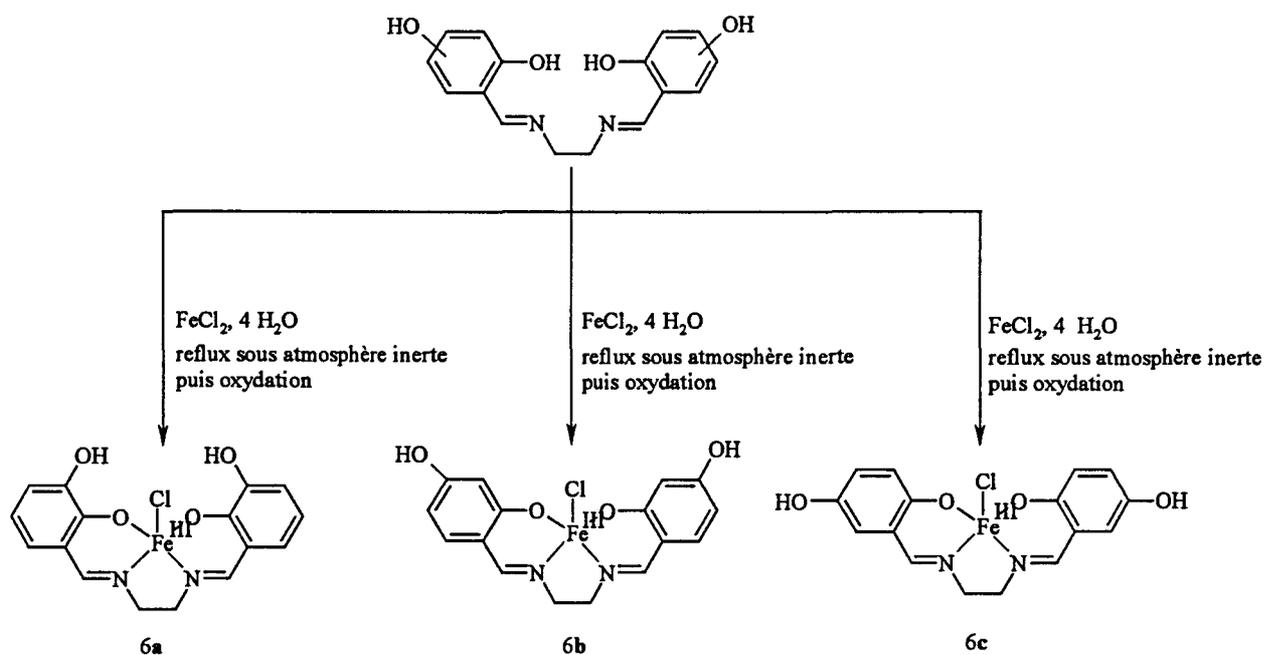


Schéma 4.1 : obtention des salènes polyhydroxylés à fer 6a, 6b et 6c

Nous avons donc synthétisé différents complexes métalliques de salènes polyhydroxylés. Après avoir vérifié la présence ou l'absence de propriétés nucléasiques pour ces métallosalènes, nous avons étudié leurs propriétés physico-chimiques avec l'espoir d'expliquer les propriétés de coupure observées.

Une étude RPE, afin de déterminer la géométrie et la structure des complexes, une étude voltammétrique, afin de déterminer les propriétés rédox et une étude par « spin-trapping », afin de déterminer la production de radicaux libres suivant l'état d'oxydation du complexe ont ainsi été menées.

Chapitre 4 :
SALENES POLYHYDROXYLES :
ET
ETUDE DE
L'ACTIVITE NUCLEASIQUE

1. PRINCIPE DE LA DETECTION DE L'ACTIVITE NUCLEASIQUE

L'activité nucléasique d'une molécule est détectée principalement par deux techniques d'électrophorèse¹⁸³ : la coupure de plasmide et la coupure d'oligonucléotides marqués.

1.1. Coupure de plasmide

Lors d'une expérience de coupure de plasmide, une coupure monobrin (schéma 1.1) convertit l'ADN circulaire superenroulé (plasmide ou forme I) en un ADN circulaire relâché (forme II) alors qu'une coupure double brin produit un ADN linéaire (forme III).

Ces trois formes différentes peuvent être séparées sur un gel d'agarose : la forme circulaire est celle qui migre le moins loin sur le gel, alors que la forme superenroulée migre le plus loin, la forme intermédiaire étant l'ADN linéaire.

Les différents fragments sont ensuite révélés en présence de bromure d'éthidium, un intercalant qui permet de visualiser sous lumière ultraviolette les différents fragments d'ADN. Les gels sont ensuite rincés à l'eau et photographiés.

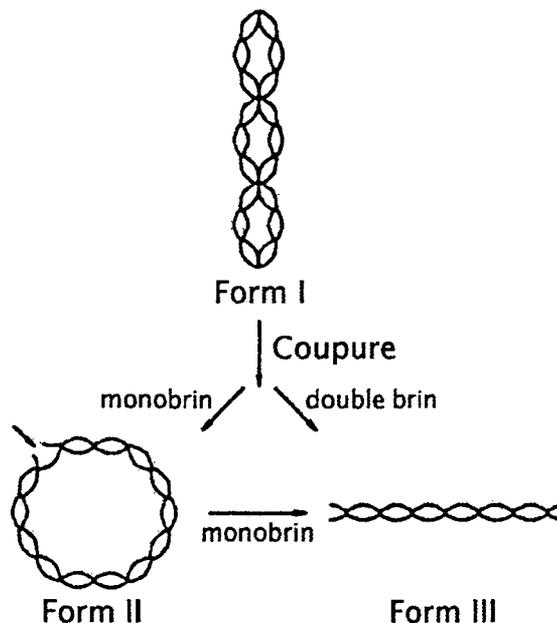


Schéma 1.1 : les différentes formes issues d'un plasmide

La coupure de plasmide est très sensible : une unique coupure simple ou double brin est suffisante pour avoir un ADN circulaire ou linéaire. Cependant cette méthode ne donne aucun renseignement sur l'existence d'une spécificité de coupure.

1.2. Coupure d'oligonucléotides marqués

Les coupures d'un oligonucléotide marqué enzymatiquement à une de ces extrémités 3' ou 5' (marquage radioactif) produisent divers fragments d'oligonucléotides qui migrent différemment selon leur taille par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide (PAGE). En séquençant cet oligonucléotide, par la méthode de Maxam-Gilbert par exemple, le nucléotide sur lequel la coupure a eu lieu peut être identifié et visualisé par autoradiographie.

Dans le cas d'une coupure préférentielle, on aura un ensemble discontinu de bandes sur le gel. Si on observe une coupure directe, sans ajout de pipéridine (ADN) ou d'aniline (ARN), il est fort probable que la nucléase oxyde directement le sucre. Si on observe une coupure indirecte après un ajout de pipéridine ou d'aniline, il est fort probable, au contraire, que la nucléase oxyde les bases nucléiques.

Lors de l'oxydation des sucres des acides nucléiques, des bandes (additionnelles ou non) liées aux bandes de séquençage apparaissent (bandes de migration au dessus ou au dessous de la bande de séquençage) : ces bandes sont relatives à des fragments 5'- ou 3'-résidus (par exemple, oligonucléotide 3'-phosphoglycolate) alors que les bandes de séquençage sont relatives à des fragments 5'- ou 3'-phosphate. Ces bandes donnent de précieux renseignements sur les mécanismes de la coupure.

Il existe, en schématisant, six profils de coupure suivant les propriétés de la nucléase (schéma 1.2) :

- la nucléase possède une affinité non spécifique : ici, le caractère diffusible de l'espèce oxydante ne joue pas car la liaison à l'acide nucléique est aléatoire. Le profil de coupure dépendra uniquement de la cible oxydée :
 - attaque du sucre : coupure uniforme (profil 1).
 - attaque de la base : coupure nucléotide spécifique (profil 2).

- La nucléase est à affinité spécifique : les profils de coupure sont plus variés suivant le caractère diffusible de l'espèce oxydante produite et la cible d'oxydation.
 - attaque du sucre par une espèce oxydante non diffusible : coupure séquence spécifique (profil 3).
 - attaque du sucre par une espèce oxydante diffusible : coupure séquence spécifique non stricte (profil 4).
 - attaque des bases nucléiques par une espèce oxydante non diffusible : coupure nucléotide et séquence spécifique (profil 5).
 - attaque des bases nucléiques par une espèce oxydante diffusible : coupure nucléotide et séquence spécifique non stricte (profil 6).

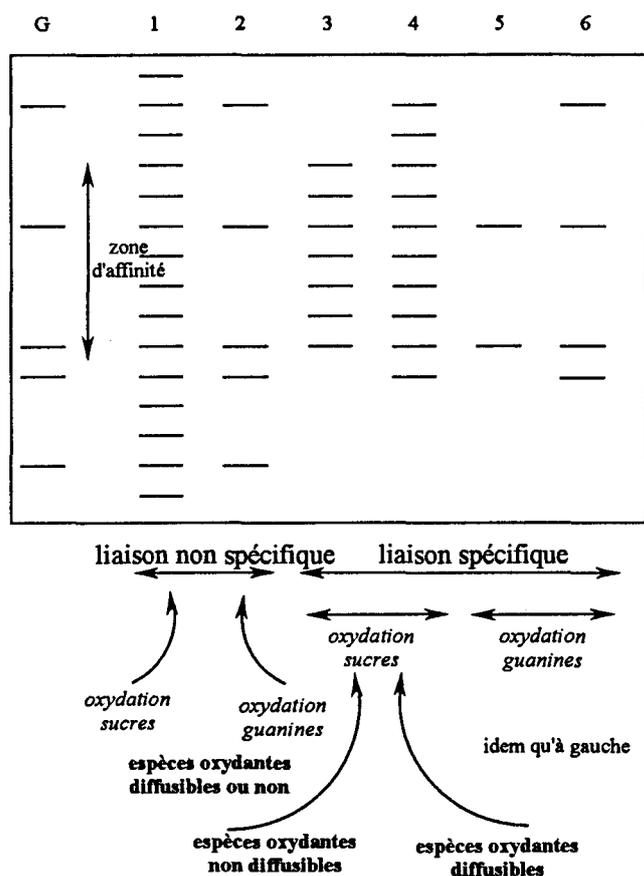


Schéma 1.2 : profils de coupure observés pour les nucléases

En résumé, une sélectivité de coupure est due soit à une liaison préférentielle de la nucléase chimique à l'ADN soit à une réactivité préférentielle de l'espèce oxydante. Par exemple, une nucléase capable d'oxyder les sucres en arrachant un H° est théoriquement

capable de couper l'ADN à n'importe quelle site. Cependant, si cette nucléase a une affinité particulière pour un type de site, une coupure préférentielle est observée.

2. SALENES POLYHYDROXYLES A CUIVRE

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

Pour étudier l'activité nucléasique des métallosalènes polyhydroxylés, nous avons mené des études de coupure de plasmide. Les tests de coupure ont été effectués par M. Bailly, Chargé de Recherche INSERM à l'Institut de Recherche contre le Cancer de Lille.

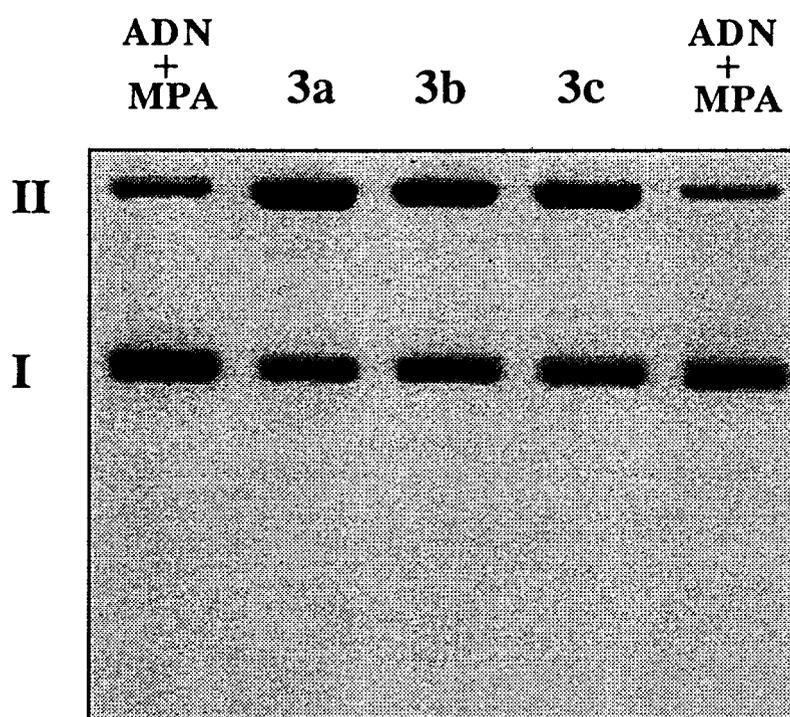


Schéma 2.1 : coupure du plasmide pUC12 par 50 μM de salènes polyhydroxylés à cuivre 3a, 3b et 3c en présence de 100 μM MPA (temps d'incubation d'une heure à 37°C)

Chaque échantillon contient 9 μl d'ADN superenroulé pUC12 (0,5 μg dans du tris HCl, 10 mM NaCl, tamponné à pH = 7), 1 μl de la solution du complexe dans le DMSO à la concentration de 50 μM .

Après une incubation de 15 minutes, on rajoute 2 μl d'une solution d'acide mercaptopropionique (5 μl dans 830 μl d'eau).

Après une incubation d'une heure à 37°C, suivie d'une lyophilisation de quatre minutes, on rajoute 5 μl de bleu dénaturant (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène

cyanol et 30% de glycérol dans l'eau) dans chaque tube et les solutions sont déposées sur gel d'agarose à 1%.

L'électrophorèse est arrêtée après deux heures à 100 V dans un tampon TBE (89 mM tris-borate, pH = 8,3 et 1 mM EDTA).

Les gels sont ensuite plongés dans une solution de bromure d'éthidium pendant 15 minutes, puis lavés à l'eau et enfin photographiés sous lumière ultraviolette.

Les complexes de cuivre II sont capables, en milieu aérobie, d'induire des coupures oxydantes sur un plasmide en présence d'un agent réducteur (ici le MPA). En effet, après une heure d'incubation à 37 °C avec 50 µM de complexe de cuivre, nous constatons la conversion d'une certaine quantité de forme II au détriment de la forme I pour 3a, 3b et 3c (schéma 2.1). On peut donc conclure que ces complexes cuivriques, en présence d'agents réducteurs, induisent des coupures monobrins sur des plasmides.

Cette activité nucléasique observée pour des complexes cuivriques en milieu réducteur^{184, 186-187} n'est pas nouvelle. Comme il l'a été déjà signalée précédemment (chapitre 1 et 2), de nombreux exemples de complexes de cuivre II (un exemple récent¹⁸⁵ de complexe de cuivre à activité nucléasique est donné dans le schéma 2.2) exercent une activité nucléasique en présence d'un agent réducteur comme l'acide ascorbique, le DTT ou le MPA.

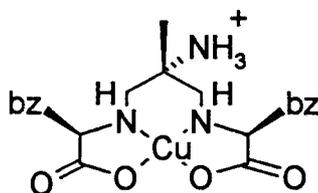


Schéma 2.2 : exemple récent de nucléase à cuivre activée par un agent réducteur extérieur et induisant des coupures double brin.

Le mécanisme d'activation de ces complexes est rappelé dans le schéma 2.3.

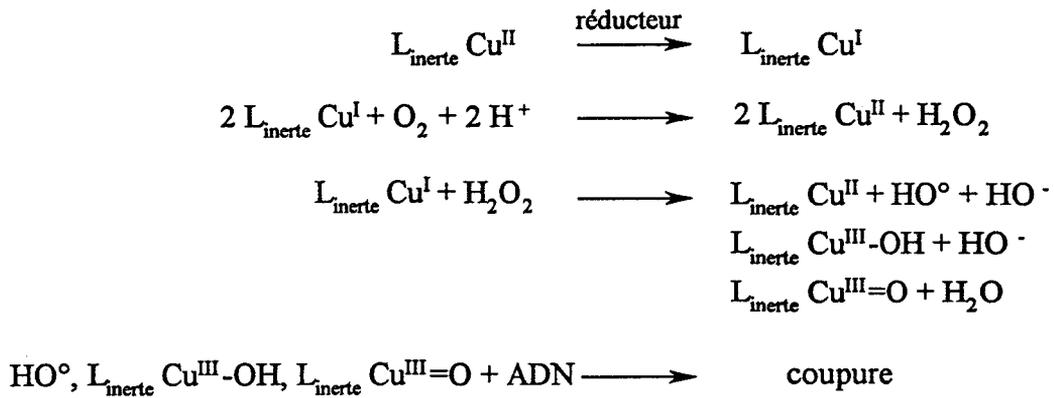


Schéma 2.3 : activation des nucléases à cuivre par un agent réducteur extérieur

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

Depuis quelques années, des exemples de complexes de cuivre II exerçant une activité nucléasique en absence d'agent activateur et en milieu aérobie sont apparus dans la littérature¹⁸⁸⁻¹⁹². Quelques exemples sont répertoriés dans le tableau 2.1.

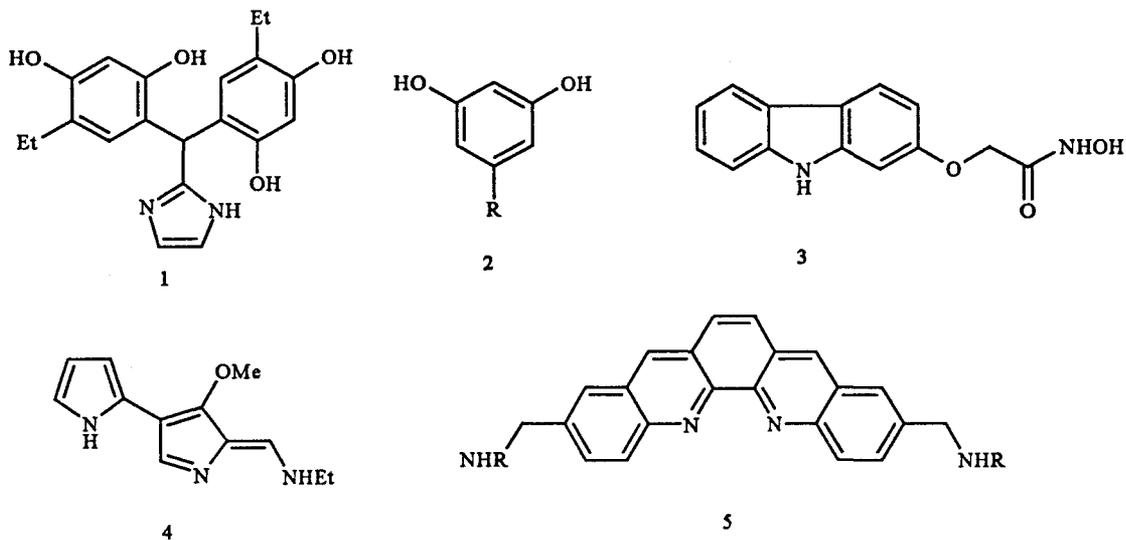
Nous nous sommes donc demandés si nos complexes cuivriques de salènes polyhydroxylés possédaient cette remarquable propriété.

Chaque échantillon contient 9 µl d'ADN superenroulé pUC12 (0,5 µg dans du tris HCl, 10 mM NaCl, tamponné à pH = 7), 1 µl de la solution du complexe dans le DMSO à la concentration désirée (0 à 80 µl).

Après une incubation d'une heure à 37°C, on rajoute 4 µl de bleu dénaturant (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol et 30% de glycérol dans l'eau) dans chaque tube et les solutions sont déposées sur gel d'agarose à 1%.

L'électrophorèse est arrêtée après deux heures à 100 V dans un tampon TBE (89 mM tris-borate, pH = 8,3 et 1 mM EDTA).

Les gels sont ensuite plongés dans une solution de bromure d'éthidium pendant 30 minutes, puis lavés à l'eau et enfin photographiés sous lumière ultraviolette.



<i>ligands</i>	<i>Conditions d'incubation</i>	<i>remarques</i>
imidazol-bisrésorcinol¹⁸⁸ (1)	2 h 100 μ M de ligand et de sel cuivrique	- complexe non caractérisé - coupure inhibée par SOD, catalase et DMSO
5-alkylrésorcinol¹⁸⁹ (2)	0,5 h 100 μ M de ligand et de sel cuivrique	- complexe non caractérisé - coupure inhibée par SOD, catalase et DMSO - coupure induite par 6-alkyl-1,2,4-trihydroxybenzène formé après oxygénation du noyau résorcinol
acide hydroxamique¹⁹⁰ (3)	40 h 100 μ M de ligand et de sel cuivrique	- complexe non caractérisé - coupure inhibée par catalase mais pas par SOD
tambjamine E¹⁹¹ (4)	0,5 h 50 μ M de ligand et de sel cuivrique	- complexe caractérisé (stoechiométrie 2 : 2) - affinité pour l'ADN ($K_a = 2.10^6$) - inhibition par catalase mais pas par SOD ou DMSO
ortho-quinacridine¹⁹² (5)	4 h 24 μ M de ligand et 160 μ M de sel cuivrique	- complexe caractérisé (stoechiométrie 1 : 1) - coupure inhibée par SOD, catalase et DMSO

Tableau 2.1 : exemples de nucléases à cuivre ne nécessitant pas de réducteur exogène

En absence d'agent activateur (schéma 2.4), seuls les complexes 3a et 3c présentant un système hydroquinone et catéchol sur le ligand salénique induisent des coupures monobris du plasmide alors que les complexes 3b et 3d, qui ne présentent pas de système hydroquinonique sur le ligand, n'induisent aucune coupure même à la forte concentration de 1

mM (la quantité de forme II est identique au contrôle). Il faut noter également qu'à la même concentration et pour un temps d'incubation identique, le pourcentage de coupure de 3a et 3c est supérieur à celui observé en présence d'un agent réducteur.

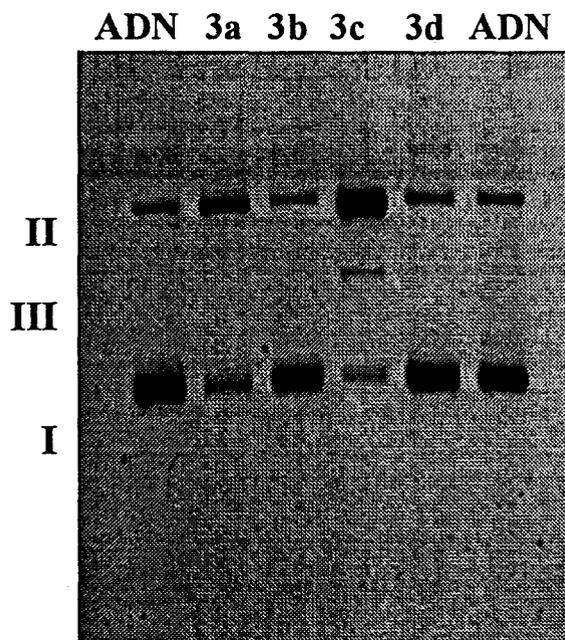


Schéma 2.4 : coupure du plasmide pUC12 par 50 μ M de salènes polyhydroxylés 3a, 3b et 3c à cuivre en absence d'agent réducteur (temps d'incubation d'une heure à 37°C).

La forme circulaire (forme II) du plasmide augmente progressivement en fonction de la concentration en complexe, au détriment de sa forme superenroulé (forme I). Après une incubation d'une heure à 37°C de 50 μ M de 3c et de 60 μ M de 3a, la forme I du plasmide est entièrement convertit en forme II.

Nous observons aussi la formation d'ADN linéaire (forme III) pour le complexe 3c à partir de 50 μ M. L'obtention d'un ADN linéaire présagerait d'une coupure double brin. Il n'en ait cependant rien : l'observation de la forme III est due à une accumulation de coupures monobrins plutôt qu'à une réelle coupure double brin comme le montre la courbe donnant la proportion de forme II obtenue en fonction de la concentration en complexe (schéma 2.5). On constate qu'à forte concentration la proportion de forme II diminue : la forme II est convertit en forme III par coupure monobrin.

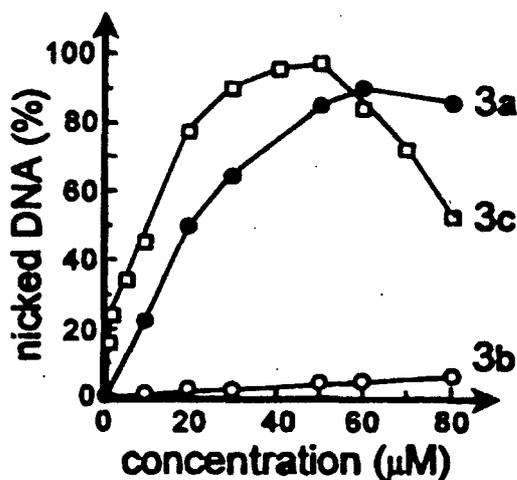


Schéma 2.5 : Proportion de forme II suivant la concentration du complexe cuivrique

En conclusion, en absence d'agent réducteur, seuls les complexes 3a et 3c exercent une activité nucléasique avec une meilleure activité pour 3c à concentration de complexe égale. Ils induisent, par ailleurs, uniquement des coupures monobrin sur le plasmide.

L'activité nucléasique observée en milieu aérobie pour certains complexes cuivriques en absence d'agent réducteur exogène (l'oxygène est indispensable à l'activité nucléasique) s'explique généralement par le fait que le ligand sert lui-même d'agent réducteur (schéma 2.6) : dans ces conditions, la coupure n'est pas catalytique.

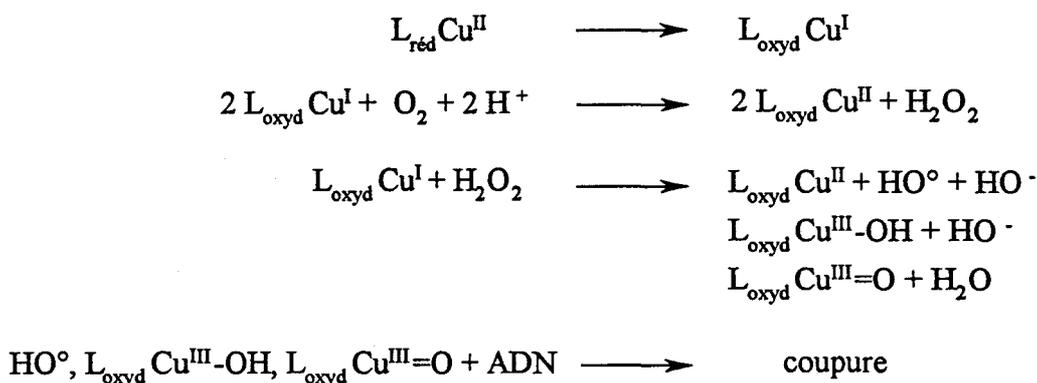


Schéma 2.6 : auto-activation des nucléases à cuivre

Ce mécanisme, à savoir la réduction du cuivre par le ligand, expliquerait-il l'activité nucléasique observée pour 3a et 3c ?

Le cuivre II, libre et non complexé, en présence d'hydroquinone¹⁹³⁻¹⁹⁴, de 2,5-dihydroxybiphényl¹⁹⁶ ou de L-dopa¹⁹⁵ exerce une activité nucléasique. Pour tous ces exemples, on suppose que l'activité nucléasique observée s'explique par la réduction du cuivre II en cuivre I par le système hydroquinone ou catéchol (schéma 2.7).

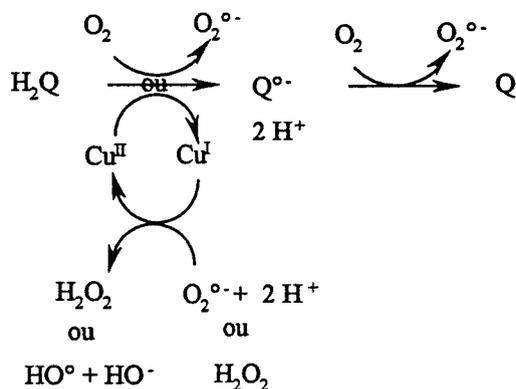


Schéma 2.7: activation du cuivre II libre par l'hydroquinone

Nous nous sommes donc demandés si l'activité nucléasique observée dans le cas des salènes polyhydroxylés à cuivre pouvait s'expliquer par un mécanisme similaire à savoir une réduction du cuivre II en cuivre I avec la formation concomitante d'un radical anion semi-quinonique sur le ligand (schéma 2.8). Pour cela, nous avons entrepris diverses études physico-chimiques qui font l'objet des chapitres suivants.

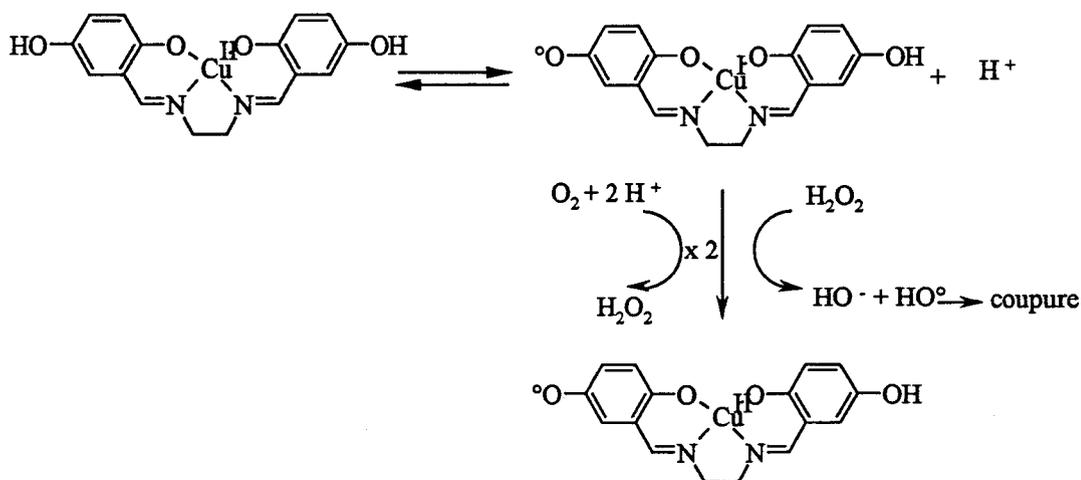


Schéma 2.8 : hypothèse de départ pour l'activation des salènes polyhydroxylés à cuivre

3. SALENES POLYHYDROXYLES A FER

3.1. Etude de la liaison à l'ADN

Nous avons d'abord étudié l'affinité pour les acides nucléiques des complexes 6a, 6b et 6c ainsi que celle des complexes de référence 6d et 6d' (complexe 6d dont les fonctions imines ont été réduites) par la technique de dénaturation thermique de l'ADN. Cette technique a aussi été utilisée pour les complexes polyhydroxylés de cuivre 3a, 3b et 3c mais elle a donné peu de résultats convaincants.

Il est établi que l'interaction d'une molécule avec l'ADN entraîne généralement une stabilisation de la double hélice d'ADN vis-à-vis de la dénaturation thermique. L'augmentation progressive de la température induit en effet le désappariement des bases nucléiques par rupture des liaisons hydrogène : les bases ne sont donc plus en « stacking » et on observe un effet hyperchrome à 260 nm. La température de dénaturation de l'ADN (T_M) correspond à la température pour laquelle 50% de l'ADN se trouve désapparié (point d'inflexion de la sigmoïde $DO_{260} = f(T)$). La mesure de la variation de température de dénaturation thermique ($\Delta T_m = T_m^{ADN + complexe} - T_m^{ADN seul}$) d'un ADN en présence d'un ligand permet ainsi d'estimer sa capacité à stabiliser la double hélice et donc de déterminer si ce dernier se lie ou non à l'ADN.

L'ADN utilisé dans ces expériences de dénaturation thermique est de l'ADN de thymus de veau ($T_m = 66 \pm 1$ °C) ou un polynucléotide poly(dA-dT).(dA-dT) ($T_m = 41 \pm 1$ °C). Les polynucléotides poly(dG-dC).(dG-dC) ne peuvent pas être utilisés en raison d'une trop grande stabilité du polynucléotide (T_m trop important).

Les courbes de dénaturation thermique ont été mesurées sur un spectrophotomètre Uvikon 943 couplé à un cryostat Neslab RTE 111. A chaque expérience, 12 échantillons sont placés dans des cuves de quartz (d'épaisseur 10 mm et de volume 1 ml) thermostatés. La température, mesurée par une sonde de platine, augmente de 20 à 100°C avec une vitesse de 1°C/min. L'absorbance est mesurée à 260 nm pour des échantillons de concentration 20 μ M en acide nucléique et 10 μ M en complexe placés dans une solution tampon BPE pH = 7,1

(6mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄ et 1 mM EDTA). La température T_m est prise au point d'inflexion de la courbe sigmoïde de la transition hyperchromique.

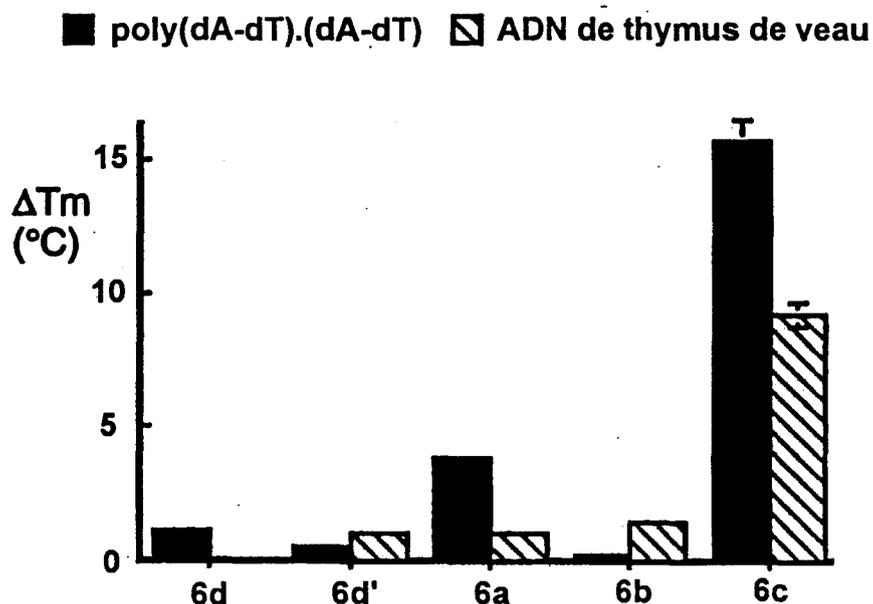


Figure 3.1 : ΔT_m des complexes 6a, b, c, d, d'

Les valeurs de ΔT_m sont données dans la figure 3.1. Une importante augmentation du T_m pour l'ADN de thymus de veau ou pour le polynucléotide poly(dA-dT).(dA.dT) est observée avec le complexe 6c. La stabilisation de la double hélice d'acides nucléiques est bien moins importante pour 6a et 6b (ΔT_m plus faible). Pratiquement aucun effet n'est observé pour les références 6d et 6d'. Pour l'ADN de thymus de veau (qui contient statistiquement autant de paires AT que de paires GC), l'ordre d'affinité est $6c \gg 6a > 6b$.

L'étude de ΔT_m montre donc que le complexe 6c possède la plus grande affinité pour l'ADN.

3.2. Coupure de plasmide

La nucléase Fe(EDTA) est activée en présence d'un agent réducteur afin d'obtenir l'état ferreux du métal. Pour cette raison, nous avons étudié la coupure du plasmide en présence et en absence de dithiothréitol ou DTT (réducteur).

Chaque échantillon contient 4 μl d'ADN superenroulé pAT (0,6 μg dans du tris-HCl, 10 mM NaCl, tamponné à pH = 7), 4 μl d'eau, 10 μl de la solution du complexe à la concentration désirée et, suivant les cas, 2 μl de DTT (1 mM). Après incubation à 37°C (temps indiqué sur les figures), on rajoute 4 μl de bleu dénaturant (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol et 30% de glycérol dans l'eau) dans chaque tube et les solutions sont déposées sur gel d'agarose à 1%. L'électrophorèse est arrêtée après deux heures à 100 V dans un tampon TBE (89 mM tris-borate, pH = 8,3 et 1 mM EDTA). Les gels sont ensuite plongés dans une solution de bromure d'éthidium (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), lavés à l'eau et enfin photographiés sous lumière ultraviolette.

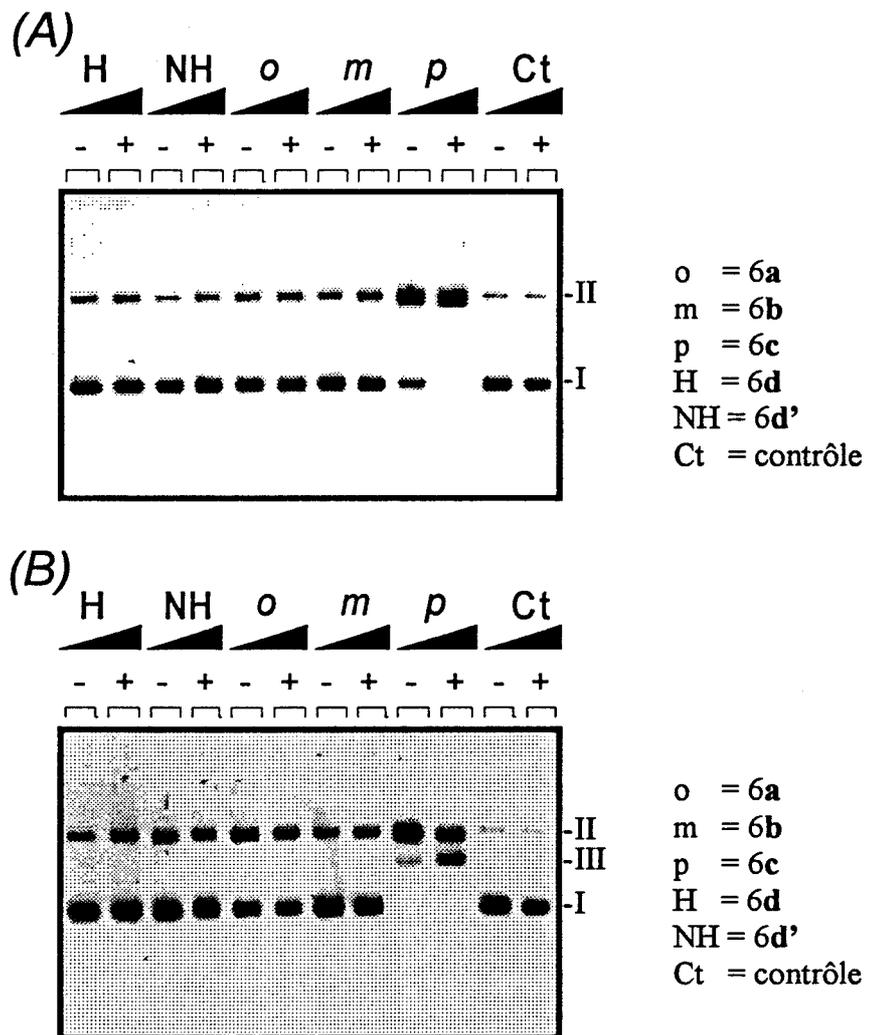


Figure 3.2 : coupure de plasmide pAT par les salènes polyhydroxylés à fer (50 μM) en présence (+) ou en absence (-) de DTT (200 μM) pour des temps d'incubation de 3,5 heures (A) ou 20 heures (B). La ligne Ct contient seulement de l'ADN.

Dans la figure 3.2, le plasmide est incubé à 37 °C pendant 3,5 heures (A) avec 50 µM de complexe 6a, b, c, d et d' en présence (+) ou en absence (-) de DTT. Pratiquement aucune coupure n'est détectée pour les complexes de référence 6d et 6d'. Elle reste faible pour les complexes 6a et 6b (6 ± 2 % de forme I est transformé en forme II). En revanche, 75 ± 5 % de plasmide superenroulé (en absence d'agent réducteur) ou sa totalité (en présence d'agent réducteur) est convertit en forme II pour un temps d'incubation de 3,5 heures.

Des gels identiques ont été obtenus pour des temps d'incubation différents. Un gel obtenu après une incubation de 20 heures est présenté en figure 3.2 (B). Ici aussi, on observe que le complexe 6c exerce la plus importante activité nucléasique. Avec les complexes 6d, d', a et b, l'addition d'un réducteur comme le DTT a peu d'effet dans le résultat de coupure (coupure qui reste faible malgré un fort temps d'incubation). A l'inverse, le complexe 6c coupe efficacement le plasmide, même en absence d'agent réducteur. Après une incubation de 20 heures sans DTT, on observe la disparition de la forme I et une légère apparition de forme III est détectée. La formation d'ADN linéaire (forme III) est bien plus importante en présence de DTT : la moitié du plasmide superenroulé se retrouve dans la forme II et l'autre moitié dans la forme III.

La figure 3.3 montre la coupure de plasmide en présence de DTT pour différentes concentrations de 6c et pour un temps d'incubation de 3 heures (figure A) ou de 8 heures (figure B). Dans les deux cas, le plasmide superenroulé (forme I) est graduellement transformé en ADN circulaire (forme II). On note ici que le métal est indispensable à l'activité nucléasique de 6c : 2c ne possède en effet aucune propriété nucléasique.

3.3. Coupure de fragments de restriction marqués

L'activité nucléasique de 6c en présence de DTT a aussi été étudiée sur deux fragments de restriction 117 bp et 160 bp marqués au ³²P à l'extrémité 3'.

Ces fragments de restriction ont été marqués au ³²P à l'extrémité 3' en présence de α-[³²P]-dATP et de AMV reverse transcriptase et préparés à partir de la digestion d'une solution tampon de plasmide pBS par *EcoRI/PvuII* (117 bp) ou de plasmide pAT par

EcoRI/AvaI (160 bp). Les produits de la digestion ont ensuite été séparés par électrophorèse (89 mM tris-borate, pH = 8,3 et 1 mM EDTA) sur un gel de polyacrylamide à 6%. Après autoradiographie, la bande correspondant à 117 bp ou 160 bp est isolée puis trempée dans l'eau pendant une nuit à 37°C. La suspension est ensuite filtrée sur filtre Millipore 0,22 µm et l'oligonucléotide est ensuite précipité en ajoutant de l'éthanol. Après lavage et séchage, les fragments de restriction sont resuspendus dans du tris (10 mM) contenant 10 mM de NaCl et ajusté à pH = 7.

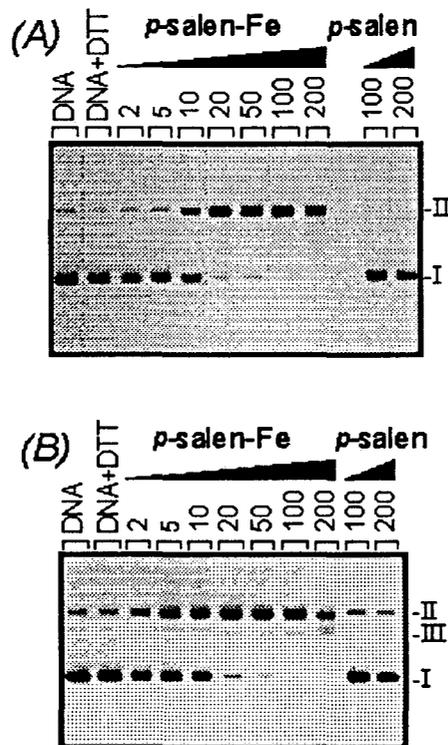


Figure 3.3 : coupure de plasmide pAT pour 6c à différentes concentrations et pour des temps d'incubation de 3 heures (A) ou 8 heures (B)

Le fragment de restriction est ensuite traité avec le complexe 6c en présence de 200 µM de DTT dans un volume de 20 µl pendant 30 minutes à température ambiante puis précipité en rajoutant de l'éthanol froid. Le résidu est ensuite resuspendu dans 5 µl de bleu dénaturant contenant 80 % de formamide puis chauffés à 90 °C pendant quatre minutes et immédiatement plongés dans de la glace pendant 4 heures. Les échantillons sont alors déposés sur un gel de polyacrylamide (8% de polyacrylamide, 7 M d'urée) puis les gels sont autoradiographiés.

Le gel de la figure 3.4 montre sans ambiguïté que la coupure est non spécifique : on observe pratiquement une « échelle » uniforme de bandes.

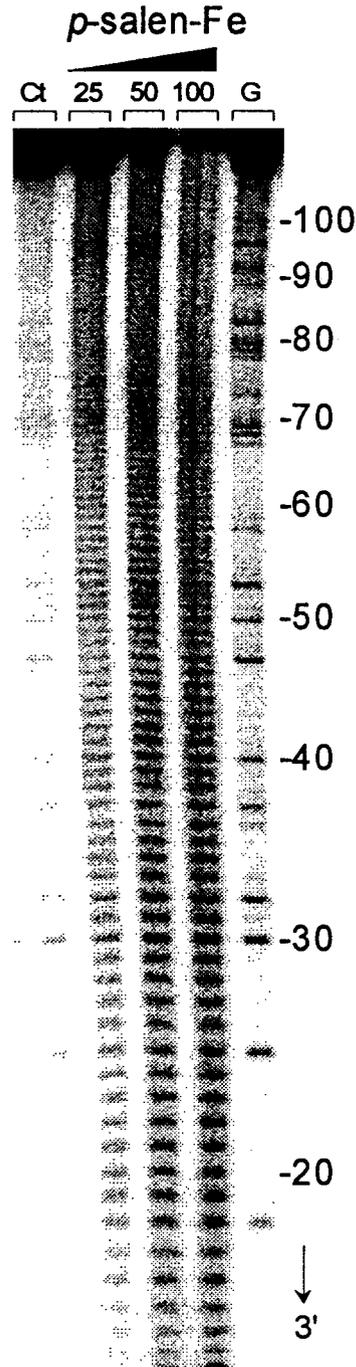


Figure 3.4 : coupure du fragment de restriction 117 pb par 6c à différentes concentrations (25, 50 et 100 μ M). La ligne Ct contient seulement de l'ADN et la ligne G représente le séquençage des guanines par le diméthylsulfate.

Un tel profil de coupure est observé pour les nucléases Fe(EDTA) et Fe(MPE) qui sont connus pour être de bons agents de footprinting. Nous avons ainsi étudié le complexe 6c

comme agent de footprinting (figure 3.5) en présence de bis benzimidazole Hoechst 33258 (agent du petit sillon qui se lie préférentiellement sur les séquences doubles brins riches en paires de bases AT) et le bisantrène, un dérivé de l'antracène (intercalant qui présente peu de spécificité de liaison).

On ajoute, au fragment de restriction 160 pb, 10 μ l de Hoechst 33258 ou de bisantrène à la concentration désirée. Le complexe ADN/ligand est gardé 30 minutes à 37°C. On ajoute alors successivement 2 μ l de 6c (100 μ M) et 2 μ l de DTT (1 mM) pour initier la coupure. Après incubation de 30 minutes à 37 °C, la réaction est arrêtée en ajoutant de l'éthanol froid pour faire précipiter les produits de coupure. Après centrifugation et deux lavages à l'éthanol 70%, les acides nucléiques sont resuspendus dans 5 μ l de bleu dénaturant contenant 80 % de formamide puis chauffés à 90 °C pendant quatre minutes et immédiatement plongés dans de la glace pendant 4 heures. Les échantillons sont alors déposés sur un gel de polyacrylamide (8% de polyacrylamide, 7 M d'urée) puis ces gels sont finalement autoradiographiés.

Dans le contrôle (qui ne contient aucun ligand d'acides nucléiques), la coupure est totalement uniforme.

En présence de l'agent du petit sillon, on observe deux baisses d'intensité de coupure autour des nucléotides 30 et 48 qui se révèlent être des séquences riches en paires de bases AT.

En présence de l'agent intercalant, l'intensité de coupure est diminuée mais aucune spécificité de liaison n'est détectée.

Nous pouvons donc conclure que le complexe 6c en présence d'un agent réducteur comme le DTT peut être utilisé comme agent de footprinting.

Nous avons vu que le complexe 6c donnent des profils de coupure identiques à ceux de la nucléase Fe(EDTA). Les études physico-chimiques qui suivent vont vérifier si le mécanisme d'action de 6c peut s'expliquer par celui de la nucléase Fe(EDTA) à savoir une production de radicaux hydroxyle en milieu réducteur.

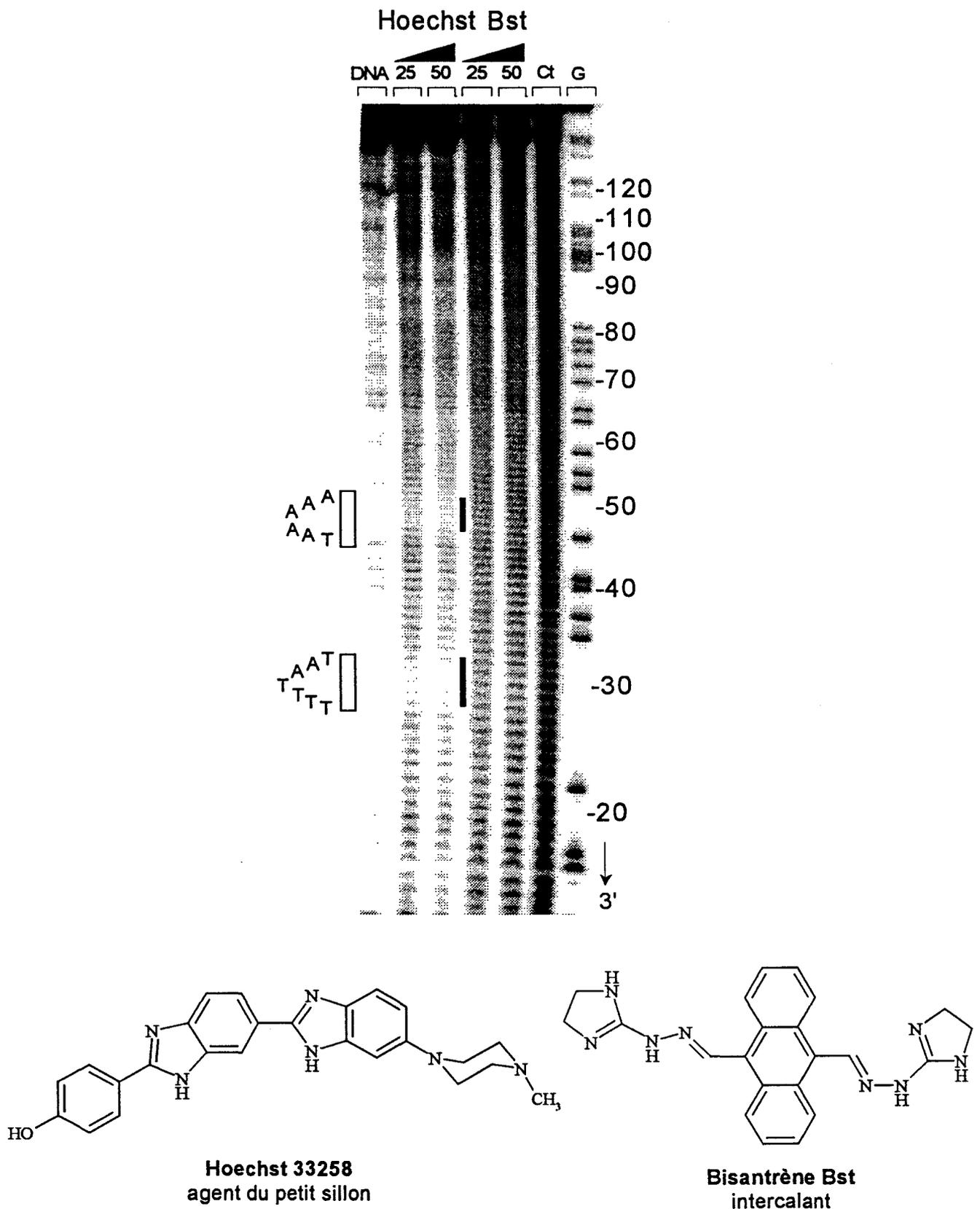


Figure 3.5 : footprinting de Hoechst 33258 et de bisantrene (bst) avec 6c sur un fragment de restriction 160 pb. La ligne Ct montre la coupure en absence de ligands et la ligne DNA contient seulement de l'ADN.

Chapitre 5 :
SALENES POLYHYDROXYLES
ET ETUDE PAR
RESONANCE PARAMAGNETIQUE
ELECTRONIQUE

1. PRINCIPE DE LA RPE

La spectroscopie RPE permet d'étudier les transitions d'énergie (fréquences de l'onde lumineuse absorbée dans le domaine des micro-ondes) entre les niveaux de spin électronique d'espèces paramagnétiques levés par un champ magnétique.

Dans un atome ou un ion où tous les électrons sont appariés, le nombre quantique de spin total est nul et il n'existe aucun moment magnétique permanent d'origine électronique. Lorsqu'il existe au contraire un ou plusieurs électrons non appariés donc un nombre quantique de spin total non nul, l'espèce, dite paramagnétique, possède un moment magnétique résultant permanent.

On distingue trois sortes d'espèces paramagnétiques :

- les composés dans l'état triplet, comme l'oxygène.
- les radicaux libres, qui sont le plus souvent des composés hautement réactifs et de faible durée de vie. Certains d'entre eux, comme les radicaux nitroxyde utilisés dans la technique de « spin trapping » sont cependant stables.
- Certains ions de transition qui possèdent une grande variété de propriétés spectroscopiques selon le nombre d'électrons non appariés qu'ils possèdent ($S = 1/2$ à $5/2$).

Nous allons maintenant voir que l'étude RPE du tenseur g et du tenseur de couplage hyperfin A d'un complexe d'ion de transition donnent des informations sur la symétrie du complexe et sur le degré de covalence de la liaison ligand-métal. En effet, facteur g et constantes de couplage hyperfin A sont, d'une part, caractéristiques d'un ion dans un environnement précis et révèlent, d'autre part, l'état fondamental de l'ion paramagnétique dans cet environnement.

1.1. L'Hamiltonien

Il existe une abondante littérature sur la théorie de la RPE¹⁹⁷⁻¹⁹⁹. Nous ne rappellerons ici que certains points qui nous paraissent indispensables pour la compréhension et l'interprétation des spectres RPE obtenus dans ce travail.

L'énergie d'interaction d'un complexe paramagnétique dans un champ magnétostatique H_0 est donnée par l'Hamiltonien H du système. Cet opérateur agit sur les spin-orbitales et a pour valeurs propres les énergies des différents niveaux du complexe. Il s'écrit :

$$H = H_{el} + H_V + H_{LS} + H_{Zlec} + H_{IS} + H_{I'S} + H_Q + H_{Znucl}$$

Où

H_{el} est l'énergie électronique du système

H_V est l'énergie du champ cristallin qui dépend de la symétrie du champ électrique créé par les ligands (théorie du champ cristallin)

H_{LS} est l'énergie d'interaction spin-orbite électronique

H_{Zlec} est l'énergie d'interaction électronique avec le champ magnétostatique

H_{IS} est l'énergie d'interaction spin nucléaire-spin électronique qui conduit à un éclatement des niveaux de spin électronique en l'absence de champ magnétique

$H_{I'S}$ est l'énergie d'interaction entre le spin électronique du métal-spin nucléaire des ligands

H_Q est l'énergie d'interaction moment quadripolaire électrique du noyau-gradient du champ électrique, qui n'existe que pour les noyaux de spin supérieur ou égal à 1

H_{Znucl} est l'énergie d'interaction nucléaire avec le champ magnétostatique

Les différents termes de l'hamiltonien sont répertoriés dans le tableau 1.1.

Les tenseurs d'interaction présents dans l'Hamiltonien sont des facteurs qui varient selon les directions respectives des moments magnétiques. Ils traduisent ainsi l'anisotropie des interactions fines, hyperfines et superhyperfines.

Termes de l'hamiltonien L : moment cinétique orbitalaire S : moment cinétique de spin électronique I : moment cinétique de spin nucléaire	Ecart entre niveaux voisins	tenseur
H_{el}	10^5 cm^{-1}	-
$H_V = \sum e_i V_i$ (somme sur les centres coordinateurs i qui créent le potentiel V_i)	10^4 cm^{-1}	-
$H_{Zelec} + H_{LS} = \beta \cdot (\mathbf{L} + g_e \cdot \mathbf{S}) \cdot \mathbf{H}_0 + \lambda \mathbf{L} \cdot \mathbf{S}$ $\approx \beta \cdot \mathbf{H}_0 \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S} + \mathbf{S} \cdot \mathbf{D} \cdot \mathbf{S}$ $\approx \beta \cdot g_{//} \cdot H_z \cdot S_z + g_{\perp} \cdot (H_x \cdot S_x + H_y \cdot S_y) +$ $D [S_z^2 - 1/3 \cdot S(S+1)] + E (S_x^2 - S_y^2)$ β : magnéton de Bohr λ : constante de couplage spin-orbite g_e : facteur de Landé électronique	$10^2 - 10^3 \text{ cm}^{-1}$	\mathbf{g} : tenseur de couplage spin-orbite \mathbf{D} : tenseur de couplage à champ nul responsable de la structure fine des spectres avec D : composante axiale et E : composante rhombique
$H_{IS} = \mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I}$	10^{-2} cm^{-1}	\mathbf{A} : tenseur de couplage hyperfin responsable de la structure hyperfine des spectres
$H_{IS} = \sum \mathbf{S} \cdot \mathbf{A}' \cdot \mathbf{I}'_i$ (somme sur les ligands i)	10^{-3} cm^{-1}	\mathbf{A}' : tenseur de couplage superhyperfin responsable de la structure superhyperfine des spectres
$H_Q = \mathbf{I} \cdot \mathbf{Q} \cdot \mathbf{I}$ $H_{Znucl} = - g_N \cdot \beta_N \cdot \mathbf{H}_0 \cdot \mathbf{I}$ β_N : magnéton nucléaire g_N : facteur de Landé nucléaire	10^{-4} cm^{-1} inobservable en bande X	\mathbf{Q} : tenseur de couplage quadripolaire

 Tableau 1.1 : expression des termes de l'Hamiltonien en RPE¹⁹⁸

1.2. La structure fine des spectres RPE

Les électrons célibataires possèdent généralement un moment cinétique orbitalaire L du à leur mouvement dans l'espace et un moment cinétique de spin S du à leur rotation sur eux-mêmes. Le tenseur \mathbf{g} traduit l'intensité de couplage entre ces moments cinétiques (tableau 1.2). Cette interaction, appelée couplage spin-orbite, dépend de l'environnement électronique.

Un électron libre possède un moment magnétique d'origine purement spinal (g_e). Lorsque les électrons d'un ion de transition libre ne sont pas dans un état S, ils possèdent un moment cinétique orbital L et le moment cinétique total d'un ion libre est $J = L + S$ (g_J). Placé dans un champ électrique cristallin (ion complexé), les moments cinétiques L et S sont partiellement découplés ($g = (g_{uu})_{u=x,y,z}$).

<i>Espèce</i>	<i>Moment magnétique μ et Energie Zeeman E</i>	<i>Facteur de Landé</i>
Electron libre	$\mu = -g_e \beta \cdot S$ $E = g_e \beta \cdot S \cdot H_0$	g isotrope $g_e = 2,0023$
Ion de transition libre	$\mu = -g_J \beta \cdot (L + S)$ $E = g_J \beta \cdot (L + S) \cdot H_0$	g isotrope $g_J = 1 + \frac{J(J+1) - L(L+1) + S(S+1)}{2J(J+1)}$
Ion de transition complexé	$\mu = -\beta \cdot (L + g_e \cdot S)$ $E = \beta \cdot (L + g_e \cdot S) \cdot H_0 + \lambda \cdot L \cdot S$ Ou $E = \beta \cdot H_0 \cdot g \cdot S + S \cdot D \cdot S$	$g = (g_{uu})_{u=x,y,z}$ où $g_{uu} = g_e - 2\lambda \sum \frac{\langle 0 L_u n \rangle \langle n L_u 0 \rangle}{E_n - E_0}$

Tableau 1.2 : expression des facteurs g

La plupart des ions de transition ont plus d'un électron non apparié dans leur état fondamental et ont donc un spin total supérieur à $1/2$ ce qui rend généralement l'interprétation de leur spectre RPE plus délicate (tableau 1.3).

Des espèces paramagnétiques ayant des valeurs différentes de g résonneront à des champs différents.

En phase liquide, le tenseur g est moyenné (mouvements rapides en solution) à : $g_0 = 1/3 \cdot \text{tr } g$ (tr-étant la trace du tenseur).

A l'état monocristallin, la position des raies de résonance est donnée, dans le cas d'une symétrie axiale, par :

$$g = (g_{//} \cos^2 \theta + g_{\perp} \sin^2 \theta)^{1/2}$$

où $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$

$$g_{//} = g_{zz}$$

θ = angle entre H_0 et l'axe de symétrie du tenseur

configuration	S haut spin	S bas spin	exemples	Observation à 77 K en bande X
d ¹	S = 1/2	S = 1/2	Ti ³⁺ , VO ²⁺	Oui
d ²	S = 1	S = 1	V ³⁺	Non
d ³	S = 3/2	S = 3/2	V ²⁺ , Cr ³⁺	Oui
d ⁴	S = 2	S = 1	Mn ³⁺ , Cr ²⁺	Non
d ⁵	S = 5/2	S = 1/2	Mn ²⁺ , Fe ³⁺	Oui
d ⁶	S = 2	S = 0	Co ³⁺ , Fe ²⁺	Non
d ⁷	S = 3/2	S = 1/2	Co ²⁺ , Ni ³⁺	Oui
d ⁸	S = 1	S = 1	Ni ²⁺ , Cu ³⁺	Non
d ⁹	S = 1/2	S = 1/2	Cu ²⁺	Oui
d ¹⁰	S = 0	S = 0	Cu ⁺ , Zn ²⁺	Non

 Tableau 1.3 : signal RPE suivant le spin des différents ions de transition¹⁹⁸

Dans un champ cristallin octaédrique ou tétraédrique, les états fondamentaux ⁿD et ⁿF des ions de transition libres sont éclatés en deux niveaux (1 doublet E et un triplet T) pour un état ⁿD et trois niveaux (un singulet A et deux triplets T) pour un état ⁿF (tableau 1.4). Le facteur g, isotrope dans une géométrie octaédrique est donné par la formule suivante dans le cas d'un état fondamental A₂ ou E :

$$g_{iso} = g_e \left(1 - k \frac{\lambda}{\Delta}\right)$$

- k = 2 pour E et k = 4 pour A₂
- Δ est la différence d'énergie entre l'état fondamental et le premier état excité
- λ est la constante de couplage spin-orbite de l'ensemble des électrons soit $\lambda = \pm \epsilon / 2S$ où S est le nombre de spin total

Une perte de symétrie (une distorsion tétragonale par exemple ou toute symétrie inférieure à la symétrie octaédrique) lève la dégénérescence des états doublets E et triplets T. Le facteur g n'est alors plus isotrope (tableau 1.5) et prend des valeurs différentes suivant l'orientation dans l'espace (grandeur tensorielle).

Configuration ϵ : constante de couplage spin-orbite d'un électron	Etat fondamental Symétrie sphérique	Etat fondamental symétrie octaédrique		Etat fondamental Symétrie tétraédrique
		<i>Bas champ</i>	<i>Fort champ</i>	<i>Bas champ</i>
d^1 Ti^{3+} ($\epsilon = 155 \text{ cm}^{-1}$)	2D	$^2T_{2g}$	$^2T_{2g}$	2E
d^2 V^{3+} ($\epsilon = 210 \text{ cm}^{-1}$)	3F	$^3T_{1g}$	$^3T_{1g}$	3A_2
d^3 V^{2+} ($\epsilon = 170 \text{ cm}^{-1}$) Cr^{3+} ($\epsilon = 275 \text{ cm}^{-1}$)	4F	$^4A_{2g}$	$^4A_{2g}$	4T_1
d^4 Cr^{2+} ($\epsilon = 230 \text{ cm}^{-1}$) Mn^{3+} ($\epsilon = 355 \text{ cm}^{-1}$)	5D	5E_g	$^3T_{1g}$	5T_2
d^5 Mn^{2+} ($\epsilon = 300 \text{ cm}^{-1}$) Fe^{3+} ($\epsilon = 460 \text{ cm}^{-1}$)	6S	$^6A_{1g}$	$^2T_{2g}$	6A_1
d^6 Fe^{2+} ($\epsilon = 400 \text{ cm}^{-1}$) Co^{3+} ($\epsilon = 580 \text{ cm}^{-1}$)	5D	$^5T_{2g}$	$^1A_{1g}$	5E
d^7 Co^{2+} ($\epsilon = 515 \text{ cm}^{-1}$)	4F	$^4T_{1g}$	2E_g	4A_2
d^8 Ni^{2+} ($\epsilon = 630 \text{ cm}^{-1}$)	3F	$^3A_{2g}$	$^3A_{2g}$	3T_1
d^9 Cu^{2+} ($\epsilon = 830 \text{ cm}^{-1}$)	2D	2E_g	2E_g	2T_2

 Tableau 1.4 : états fondamentaux pour une géométrie octaédrique/tétraédrique du complexe¹⁹⁹

Configuration électronique fondamental	Elongation tétragonale	Compression tétragonale
$3d^1$ (symétrie tétraédrique)	$g_{//} = g_e$ $g_{\perp} = g_e - 6.\lambda/\Delta$ $g_e = g_{//} > g_{\perp}$	$g_{//} = g_e - 8.\lambda/\Delta$ $g_{\perp} = g_e - 2.\lambda/\Delta$ $g_e > g_{\perp} > g_{//}$
$3d^2$ (symétrie tétraédrique)		$g_{//} = g_e - 8.\lambda/\Delta_{//}$ $g_{\perp} = g_e - 8.\lambda/\Delta_{\perp}$ $g_{\perp} \approx g_{//} < g_e$
$3d^3$ (symétrie octaédrique)		$g_{//} = g_e - 8.\lambda/\Delta_{//}$ $g_{\perp} = g_e - 8.\lambda/\Delta_{\perp}$ $g_{\perp} \approx g_{//} < g_e$
$3d^4$ haut spin (symétrie octaédrique)	$g_{//} = g_e$ $g_{\perp} = g_e - 6.\lambda/\Delta$ $g_e = g_{//} > g_{\perp}$	$g_{//} = g_e - 8.\lambda/\Delta$ $g_{\perp} = g_e - 2.\lambda/\Delta$ $g_e > g_{\perp} > g_{//}$
$3d^5$ haut spin (symétrie octaédrique)		$g_{\perp} \approx g_{//} = g_e$
$3d^6$ bas spin		Pas de signal RPE
$3d^7$ bas spin (symétrie octaédrique)	$g_{//} = g_e$ $g_{\perp} = g_e - 6.\lambda/\Delta$ $g_e = g_{//} < g_{\perp}$	$g_{//} = g_e - 8.\lambda/\Delta$ $g_{\perp} = g_e - 2.\lambda/\Delta$ $g_e < g_{\perp} < g_{//}$
$3d^8$ (symétrie octaédrique)		$g_{//} = g_e - 8.\lambda/\Delta_{//}$ $g_{\perp} = g_e - 8.\lambda/\Delta_{\perp}$ $g_{\perp} \approx g_{//} > g_e$
$3d^9$ (symétrie octaédrique)	$g_{//} = g_e$ $g_{\perp} = g_e - 6.\lambda/\Delta$ $g_e = g_{//} < g_{\perp}$	$g_{//} = g_e - 8.\lambda/\Delta$ $g_{\perp} = g_e - 2.\lambda/\Delta$ $g_e < g_{\perp} < g_{//}$

 Tableau 1.5 : facteur g pour une géométrie avec élongation tétragonale du complexe¹⁹⁹

Considérons le cas plus délicat d'un spin $S > 1/2$.

L'application d'un champ magnétique découple les états de spin en $2S+1$ niveaux. Les transitions permises entre niveaux adjacents ($\Delta M_S = \pm 1$) ont lieu à la même fréquence pour un champ cristallin de symétrie octaédrique ou tétraédrique.

Cependant, un fort champ cristallin de symétrie inférieure à la symétrie octaédrique ou tétraédrique lève la dégénérescence des états de spin en l'absence de champ magnétique (zero field splitting ou ZFS). Les transitions permises ($\Delta M_S = \pm 1$) ont lieu à des fréquences différentes : l'intensité et la position de ces transitions sont indépendantes les unes des autres mais dépendantes de l'orientation du complexe dans le champ magnétique.

Les ions de transition avec un nombre pair d'électrons non appariés présentent un spectre RPE suivant la magnitude du ZFS. Si la différence d'énergie entre les différents niveaux de spin en champ nul est supérieure à l'énergie apportée par la radiation lumineuse ($ZFS > 0,3 \text{ cm}^{-1}$ en bande X), on n'observe pas de signal en RPE même si l'espèce est paramagnétique !

En résumé, l'état fondamental décrivant un complexe est constitué pour une large part de la configuration électronique fondamentale mais aussi dans une très faible mesure des configurations électroniques excitées issues du même terme spectroscopique de l'ion libre. Ce mélange existe en raison du couplage spin-orbite c'est à dire le couplage entre le moment cinétique de spin et le moment cinétique orbital.

Ceci a deux conséquences :

- Les facteurs g s'écartent de la valeur g_e pour l'électron libre.
 $g > g_e$ pour les couches plus qu'à demi-remplies
 $g < g_e$ pour les couches moins qu'à moitié remplies.
- Selon la nature de l'orbitale semi-occupée dans la configuration électronique fondamentale, on a $g_{\parallel} > g_{\perp}$ ou l'inverse.

Il ne faut pas oublier que le caractère covalent de l'interaction du centre métallique avec le ou les ligands modifie aussi le tenseur g (les valeurs de g précédentes sont des valeurs déterminées par la théorie du champ cristallin qui ne tient pas compte du caractère covalent de la liaison métal-ligand).

1.3. La structure hyperfine des spectres RPE

Quand un ou des électrons sont au voisinage d'un noyau de spin nucléaire non nul (tableau 1.6), il y a interaction entre les moments magnétiques de spin des électrons et du noyau. On observe un couplage hyperfin qui se traduit par une multiplication des raies du signal RPE ($2I+1$ raies de même intensité).

Eléments de transition	Noyaux de spins non nuls
Sc	^{45}Sc ($I = 7/2$, 100%)
Ti	^{47}Ti ($I = 5/2$, 7%), ^{49}Ti ($I = 7/2$, 5%)
V	^{50}V ($I = 6$, 0,2%), ^{51}V ($I = 7/2$, 99,8%)
Cr	^{53}Cr ($I = 3/2$, 9%)
Mn	^{55}Mn ($I = 5/2$, 100%)
Fe	^{57}Fe ($I = 1/2$, 2%)
Co	^{59}Co ($I = 7/2$, 100%)
Ni	^{61}Ni ($I = 3/2$, 1,2%)
Cu	^{63}Cu ($I = 3/2$, 69%), ^{65}Cu ($I = 3/2$, 31%)
Zn	^{67}Zn ($I = 5/2$, 4%)

Tableau 1.6 : spins nucléaires non nuls des noyaux des ions de transition 3d.
En gras, les structures hyperfines observables

Si l'on s'intéresse sur l'origine des interactions hyperfines, deux phénomènes sont importants :

- d'une part le terme de contact de Fermi k responsable de la partie isotrope du tenseur
- d'autre part une interaction dipôle nucléaire-dipôle électronique responsable de la composante anisotrope du couplage hyperfin. Or le dipôle électronique n'est pas ponctuel mais présente une certaine délocalisation dans l'espace, imposée par la nature de l'orbitale accueillant l'électron célibataire. La structure électronique, directement reliée à la géométrie du composé étudié est donc à l'origine de l'anisotropie du tenseur A .

1.4. La structure superhyperfine des spectres RPE

Une interaction dite superhyperfine impliquant les atomes coordonnés peut parfois être observée. En effet, la densité de spin n'est généralement pas strictement localisée sur l'ion métallique mais peut se délocaliser sur la première sphère de coordination (et éventuellement plus loin). Or si l'atome coordonné possède un spin nucléaire non nul (comme ^{14}N où $I = 1$), un couplage avec cet atome peut être observé.

Comme l'intensité de couplage est nettement plus faible avec les atomes coordonnés qu'avec le noyau métallique (densité de spin plus faible sur les atomes coordonnés que sur l'ion métallique), le couplage superhyperfine est rarement résolu sur les spectres.

1.5. Observation d'un signal RPE

Dans la pratique, pour réaliser les conditions de résonance, on fixe la fréquence fournie par une source micro-ondes aux alentours de 9,4 GHz (bande X) et on fait varier le champ externe H_0 . On enregistre la première dérivée de la courbe d'absorption afin d'obtenir une plus grande sensibilité et une meilleure définition.

L'absorption et l'émission induite ayant des probabilités égales, les populations de chaque niveau ont tendance à devenir équivalente. Toutefois, une surpopulation d'environ 10^{-3} du niveau inférieur est maintenue par les phénomènes de relaxation. On peuple le niveau inférieur c'est-à-dire on augmente l'intensité du signal RPE soit en abaissant la température, soit en augmentant H_0 .

Les conditions d'observation des espèces paramagnétiques sont hautement restrictives. En fait, il est exceptionnel d'observer un signal RPE sur un échantillon pur en poudre ou en solution à température ambiante. Dans de nombreux cas, il est nécessaire de diluer l'échantillon paramagnétique en l'incorporant dans une matrice diamagnétique isomorphe (la dilution permet de réduire les interactions d'échange avec les ions paramagnétiques voisins) et de l'étudier à basse température 77 K ou parfois 4 K (la baisse de température augmente le temps de relaxation spin-réseau).

La plupart des ions de transition ne sont observables par RPE qu'en phase solide et à basse température où le temps de relaxation électronique transversal est au moins de l'ordre de 10^{-10} s pour donner un signal observable. Ce temps de relaxation est d'autant plus court que le couplage spin-orbite et que l'interaction entre les spins électroniques sont plus grands. C'est pourquoi les ions Mn^{2+} , VO^{2+} , Cu^{2+} , et Ti^{3+} , dont les temps de relaxation électroniques se situent entre 10^{-10} et 10^{-8} s à température ordinaire sont facilement observables par RPE en solution à température ambiante.

2. LES SALENES POLYHYDROXYLES A CUIVRE

2.1. Spectres RPE suivant le degré d'oxydation du cuivre

Comme nous l'avons vu précédemment, la spectroscopie RPE permet d'établir la structure électronique et la géométrie de la sphère de coordination d'un centre métallique paramagnétique.

Le cuivre de degré d'oxydation I ou Cu^{I} possède une configuration électronique $3d^{10}$ et donc ne possède pas d'électron non appariés. Il ne donnera donc aucun signal en RPE.

Le cuivre de degré d'oxydation II ou Cu^{II} est parfaitement détectable par spectroscopie RPE²⁰⁰⁻²⁰² puisqu'il possède un unique électron non apparié (configuration électronique $3d^9$).

Les complexes cuivriques présentent généralement une géométrie tétragonale, en raison de l'effet Jahn-Teller, avec quatre ligands équatoriaux fortement liés et un, deux ou aucun ligands axiaux faiblement liés.

Un complexe de symétrie octaédrique donnera donc un signal à $g > g_e$ de quatre raies de même intensité en raison d'un couplage hyperfin avec le noyau cuivrique ($I = 3/2$).

Un complexe de symétrie axiale donnera deux signaux de quatre raies (figure 2.1), plus ou moins résolues suivant l'intensité de couplage, correspondant à $g_{//}$ et g_{\perp} (tableau 2.1).

Etat fondamental x^2-y^2	Etat fondamental $3z^2-r^2$
$g_{//} = g_e - 8 \frac{\lambda}{\Delta_1}$ $g_{\perp} = g_e - 2 \frac{\lambda}{\Delta_2}$ $A_{//} = P. \left[-k - \frac{4}{7} + \frac{3}{7}(g_{\perp} - g_e) + (g_{//} - g_e) \right]$ $A_{\perp} = P. \left[-k + \frac{2}{7} + \frac{11}{14}(g_{\perp} - g_e) \right]$	$g_{//} = g_e$ $g_{\perp} = g_e - 6 \frac{\lambda}{\Delta_2}$ $A_{//} = P. \left[-k + \frac{4}{3} - \frac{1}{7}(g_{\perp} - g_e) \right]$ $A_{\perp} = P. \left[-k - \frac{2}{7} + \frac{15}{14}(g_{\perp} - g_e) \right]$
$g_{//} > g_{\perp} > g_e$ $(g_{//} - g_e) \approx 4.(g_{\perp} - g_e)$ $ A_{//} \gg A_{\perp} $ $A_{//} \text{ compris entre } -150 \text{ et } -250.10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ $A_{\perp} \text{ de l'ordre de } -35.10^{-4} \text{ cm}^{-1}$	$g_{\perp} > g_{//} = g_e$

Tableau 2.1 : caractéristiques spectroscopiques de Cu^{II} dans le cas d'une symétrie tétragonale²⁰²

Le temps de relaxation est suffisamment long à température ambiante pour permettre l'observation d'un signal en solution (isotrope en raison de l'agitation moléculaire). Cependant, l'observation du signal en solution gelée à 77 K permet de supprimer l'agitation moléculaire et donc l'observation de l'anisotropie du spectre.

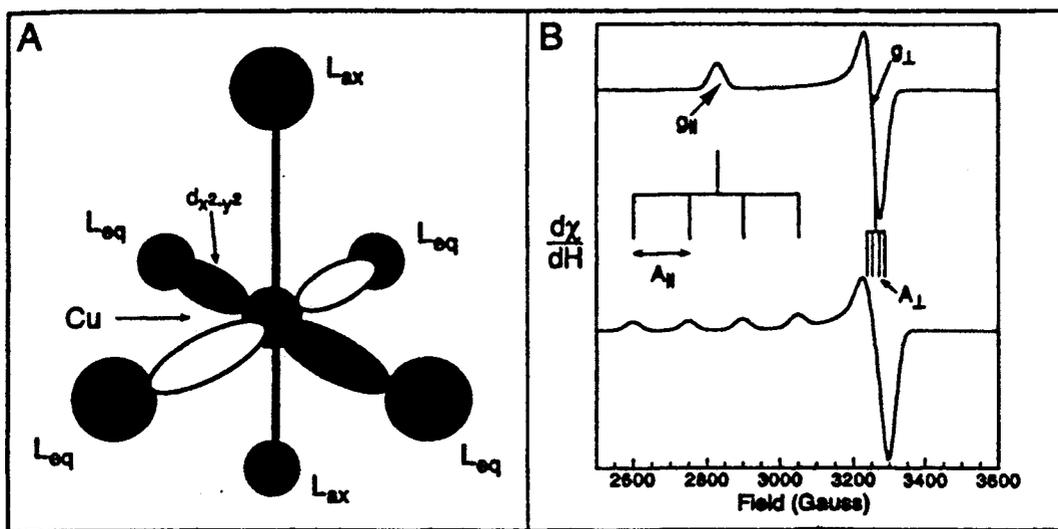
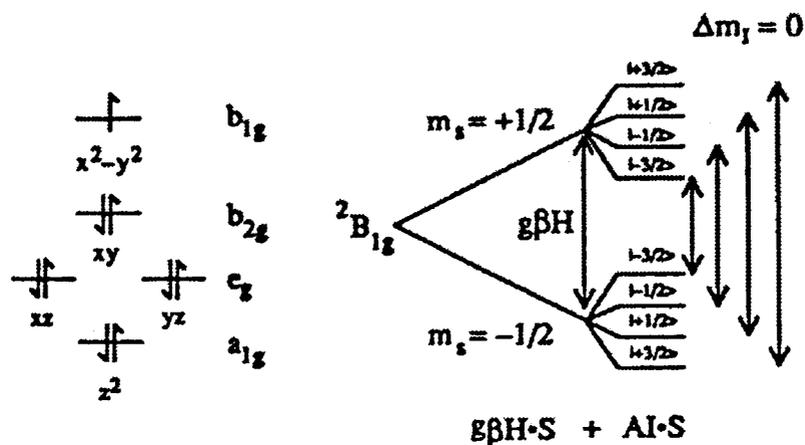


Figure 2.1 : RPE du cuivre II²⁰¹

Le cuivre de degré d'oxydation III ou Cu^{III} possède une configuration électronique fondamentale de 3d⁸. Les paramètres en champ nul sont très grands ce qui empêche toute observation de signal en bande X puisque le niveau fondamental M_S = 0 ne possède pas de dégénérescence de spin.

2.2. Spectres RPE des salènes polyhydroxylés

Pour réaliser ces spectres RPE, nous avons utilisé des solutions des différents complexes dans le DMSO à la même concentration de 2 mM.

Les spectres ont été enregistrés en solution gelée à 77 K et à température ambiante sur un appareil VARIAN E 109, fonctionnant en bande X (~ 9,5 GHz) opérant dans le mode TM et sur un Bruker ESC 106.

Les valeurs de g ont été calculées en utilisant une référence externe (strong pitch)

$$g_{\text{réf}} = 2,0028 \text{ et grâce à la relation } g = g_{\text{réf}} \frac{H_{\text{réf}}}{H}$$

$$\text{Pour le calcul de } g, \text{ on a utilisé la relation } g = \frac{h\nu}{\beta H} = 714,477 \frac{\nu(\text{GHz})}{H(\text{G})}$$

2.2.1. Configuration électronique fondamentale et géométrie des complexes

La figure 2.2 montre les spectres RPE des complexes 3a, 3b et 3c en solution gelée à 77 K (solutions plongées dans l'azote liquide). On observe deux systèmes de raies.

Le premier, à bas champ, est de faible intensité. Il correspond à g_{\parallel} et est constitué de trois raies équidistantes révélant une forte interaction hyperfine de l'électron célibataire avec le noyau de cuivre suivant l'axe de symétrie (qui est aussi la direction du champ magnétique). La quatrième raie d'interaction hyperfine associée à g_{\parallel} est masquée par l'ensemble correspondant à g_{\perp} .

Le deuxième ensemble se situe à plus haut champ et est de plus forte intensité. Il est associé à g_{\perp} et comprend, outre la quatrième raie associée à g_{\parallel} , l'ensemble élargi et non subdivisé associé à g_{\perp} . L'interaction hyperfine dans le plan du complexe est bien plus faible que celle suivant l'axe de symétrie.

Les différentes valeurs de g_{\parallel} et de g_{\perp} relatives aux quatre complexes cuivriques de salènes polyhydroxylés sont regroupées dans le tableau 2.2.

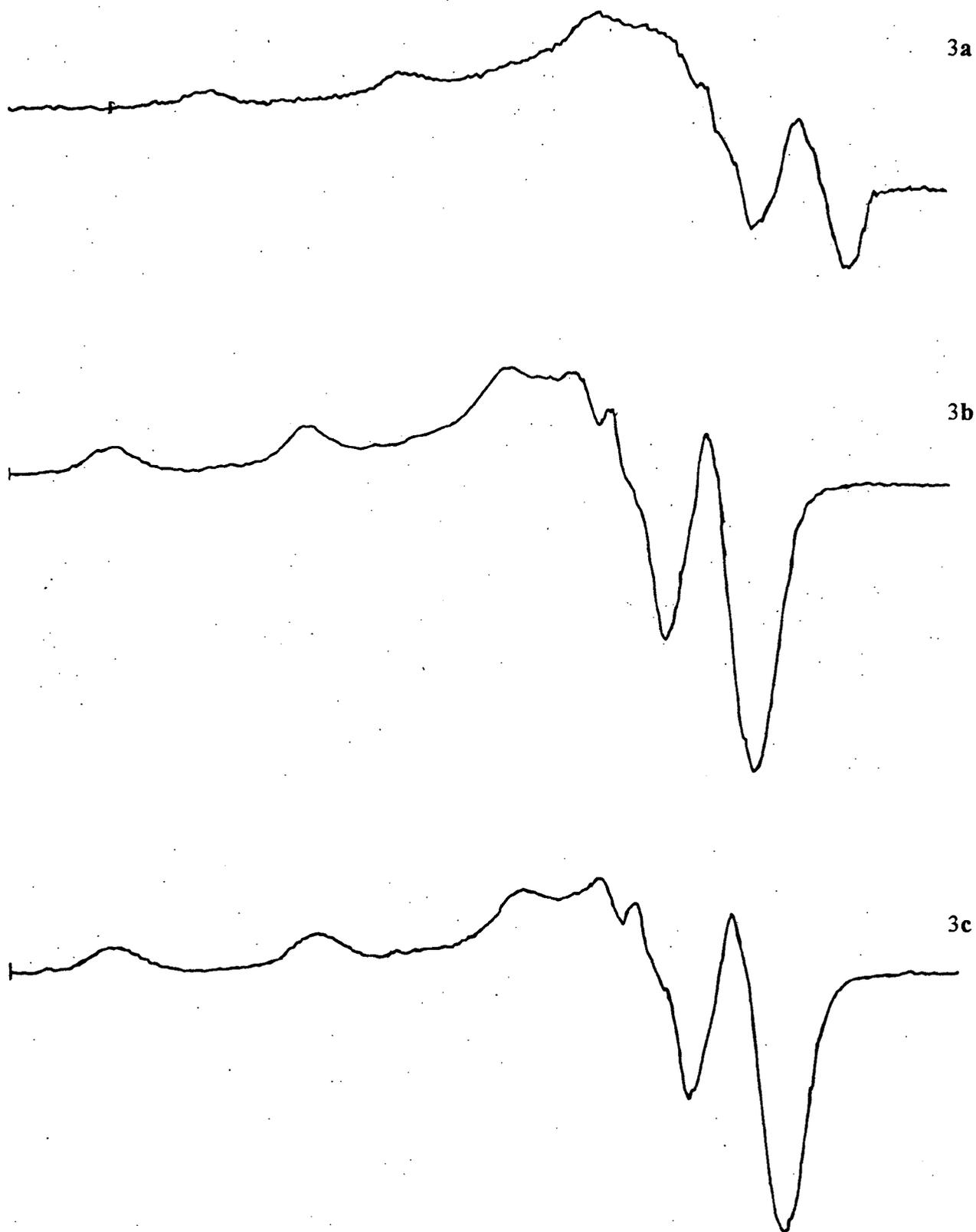


Figure 2.2 : spectres RPE de 2 mM de 3a, 3b et 3c en solution gelée dans le DMSO

Des valeurs de g_{\parallel} autour de 2,21 et de A_{\parallel} autour de $-182 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ sont compatibles avec un système 2N2O même si on se situe à la frontière du domaine donné par Peisach-Blumberg (figure 2.3).

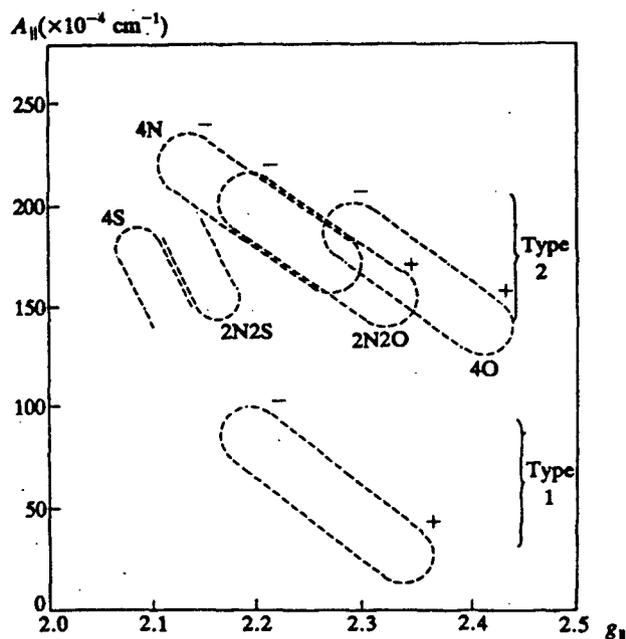


Figure 2.3 : diagramme de Peisach-Blumberg $A_{\parallel} = f(g_{\parallel})$ ²⁰²

On constate que, dans tous les cas, g_{\parallel} est supérieur à g_{\perp} . On peut donc affirmer que :

- l'électron d célibataire du cuivre occupe une orbitale $d_{x^2-y^2}$ (configuration électronique fondamentale) : les lobes de cette orbitale sont pointés en direction des quatre centres coordinateurs du ligand ce qui permet une forte interaction antiliante avec le ligand et une délocalisation de l'électrons d célibataire du métal sur les orbitales du ligand.
- les complexes cuivriques sont de symétrie tétragonale ou axiale (complexe de géométrie plan-carré, pyramidale à base carrée ou octaédrique)

La figure 2.4 donne les spectres RPE des composés 3a, 3b et 3c en solution à température ambiante. Ils montrent un ensemble de raies uniques et élargies à g_0 . Cet ensemble est le résultat des différentes orientations prises par le spin grâce à l'agitation moléculaire.

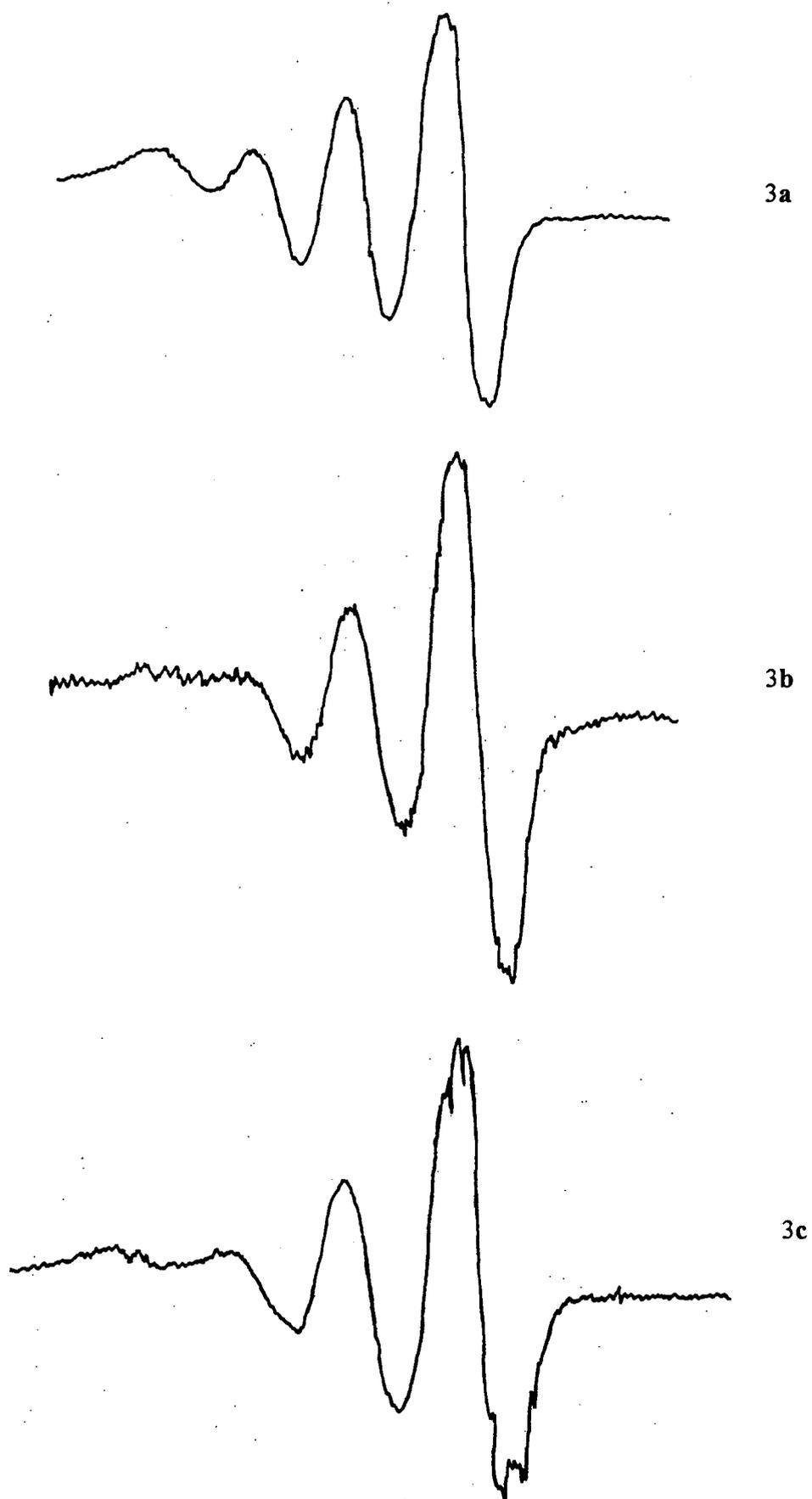


Figure 2.6 : spectres RPE de 2 mM de 3a, 3b et 3c en solution à température ambiante.

La figure 2.5 représente la dérivée seconde d'une plage de 100 G du spectre RPE du complexe 3c en solution dans le DMSO à température ambiante. On y observe un ensemble de 10 raies qui est du à l'interaction superhyperfine du centre cuivrique avec les deux azotes symétriques coordinateurs du ligand salénique. Ces dix raies se partagent en deux ensembles de 5 raies d'intensité 1 : 2 : 3 : 2 : 1 correspondant à ^{63}Cu et à ^{65}Cu .

Sur la même figure est ajouté le spectre du complexe simulé sur le Software Brüker WINSIMFONIA en utilisant comme constante de couplage superhyperfine 14,25 G. On constate une bonne corrélation avec le signal expérimental.

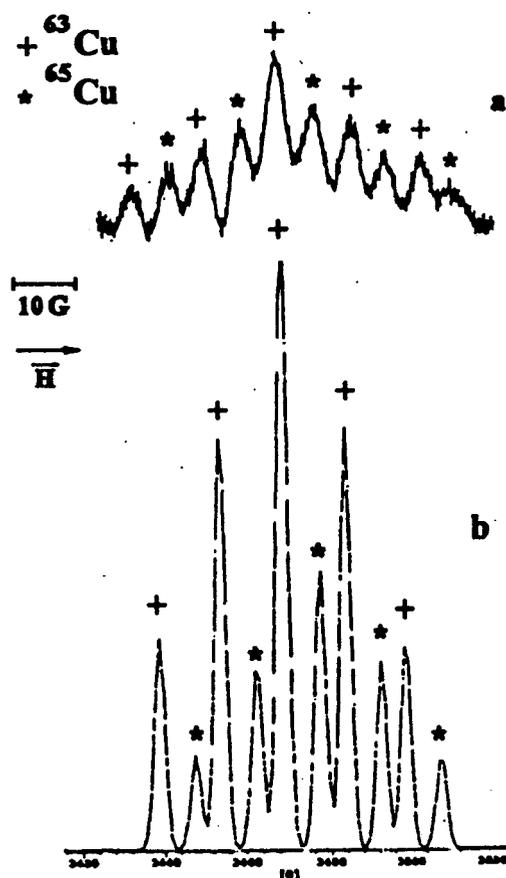


Figure 2.5 : Couplage superhyperfine du complexe 3c (spectre RPE expérimental –seconde harmonique- et simulé) de 2 mM de 3c dans le DMSO à température ambiante.

En conclusion, les paramètres spectroscopiques g et A des différents complexes ont été rassemblés dans le tableau 2.2.

Les composantes $g_{//}$ et $A_{//}$ ont été directement mesurées à partir des spectres RPE des complexes en solution gelée où elles sont parfaitement résolues.

Sur ces mêmes spectres, il est particulièrement difficile de mesurer g_{\perp} et A_{\perp} en raison du manque de résolution. Ces paramètres ont ainsi été calculés à partir des valeurs moyennes

isotropes g_0 et A_0 , mesurés sur les spectres à température ambiante. En effet, g_0 et A_0 sont reliés à $g_{//}$, g_{\perp} , $A_{//}$ et A_{\perp} suivant les relations :

$$g_0 = 1/3 \cdot \text{tr } \mathbf{g} = 1/3 \cdot (g_{//} + 2 g_{\perp})$$

$$A_0 = 1/3 \cdot \text{tr } \mathbf{A} = 1/3 \cdot (A_{//} + 2 A_{\perp})$$

complexes	Facteur g			Constante A (^{63}Cu)(10^4 cm^{-1})			$g_{//} / A_{//}$	α^2	k
	g_{iso}	$g_{//}$	g_{\perp}	A_{iso}	$A_{//}$	A_{\perp}			
3a	2,100	2,207	2,046	- 83,5	- 181,1	- 34,73	122	0,69	0,33
3b	2,098	2,207	2,043	- 85,6	- 181,0	- 37,88	122	0,68	0,33
3c	2,098	2,207	2,043	- 86,7	- 181,4	- 38,86	121	0,69	0,34
3d	2,050	2,210	1,970	- 83,0	- 178,6	- 35,20	124	0,72	0,28
<i>Avec ajout de soude</i>									
3a	2,094	2,230	2,026	- 86,5	- 185,2	- 37,20	120	0,73	0,33
3b	2,092	2,210	2,033	- 88,3	- 183,2	- 40,90	120	0,69	0,33
3c	2,095	2,220	2,033	- 88,4	- 191,7	- 36,70	116	0,74	0,34

Tableau 2.2 : constantes spectroscopiques RPE, α^2 et k des complexes 3a, 3b et 3c

2.2.2. Activation du système hydroquinonique

En présence d'une petite quantité de soude 1 M afin d'activer le système hydroquinonique ou catéchol (schéma 2.1), on observe une diminution de près de 60% du signal RPE du cuivre ainsi qu'un changement de l'allure du spectre pour les complexes 3a et 3c mais pas pour le complexe 3b.

Les complexes 3a et 3c sont capables de former des radicaux semi-quinoniques. L'interaction antiferromagnétique entre la semi-quinone paramagnétique ($S = 1/2$) et l'ion

cuivrique ($S = 1/2$) est vraisemblablement responsable de la baisse et de l'élargissement des raies du signal RPE.

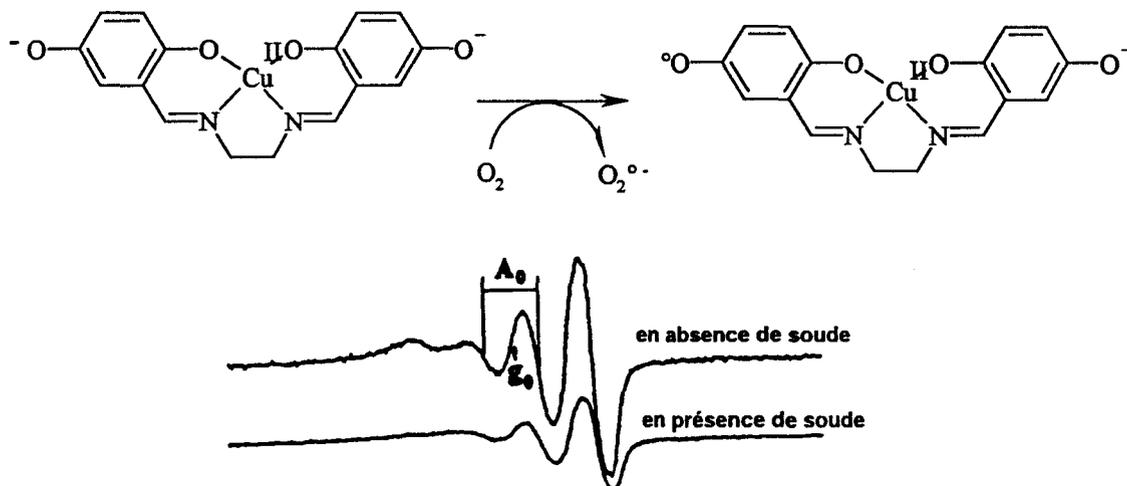


Schéma 2.1 : activation du système hydroquinonique en milieu basique (spectre RPE de 2 mM de 3c dans le DMSO à température ambiante)

2.2.3. Mesure du caractère covalent de la liaison métal-ligand

La théorie du champ de ligands mise au point par Maki et McGarvey²⁰² en 1958 prend en compte le caractère covalent de la liaison métal-ligand.

Dans cette théorie, on ajoute aux fonctions d'onde du métal $10>$ (état fondamental) et $1n>$ (états excités) des combinaisons linéaires d'orbitales du ligand $10>_L$ et $1n>_L$ adaptées à la symétrie du complexe pour former des orbitales antiliantes (tableau 2.3).

Modèle du champ cristallin	Modèle du champ de ligands
$g_{ } = g_e - 8 \frac{\lambda}{\Delta_1}$ $g_{\perp} = g_e - 2 \frac{\lambda}{\Delta_2}$ $A_{ } = P \cdot \left[-k - \frac{4}{7} + \frac{3}{7}(g_{\perp} - g_e) + (g_{ } - g_e) \right]$ $A_{\perp} = P \cdot \left[-k + \frac{2}{7} + \frac{11}{14}(g_{\perp} - g_e) \right]$ $P = 2\beta\beta_{\text{NEN}}\langle r^{-3} \rangle_{3d} = 0,025 \text{ cm}^{-1} \text{ pour Cu}^{\text{II}} \text{ libre}$	$g_{ } = g_e - 8\alpha^2\beta_1^2 \frac{\lambda}{\Delta_1}$ $g_{\perp} = g_e - 2\alpha^2\beta_1^2 \frac{\lambda}{\Delta_2}$ $A_{ } = P \cdot \left[-k - \frac{4}{7}\alpha^2 + \frac{3}{7}(g_{\perp} - g_e) + (g_{ } - g_e) \right]$ $A_{\perp} = P \cdot \left[-k + \frac{2}{7}\alpha^2 + \frac{11}{14}(g_{\perp} - g_e) \right]$ $P = 2\beta\beta_{\text{NEN}}\langle r^{-3} \rangle_{3d} = 0,025 \text{ cm}^{-1} \text{ pour Cu}^{\text{II}} \text{ libre}$
Base d'orbitales utilisée $10>$ et $1n>$	Base d'orbitales utilisée $\alpha \cdot 10> + \beta \cdot 10>_L$ et $\alpha_n \cdot 1n> + \beta_n \cdot 1n>_L$

Tableau 2.3 : complexe cuivrique de symétrie tétragonale²⁰²

On peut comparer les équations donnant $A_{//}$ et A_{\perp} suivant les deux modèles : celui du champ cristallin et celui du champ de ligands. Leur forme est similaire, la seule différence vient du fait que les termes tenant compte de la covalence de la liaison métal-ligand sont α^2 pour la structure hyperfine et $\alpha\beta_1$, $\alpha\beta_1$ pour le facteur g.

Nous pouvons ainsi utiliser les paramètres spectroscopiques du tableau 2.2 pour calculer (tableau 2.2):

- le facteur α^2 : il mesure le caractère covalent de la liaison métal-ligand ($\alpha^2 = 1$ pour une liaison purement ionique). Le caractère covalent d'une liaison métal-ligand réduit la contribution orbitale sur la structure hyperfine via α^2 : α^2 traduit donc la densité d'électron non apparié sur l'orbitale d centrée sur le cuivre.
- Le facteur k, communément appelé terme de contact de Fermi. Il tient compte de la contribution aux paramètres d'interaction hyperfine de la polarisation des électrons s de cœur (cette polarisation ayant pour origine l'électron d célibataire). k traduit donc la probabilité non nulle de trouver l'électron célibataire sur le centre métallique.

On constate que α^2 est plus faible pour les complexes cuivriques 3a, 3b et 3c que pour le complexe cuivrique de salène non hydroxylé 3d. La liaison métal-ligand a un caractère covalent plus marqué pour les complexes de salènes polyhydroxylés ceci vraisemblablement en raison des groupements donneurs hydroxyle.

Il est important de noter que, lorsqu'on active le système hydroquinonique ou catéchol en ajoutant un peu de soude au milieu, on observe une augmentation importante de α^2 pour les complexes 3a et 3c mais pas pour 3b. Cette augmentation de α^2 suggère une augmentation du caractère ionique de la liaison cuivre-ligand peut-être due à la formation d'un radical anion semi-quinonique : dans le cas du complexe 3b, cette formation de radical anion semi-quinonique est impossible et on observe aucun changement de α^2 .

Que ce soit en milieu basique ou neutre, le facteur k des complexes cuivriques de salènes polyhydroxylés est plus élevé que celui du complexe cuivrique de salène non hydroxylé. Le faible terme de contact de Fermi du complexe $3d$ traduit une distorsion tétraédrique de la symétrie autour du centre cuivrique ce qui explique la diminution de la valeur de la constante de couplage hyperfin.

2.2.4. Conclusion

Cette étude RPE des complexes saléniques polyhydroxylés a dégagé les propriétés suivantes :

- La configuration électronique fondamentale des complexes est $d_{x^2-y^2}$ ce qui permet une forte interaction antiliante avec le ligand salénique.
- La géométrie des complexes est tétragonale alors que le complexe $3d$ subit une distorsion tétraédrique.
- La liaison métal-ligand possède un fort caractère covalent en raison de l'effet donneur des groupements hydroxyle.

3. LES SALENES POLYHYDROXYLES A FER

3.1. Spectres RPE suivant le degré d'oxydation du fer

Le fer de degré d'oxydation II ou Fe^{II} possède une configuration électronique fondamentale $3d^6$. Il peut être haut spin ou bas spin.

A l'état bas spin ($S = 0$), tous les électrons sont appariés et donc on observe aucun signal RPE.

A l'état haut spin ($S = 2$), les paramètres en champ nul sont grands et empêchent toute observation en bande X puisque le niveau fondamentale est $M_S = 0$.

Le fer de degré d'oxydation III ou Fe^{III} possède une configuration électronique $3d^5$. Il peut être haut spin ou bas spin.

Pour un complexe haut spin ($S = 5/2$) de symétrie octaédrique, les six états de spin de l'état fondamental sont répartis en l'absence de champ magnétique en deux ensembles, l'un comprenant les états de spin $\pm 3/2$ et l'autre comprenant les états de spin $\pm 5/2$ et $\pm 1/2$. En présence d'un champ magnétique extérieur, cinq transitions de spin ($\Delta M_S = \pm 1$) sont ainsi possibles à des fréquences très proches ce qui se traduit pour des appareils à faible pouvoir de résolution par un signal RPE d'une unique raie à $g \approx 2$.

Pour un complexe haut spin ($S = 5/2$) de symétrie axiale, l'abaissement de la symétrie du système fait que le paramètre en champ nul D intervient ($E/D = 0$). Suivant la valeur du paramètre D par rapport à l'énergie de résonance, on observe trois types de signaux RPE :

- $D \ll hv$: les six états de spins dégénérés de l'état fondamental sont répartis en trois états doublets, dits de Kramer, très proches ($\pm 5/2, \pm 3/2, \pm 1/2$). Toutes les transitions de structure fine sont accessibles ($\Delta M_S = \pm 1$) mais à faible résolution, on observera qu'une seule raie à $g \approx 2$.
- $D \gg hv$: les six états de spin dégénérés de l'état fondamental sont répartis en trois doublets de Kramer éloignés. On observera que la transition $M_S = 1/2 \leftrightarrow M_S = -1/2$, soit deux raies correspondant à $g_{\parallel} = 2$ et $g_{\perp} = 6$ en tenant compte de la symétrie axiale du système.
- $D \approx hv$: les spectres en bande X (9,4 GHz) sont difficilement observables. On préfère travailler en bande Q (35 GHz) pour revenir au cas $D \ll hv$.

Pour un complexe haut spin ($S = 5/2$) de symétrie rhomboédrique, le paramètre en champ nul E devient non négligeable ($E/D = 1/3$). Dans le cas $D \gg hv$, on observe une raie à $g = 4,3$.

Le fer de degré d'oxydation IV ou Fe^{IV} possède une configuration électronique fondamentale $3d^4$. Les paramètres en champ nul sont grands et empêchent toute observation en bande X puisque le niveau fondamentale est $M_S = 0$.

3.2. Spectres RPE des salènes polyhydroxylés à fer

Pour réaliser les spectres RPE, les complexes ferriques 6a, 6b et 6c ont été mis en solution dans le méthanol à la concentration de 1 mM.

Les spectres ont été enregistrés uniquement en solution gelée à 77 K. Les autres conditions expérimentales restent identiques à celles du paragraphe précédent.

La figure 3.2 montre les spectres RPE des complexes 6a, 6b et 6c en solution gelée à 77 K. On observe une raie bien résolue à bas champ correspondant à $g \approx 6$ (tableau 3.1). Il n'y a pas d'interaction hyperfine puisque les proportions d'isotopes de noyaux de fer de spin non nul sont négligeables.

complexes	g_{\parallel}	g_{\perp}
6a	≈ 2	6,12
6b	≈ 2	6,26
6c	≈ 2	6,07

Tableau 3.1 : constantes spectroscopiques des complexes 6a, 6b et 6c

On peut donc affirmer que les complexes ferriques de salènes polyhydroxylés 6a, 6b et 6c sont des complexes de fer III haut spin de symétrie axiale.

En présence d'une petite quantité de soude (figure 3.1) afin d'activer le système hydroquinonique (la solution change de couleur et passe du rouge au vert), on observe un dédoublement de la raie à $g \approx 6$ ainsi qu'une légère diminution du signal. En même temps, on observe le signal du radical semi-quinonique.

En présence d'ADN (milieu méthanol/tampon), ce dédoublement, accompagné d'une forte diminution du signal RPE, est de nouveau observé.

L'origine de ce dédoublement en milieu basique ou en présence d'acides nucléiques, reste inexpliqué.

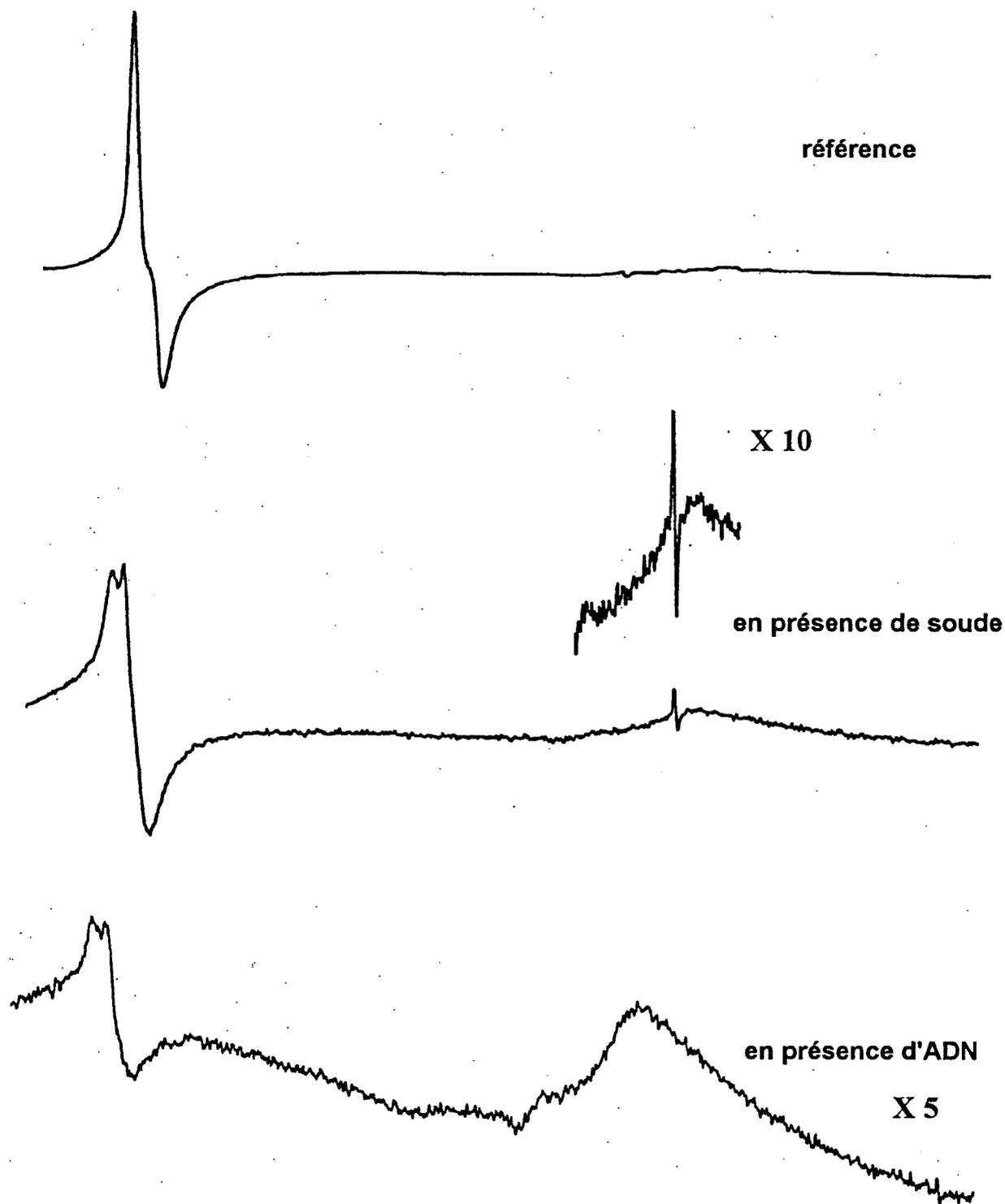


figure 3.1 : spectre RPE de 6c (1 mM dans le méthanol) en présence de NaOH (1 mM) ou d'ADN de thymus de veau (300 μ M)

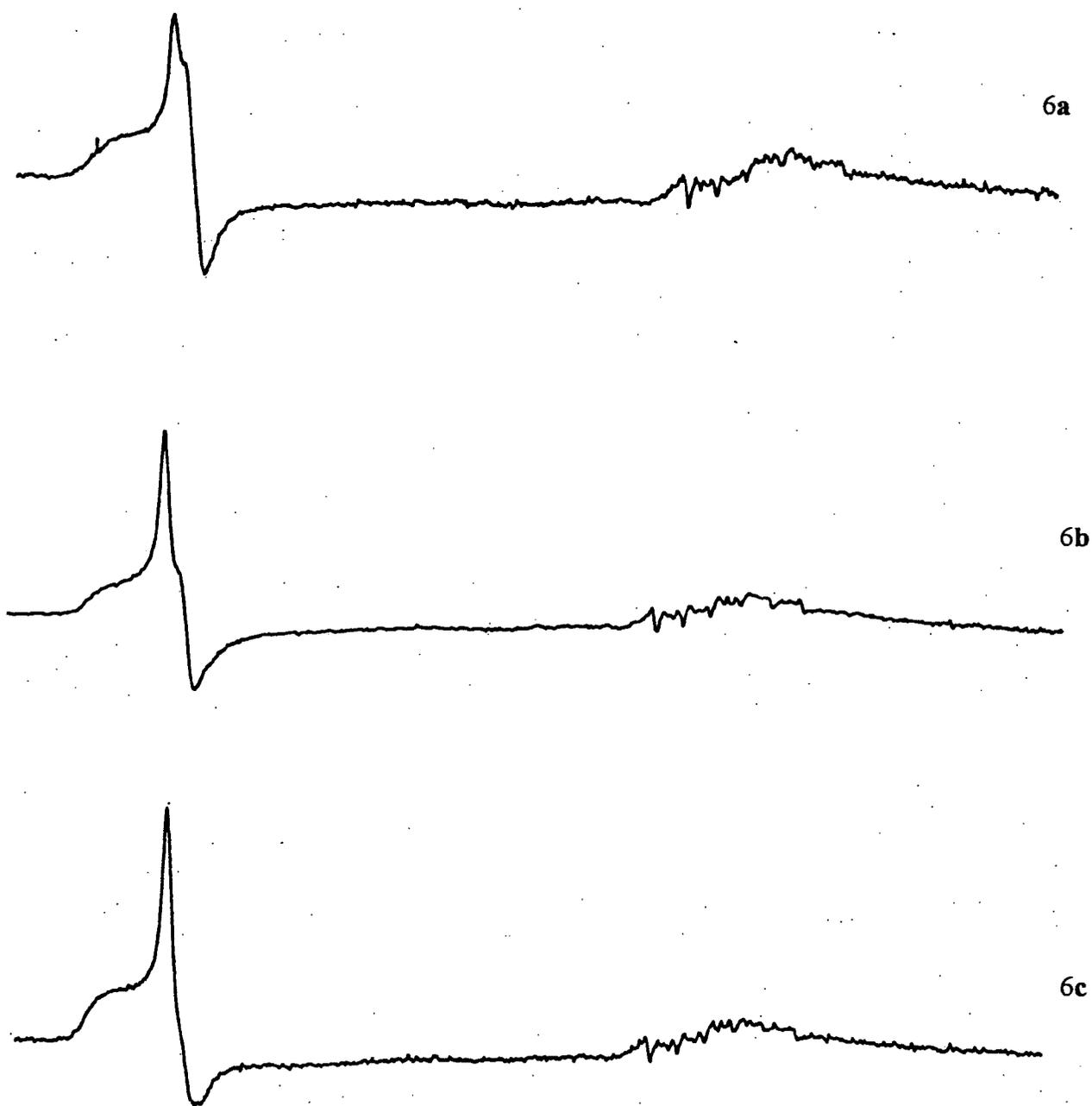


Figure 3.2 : spectres RPE de 1 mM de 6a, 6b et 6c en solution gelée (méthanol)

Chapitre 6 :
SALENES POLYHYDROXYLES
ET ETUDE PAR
VOLTAMMETRIE CYCLIQUE

1. PRINCIPE DE LA VOLTAMMETRIE CYCLIQUE

Les techniques voltammétriques sont très variées : à balayage linéaire, à impulsion différentielle...

Nous avons choisi de travailler en voltammétrie cyclique²⁰³⁻²⁰⁶ c'est-à-dire que le signal tension imposé est délivré en « dents de scie » à une électrode de travail ($E = E_i \pm v.t$ où v est la vitesse de balayage et E_i le potentiel initial).

C'est une méthode simple qui permet d'obtenir de nombreuses informations qualitatives et quantitatives (allure et modification des voltammogrammes avec la vitesse de balayage, perte de réversibilité, apparition de nouvelles vagues...).

1.1. Description d'un voltammogramme type

En voltammétrie cyclique, la courbe donnant le courant en fonction du potentiel fait apparaître deux régions (figure 1.1).

Considérons l'exemple de la réduction réversible d'une substance A en solution dont le potentiel normal est E_0 . On effectue un balayage de potentiel vers les potentiels négatifs à partir d'un potentiel initial E_i suffisamment oxydant ($E_i \gg E_0$) et on enregistre le courant (la réponse).

Au début, lorsque le potentiel imposé est suffisamment oxydant ($E \gg E_0$), le courant dû à la réduction du composé A est négligeable et on observe uniquement un courant capacitif (zone ab).

Quand le potentiel s'approche de E_0 ($E > E_0$), la vitesse de réduction de A en A° augmente : le courant est limité par l'échange d'électrons à l'électrode. A chaque $\Delta E = E - E_0$ correspond une valeur de $[A]/[A^\circ]$ (loi de Nernst). Dans cette zone de la courbe (zone bc), le courant augmente exponentiellement.

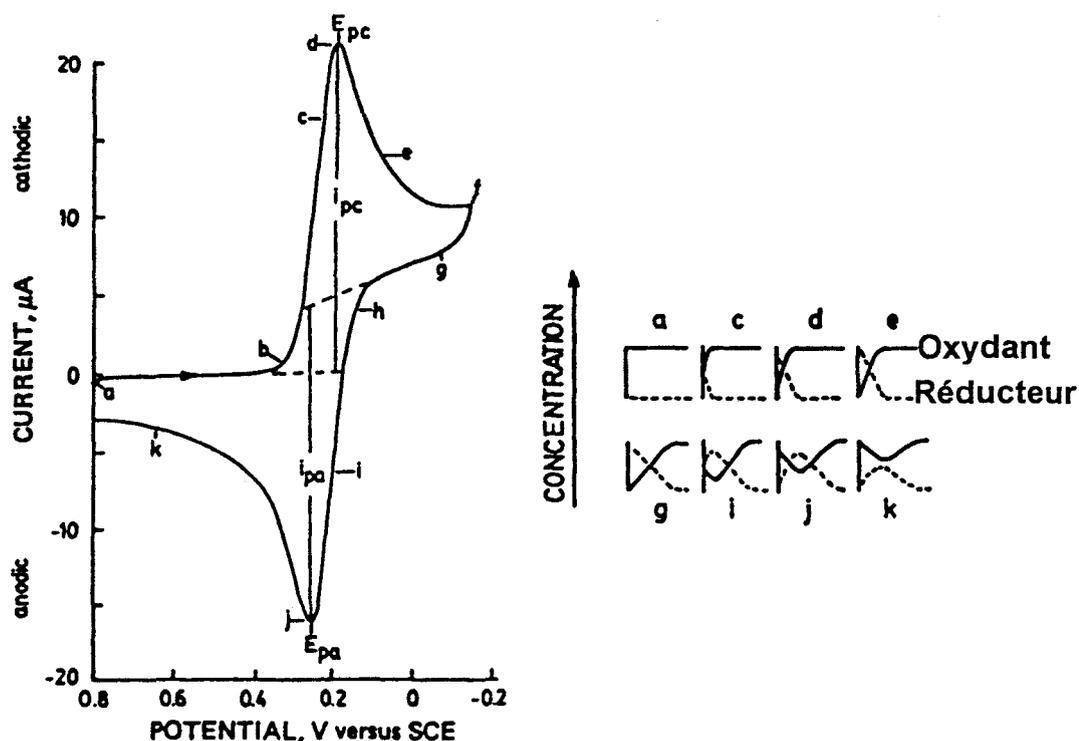


Figure 1.1 : voltammogramme typique

Une fois que le potentiel normal E_0 du couple A/A° est dépassé de quelques dizaines de millivolts (zone cd), l'échange d'électrons, c'est-à-dire le courant, est limité par le transport de A par diffusion de la solution vers l'électrode (du fait de la vitesse de réduction de A en A° élevée, la substance électroactive A, qui est apportée à l'électrode seulement par diffusion, disparaît rapidement au voisinage de la dite électrode : le gradient de concentration augmente ainsi que l'épaisseur de la couche de diffusion). On assiste à une diminution de i en $t^{1/2}$ ou, comme E est une fonction linéaire du temps t jusqu'à l'inversion de balayage du potentiel, à une décroissance en $E^{1/2}$ (zone df).

La convolution des deux phénomènes, contrôle de i par ΔE puis par le transport diffusionnel est à l'origine de la forme caractéristique du voltammogramme avec existence d'un pic de courant cathodique ($A + e^- \rightarrow A^\circ$) correspondant à un maximum de courant (E_{pc}).

Après inversion du sens du balayage du potentiel, un phénomène analogue se met en place, phénomène qui concerne cette fois l'oxydation de l'espèce A° .

Si A° est stable chimiquement pendant la durée du balayage ou si le balayage des potentiels est suffisamment rapide pour que le produit de réduction formé à l'aller soit encore présent lors du balayage retour, la branche retour du voltammogramme présente un pic d'oxydation de A° (pic de courant anodique E_{pa}) de même taille que le pic de réduction de A : le voltammogramme est dit réversible.

Dans le cas contraire ou si la vitesse de balayage est trop faible, le pic d'oxydation de A° est plus petit, voire complètement inexistant : le voltammogramme est dit irréversible.

1.2. Systèmes lents et rapides

Un voltammogramme est ainsi caractérisé :

- par le rapport des intensités des courants de pic $-i_{pa}/i_{pc}$ (i_{pa} correspond au maximum du pic d'oxydation et i_{pc} au maximum du pic de réduction)

- par l'écart des potentiels $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$ et par $E_p^{1/2} = \frac{(E_{pa} + E_{pc})}{2}$ où E_{pa} correspond au maximum du pic d'oxydation et E_{pc} au maximum du pic de réduction.

On peut caractériser un système, à savoir dire si un système est rapide ou lent, suivant ces caractéristiques (tableau 1.1).

1.3. Systèmes accompagnés de réaction chimique

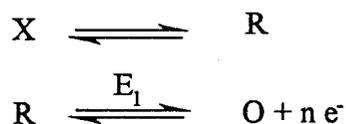
Le transfert d'électron est parfois accompagné d'une réaction chimique qui met en jeu des espèces électroactives. Selon le type de réaction chimique couplée à la réaction rédox, l'allure du voltammogramme change.

$A + n e^- \leftrightarrow A^\circ$	OXYDATION	REDUCTION
SYSTEME RAPIDE	$E_{pa} = E_o + \frac{0,03}{n}$ $E_{pa} - E_{pa}^{1/2} = \frac{0,06}{n}$	$E_{pc} = E_o - \frac{0,03}{n}$ $E_{pc} - E_{pc}^{1/2} = -\frac{0,06}{n}$
	Quelle que soit la valeur de la vitesse de balayage : $E_o = \frac{(E_{pa} + E_{pc})}{2}$ $\Delta E_p = \frac{0,06}{n}$ $-\frac{i_{pa}}{i_{pc}} = 1$	
SYSTEME LENT Facteur de transfert $\alpha \approx 0,5$	$E_{pa} = cste + \frac{0,06}{cn} \log v^{1/2}$ $E_{pa} - E_{pa}^{1/2} = \frac{0,048}{cn}$	$E_{pc} = cste - \frac{0,06}{cn} \log v^{1/2}$ $E_{pc} - E_{pc}^{1/2} = \frac{-0,048}{cn}$
	$\Delta E_p = \frac{0,12}{cn} \log v^{1/2}$ $-\frac{i_{pa}}{i_{pc}} \text{ variable}$	

 Tableau 1.1 : caractéristiques d'un voltammogramme²⁰³

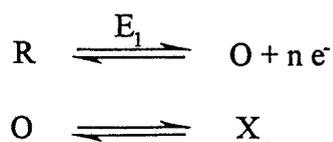
On peut citer (E représente une réaction rédox hétérogène à la surface de l'électrode et C une réaction chimique homogène) :

- Le mécanisme CE



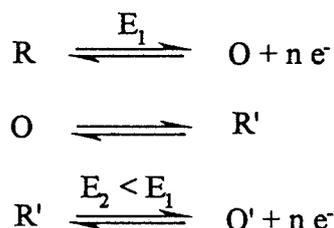
L'espèce électroactive R est générée par une réaction chimique qui précède le transfert d'électrons à l'électrode.

- Le mécanisme EC



Le produit O, formé lors de la réaction à l'électrode, réagit pour donner une espèce non électroactive au potentiel où l'oxydation de R se produit. On n'observe donc pas la réduction de O au balayage retour.

- Le mécanisme ECE



Un second transfert d'électrons a lieu lorsque le produit formé R' est électroactif dans la zone de potentiel où a lieu la première réaction électrochimique. Le courant anodique augmente donc puisqu'il correspond aux oxydations de R et de R'. Au balayage retour, le pic de réduction de O est plus petit (équilibre entre les formes O et R') voire inexistant (réaction irréversible de O en R') vu qu'une partie ou la totalité de O a été consommée pour donner R'. On observe, de plus, au balayage retour le pic de réduction de O' et l'apparition du pic d'oxydation de R' lors d'un deuxième balayage.

1.4. Conditions opératoires

Avant de mettre en œuvre une étude électrochimique, il est nécessaire de définir les conditions opératoires :

- **choix de l'électrode de travail** : dans le cas d'oxydation ou de réduction électrochimique, on a constaté que le mécanisme même de la réaction peut dépendre de la nature de l'électrode. Mais de telles constatations sont rarement expliquées. De plus, l'adsorption sur l'électrode de substrat électroactif ou de ses produits de dégradation peut provoquer l'inhibition de réactions électrochimiques ou une passivation de l'électrode.

- **choix du solvant et de l'électrolyte support** : le solvant doit évidemment dissoudre le substrat à électrolyser. De plus, il est nécessaire de disposer d'un milieu conducteur. Pour cela, on utilise un électrolyte support, non électroactif. Le solvant doit dissoudre ce sel de fond à la concentration minimale de 0,1 M ce qui exclut les solvants non dissociant. Les solvants les plus utilisés sont l'acétonitrile, le diméthylformamide et le diméthylsulfoxyde qui sont des solvants dipolaires aprotiques. Le domaine des potentiels accessibles dans ces solvants dépend surtout de la nature de l'électrolyte support. Le solvant peut, quant à lui, intervenir par son caractère protique et par ses propriétés nucléophiles dans l'étude voltammétrique.

Le système DMSO/TEAClO₄ permet d'étendre l'étude entre -2,4 ou -2,7 V vs SCE (réduction du cation ammonium quaternaire) et + 2,1 V vs SCE (oxydation du DMSO).

2. LIGANDS SALENIQUES POLYHYDROXYLES

Le potentiel de l'électrode de travail (électrode de platine CTV 101 T), imposé par un montage potentiostatique, est mesuré par rapport à une électrode de référence (électrode au calomel saturée) située à son voisinage pour minimiser la résistance ohmique entre les deux électrodes. Une troisième électrode, dite électrode auxiliaire (électrode de platine), permet de mesurer l'intensité électrique au potentiel imposé (schéma 2.1).

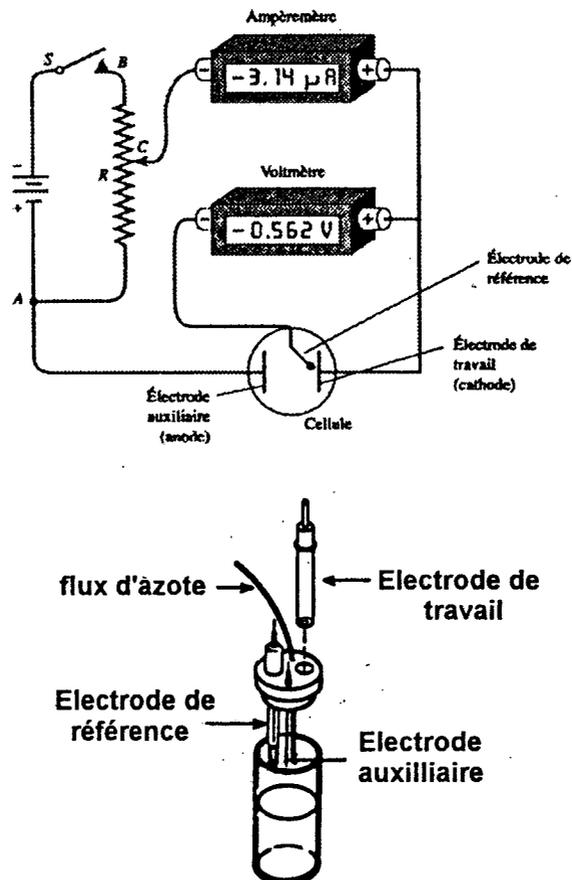


Figure 2.1 : montage potentiostatique et cellule électrochimique

Les études de voltammétrie cyclique ont été réalisées avec un potentiostat SOLEA TACUSSEL PJT 120 équipé d'une interface programmable SOLEA TACUSSEL IMT1.

L'étude voltammétrique a été effectuée sur 1 mM de salènes polyhydroxylés à cuivre, nickel, zinc et fer sous un courant d'azote.

Le sel perchlorique de la tétraéthylamine ou TEAClO₄ (recristallisé deux fois dans l'eau et séchée à 60 °C sous vide pendant quatre heures) est utilisé comme électrolyte-support à la concentration de 0,1 M.

Le solvant utilisé est le diméthylsulfoxyde ou DMSO à 0,01% (distillée sous courant d'azote et sous CaH₂) et dégazé avec de l'azote avant emploi.

Les voltammogrammes ont été enregistrés à 25°C à 50 mV.s⁻¹ (et à d'autres vitesses) entre +1 V vs SCE et -2 V vs SCE.

Les expériences couplant l'électrochimie et la RPE utilisent de nombreux dispositifs différents pour la cellule porte-échantillon. La cellule électrochimique utilisée est en quartz suprasil. Cathode et anode sont des fils de platine. Toutes les manipulations ont été réalisées en absence d'oxygène.

Lors de l'étude voltammétrique des ligands saléniques polyhydroxylés (figure 2.2), on observe deux pics, l'un anodique et l'autre cathodique, pour les ligands possédant un système hydroquinonique 2c ou catéchol 2a, et aucun pic, que ce soit anodique ou cathodique, pour le ligand possédant un système résorcinol 2b.

E _{pa} et i _{pa}	25 mV.s ⁻¹	50 mV.s ⁻¹	80 mV.s ⁻¹	100 mV.s ⁻¹	125 mV.s ⁻¹	200 mV.s ⁻¹
2a	526 mV 9,73 μA	560 mV 11,42 μA	583 mV 14,27 μA	631 mV 15,30 μA	631 mV 16,17 μA	631 mV 20,64 μA
2b	- -	- -	- -	- -	- -	- -
2c	580 mV 7,43 μA	592 mV 9,46 μA	619 mV 9,56 μA	637 mV 13,39 μA	646 mV 14,26 μA	655 mV 16,45 μA

E _{pc} et i _{pc}	25 mV.s ⁻¹	50 mV.s ⁻¹	80 mV.s ⁻¹	100 mV.s ⁻¹	125 mV.s ⁻¹	200 mV.s ⁻¹
2a	-755 mV -3,08 μA	-740 mV -4,73 μA	-735 mV -6,36 μA	-726 mV -6,88 μA	-726 mV -8,31 μA	-726 mV -9,26 μA
2b	- -	- -	- -	- -	- -	- -
2c	-769 mV -2,28 μA	-762 mV -4,39 μA	-753 mV -5,74 μA	-745 mV -7,09 μA	-745 mV -7,56 μA	-745 mV -7,96 μA

Tableau 2.1 : pics d'oxydation et de réduction en fonction de la vitesse de balayage

En augmentant la vitesse de balayage (tableau 2.1), les intensités des pics d'oxydation et de réduction augmentent ainsi que les potentiels d'oxydation et de réduction.

On observe donc que le système d'oxydoréduction est un système irréversible pour 2a et 2c et qu'il n'y a pas de système électroactivable pour 2b.

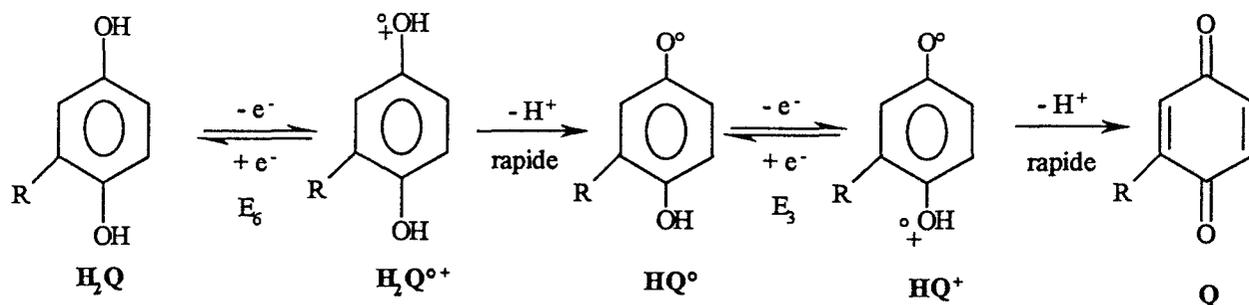
En balayant entre 0 et - 2 V, on observe aucun pic en réduction. Mais, en balayant entre 0 et 1 V, on observe le pic d'oxydation. Enfin, en balayant entre + 1 V et - 2 V, on observe le pic d'oxydation et de réduction : le pic de réduction n'apparaît que si l'on observe préalablement le pic d'oxydation. On envisage donc l'oxydation du ligand en quinone pour le pic d'oxydation et la réduction de la quinone en ligand pour le pic de réduction.

Nous proposons les phénomènes suivant pour rendre compte de l'irréversibilité observée pour les systèmes d'oxydoréduction portés par le ligand salénique.

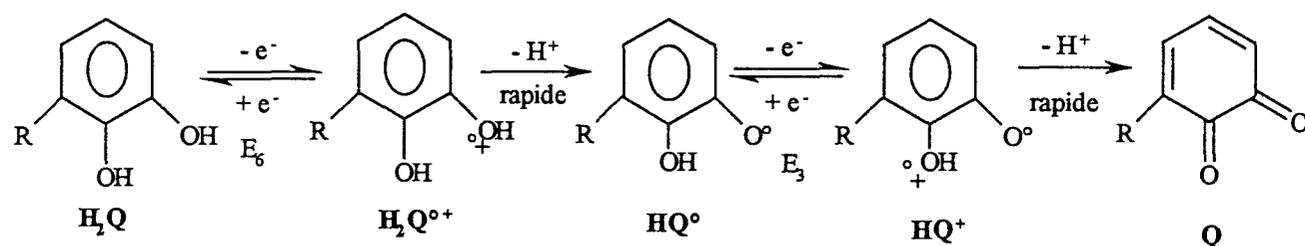
Lors de l'oxydation anodique²⁰⁷ (schéma 2.1), un premier transfert d'électron a lieu à un potentiel E_6 suivi par une déprotonation rapide pour donner un radical du type HQ^\bullet . Ce radical est plus facilement oxydable que H_2Q ($E_6 > E_3$) et donc subit un deuxième transfert d'électron pour donner une quinone (ou un catéchol) protonnée HQ^+ qui se déprotonne rapidement pour donner la quinone. Ces différentes étapes ne peuvent être séparées en voltammétrie cyclique et on observe globalement une oxydation irréversible à deux électrons (processus ECEC).

Lors de la réduction cathodique²⁰⁸, le système ortho ou para quinonique, formé préalablement par oxydation au voisinage de l'électrode, ne peut pas être considéré comme évoluant dans un milieu aprotique : il y a des protons H^+ qui ont été produits lors de l'oxydation ! Il faut donc considérer le problème de la réduction en supposant qu'on a ajouté au solvant aprotique un donneur de protons²⁰⁹.

Si le milieu était véritablement aprotique (schéma 2.2), on observerait une suite de deux réductions pratiquement réversibles.



système électroactif



système électroactif

Schéma 2.1 : oxydation anodique de 2a et 2c

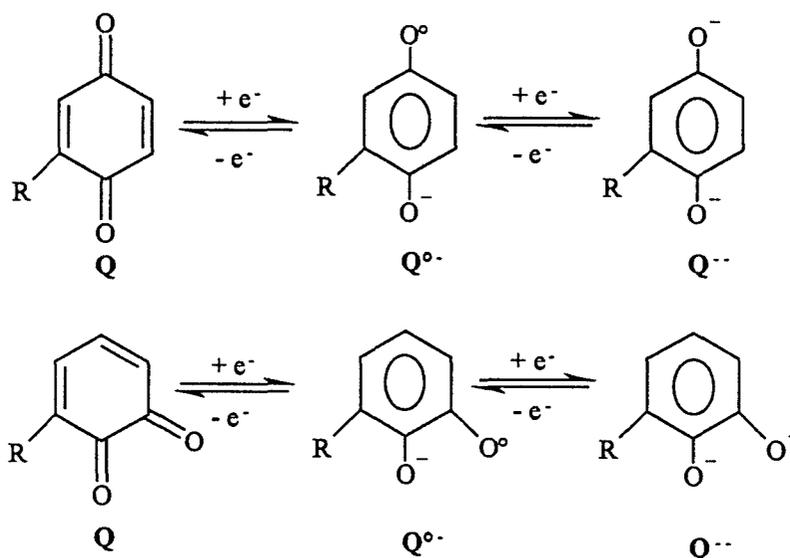


Schéma 2.2 : réduction cathodique en milieu aprotique d'un système quinonique

En fait (schéma 2.3), un premier transfert d'électron a lieu à un potentiel E₁ et forme le radical semi-quinonique. Ce radical semi-quinonique est rapidement protonné pour donner le radical HQ[•]. Ce radical est plus facilement réductible que l'ortho ou la para quinone (E₁ < E₄) et donc subit un deuxième transfert d'électron pour donner HQ⁻ qui, protonné, donne H₂Q. On observe ainsi un phénomène irréversible de réduction à deux électrons (processus ECE).

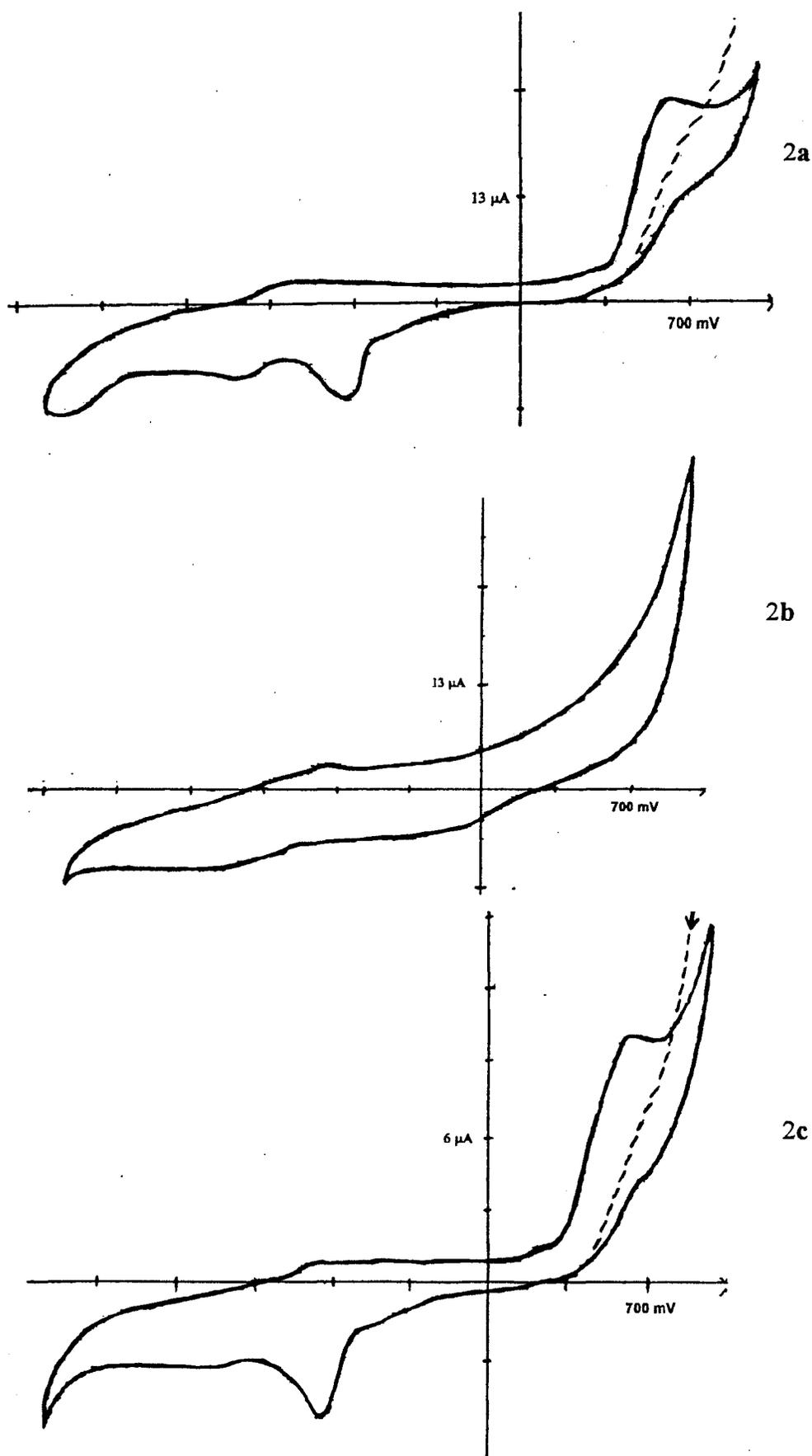


Figure 2.1 : voltammogrammes des ligands saléniques 2a, 2b et 2c (1mM) dans le DMSO à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ en présence de 0,1 M de TEAClO_4

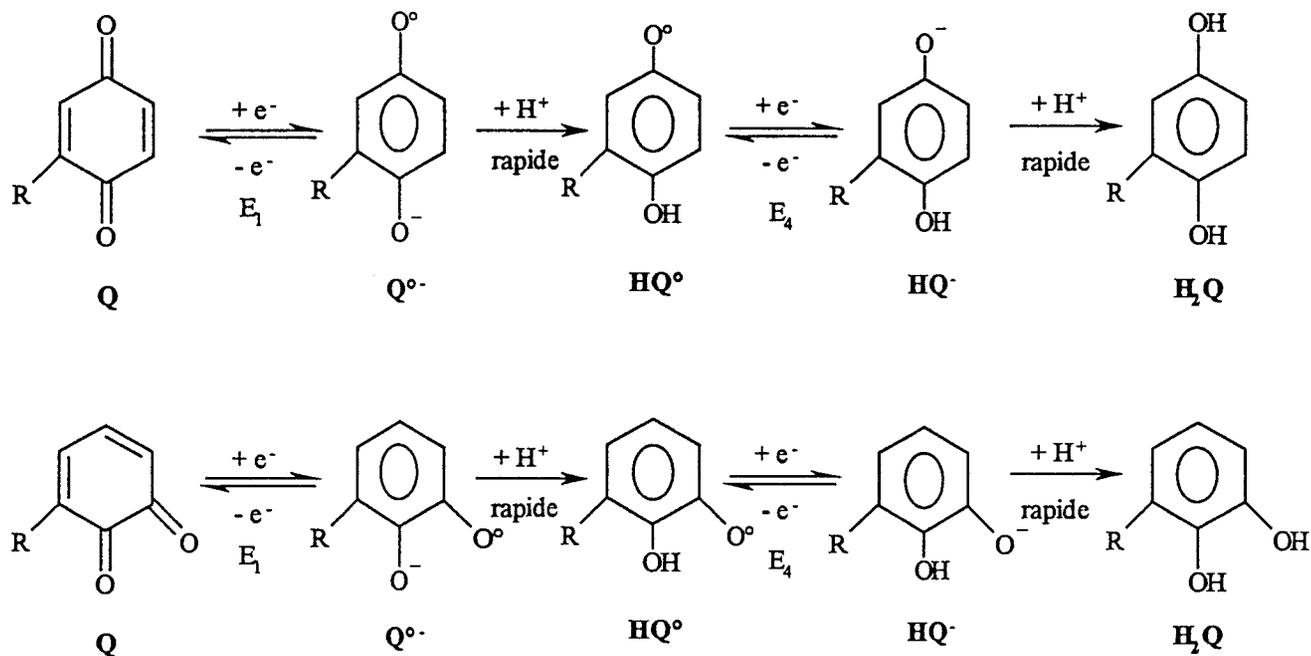


Schéma 2.3 : réduction cathodique de 2a et 2c

Une alternative au processus ECE est une réaction de dismutation du radical semi-quinonique²⁰⁸ (schéma 2.4). Mais globalement, le résultat est le même, à savoir, une réduction irréversible à deux électrons.

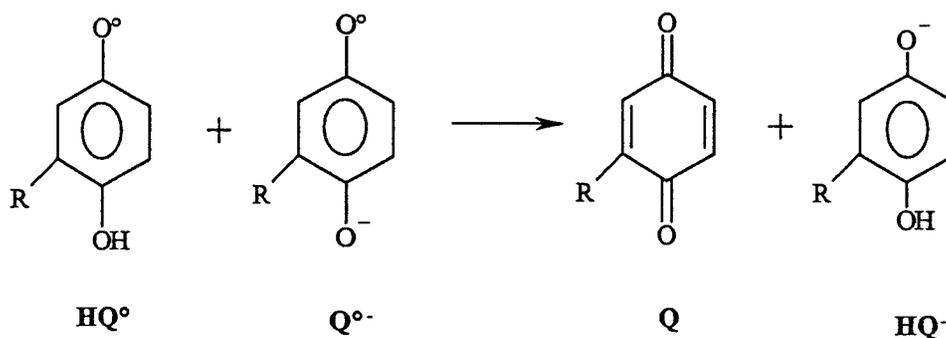


Schéma 2.4 : dismutation du radical semi-quinonique

En résumé, les systèmes paraquinone/hydroquinone et orthoquinone/catéchol des ligands saléniques polyhydroxylés 2a et 2c peuvent être considérés comme un ensemble de réactions de transfert d'électrons et de transfert de protons en équilibre. En considérant tous les états possibles de protonations et d'échanges d'électrons, on peut résumer les résultats voltammétriques dans le schéma suivant :

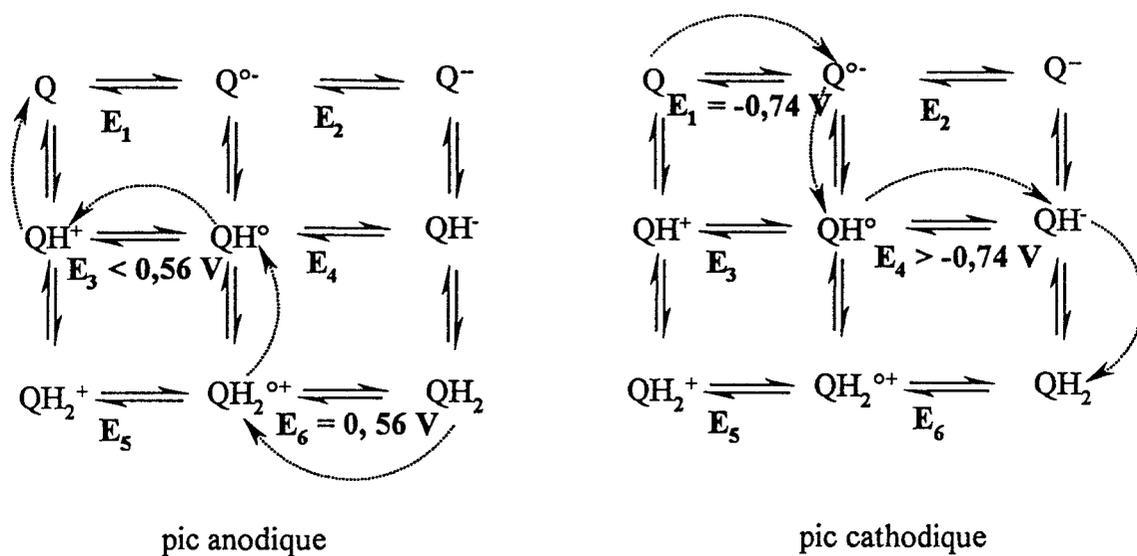


Schéma 2.5 : résumé des phénomènes lors de l'oxydation anodique et de la réduction cathodique de 2a (similaire pour 2c)

3. COMPLEXES CUIVRIQUES DE SALÈNES POLYHYDROXYLES

Les conditions opératoires sont identiques à celles du paragraphe précédent.

Les voltammogrammes des complexes cuivriques **3a** et **3c** (figure 3.1 et tableau 3.1) montrent deux ensembles de pics supplémentaires aux pics relatifs aux ligands. On peut donc raisonnablement les attribuer à la présence du métal²¹⁰⁻²¹¹.

vs SCE	H ₂ Q → Q	Q → H ₂ Q	Système 1 : Cu ^{II} /Cu ^I			Système 2 : Cu ^{III} /Cu ^{II}		
	E _{pa}	E _{pc}	E _{pc}	E _{pa}	E ^{1/2}	E _{pc}	E _{pa}	E ^{1/2}
3a	+ 0,55 V	- 0,82 V	- 1,41 V	- 1,28 V	- 1,33 V	- 0,15 V	+ 0,05 V	- 0,10 V
3b	-	-	- 1,56 V	-	-	-	-	-
3c	+ 0,45 V	- 0,72 V	- 1,53 V	- 0,82 V	-	- 0,20 V	- 0,06 V	- 0,13 V
3d	-	-	- 1,06 V	- 0,94 V	- 1,00 V	-	-	-

Tableau 3.1 : potentiels des différents pics observés pour les complexes **3a**, **3b** et **3c** à 50 mV.s⁻¹

Le cuivre peut prendre différents états d'oxydation (tableau 3.2) :

- Les états d'oxydation + 1 et + 2 sont les plus communs.
- L'état d'oxydation + 3 est caractérisé dans quelques cas mais semble un intermédiaire de réaction courant.
- Les états d'oxydation 0 et + 4 sont très rares.

Etat d'oxydation	Coordination	Géométrie
Cu ^I (d ¹⁰)	3 ou 4	Surtout tétraédrique ou trigonale
Cu ^{II} (d ⁹)	4 à 6	Surtout tétragonale (plan-carré, pyramidal plan-carré et bipyramidal plan-carré) avec quatre ligands équatoriaux liés fortement et 1 ou 2 ligands axiaux liés faiblement (effets Jahn-Teller)
Cu ^{III} (d ⁸)	4 ou 6	Surtout plan-carré ou pyramidal plan-carré (un cas de géométrie octaédrique pour CuF ₆ ³⁻)

Tableau 3.2 : états d'oxydation du cuivre et géométries du complexe caractéristiques

Etudions plus en détail ces deux ensembles.

3.1. Ensemble de pics à $\approx -1,4$ V

3.1.1. Détermination du couple associé

Lors d'un balayage de potentiel entre 0 et -2 V, on observe un pic de réduction pour **3b** qui est accompagné d'un pic d'oxydation pour **3a** et **3c**. Le pic d'oxydation n'apparaît que si on a d'abord le pic de réduction.

Ces ensembles de pics relatifs à **3a**, **3b** et **3c**, présentent donc des caractéristiques différentes :

- pour **3a**, l'ensemble constitue un système semi-réversible avec $E^{1/2} = -1,33$ V vs SCE et $\Delta E = 130$ mV.
- Pour **3b**, l'ensemble se résume à un pic de réduction.
- Pour **3c**, l'ensemble constitue un système irréversible avec un $\Delta E = 690$ mV

Deux hypothèses de couples oxydoréducteurs sont envisageables pour l'attribution de cet ensemble de pics : les couples $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ et $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^0$.

Pour déterminer la nature du couple mis en jeu, nous avons couplé l'électrochimie à la spectroscopie RPE.

Si le système est relatif au couple $\text{Cu}^{\text{I}}/\text{Cu}^0$, on ne verra aucun signal RPE à un potentiel supérieur à celui de la réduction. Dans le cas contraire, nous pourrions affirmer que le système est relatif au couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$.

Entre le potentiel naturel et $-1,4$ V, on observe le signal RPE du cuivre II.

En fixant le potentiel de la solution à $-1,4$ V (figure 3.3), on observe une baisse de 60% du signal RPE du cuivre II par rapport au signal de référence (signal au potentiel d'abandon) : le cuivre II se réduit en cuivre I (électrolyse).

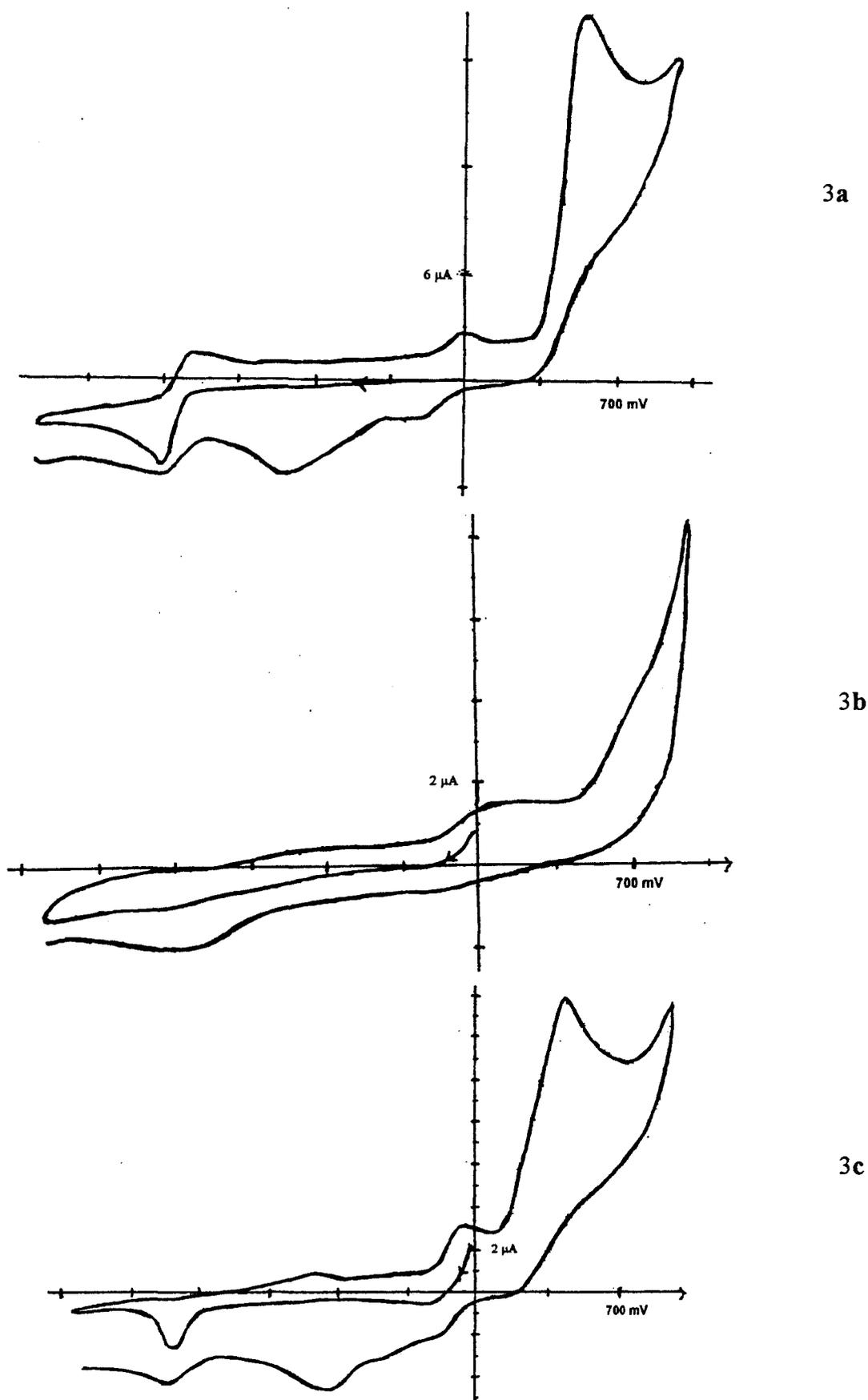
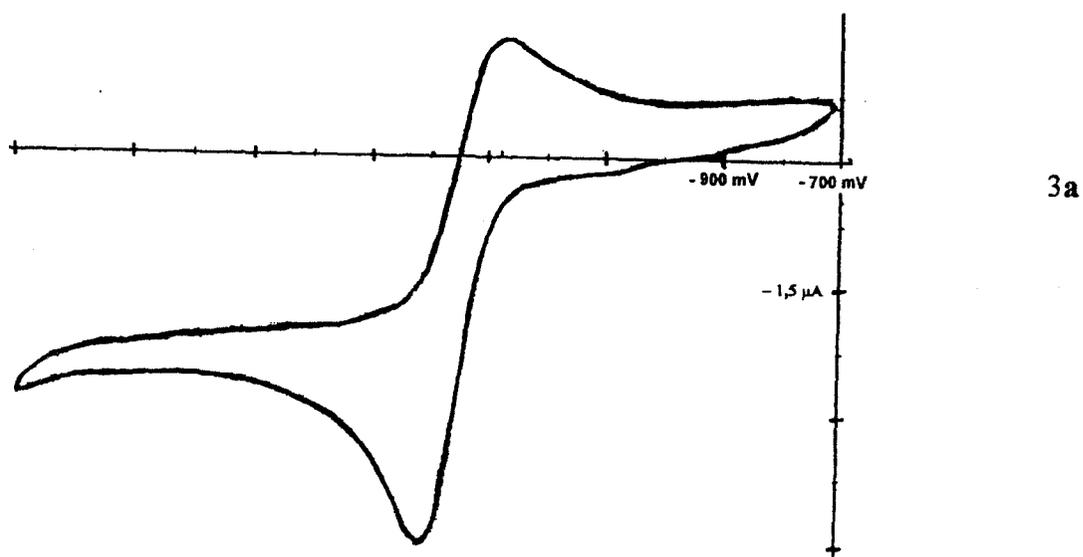
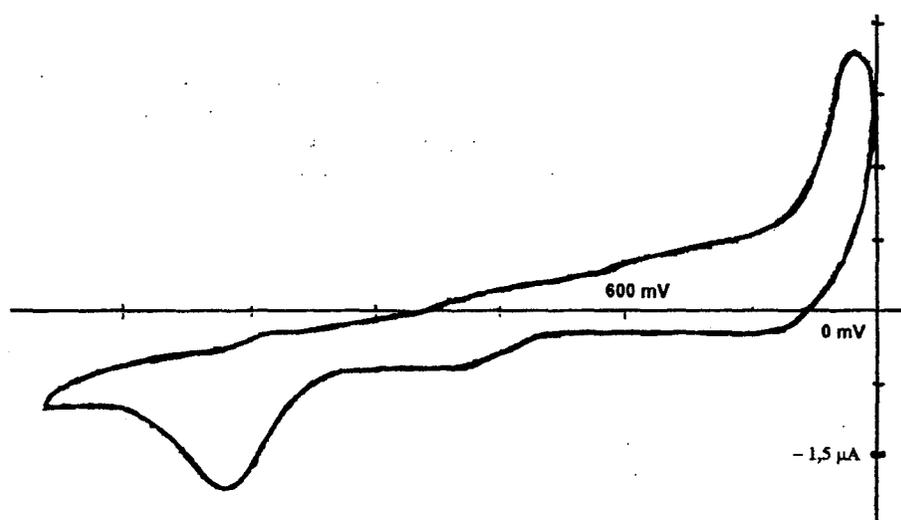


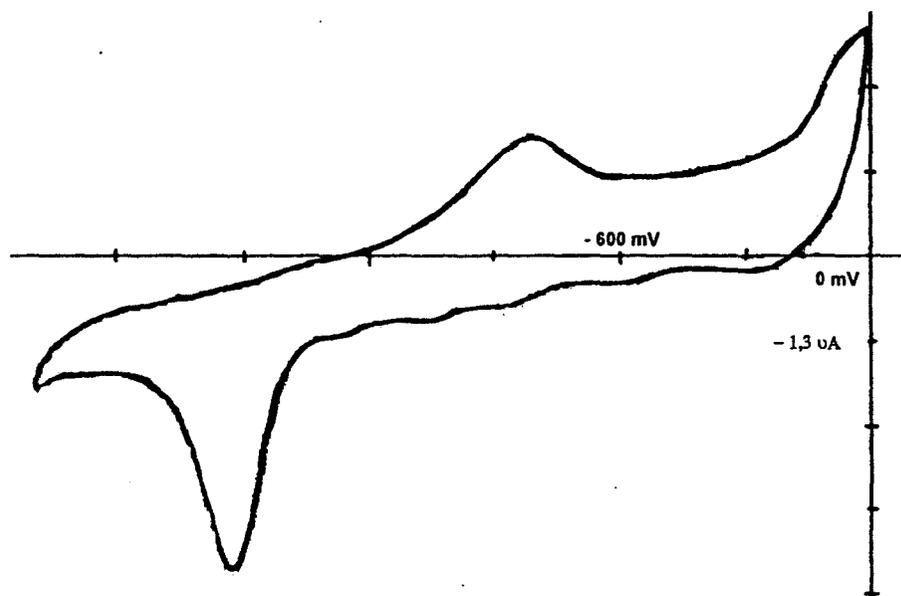
Figure 3.1 : voltammogrammes des complexes saléniques cuivriques 3a, 3b et 3c (1 mM) dans le DMSO à $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ en présence de 0,1 M de TEAClO_4



3a



3b



3c

Figure 3.2 : pics relatifs au couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ pour 3a, 3b et 3c

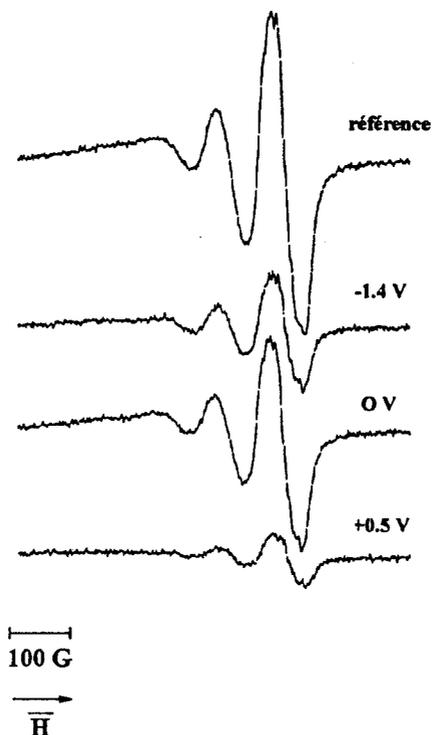


Figure 3.3 : Signal RPE à température ambiante et à différents potentiels pour 3c (2 mM dans le DMSO)

En fixant ensuite le potentiel de la solution à 0 V (figure 3.3), on observe une restauration partielle du signal RPE du cuivre II.

Nous pouvons donc affirmer que le système semi-réversible à $E_p^{1/2} = -1,33$ V pour 3a et irréversible à $E_{pc} = -1,53$ V pour 3c est relatif au couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$.

Il faut noter que le signal résiduel à -1,4 V reste typique d'un complexe cuivrique : le cuivre II ne se décomplexe pas lors de la réduction. On ne pourra donc pas attribuer le deuxième système d'oxydoréduction situé autour de $-0,1$ V à du cuivre II décomplexé.

On peut s'interroger sur l'irréversibilité du couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ pour 3b et 3c. On remarque un léger dépôt sur l'électrode pour ces complexes. Il y a donc adsorption d'un produit, probablement du cuivre métallique provenant de la dismutation du cuivre I formé.

3.1.2. Discussion

On peut s'étonner que ce couple soit situé très bas dans l'échelle des potentiels. Pour comprendre cette valeur atypique, il faut s'interroger sur les facteurs²¹² qui influencent le potentiel du couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ (tableau 3.3).

Selon le ou les atomes coordinants, l'état d'oxydation I est plus ou moins stabilisé. Ainsi, l'effet de l'atome coordinateur pour stabiliser le cuivre I (le potentiel E^0 du couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ augmente) suit l'ordre de la basicité $\text{N} > \text{S} > \text{O}$.

Solvants et milieux sont bien connus pour influencer les propriétés rédox des complexes cuivriques. Ce phénomène se révèle primordial pour les protéines à cuivre dont l'activité fonctionnelle dépend du potentiel rédox de leur centre métallique. Ainsi, un milieu polaire ou un environnement à forte constante diélectrique stabilise le degré II du cuivre (le potentiel E^0 du couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ baisse) et favorise donc l'observation de hauts degrés d'oxydation. Inversement, un milieu non polaire favorise la réduction du Cu^{II} en Cu^{I} .

Les différences de géométrie et de coordination du cuivre dictent les propriétés rédox des complexes. Un changement de degré d'oxydation peut s'accompagner d'un changement drastique de la sphère de coordination et la barrière d'énergie de tels réarrangements affectent les propriétés thermodynamiques et cinétiques de tels changements. Les potentiels de réduction du couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ varient donc suivant le type de ligand et la géométrie du complexe. Ainsi une distorsion tétraédrique sur une coordination plane stabilise le degré I du cuivre (le potentiel E^0 du couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ augmente).

Les facteurs influençant le potentiel de réduction du couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$ d'un site actif enzymatique et à fortiori d'un complexe métallique peuvent être réunis dans l'équation suivante²¹² :

$$E^0 (\text{V}) = \text{IE} (\text{eV}) - 4,5 + U (\text{V})$$

(4,5 eV est un facteur correctif pour tenir compte de la référence ENH)

Où

IE est l'énergie d'ionisation

U est l'énergie de solvation

$L_nCu^{II} + e^- \rightarrow L_nCu^I$ $\Delta G^0 = -F.E^0$	solvant	Potentiel E^0 en V vs SCE
Effets électroniques		
$Cu(5-NO_2phen)_2^{2+} / Cu(5-NO_2phen)_2^+$	Dioxane	+ 0,379
$Cu(5-NH_2phen)_2^{2+} / Cu(5-NH_2phen)_2^+$	Dioxane	+ 0,248
$Cu(phen)_2^{2+} / Cu(phen)_2^+$	Dioxane	+ 0,296
Effets de solvant		
Cu^{2+} / Cu^+	Acétonitrile ($\epsilon = 38,8$)	+ 1,28
	Pyridine ($\epsilon = 12,3$)	+ 0,69
	Dioxane ($\epsilon = 2,2$)	+ 0,25
	Eau ($\epsilon = 78,5$)	+ 0,16
$Cu(phen)_2^{2+} / Cu(phen)_2^+$	Acétonitrile ($\epsilon = 38,8$)	+ 0,32
	Dioxane ($\epsilon = 2,2$)	+ 0,296
	Eau ($\epsilon = 78,5$)	+ 0,17
Effets stériques et de géométrie		
$Cu(dmop)_2^{2+} / Cu(dmop)_2^+$	Eau	+ 0,59
$Cu(phen)_2^{2+} / Cu(phen)_2^+$	Eau	+ 0,17
$Cu(NH_3)_2^{2+} / Cu(NH_3)_2^+$	Eau	+ 0,31
$Cu(Pyr)_2^{2+} / Cu(Pyr)_2^+$	Eau	+ 0,30
$Cu(morph)_2^{2+} / Cu(morph)_2^+$	Eau	+ 0,25
$Cu(bpy)_2^{2+} / Cu(bpy)_2^+$	Eau	+ 0,12
$Cu(en)_2^{2+} / Cu(en)_2^+$	Eau	- 0,36

 Tableau 3.3 : exemples de couples Cu^{II}/Cu^I

Les facteurs qui contribuent à l'énergie d'ionisation sont :

- l'énergie de l'orbitale moléculaire « rédox active » dont l'énergie est grandement affectée par la géométrie et la force du champ de ligands : une forte interaction antiliante avec le ou les ligands augmente son énergie et donc facilite l'oxydation du cuivre I en cuivre II (E^0 faible). L'énergie d'une orbitale $d_{x^2-y^2}$ « rédox active » d'un complexe de cuivre II est beaucoup plus basse dans une géométrie tétraédrique (T_d) que dans une géométrie tétragonale (D_{4h}) : le potentiel de réduction du couple Cu^{II}/Cu^I est donc plus élevé dans un complexe de géométrie tétraédrique que dans celui de géométrie tétragonale. Certains auteurs²¹² suggèrent que la structure tétraédrique d'un complexe contribue à + 500 mV de la valeur du potentiel.
- la charge nucléaire effective (Z_{eff}) du centre métallique qui est modifiée suite à la complexation. Celle-ci dépend du pouvoir inductif donneur du ou

des ligands. Une diminution de Z_{eff} c'est-à-dire une augmentation de la densité électronique sur le métal (ligands fortement donneurs) augmentent l'énergie des orbitales d du centre métallique ce qui rend le métal plus facilement oxydable (E^0 faible).

- la relaxation électronique des électrons non « rédox actifs » c'est-à-dire le réarrangement spatial des électrons suite au processus rédox (perte ou gain d'électron) rend le métal plus ou moins facile à oxyder.

Les facteurs qui influencent l'énergie d'hydratation sont :

- la taille du centre métallique : le petit rayon de l'ion cuivrique contribue à la haute énergie d'hydratation de Cu^{2+} et donc à la stabilité de $\text{Cu}^{2+}_{\text{aq}}$ sur $\text{Cu}^{+}_{\text{aq}}$.
- le réarrangement de l'environnement du centre métallique suite à un changement rédox.
- la nature du milieu (local pour une protéine) : en raison de sa faible densité de charge, Cu^{I} peut être stabilisé en abaissant la constante diélectrique du solvant. Cette augmentation de la stabilité est en partie dûe à la coordination de molécules de solvant.

3.1.3. Conclusion

Dans le cas de nos salènes polyhydroxylés à cuivre, l'état d'oxydation II du cuivre est stabilisé par :

- la géométrie plan-carré du complexe
- l'interaction antiliante avec le ligand salénique
- les groupements donneurs hydroxyle
- la nature du solvant d'étude

Tous ces paramètres peuvent expliquer la valeur très basse du potentiel du couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$.

3.2. Ensemble de pics à $\approx -0,1$ V

Lors d'un balayage de potentiel entre 1 et -2 V, on observe un pic de réduction et un pic d'oxydation, lié au précédent autour de $-0,1$ V pour 3a et 3c.

L'ensemble situé à un potentiel plus bas étant attribué au couple $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$, il semble « naturel » d'attribuer l'ensemble de pics à $E^{1/2} = -0,10$ V pour 3a et $-0,13$ V pour 3c au couple $\text{Cu}^{\text{III}}/\text{Cu}^{\text{II}}$.

En fixant le potentiel de la solution à un potentiel compris entre 0 et $+0,5$ V (figure 3.3), on observe une baisse du signal RPE (80 % à $+0,5$ V vs SCE) par rapport au signal RPE de référence (signal au potentiel d'abandon du système) : le cuivre II, paramagnétique, est oxydé en cuivre III, silencieux en bande X (électrolyse).

Mais une autre explication pourrait expliquer cette chute du signal RPE : la formation d'un radical sur le ligand salénique qui par couplage antiferromagnétique avec le cuivre II « éteindrait » le signal RPE du cuivre II.

Cette ambiguïté sur le degré d'oxydation du métal en présence d'un ligand non « rédox innocent » n'est pas nouvelle²¹³. HQCu^{III} ou $\text{HQ}^{\text{o}\cdot}\text{Cu}^{\text{II}}$ sont deux formes mésomères limites si la géométrie de l'ensemble ne bouge pas.

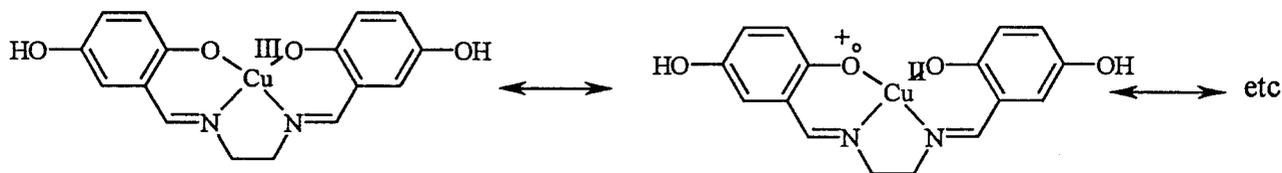


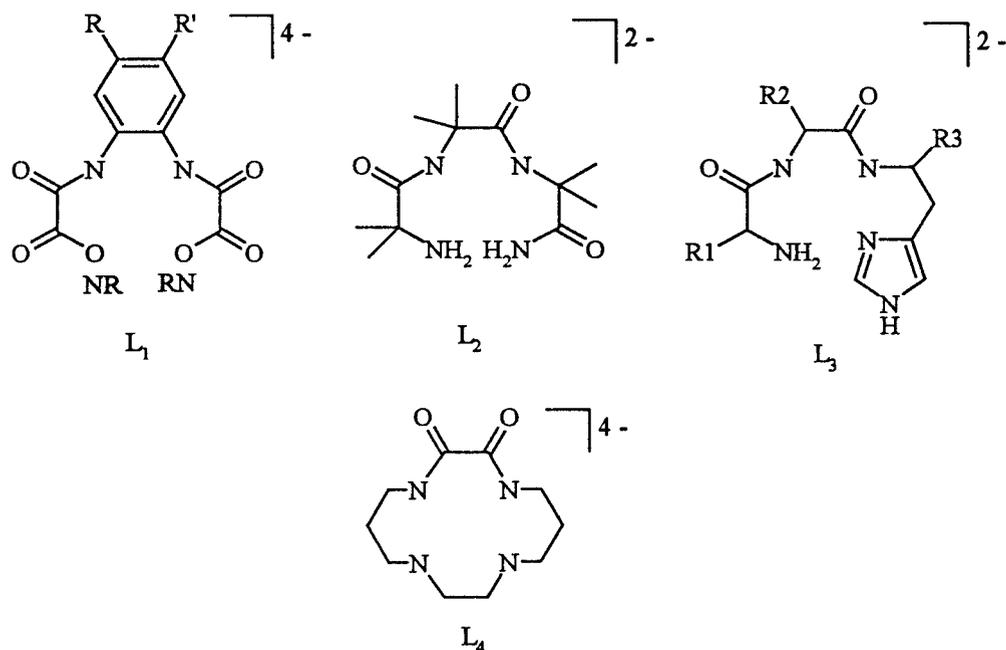
Schéma 3.1 : formes mésomères entre HQCu^{III} ou $\text{HQ}^{\text{o}\cdot}\text{Cu}^{\text{II}}$ (idem pour 3a)

Examinons plus en détail ces deux cas limites.

3.2.1 Hypothèse du cuivre III

L'état d'oxydation du cuivre III ne semble pas être un état d'oxydation biologique : le potentiel rédox du couple $\text{Cu}^{\text{III}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ est généralement trop élevé.

Cependant, de nombreux exemples de complexes de cuivre III synthétiques²¹⁴⁻²¹⁸ existent dans la littérature. Quelques exemples sont donnés dans le tableau 3.4.



complexes	Potentiel de Cu^{III}/Cu^{II}	solvant
L_1Cu^{II216}	0,41 à -0,02 V vs SCE	Acétonitrile
L_2Cu^{II218}	0,80 à 0,17 V vs SCE	Acétonitrile
L_3Cu^{II218}	1,00 à 0,37 V vs NHE	Eau
L_4Cu^{II217}	0,60 à 0,50 V vs SCE	acétonitrile

Tableau 3.4 : exemple de ligands stabilisant le degré III du cuivre

Le potentiel du couple Cu^{III}/Cu^{II} est très sensible à la nature du ligand. Le degré III d'oxydation du cuivre est ainsi stabilisé^{214, 219-220} par divers facteurs :

- un fort champ de ligands : l'énergie de stabilisation entre les configurations fondamentales d^9 (Cu^{II}) et d^8 (Cu^{III}) est plus importante.
- des ligands fortement donneurs : ils augmentent la densité électronique du métal et donc stabilisent les hauts degrés d'oxydation.
- une géométrie plan carré du complexe.

3.2.2. Hypothèse du cuivre II/radical sur le ligand

Dans le cas d'un centre métallique M paramagnétique (Cu^{II}) couplé avec un deuxième centre paramagnétique (radical organique L), il faut ajouter aux hamiltoniens H_M et H_L pris séparément un terme d'interaction H_{inter} ²²¹:

$$H = H_M + H_L + S_M.J.S_L$$

$$H_{\text{inter}} = S_M.J.S_L \approx J_0.S_M.S_L + S_M.D.S_L$$

Ce terme d'interaction comprend :

- l'interaction dipolaire électron-électron ou $S_M.D.S_L$: c'est une grandeur tensorielle qui est moyennée à zéro si l'agitation moléculaire est suffisante (spectre RPE en solution à température ambiante) et donc ne contribue qu'à un élargissement des raies.
- l'interaction d'échange électron-électron ou $J_0.S_M.S_L$: il représente l'écart énergétique entre le niveau fondamental et le premier état excité.

Un ion cuivrique ($S = 1/2$) complexé par un ligand portant un centre radicalaire ($S = 1/2$) conduit ainsi à trois cas limites :

- l'interaction entre le cuivre et le radical organique est inexistante : les deux spins ne sont pas corrélés, ion cuivrique et radical organique peuvent être traités indépendamment. On observe en RPE le signal des deux entités paramagnétiques.
- l'interaction d'échange ($J_0 > 0$) entre les électrons non appariés situés dans des orbitales magnétiques non orthogonales (recouvrement possible) est faible : elle donne un état fondamental singulet ($S = 0$). L'espèce est donc diamagnétique (aucun signal RPE observé) et le couplage est dit antiferromagnétique.
- l'interaction d'échange ($J_0 < 0$) entre les électrons non appariés situés dans des orbitales magnétiques orthogonales (recouvrement impossible) est forte : elle donne un état fondamental singulet ($S = 1$). L'espèce est donc paramagnétique (signal RPE observé si les paramètres à champ nul ne sont pas très importants) et le couplage est dit ferromagnétique.

De nombreux exemples de sites actifs enzymatiques présentant un centre métallique près d'un radical organique existent²²². Ainsi, depuis quelques années, des complexes cuivriques couplés à un radical phénoxy et mimant l'activité catalytique de la galactose oxydase sont particulièrement étudiés. Nous les prendrons comme exemple d'interaction entre le métal paramagnétique et un radical organique.

La galactose oxydase²²³ est une protéine cuivrique monomérique (68,5 kDa) extracellulaire de type II d'origine fongique. Elle catalyse avec peu de spécificité les alcools primaires en aldéhydes. Lors de la réaction, il y a transfert de deux électrons sur une molécule d'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène (la formation de peroxyde d'hydrogène serait la fonction biologique de cette enzyme).

Le site actif de cette enzyme présente un ion cuivrique lié à un radical tyrosyle, d'une part modifié en ortho par une liaison covalente avec une cystéine (schéma 3.2), et d'autre part en « stacking » avec un noyau tryptophane.

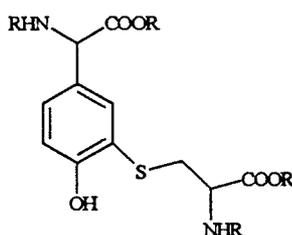
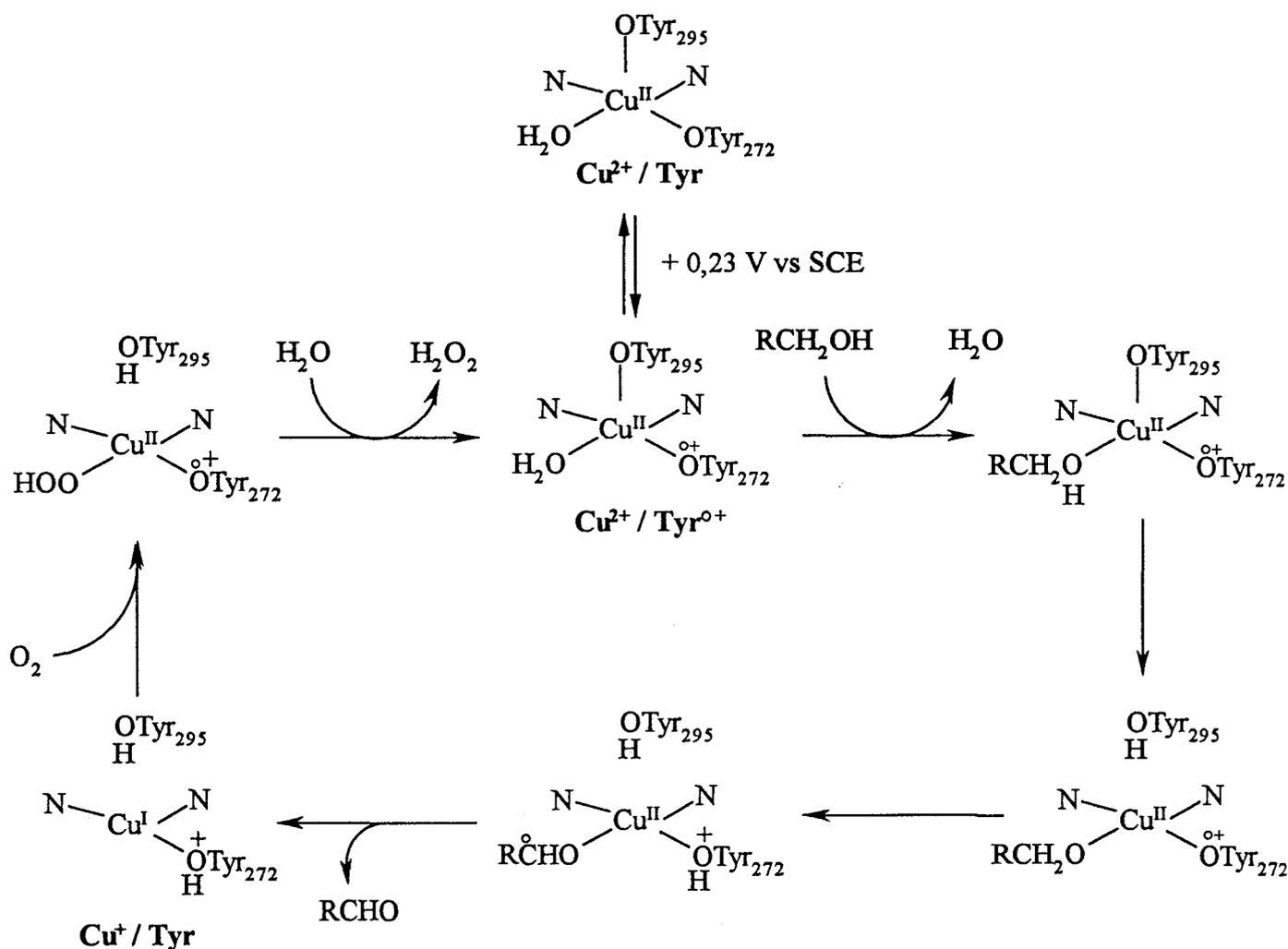


Schéma 3.2 : Tyrosine 272

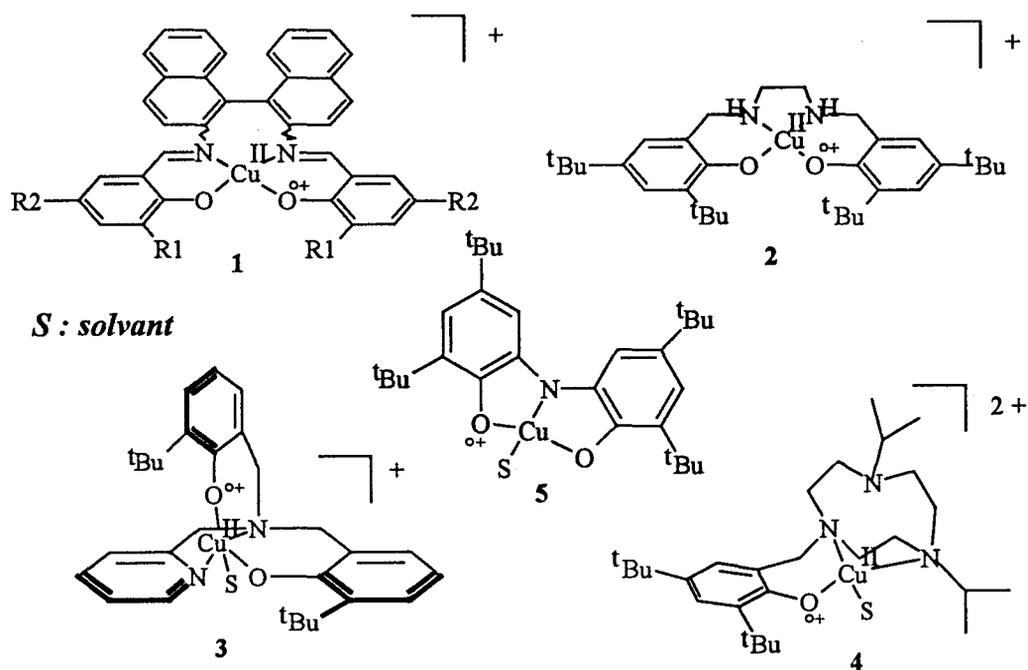
La structure du site actif de cette enzyme révélée par RX (résolution 1,7 Å) montre que le site de coordination du cuivre contient deux histidines (His 496 et 581), deux résidus tyrosines (Tyr 272 et 295) et une molécule d'acétate (pH \approx 4,5) ou d'eau (pH \approx 7) exogène apportée lors de la recristallisation de l'enzyme. L'ensemble forme une pyramide à base carrée distordue dont une tyrosine (Tyr 295) est en position axiale et l'autre (Tyr 272) en position équatoriale.

Le radical tyrosyle est situé en position équatoriale et est coordonné au métal : le couplage entre le radical tyrosyle ($S = \frac{1}{2}$) et l'ion cuivrique ($S = \frac{1}{2}$) est de nature antiferromagnétique ($S = 0$, $-2J > 200 \text{ cm}^{-1}$). $\text{Cu}^{2+}/\text{Tyr}^{\text{o}}$ est donc silencieux en RPE mais le signal RPE du radical tyrosyle peut être généré à partir de l'enzyme décomplexée soumise à des conditions oxydantes.



Le cycle catalytique est le suivant (schéma 3.3) : deux électrons sont retirés du substrat, l'un est accepté par le radical, l'autre par le métal. En milieu anaérobie, l'alcool est oxydé en aldéhyde et la forme Cu^+/Tyr de l'enzyme est stable. En milieu aérobie, l'alcool est oxydé en aldéhyde et le site actif de l'enzyme est régénéré par réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène.

De nombreux ligands de complexes cuivriques²²⁴⁻²³⁰ peuvent être oxydés en radical phénoxy. Certains d'entre eux présentent même une activité « galactose oxydase like ». Quelques exemples sont donnés dans le tableau 3.5.



Complexes cuivriques	Potentiel d'oxydation du couple $ROCu^{II}/RO^{\bullet+}Cu^{II}$	Couplage entre le cuivre et le radical phénoxy
1 (Wang et Stack) ²²⁴	0,80 à 1,10 V vs SCE (acétonitrile)	Anti ou ferromagnétique
2 (Pierre et al) ²²⁵	0,11 V vs SCE (DMF)	Anti ou ferromagnétique
3 (Pierre et al) ²²⁶⁻²²⁸	0,64 V vs SCE (acétonitrile)	Ferromagnétique
4 (Tolman et al) ²²⁹⁻²³⁰	0,79 V vs SCE (CH_2Cl_2)	Anti ou ferromagnétique
5 (Wiegardt et al) ²⁴⁸	0,12 V vs SCE (CH_2Cl_2)	Antiferromagnétique

Tableau 3.5 : exemples de complexes cuivriques présentant un radical phénoxy après oxydation

3.2.3. Conclusion

Maintenant que nous avons résumé les principales caractéristiques des deux formes mésomères limites décrivant l'espèce issue de l'oxydation de LCu^{II} , il nous reste maintenant à déterminer quelle forme mésomère la décrit le plus fidèlement : LCu^{III} ou $L^{\bullet}Cu^{II}$?

Nous pensons personnellement être en présence de cuivre III et ce pour plusieurs raisons :

- les voltammogrammes du ligand seul ne montrent pas la formation de radical autour de $-0,1$ V.

- entre 0 et + 0,5 V, nous n'avons détecté aucun signal RPE de radicaux semi-quinonique pour 3a et 3c. Mais à + 0,5 V, on détecte la formation d'un faible signal RPE de radical semi-quinonique (figure 3.4). Il faut donc admettre une oxydation en HQCu^{III} à 0 V dans un premier temps, puis dans un second temps l'oxydation en radical semi-quinonique $\text{HQ}^{\circ}\text{Cu}^{\text{III}}$ à + 0,5V.

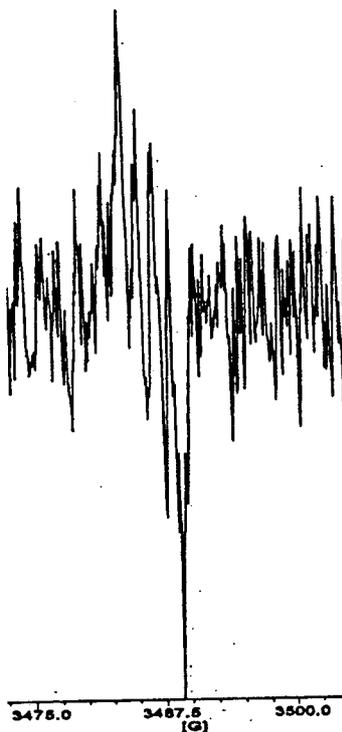


Figure 3.4 : détection en RPE du radical semi-quinonique à + 0,5 V

- des études voltammétriques avec des conditions opératoires similaires ont été réalisées sur les complexes saléniques polyhydroxylés de zinc II^{231} 4a et de nickel II 5a (figure 3.5). Aucun pic d'oxydation ou de réduction n'a été observé dans la zone de - 0,1 V. Un pic d'oxydation apparaît certes à + 0,3 V (outre le pic d'oxydation à deux électrons à + 0,65 V et le pic de réduction apparenté à - 0,74 V) pour le complexe de zinc mais il se trouve qu'un épaulement existait à ce même potentiel pour le complexe de cuivre 3a.
- la géométrie du complexe plan-carré et les effets donneurs des groupements hydroxyle sont des facteurs qui stabilisent l'état d'oxydation III du cuivre.

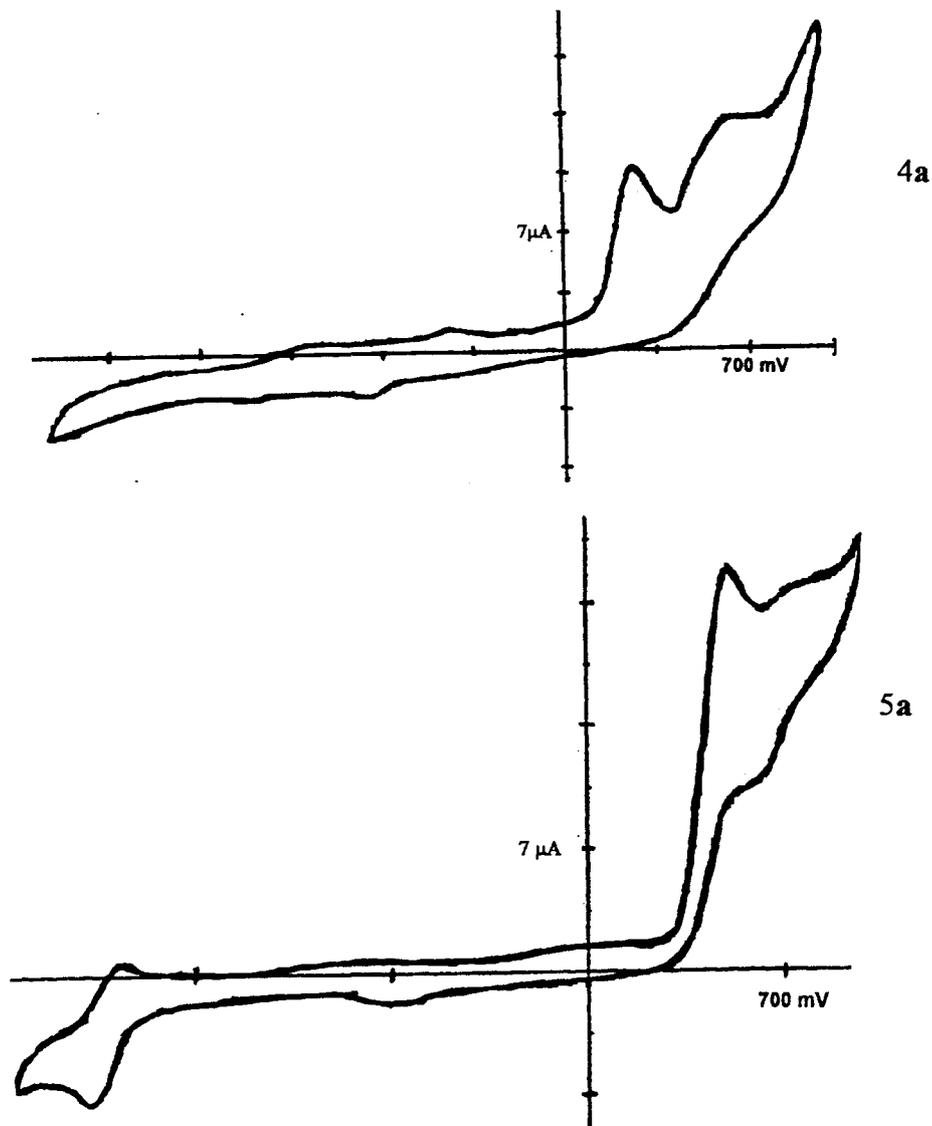


Figure 3.4 : voltammogramme des complexes saléniques de zinc 4a et de nickel 5a dans le DMSO à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ en présence de $0,1 \text{ M}$ de TEAClO_4

En conclusion, nous pouvons raisonnablement attribuer le système réversible observé à $-0,1 \text{ V}$ au couple $\text{Cu}^{\text{III}}/\text{Cu}^{\text{II}}$ même si aucune observation directe n'a été faite.

Les différents résultats de voltammétrie sont résumés dans la figure suivante :

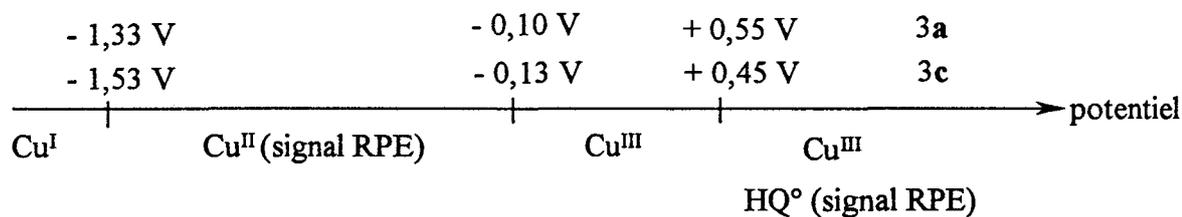


Figure 3.5 : états d'oxydation de 3a et 3c

4. COMPLEXES FERRIQUES DE SALENES POLYHYDROXYLES

Les conditions opératoires sont identiques à celles du paragraphe précédent.

Les voltammogrammes des complexes ferriques 6a, 6b et 6c (figure 4.1 et tableau 4.1) montrent plusieurs pics supplémentaires à ceux relatifs aux ligands.

Potentiel vs SCE	Syst 1 : Fe ^{III} /Fe ^{II} ?			Syst 2 : Fe ^{II} /Fe ^I ?		Autres pics		Syst 3 : H ₂ Q/Q	
	E _{pa}	E _{pc}	E ^{1/2}	E _{pa}	E _{pc}	E _{pa}	E _{pc}	E _{pa}	E _{pc}
6a	-0,04 V	-0,15 V	-0,09 V	-0,99 V?	-1,19 V	+0,84 V	-0,69 V*	+0,54 V	-0,69 V*
6b	Non observé			?	-1,24 V	+0,86 V	-0,81 V	-	-
6c	-0,09 V	-0,17 V	-0,13 V	-0,89 V	-1,26 V	+0,85 V -0,63 V	-0,80 V*	+0,49 V	-0,80 V*
6d	-	-	-0,35 V	-	-	-	-	-	-

Tableau 4.1 : potentiels des différents pics observés pour les complexes 6a, 6b et 6c à 50 mV.s⁻¹(* pics confondus)

Par comparaison avec le complexe 6d et à FeCl₃ (E^{1/2} = -0,14 V vs SCE), les systèmes réversibles (systèmes 1) présents à -0,09 V pour 6a et à -0,13 V pour 6c peuvent être attribués au couple d'oxydoréduction Fe^{III}/Fe^{II}. Bizarrement, ce système n'apparaît pas pour 6b. L'ensemble des pics irréversibles (système 2) situés à des potentiels plus réducteurs peut être attribué au couple Fe^{II}/Fe^I. Cependant les pics d'oxydation présents pour tous les complexes ferriques aux alentours de +0,8 V et les pics de réduction situés à environ -0,8 V (ce pic n'apparaît que si le pic d'oxydation à +0,8 V est présent) n'ont pas encore été interprétés.

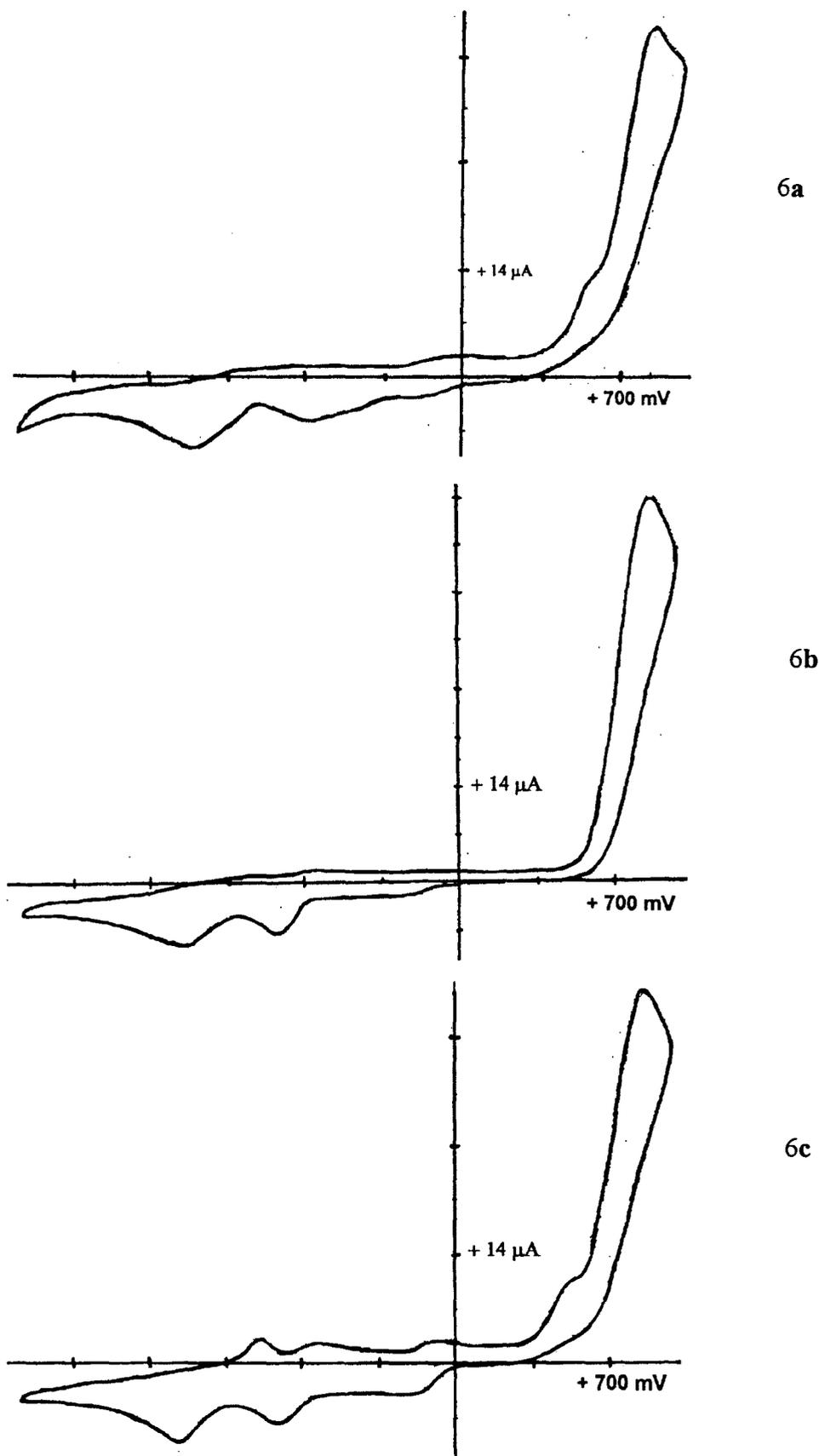


figure 4.1 : voltammogrammes de 1 mM de 6a, 6b et 6c dans le DMSO à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ en présence de 0,1 M de TEAClO_4

Chapitre 7 :
SALENES POLYHYDROXYLES
ET ETUDE PAR
SPIN TRAPPING

1. PRINCIPE DU SPIN TRAPPING

Les radicaux libres sont des entités possédant un électron célibataire ce qui leur confère une très grande réactivité. Ils sont donc généralement instables et leur durée de vie est très faible. La formation de radicaux libres peut être détectée par spectroscopie RPE seulement si la durée de vie de ces radicaux est suffisamment longue.

En revanche, la mise en évidence d'espèces radicalaires transitoires, de courte durée de vie, nécessite l'emploi de la technique dite de « spin-trapping » ou piégeage de radicaux libres.

La technique du « spin-trapping »²³² (schéma 1.1), mise au point en 1968 par le professeur Jansen, utilise un composé diamagnétique (le spin-trap ou piègeur) qui réagit avec un radical pour donner un composé paramagnétique stable et observable en RPE (l'adduit).

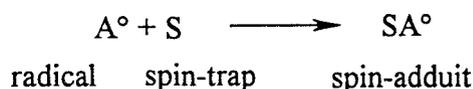


Schéma 1.1 : principe du « spin-trapping »

Le radical piégé par le spin-trap peut être identifié à partir des caractéristiques RPE (constantes de couplage hyperfin A) du spin-adduit.

En effet, quand un électron célibataire est centré sur un atome porteur de n hydrogènes H_α magnétiquement équivalents (schéma 1.2), on observe, outre le couplage avec le noyau portant l'électron célibataire ($2I + 1$ raies de même intensité), un couplage entre l'électron célibataire et les hydrogènes H_α ($n + 1$ raies dont les intensités sont données par le triangle de Pascal). Pour un enchaînement carboné présentant n' hydrogènes H_β magnétiquement équivalents (schéma 1.2), on observe aussi un couplage entre l'électron célibataire et H_β ($n' + 1$ raies dont les intensités sont données par le triangle de Pascal). Selon les conformations de l'espèce radicalaire, on peut parfois détecter des couplages à longue distance avec H_γ et H_δ .

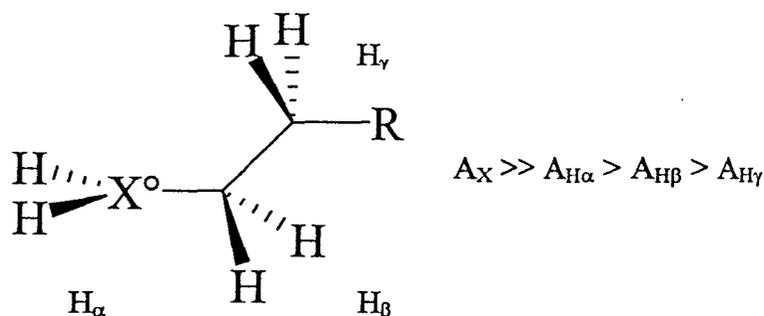
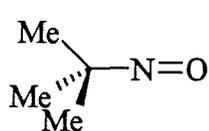
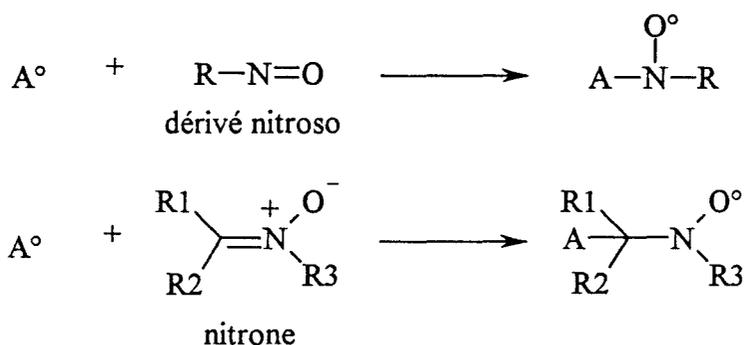


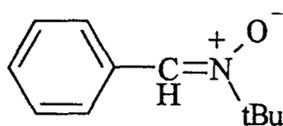
Schéma 1.2 : constantes de couplage présentes dans le spin-adduit

Les deux types de spin-trap les plus employés sont (schéma 1.3) :

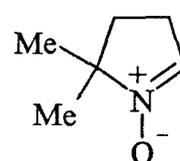
- les dérivés nitroso dont le plus utilisé est le 2-méthyl-2-nitroso-propane ou NtB
- les nitrones dont les plus utilisées sont le n-terbutyl-nitron (PBN) et la 5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO).



NtB



PBN



DMPO

Schéma 1.3 : exemples de « spin-trap »

Les dérivés de type nitroso sont généralement plus sensibles que les composés de type nitron parce que l'espèce radicalaire à identifier se condense plus près du centre paramagnétique. Cependant, ils donnent des solutions instables sensibles à la lumière ou à la température et de plus ont tendance à former des dimères les rendant inutilisables pour le spin-trapping (schéma 1.4). Enfin, ils sont assez inadaptés pour l'étude des radicaux centrés sur l'oxygène (RO° , ROO° , O_2° , HO°) puisque l'adduit formé est très instable.

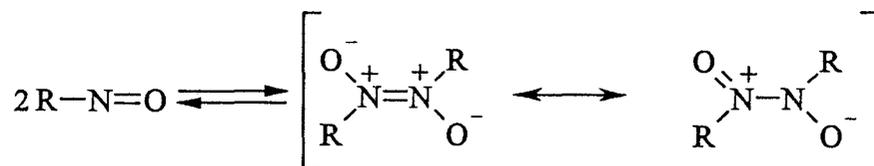


Schéma 1.4 : instabilité des nitrones

A l'inverse, les dérivés de type nitronne, faciles à manipuler, donnent des solutions très stables et sont adaptés à l'étude des radicaux oxygénés.

Certes les adduits formés avec le PBN sont plus stables mais ceux formés avec le DMPO conduisent à des spectres plus caractéristiques de l'adduit. C'est pourquoi, nous avons utilisé le DMPO qui a une durée de vie en solution de trois à quatre heures.

La constante hyperfine de couplage avec un proton H_β suit l'équation de Heller-McConnel (schéma 1.5) :

$$A_{H\beta} = A + B \cdot \cos^2 \theta$$

Où θ est l'angle dièdre compris entre le plan formé d'une part par l'orbital $2p_z$ de N et la liaison CN et d'autre part le plan formé par les liaisons CH et CN

Ainsi chaque radical piégé modifie la valeur de θ suivant ses propres caractéristiques stériques et électroniques

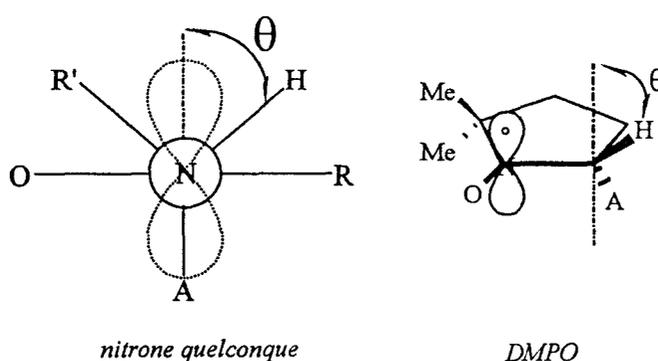


Schéma 1.5 : paramètres de l'équation de Heller-McConnel

Le spin-trap DMPO possède une conformation rigide (cycle) qui place l'hydrogène H_β pratiquement en position éclipsée avec l'orbital $2p_z$ de N (θ est donc petit et $A_{H\beta}$ important). En conséquence de petits changements stéréoelectroniques du radical piégé provoquent des modifications importantes de $A_{H\beta}$.

Les spectres RPE des adduits avec le DMPO présentent au maximum 6 raies : le couplage entre l'électron célibataire et le noyau d'azote ($I = 1$) donne une structure hyperfine à 3 raies de même intensité et le couplage entre l'électron célibataire et l'hydrogène H_{β} conduit à un dédoublement du triplet ce qui donne au total six raies de même intensité dont les constantes de couplage dépendent de la nature du radical A° piégé.

Il est à remarquer que l'on a généralement $A_N > A_{H\beta}$ pour un radical centré sur l'oxygène (figure 1.1).

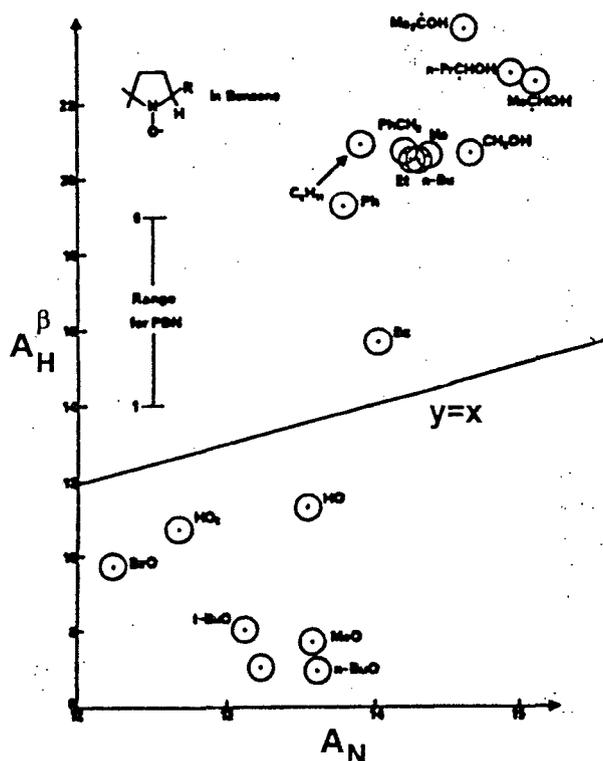


Figure 1.1 : corrélation entre A_N et $A_{H\beta}$

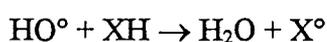
Les constantes de couplage relatives au piégeage des radicaux superoxyde O_2° et hydroxyle HO° ainsi que les spectres RPE sont donnés dans le tableau 1.1 et la figure 1.2.

Il est à noter que la détection d'un spectre de DMPO-OH ne signifie pas forcément que des radicaux HO° ont été piégés par le DMPO. Différentes voies de formation de DMPO-OH, autres que celle correspondant au piégeage des radicaux HO° par le DMPO sont possibles. Ainsi, l'adduit DMPO-OOH, instable, se transforme partiellement en DMPO-OH (schéma 1.6) : on peut donc obtenir le radical DMPO-OH sans qu'il y ait formation de radicaux HO° dans le milieu.

Radical piégé	Adduit formé	A_N	$A_{H\beta}$	$A_{H\gamma}$	Signal RPE
HO°	DMPO-OH	14,8 G	14,8 G	-	4 raies d'intensité 1 : 2 : 2 : 1
$HO^\circ/DMSO$	DMPO- CH_3	16 G	23 G	-	6 raies de même intensité
$O_2^{\circ-}$	DMPO-OOH	14,8 G	11,6 G	1,2 G	6 raies dédoublées

Tableau 1.1 : constantes de couplage hyperfines des spin-adduits avec les radicaux libres oxygénés

Afin de certifier la formation de radicaux hydroxyle et donc contrôler que l'adduit DMPO-OH est bien formé par piégeage de HO° , on ajoute dans le milieu une molécule XH (DMSO ou EtOH) sur laquelle le radical hydroxyle pourra réagir suivant la réaction :



Le nouveau radical X° (CH_3° ou EtO°) pourra lui-même être piégé par le DMPO. Les signaux RPE de ces nouveaux adduits sont suffisamment différents pour être distingués sans ambiguïté.

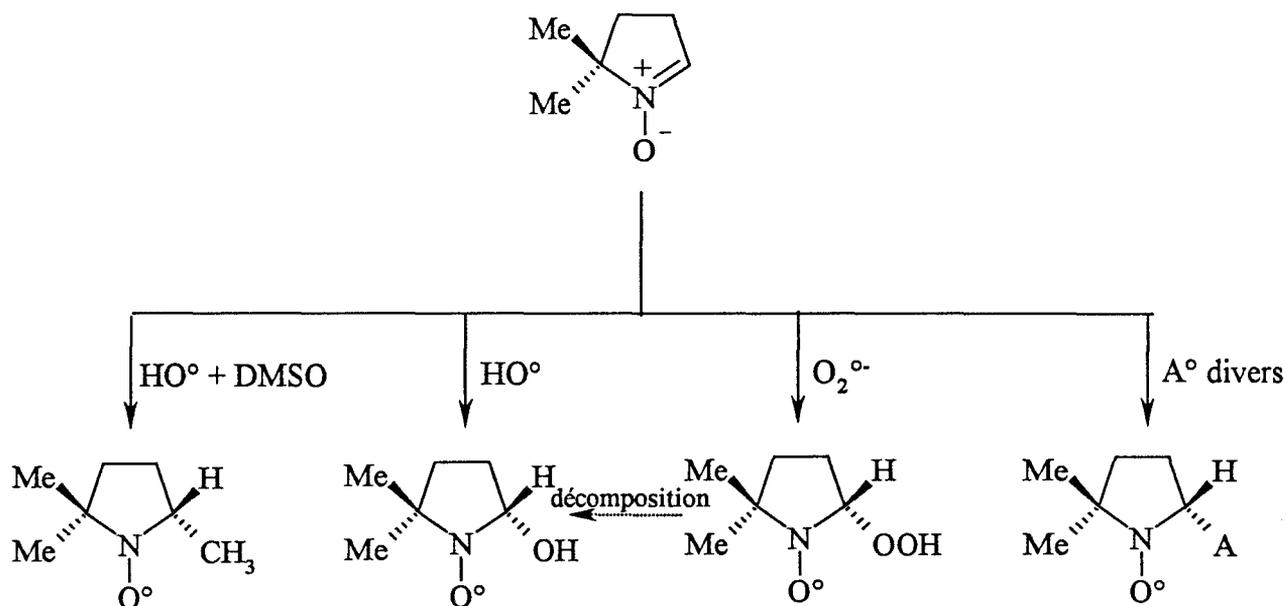


Schéma 1.6 : piégeage des radicaux oxygénés par le DMPO

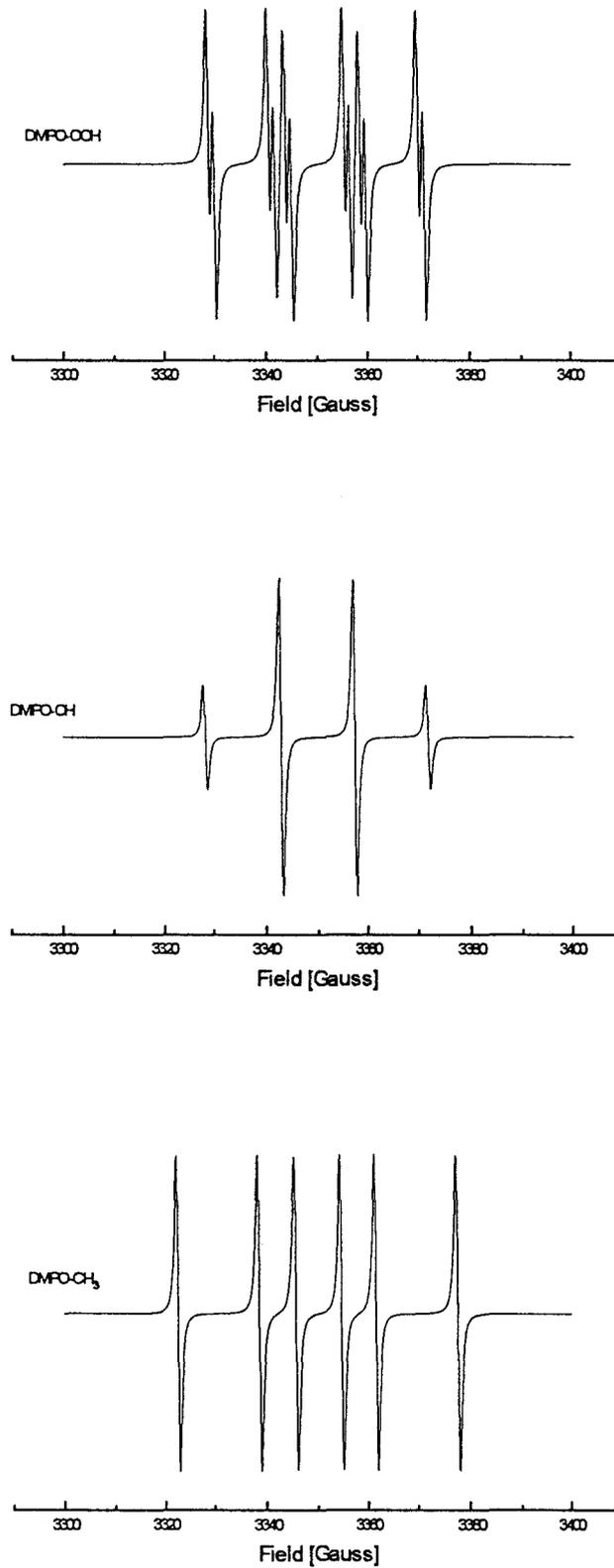


Figure 1.2 : Spectres RPE simulés des adduits DMPO-OOH, DMPO-OH, DMPO-CH₃

2. LES SALÈNES POLYHYDROXYLES A CUIVRE

Des expériences de « spin-trapping » en utilisant le DMPO ont été entreprises afin de détecter la formation d'espèces activées de l'oxygène suivant l'état d'oxydation du cuivre. Ces études ont donc été couplées à l'électrochimie.

Le DMPO utilisé est un produit commercial (Sigma Chemical Company). Alors que le DMPO, à l'état pur, est un solide incolore dont le point de fusion est de 25°C, le produit commercial est généralement un liquide présentant une coloration jaune. Il a été montré en RPE qu'il contient une impureté radicalaire (schéma 2.1) dont les constantes de couplage sont $A_N = 15,3 \text{ G}$ et $A_{H\beta} = 22 \text{ G}$ et qui pourrait être un dimère.

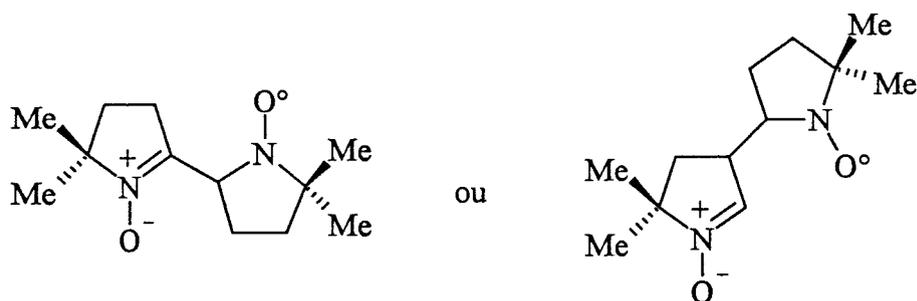


Schéma 2.1 : impuretés supposées dans le DMPO commercial

Avant utilisation, le DMPO commercial est donc distillé avec précaution, sous vide, est stocké par fractions dans des tubes conservés à -20 °C sous argon.

Des solutions de 2 mM de métallosalènes dans le DMSO ont été préparées. Des témoins comprenant uniquement du DMSO ont été réalisés à chaque expérience.

A ces solutions, on a ajouté un volume de DMPO afin d'obtenir une concentration finale en DMPO de 3,2 mM.

Les conditions opératoires sont les suivantes : constante de temps de 0,25 s, amplitude de modulation de 0,8 G, fréquence de modulation de 100 KHz, gain de $8 \cdot 10^4$, puissance de 10 mW et fréquence microonde de 9,4 GHz.

2.1. Etude à l'état d'oxydation naturel

En n'imposant aucun potentiel aux solutions des complexes 3a et 3c dans le DMSO à température ambiante, on observe (figure 2.1) le spectre RPE isotrope à quatre raies du cuivre II avec un ensemble de raies d'intensité faible superposées sur la raie du cuivre II à plus haut champ (correspondant à $m_I = +3/2$).

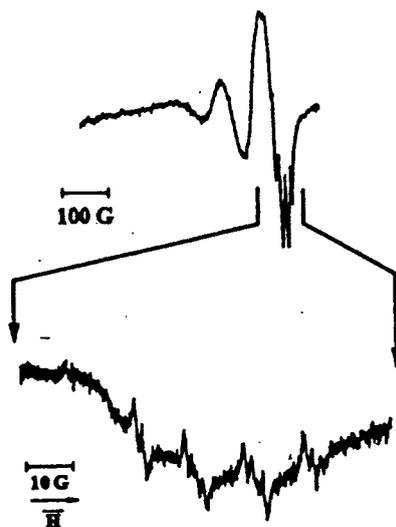


Figure 2.1 : spectre RPE de 3c (2mM) à l'état d'oxydation naturel en présence de DMPO (3,2 mM) dans une solution de DMSO à température ambiante. Les constantes de couplage hyperfin mesurées sont : $a_N = 14,35 \text{ G}$; $a_{H\beta} = 12,75 \text{ G}$; $a_{H\gamma} = 1,5 \text{ G}$

Une observation plus approfondie de cet ensemble (figure 2.1) révèle la présence de six raies dédoublées caractéristiques de l'adduit DMPO-OOH.

L'observation de cet adduit DMPO-OOH est la preuve de la formation, à l'état d'oxydation naturel, de radicaux superoxyde $O_2^{\circ-}$ pour les complexes 3a et 3c. Cette formation est faible étant donné l'intensité du signal observé. En revanche, aucun adduit n'a été détecté pour le complexe 3b : 3b ne forme donc pas de radicaux superoxyde $O_2^{\circ-}$ à l'état d'oxydation naturel.

Lorsqu'on répète l'expérience après un courant d'oxygène de la solution, l'intensité du signal de l'adduit DMPO-OOH augmente.

La même étude de « spin-trapping » à l'état d'oxydation naturel a été réalisée en remplaçant le DMSO par l'éthanol.

On observe (figure 2.2) de nouveau un ensemble de raies superposées sur la raie du cuivre II à plus haut champ pour 3a et 3c. L'observation plus approfondie de cet ensemble révèle, cette fois, un ensemble de six raies d'intensités pratiquement équivalentes et complètement différent de celui observé dans le DMSO.

Nous constatons que $a_N > a_{H\beta}$: le radical piégé est donc un radical oxygéné. Cependant les valeurs des constantes a_N et $a_{H\beta}$ exclut l'hypothèse d'un radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et hydroxyle HO^{\bullet} .

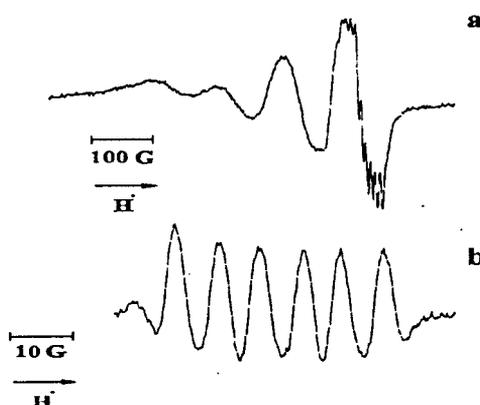


Figure 2.2 : spectre RPE de 3c (2mM) à l'état d'oxydation naturel en présence de DMPO (3,2 mM) dans une solution d'éthanol à température ambiante. Les constantes de couplage hyperfin de l'adduit, sont : $a_N = 13,0$ G et $a_{H\beta} = 7,7$ G

Un tel adduit du DMPO, avec des valeurs de constantes de couplage hyperfin identiques, a déjà été rencontré dans la littérature²³³ : il s'agit de l'adduit $DMPO-OOCu^{II}L$ ($a_N = 12,8$ G et $a_{H\beta} = 7,7$ G).

Nous proposons donc que le DMPO piège l'espèce $LCu^{II}O_2$, qui possède un électron célibataire, pour donner le spin-adduit $DMPO-OOCuL$. Comme le noyau de cuivre est éloigné de plus de trois liaisons du centre radicalaire que constitue le nitroxyde, il n'intervient pas dans le couplage hyperfin de l'adduit (schéma 2.2).

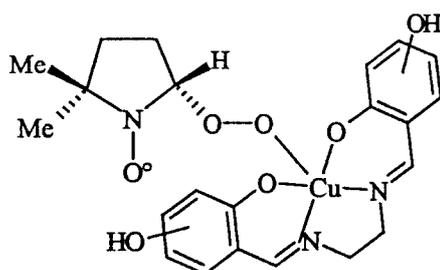


Schéma 2.2 : espèce DMPO-OOCuL pour 3a et 3c

D'autres arguments vont dans le sens de la formation d'une espèce $LCu^{II}O_2$ à l'état d'oxydation naturel :

- quand le DMPO est ajouté à une solution dégazée de 3a ou 3c, on n'observe pas la formation de l'adduit.
- Quand le DMPO est ajouté à une solution de 3a ou 3c sous courant d'oxygène, on observe de nouveau la formation de l'adduit et en même temps, le signal RPE du cuivre II a pratiquement disparu.

Comme le DMPO est incapable de former un adduit avec l'oxygène, la formation d'un adduit avec $LCu^{II}O_2$ montre l'augmentation du caractère radicalaire de l'oxygène lié au cuivre.

On peut se demander pourquoi un tel adduit n'a pas été détecté dans le DMSO. Une explication serait que l'affinité de l'oxygène avec le complexe augmente avec la polarité du solvant ($\epsilon_r = 0,62$ pour le DMSO et 0,88 pour l'éthanol). En effet, une stabilisation plus importante est attendue pour l'espèce superoxo dans un solvant de polarité plus grande. Ce phénomène de stabilisation a été observé pour des complexes de cobalt II avec différentes bases de Schiff²³³.

A l'état d'oxydation naturel et dans l'éthanol, les complexes 3a et 3c peuvent donc former un adduit de coordination avec l'oxygène que l'on notera $LCu^{II}O_2$. Dans de tels composés, il y a transfert plus ou moins partiel d'un électron du métal à l'oxygène, le cas limite étant la formation d'une espèce métal superoxo²³⁴⁻²³⁵ :



En résumé, nous avons observé à l'état d'oxydation naturel de 3a et 3c, la formation d'anions superoxyde en milieu aprotique et la formation d'une espèce métal-superoxo en milieu protique.

On peut regrouper ces deux observations dans le schéma suivant :

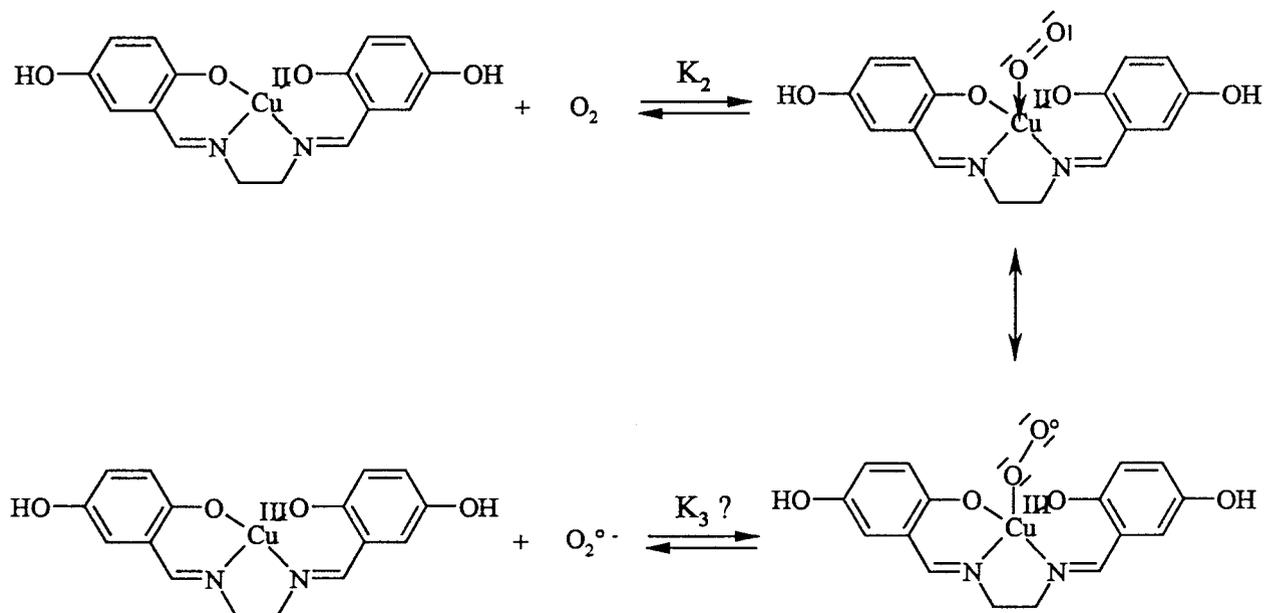
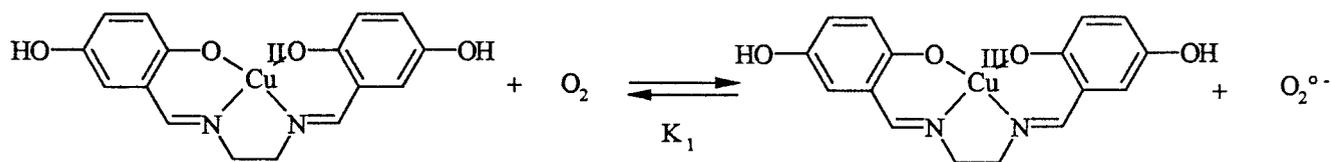


Schéma 2.3 : évolution du complexe 3c à l'état naturel
(mécanisme similaire pour 3a)

Celui-ci suppose la formation d'un premier équilibre entre le complexe cuivrique et le complexe superoxo à l'état naturel suivi d'un second équilibre pour tenir compte de la formation d'anions superoxyde.

On peut se demander s'il est possible que l'oxygène oxyde directement le cuivre II en cuivre III²³⁷? Avec les valeurs de potentiels de réduction des couples O₂/O₂^{•-} (-0,8 V vs SCE) et Cu^{III}/Cu^{II} (-0,13 V vs SCE pour 3c et -0,10 V vs SCE pour 3a), le calcul de la constante d'équilibre de la réaction 1 donne :



$$K = \exp\left[\frac{F}{RT}(E_{O_2/O_2^{\cdot-}}^0 - E_{Cu^{III}/Cu^{II}}^0)\right] = 10^{-12}$$

L'oxygène, en tant qu'espèce non coordonné avec le métal, est donc thermodynamiquement incapable d'oxyder le cuivre II. En d'autres termes, l'équilibre 3 est très défavorisé ($K_1 = K_2K_3$) : ceci expliquerait le faible signal de l'adduit DMPO-OOH observé à l'état d'oxydation naturel pour les complexes cuivriques 3a et 3c.

Une autre possibilité est que les anions superoxyde se forment par autooxydation des système ortho et para hydroquinoniques suivant la réaction :

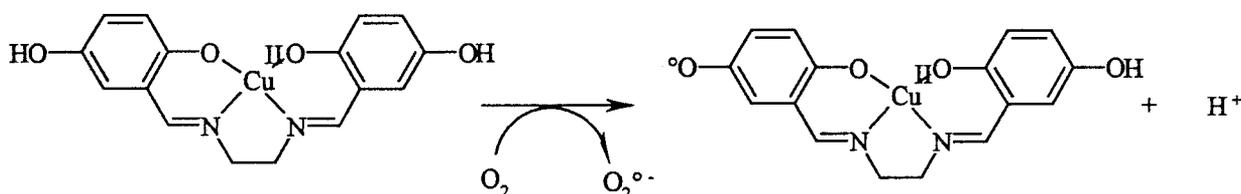


Schéma 2.4 : production de radicaux superoxyde par oxydation du système hydroquinonique de 3c (mécanisme similaire pour 3a)

2.2. Etude en milieu réducteur

En imposant un potentiel réducteur inférieur à $-1,4$ V à des solutions de complexes 3a, 3b et 3c, on observe la disparition (figure 2.3) du signal du cuivre II (réduction en cuivre I) et l'apparition d'un spectre de six raies caractéristiques de l'adduit DMPO-CH₃.



Figure 2.3 : spectre RPE de 3c (2mM) en présence de DMPO (3,2 mM) en milieu réducteur ($-1,4$ V) dans une solution de DMSO à température ambiante. Les constantes de couplage sont : $a_N = 14,7$ G et $a_{H\beta} = 21,0$ G

Cette présence de DMPO-CH₃ est la signature de la formation de radicaux hydroxyle HO° : ces radicaux hydroxyle décomposent le DMSO et forment des radicaux méthyle CH₃°.

Cette formation de radicaux hydroxyle pourrait s'expliquer par le schéma 2.5.

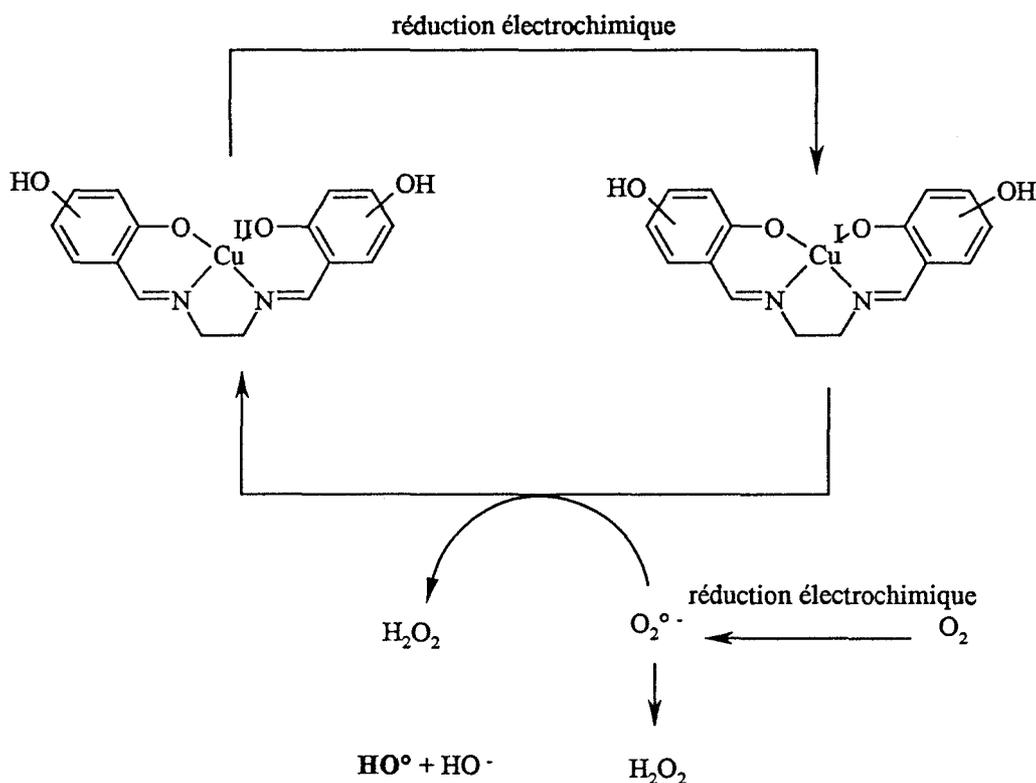


Schéma 2.5 : évolution des complexes en milieu réducteur

Il se forme par réduction électrochimique des anions superoxyde ($E(O_2/O_2^{\circ-}) = -0,8V$) et du cuivre I ($E(Cu^{II} \rightarrow Cu^I) \approx -1,4 V$). Ces anions superoxyde, soit se dismutent en peroxyde d'hydrogène, soit se réduisent grâce au cuivre I en peroxyde d'hydrogène. Les protons nécessaires lors de cette réaction sont apportés par l'eau résiduelle présent dans le DMSO (l'existence de cette eau résiduelle est confirmée en électrochimie). Le peroxyde d'hydrogène formé serait finalement réduit en radicaux hydroxyle en présence de cuivre I (réaction de type Fenton). Ce schéma réactionnel reprend celui de l'activation des nucléases à cuivre en milieu réducteur.

2.3. Etude en milieu oxydant

En imposant un potentiel oxydant supérieur à + 0,5 V, on observe (figure 2.4) la disparition du signal RPE du cuivre II et l'apparition d'un ensemble de 9 raies pour 3a et 3c.

Cet ensemble est caractéristique de l'adduit DMPO-H qui présente deux H_{β} isochrones : le signal RPE de cet adduit comprendra donc trois triplets (a_N) de trois raies d'intensité 1 : 2 : 1 ($a_{H\beta}$).



Figure 2.4 : spectre RPE de 3c (2mM) en présence de DMPO (3,2 mM) en milieu oxydant (+ 0,5 V) dans une solution de DMSO à température ambiante. Les constantes de couplage hyperfin sont : $a_N = 15,75$ G et $a_{H\beta} = 20,37$ G

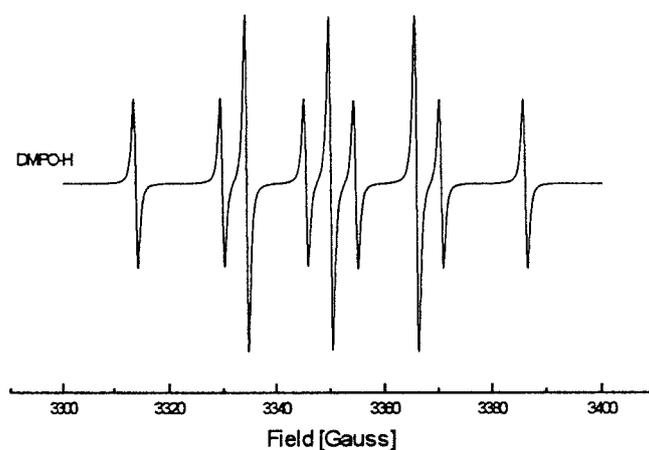


Figure 2.5 : spectre simulé de DMPO-H

Cet adduit prouve la formation de radicaux H° dans le milieu. Des contrôles réalisés dans le DMSO, l'éthanol et le méthanol pur et imposés à un potentiel de + 0,5 V n'ont pas donné lieu à un piégeage de radicaux H° . Les phénomènes d'artefacts étant éliminés, on peut

raisonnablement attribuer la présence de radicaux H° à la formation d'un radical semi-quinonique par coupure homolytique de la liaison O-H. Cette hypothèse est confortée par l'observation d'un faible signal de radical semi-quinonique à ce potentiel (figure 3.4 du chapitre 6).

On propose donc le schéma 2.6 pour tenir compte de ces observations expérimentales.

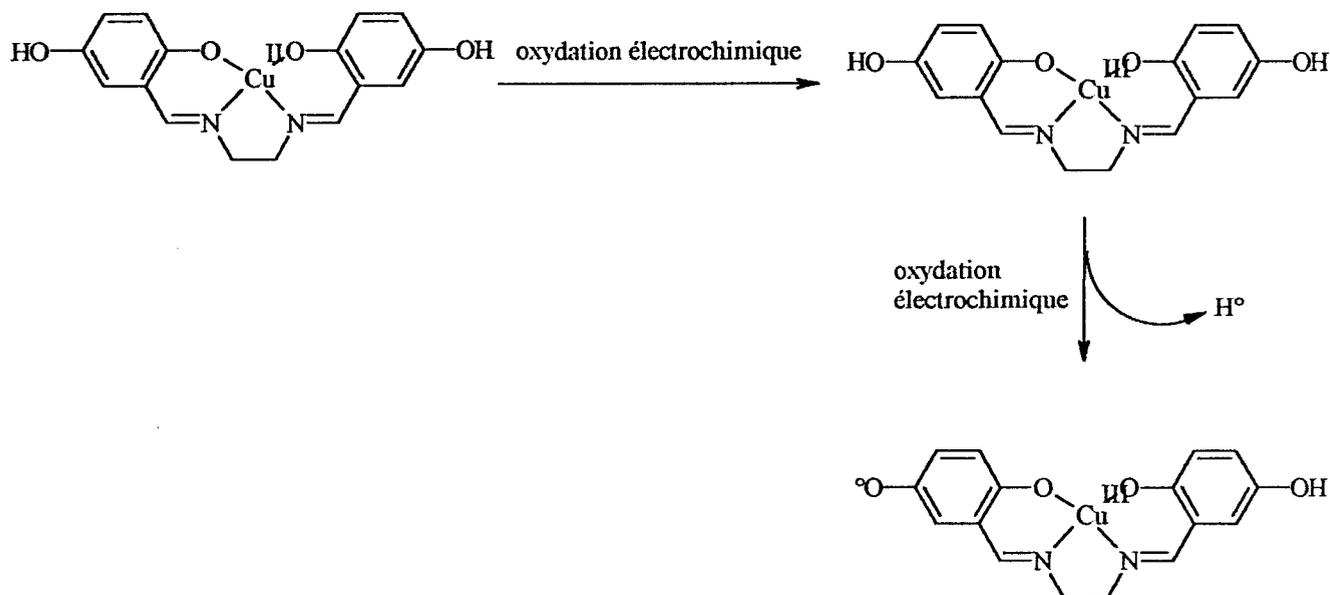


Schéma 2.6 : évolution du complexe 3c en milieu oxydant (mécanisme similaire pour 3a)

Dans un premier temps, le cuivre II est oxydé en cuivre III sans formation de radical semi-quinonique pour des potentiels compris entre 0 V et + 0,5 V. Puis, dans un deuxième temps, un radical semi-quinonique se forme pour des potentiels supérieurs à + 0,5 V.

2.4. Conclusion

Pour conclure, le tableau suivant réunit les différents radicaux piégés suivant le potentiel d'étude.

- 1,33 V	- 0,10 V	+ 0,55 V	3a
- 1,53 V	- 0,13 V	+ 0,45 V	3c
formation de HO°	formation de $O_2^{\circ-}$ et $LCu^{II}O_2$	-	formation de H°

Potentiel d'étude	Conclusion
Etat naturel	DMPO-OOH caractéristique de la présence de O_2° dans le DMSO
	DMPO-OOCuL caractéristique de la présence de $LCu^{II}O_2$ dans EtOH
$E < -1,4 V$	DMPO-CH ₃ caractéristique de la présence de HO° dans le DMSO
$E > +0,5 V$	DMPO-H caractéristique de la présence de H°

Tableau 2.1 : formation de radicaux libres oxygénés suivant l'état d'oxydation du métal pour 3a et 3c.

3. SALENES POLYHYDROXYLES A FER

Afin d'identifier la formation éventuelle de radicaux libres à l'état d'oxydation naturel et en milieu réducteur de ces complexes, des expériences de marquage de spin avec le DMPO ont été entreprises. Etant donné que les états d'oxydation de ces complexes n'ont pas été totalement déterminés, ces études de spin-trapping n'ont pas été couplé à l'électrochimie.

Des solutions de 2 mM de complexes ferriques dans un mélange méthanol/tampon ont été préparées. Des témoins comprenant uniquement le milieu d'étude ont été réalisés à chaque manipulation. A ces solutions, on a ajouté un volume de DMPO afin d'obtenir une concentration finale en DMPO de 3,2 mM.

A l'état d'oxydation naturel, aucune espèce radicalaire n'a été piégée en présence d'ADN.

En présence de soude et de DMPO, le radical semi-quinonique est observé dans un premier temps pour 6c. Puis celui-ci disparaît peu à peu pour laisser la place au signal RPE d'un adduit avec le DMPO. Cet adduit qui présente six raies (figure 3.1) est caractéristique de la présence dans le milieu de l'espèce MeO^\bullet . A l'état d'oxydation naturel, 6c est donc capable d'oxyder le méthanol du milieu vraisemblablement via la formation d'une semi-quinone.

A l'état réduit (ajout de DTT) et en présence de DMPO/DMSO, on détecte la formation de l'adduit DMPO-OH qui est issu de la décomposition de DMPO-OOH (figure 3.2). En milieu réducteur (DTT), 6c forme donc des radicaux superoxyde.

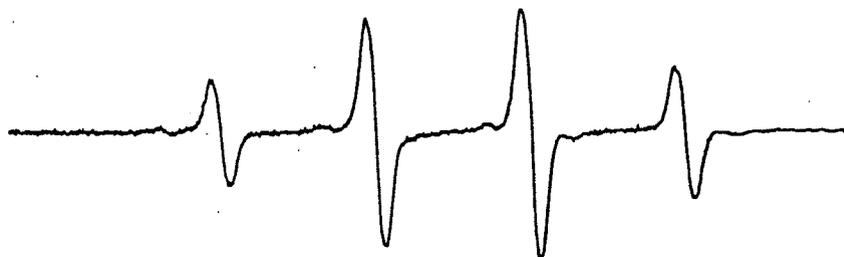


Figure 3.2 : spin-trapping de 6c (2 mM) en présence de DMPO/DMSO à température ambiante en milieu réducteur (DTT). Les constantes de couplage sont : $a_N = a_H = 15,2 \text{ G}$

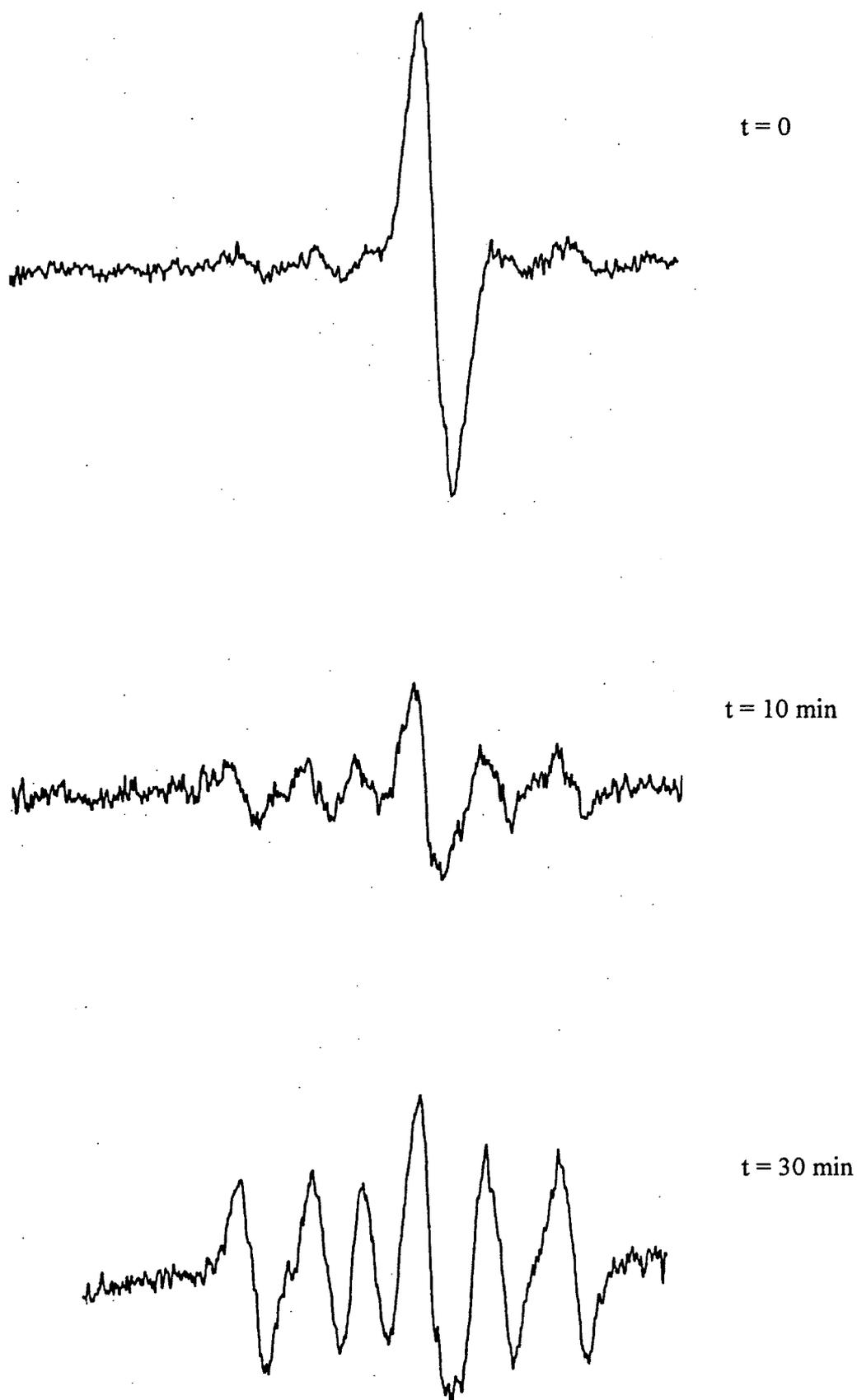


Figure 3.1 : signaux RPE au cours du temps de 6c (2 mM) en présence de soude et de DMPO (3,2 mM) dans une solution à température ambiante.

CONCLUSION

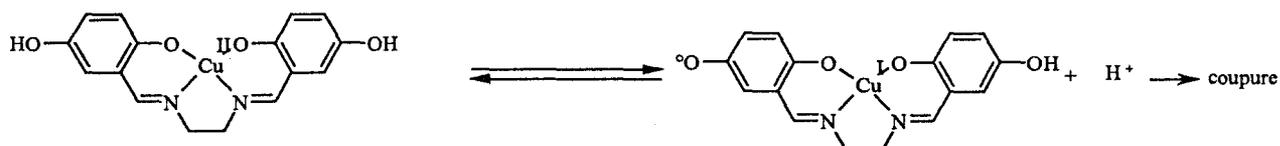
L'objectif de ces diverses études physico-chimiques est d'expliquer l'activité nucléasique observée à l'état d'oxydation naturel et en milieu aérobie pour les complexes 3a et 3c. En effet, dans des conditions physiologiques et en présence uniquement d'oxygène, ces complexes peuvent couper l'ADN sans activation chimique, électrochimique ou photochimique.

En toute rigueur, les études de RPE et d'électrochimie auraient dues être réalisées dans un mélange DMSO/tampon identique aux expériences de coupure.

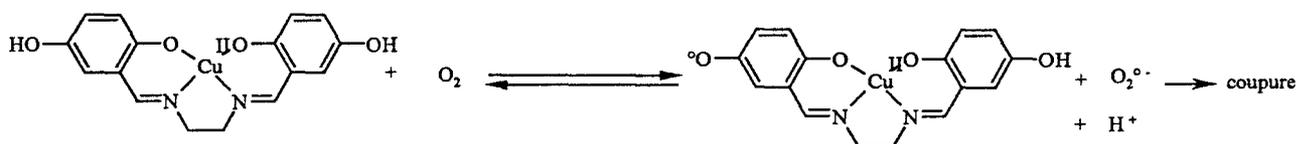
Mais pour des raisons techniques, ceci ne fut pas possible car la solubilité limitée des complexes de cuivre dans l'eau est relativement faible. Dans le mélange eau-DMSO utilisé lors des expériences de coupure de plasmide, on ne peut pas dépasser la concentration de $80\mu\text{M}$. Or des concentrations de l'ordre du millimolaire se sont révélées nécessaires pour l'étude RPE et voltammétrique. De telles concentrations sont atteintes uniquement dans le DMSO.

En émettant toutes les réserves qui s'imposent lorsqu'on transpose les propriétés physico-chimiques observées dans le DMSO à celles supposées dans un milieu eau-DMSO, on peut envisager trois hypothèses pour expliquer l'activité nucléasique observée à l'état naturel pour les complexes 3a et 3c (schéma 1.1).

hypothèse 1



hypothèse 2



hypothèse 3

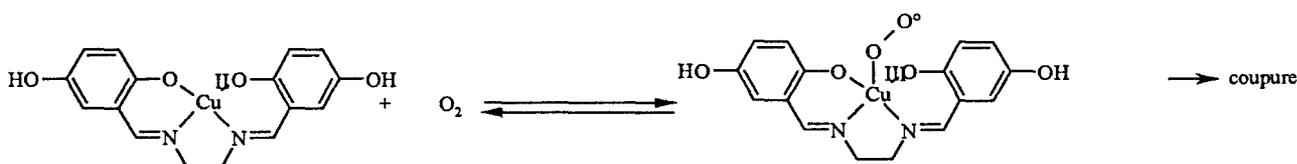


Schéma 1.1 : hypothèses envisagées pour expliquer l'activité nucléasique pour 3c
(mécanisme similaire pour 3a)

La première hypothèse, celle émise au tout début de ce mémoire, concerne la réduction du cuivre II en cuivre I par le ligand salénique comportant un système ortho ou para hydroquinonique. Cette hypothèse a déjà été émise pour quelques auto-nucléases. Cependant, nous avons vu que le ligand salénique stabilise fortement le degré d'oxydation II du cuivre. Une réduction par le système hydroquinonique semble donc peu probable. D'autre part, aucune observation de radicaux semi-quinonique n'a été faite à l'état d'oxydation naturel des complexes 3a et 3c²³⁷⁻²³⁸ (le cuivre I, diamagnétique, ne peut pas empêcher son observation). De plus, il ne faut pas oublier la présence de DMSO dans le milieu tampon (le DMSO est connu pour être un piègeur de radicaux hydroxyle). Une coupure par des radicaux hydroxyle libres semble donc exclut.

La deuxième hypothèse concerne la réduction de l'oxygène en anion superoxyde par le système ortho ou para hydroquinonique porté par le ligand salénique.

Une production faible d'anions superoxyde a effectivement été observée à l'état d'oxydation naturel des complexes 3a et 3c. Cependant l'anion superoxyde O_2° n'est pas connu pour ses propriétés nucléasiques : 520 μ M d'une solution de KO_2 dans le DMSO en présence d'éther couronne 18-C-6 pour la solubilisation, ne produit aucune coupure sur plasmide²³⁹. D'autre part, cette hypothèse est en parfaite contradiction avec l'absence d'activité nucléasique observée pour les ligands saléniques à l'état naturel.

La troisième et dernière hypothèse concerne la formation d'un adduit avec l'oxygène dont une des formes mésomères limites est l'espèce superoxo. Une telle espèce a été effectivement observée en milieu polaire. Or Burrows et al²³⁹ ont déjà émis l'hypothèse d'une activité nucléasique pour un complexe de type $LNi^{II}O_2$. Il n'est donc pas déraisonnable de penser qu'à l'instar de $LNi^{II}O_2$, l'espèce $LCu^{II}O_2$ exerce une activité nucléasique.

Quant aux salènes polyhydroxylés à fer, ils sont, à notre connaissance, le premier exemple de salènes complexés par le fer possédant des propriétés nucléasiques. Il a été montré que le complexe 6c possède la plus grande activité nucléasique dans la série des salènes

polyhydroxylés à fer et que, de plus, et il faut le souligner, il peut être utilisé comme agent de footprinting. En effet, les métalloalènes possèdent en général des propriétés nucléasiques plus faibles que les agents de footprinting usuels comme Fe(EDTA) et n'ont jamais été utilisés en footprinting. A notre connaissance, le complexe 6c serait le premier métalloalène à pouvoir être utilisé de cette manière.

Dans un avenir proche, nous nous proposons de modifier le squelette salénique, tout en gardant le système ortho ou para hydroquinonique, pour rendre les complexes plus solubles et s'abstenir de la présence de DMSO.

Une possibilité, parmi d'autres, est d'introduire une queue hydrophile sur le pont diamine (schéma 2.2).

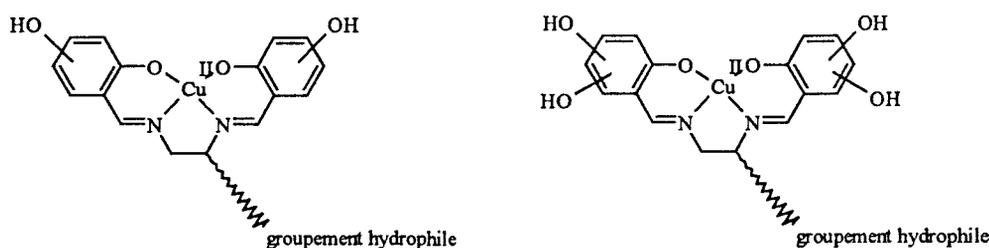
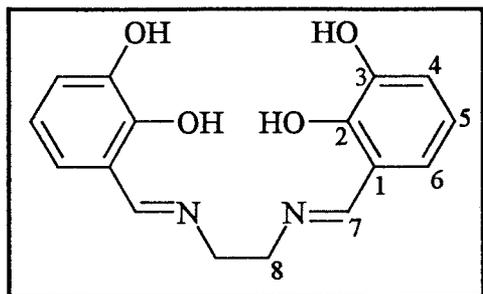


Schéma 2.2 : Salènes polyhydroxylés hydrosolubles à cuivre

Nous envisageons aussi d'étudier l'activité catalytique de ces complexes. En effet, il n'est pas déraisonnable de penser que de tels complexes puissent catalyser l'oxydation de substrats comme le toluène.

PARTIE EXPERIMENTALE

- Les dérivés hydroxylés de l'aldéhyde salicylique, le chlorure ferreux $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ proviennent d'Aldrich et ont été utilisés sans purification préalable.
- L'éthylènediamine provient de Merck et a été utilisé sans purification préalable.
- Les solvants éthanol et méthanol utilisés sont des solvants de pureté commerciale et ont été séchés sur magnésium en présence d'iode puis distillés sous argon avant emploi.
- Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur plaques de silice 60 F₂₅₄ d'épaisseur 0,2 mm, de référence 5735 Merck. Le solvant d'élution dépend des composés et est indiqué pour chaque cas. La révélation des plaques CCM est faite sous lumière ultraviolette à 254 nm, sous vapeurs d'iode saturées et à la ninhydrine 0,1% dans le méthanol pour les composés azotés.
- Les spectres Infra-Rouge (IR) ont été réalisés sur un appareil Perkin-Elmer 881 en utilisant des pastilles de KBr comme support inerte. Les longueurs d'onde ν sont exprimées en cm^{-1} . Seuls les pics principaux sont indiqués.
- Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ^1H et ^{13}C ont été réalisés sur un appareil BRÜKER 300 NB (300 MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au Triméthylsilane (TMS) pris comme étalon interne. Les constantes de couplage (J) sont données en Hertz. Ont été utilisées comme abréviations s (singulet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet dédoublé), m (multiplet).
- Les spectres de masse en Impact Electronique ont été réalisés sur un spectromètre quadripolaire RIBERMAG R 10-10 fonctionnant à 70 eV. Les spectres de masse en « Mass Absorption Laser Desorption Ionisation » positifs ou négatifs (MALDI⁺ ou MALDI⁻) sont réalisés sur un spectromètre Finigan MAT Vision 2000 (Bremen). La matrice utilisée est un mélange eau / acide dihydroxybenzoïque
- Les points de fusion (mp) ont été mesurés sur une plaque Thermopan et n'ont pas été corrigés.

N, N' -bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine (2a)

Une solution de 1,88 g (13,61 mmol) de 2,3-dihydroxybenzaldéhyde et 0,40 g (6,66 mmol) d'éthylènediamine dans le toluène (150 ml) est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 3 h dans un montage de type Dean-Stark. Après retour à température ambiante, la suspension est filtrée sur verre fritté, lavée à l'éthanol (2 x 10 ml) et séchée à l'éther (2 x 10 ml) pour donner la base de Schiff correspondante.

CCM : $R_f = 0,78$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

Rendement : 98% (1,96 g d'un solide orange)

Mp (°C) : > 230 °C

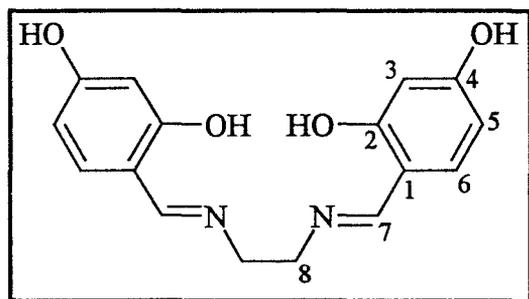
MS (MALDI⁺) : $(M + H)^+ = 301,4$; $(M + Na)^+ = 323,5$

¹H RMN (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 3,92 (s, 4H, H₈) ; 6,64 (t, 2H, $J = 7,6-7,8$ Hz, H₅) ; 6,83 (m, 4H, H₄ et H₆) ; 8,54 (s, 2H, H₇) ; 12,80 (OH)

¹³C RMN (DMSO-d₆, δ ppm) : 58,04 (CH₂) ; 117,69 (CH) ; 117,76 (CH) ; 118,20 (C_q) ; 121,86 (CH) ; 145,85 (C_q) ; 151,10 (C_q) ; 167,19 (CH)

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 3400 (OH) ; 1630 (imine) ; 1540 ; 1460 ; 1380 ; 1280 ; 1240 ; 1200 ; 1020 ; 900 ; 860 ; 790 ; 740

N, N' –bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine (2b)



Une solution de 1,88 g (13,61 mmol) de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde et 0,40 g (6,66 mmol) d'éthylènediamine dans le toluène (150 ml) est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 3 h dans un montage de type Dean-Stark. Après retour à température ambiante, la suspension est filtrée sur verre fritté, lavée à l'éthanol (2 x 10 ml) et séchée à l'éther (2 x 10 ml) pour donner la base de Schiff correspondante.

CCM : $R_f = 0,56$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

Rendement : 97% (1,94 g d'un solide orange)

Mp (°C) : > 230 °C

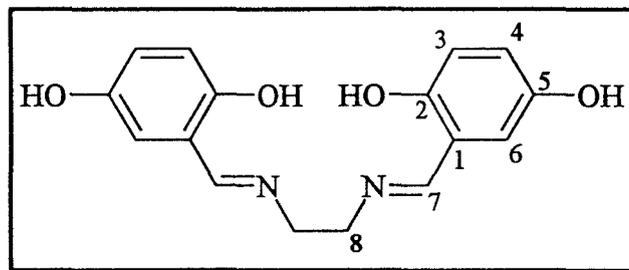
MS (MALDI⁺) : $(M + H)^+ = 301,4$; $(M + Na)^+ = 323,5$

¹H RMN (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz, TMS) : 3,76 (s, 4H, H₈) ; 6,14 (d, 2H, $J_{H_3H_5} = J_{H_5H_3} = 2,2$ Hz, H₃) ; 6,24 (dd, 2H, $J_{H_5H_3} = J_{H_3H_5} = 2,2$ Hz et $J_{H_5H_6} = J_{H_6H_5} = 8,3$ Hz ; H₅) ; 7,15 (d, 2H, $J_{H_6H_5} = J_{H_5H_6} = 8,3$ Hz ; H₆) ; 8,35 (s, 2H, H₇) ; 12,60 (OH)

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, δ ppm) : 57,66 (CH₂) ; 102,58 (CH) ; 106,96 (CH) ; 111,12 (C_q) ; 133,39 (CH) ; 161,97 (C_q) ; 164,63 (C_q) ; 165,80 (CH)

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 2800 (OH) ; 1640 (imine) ; 1580 ; 1500 ; 1480 ; 1360 ; 1280 ; 1240 ; 1210 ; 1160 ; 1120 ; 1000 ; 980 ; 840 ; 800 ; 610

N, N' –bis(5-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine (2c)



Une solution de 1,88 g (13,61 mmol) de 2,5-dihydroxybenzaldéhyde et 0,40 g (6,66 mmol) d'éthylènediamine dans le toluène (150 ml) est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 3 h dans un montage de type Dean-Stark. Après retour à température ambiante, la suspension est filtrée sur verre fritté, lavée à l'éthanol (2 x 10 ml) et séchée à l'éther (2 x 10 ml) pour donner la base de Schiff correspondante.

CCM : $R_f = 0,90$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

Rendement : 97% (1,93 g d'un solide orange)

Mp (°C) : > 230 °C

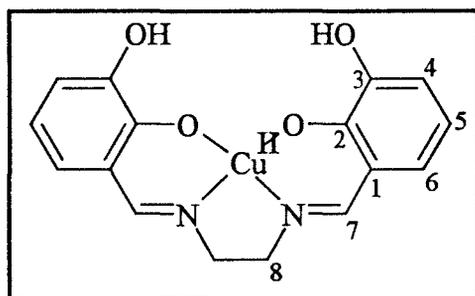
MS (MALDI⁺) : $(M + H)^+ = 301,4$; $(M + \text{Na})^+ = 323,5$; $(M + \text{K})^+ = 339,4$

¹H RMN (DMSO-*d*₆, δ ppm, *J* Hz, TMS) : 3,86 (s, 4H, H₃) ; 6,67-6,79 (m, 6H, H₃, H₄, H₆) ; 8,46 (s, 2H, H₇) ; 8,97 (OH) ; 12,51 (OH)

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, δ ppm) : 59,03 (CH₂) ; 116,47 (CH) ; 116,85 (CH) ; 118,50 (C_q) ; 119,88 (CH) ; 149,27 (C_q) ; 152,99 (C_q) ; 166,33 (CH)

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 3320(OH) ; 1640 (imine) ; 1600 ; 1510 ; 1450 ; 1410 ; 1310 ; 1260 ; 1220 ; 1180 ; 1040 ; 970 ; 860 ; 840 ; 800 ; 680

N, N' –bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine cuivre (II) (3a)



Une solution de 0,250 g (0,83 mmol) de N,N'-bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 20 ml d'éthanol sec avec 0,170 g (0,83 mmol) d'acétate de cuivre II monohydraté $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ solubilisé dans 2 ml d'eau est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 2 h. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe cuivrique correspondant.

CCM : $R_f = 0,74$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

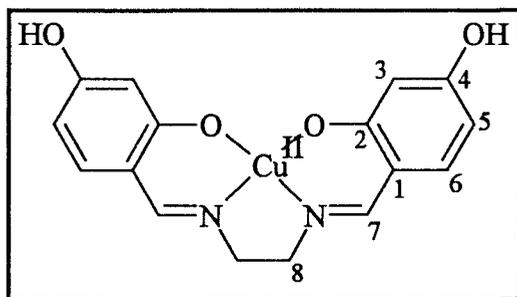
Rendement : 70% (0,211 g d'un solide brun)

Mp (°C) : > 230 °C

MS (MALDI⁺) : $(M + \text{H})^+ = 362,3$; $(M + \text{Na})^+ = 384,4$; $(M + 3\text{H} - \text{Cu})^+ = 301,4$

¹H RMN (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : pic d'allure gaussienne dans la région des hydrogènes aromatiques en raison du paramagnétisme du cuivre II.

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 3400 (OH) ; 1620 (imine) ; 1550 ; 1450 ; 1400 ; 1310 ; 1220 ; 870 ; 740 ; 620

N, N' –bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine cuivre (II) (3b)

Une solution de 0,250 g (0,83 mmol) de N,N'-bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 20 ml d'éthanol sec avec 0,170 g (0,83 mmol) d'acétate de cuivre II monohydraté $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ solubilisé dans 2 ml d'eau est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 2 h. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe cuivrique correspondant.

CCM : $R_f = 0,68$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

Rendement : 89% (0,268 g d'un solide violet)

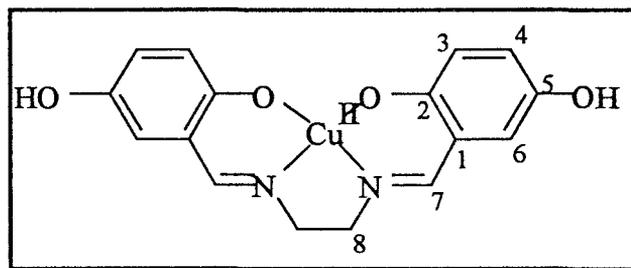
Mp (°C) : > 230 °C

MS (MALDI⁺) : $(M + H)^+ = 362,1$; $(M + \text{Na})^+ = 384,2$; $(M + \text{K})^+ = 400,2$; $(M + 3.H - \text{Cu})^+ = 301,2$

¹H RMN (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : pic d'allure gaussienne dans la région des hydrogènes aromatiques en raison du paramagnétisme du cuivre II.

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 3400 (OH) ; 1620 (imine) ; 1540 ; 1440 ; 1340 ; 1220 ; 1180 ; 1130 ; 990 ; 850 ; 800 ; 650

N, N' –bis(5-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine cuivre (II) (3c)



Une solution de 0,250 g (0,83 mmol) de N,N'-bis(5-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 20 ml d'éthanol sec avec 0,170 g (0,83 mmol) d'acétate de cuivre II monohydraté $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ solubilisé dans 2 ml d'eau est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 2 h. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe cuivrique correspondant.

CCM : $R_f = 0,52$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

Rendement : 86% (0,259 g d'un solide noir)

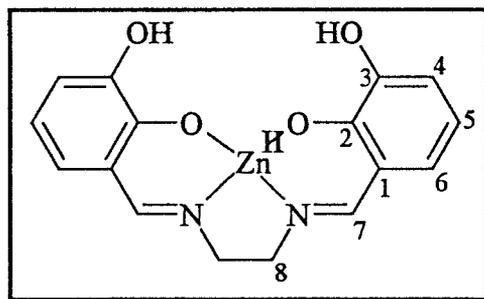
Mp (°C) : > 230 °C

MS (MALDI⁺) : $(M + H)^+ = 361,5$; $(M + 3.H - \text{Cu})^+ = 301,3$

¹H RMN (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz, TMS) : pic d'allure gaussienne dans la région des hydrogènes aromatiques en raison du paramagnétisme du cuivre II.

IR (KBr, $\nu \text{ cm}^{-1}$) : 3200 (OH) ; 1630 (imine) ; 1540 ; 1460, 1400, 1370, 1320, 1220, 1150, 1080, 970, 860, 840, 800



N, N' –bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine zinc (II) (4a)

Une solution de 0,250 g (0,83 mmol) de N,N'-bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 20 ml d'éthanol sec avec 0,183 g (0,83 mmol) d'acétate de zinc II dihydraté $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solubilisé dans 2 ml d'eau est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 2 h. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe de zinc II correspondant.

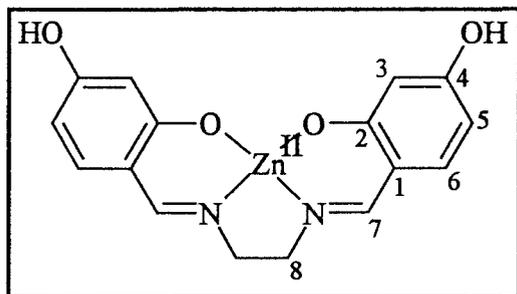
CCM : $R_f = 0,60$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

Rendement : 90% (0,276 g d'un solide jaune)

Mp (°C) : > 230 °C

MS (MALDI⁺) : $(M + H)^+ = 364,5$; $(M + \text{Na})^+ = 385,4$

IR (KBr, $\nu \text{ cm}^{-1}$) : 3400 (OH) ; 1620 (imine) ; 1560 ; 1450 ; 1400 ; 1340 ; 1320 ; 1280 ; 1220 ; 1200 ; 880 ; 740 ; 630

N, N' –bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine zinc (II) (4b)

Une solution de 0,250 g (0,83 mmol) de N,N'-bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 20 ml d'éthanol sec avec 0,183 g (0,83 mmol) d'acétate de zinc II dihydraté $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ solubilisé dans 2 ml d'eau est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 2 h. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe de zinc II correspondant.

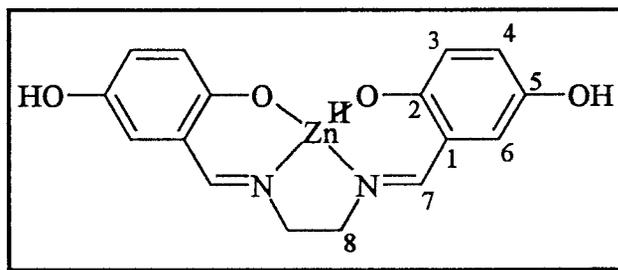
CCM : $R_f = 0,50$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

Rendement : 92% (0,280 g d'un solide jaune)

Mp (°C) : > 230 °C

MS (MALDI⁺) : $(M + H)^+ = 364,4$; $(M + Na)^+ = 385,6$

IR (KBr, ν cm^{-1}) : 3400 (OH) ; 1620 (imine) ; 1540 ; 1460 ; 1360 ; 1240 ; 1190 ; 1130 ; 990 ; 840 ; 800 ; 660

N, N' –bis(5-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine zinc (II) (4c)

Une solution de 0,250 g (0,83 mmol) de N,N'-bis(5-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 20 ml d'éthanol sec avec 0,183 g (0,83 mmol) d'acétate de zinc II dihydraté $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solubilisé dans 2 ml d'eau est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 2 h. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe de zinc II correspondant.

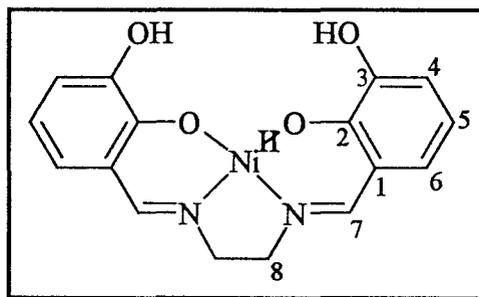
CCM : $R_f = 0,60$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

Rendement : 91% (0,276 g d'un solide jaune)

Mp ($^\circ\text{C}$) : > 230 $^\circ\text{C}$

MS (MALDI⁺) : $(M + H)^+ = 364,5$; $(M + \text{Na})^+ = 385,4$

IR (KBr, ν cm^{-1}) : 3400 (OH) ; 1610 (imine) ; 1540 ; 1440 ; 1400 ; 1320 ; 1300 ; 1250 ; 1220 ; 1170 ; 1130 ; 1100 ; 950 ; 860 ; 820 ; 790

N, N' –bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine nickel (II) (5a)

Une solution de 0,250 g (0,83 mmol) de N,N'-bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 20 ml d'éthanol sec avec 0,207 g (0,83 mmol) d'acétate de nickel II tétrahydraté $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ solubilisé dans 2 ml d'eau est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 1 h. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe de nickel II correspondant.

CCM : R_f = trainée (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

Rendement : 82% (0,244 g d'un solide marron)

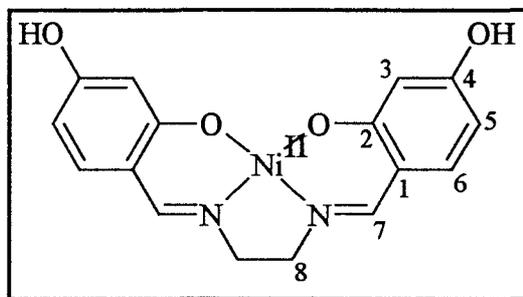
Mp (°C) : > 230 °C

MS (MALDI⁺) : $(M + \text{H})^+ = 357,0$; $(M + \text{Na})^+ = 379,1$; $(M + \text{K})^+ = 394,8$

¹H RMN (DMSO-d₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 3,4 (4H, mal résolu, H₈) ; 6,4 (2H, mal résolu, H₃) ; 6,7 (4H, mal résolu, H₄ et H₆) ; 7,9 (2H, mal résolu, H₇) ; 8,4 (2H, mal résolu, OH)

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 3400 (OH) ; 1620 (imine) ; 1560 ; 1450 ; 1400 ; 1340 ; 1320 ; 1280 ; 1220 ; 1200 ; 880 ; 740 ; 630

N, N' -bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine nickel (II) (5b)



Une solution de 0,250 g (0,83 mmol) de N,N'-bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 20 ml d'éthanol sec avec 0,207 g (0,83 mmol) d'acétate de nickel II tétrahydraté $\text{Ni}(\text{OAc})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ solubilisé dans 2 ml d'eau est portée à reflux sous agitation vigoureuse pendant 1 h. Après retour à température ambiante, la solution est filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe de nickel II correspondant.

CCM : $R_f = 0,68$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

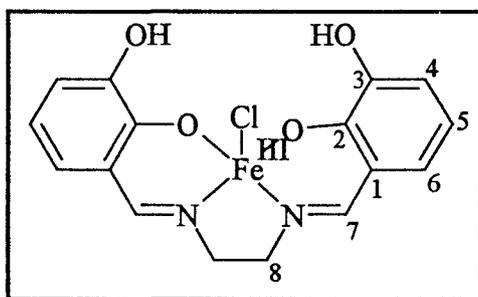
Rendement : 69% (0,204 g d'un solide rouge)

Mp (°C) : > 230 °C

MS (MALDI⁺) : $(M + H)^+ = 356,9$; $(M + \text{Na})^+ = 378,9$; $(M + \text{K})^+ = 394,8$

¹H RMN (DMSO-*d*₆, δ ppm, J Hz, TMS) : 3,26 (4H, mal résolu, H₈) ; 6,03 (4H, mal résolu, H₃ et H₅) ; 7,03 (2H, mal résolu, H₆) ; 7,58 (2H, mal résolu, H₇) ; >12 (OH)

IR (KBr, ν cm⁻¹) : 3400 (OH) ; 1620 (imine) ; 1540 ; 1460 ; 1360 ; 1240 ; 1190 ; 1130 ; 990 ; 840 ; 800 ; 660

N, N' –bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine fer (III) (6a)

Sous argon, à une solution de 0,500 g (1,66 mmol) de N, N' –bis(3-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 30 ml d'éthanol anhydre et dégazé et 5 ml d'acétone anhydre et dégazé, est ajoutée 0,298 g (1,70 mmol) de chlorure de fer II tétrahydrate $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. La suspension solide est portée à reflux pendant 1h sous agitation vigoureuse. Après retour à température ambiante, la solution est oxydée 10 minutes par un bullage d'air. La solution est ensuite filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe de fer III correspondant.

CCM : $R_f = 0$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

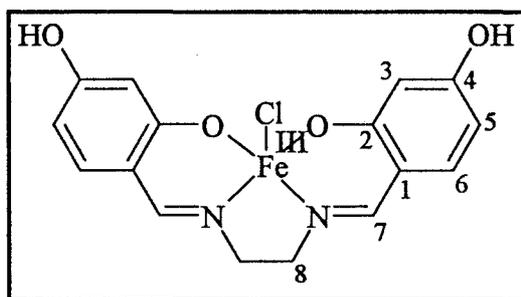
Rendement : 82% (0,531 g d'un solide noir)

Mp (°C) : > 230 °C

MS (MALDI⁺) : $(M - \text{Cl})^+ = 354,2$

IR (KBr, $\nu \text{ cm}^{-1}$) : 3400 (OH) ; 1640 (imine) ; 1600 ; 1540 ; 1480 ; 1450 ; 1250 ; 1220 ; 1080 ; 1040 ; 1020 ; 860 ; 790 ; 750

N, N' –bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine fer (III) (6b)



Sous argon, à une solution de 0,500 g (1,66 mmol) de N, N' –bis(4-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 30 ml d'éthanol anhydre et dégazé et 5 ml d'acétone anhydre et dégazé, est ajoutée 0,298 g (1,70 mmol) de chlorure de fer II tétrahydrate $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. La suspension solide est portée à reflux pendant 1h sous agitation vigoureuse. Après retour à température ambiante, la solution est oxydée 10 minutes par un bullage d'air. La solution est ensuite filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe de fer III correspondant.

CCM : $R_f = 0$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

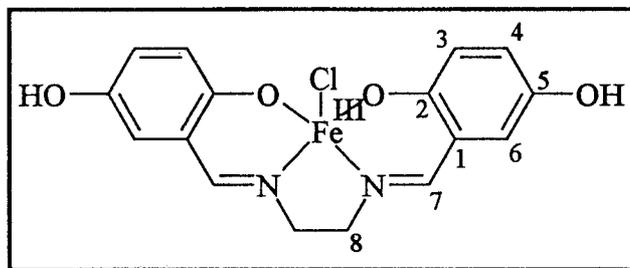
Rendement : 77% (0,500 g d'un solide noir)

Mp ($^\circ\text{C}$) : > 230 $^\circ\text{C}$

MS (MALDI⁺) : $(M - \text{Cl})^+ = 354,0$

IR (KBr, $\nu \text{ cm}^{-1}$) : 3400 (OH) ; 1600 (imine) ; 1540 ; 1500 ; 1390 ; 1340 ; 1220 ; 1180 ; 1140 ; 1030 ; 1010 ; 990 ; 850 ; 810 ; 640

N, N' –bis(5-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine fer (III) (6c)



Sous argon, à une solution de 0,500 g (1,66 mmol) de N, N' –bis(5-hydroxysalicylidène)-éthylènediamine dans 30 ml d'éthanol anhydre et dégazé et 5 ml d'acétone anhydre et dégazé, est ajoutée 0,298 g (1,70 mmol) de chlorure de fer II tétrahydrate $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$. La suspension solide est portée à reflux pendant 1h sous agitation vigoureuse. Après retour à température ambiante, la solution est oxydée 10 minutes par un bullage d'air. La solution est ensuite filtrée sur verre fritté puis lavée avec de l'eau (3 x 10 ml), du méthanol (3 x 10 ml) et séchée à l'éther diéthylique (3 x 10 ml) pour donner le complexe de fer III correspondant.

CCM : $R_f = 0$ (éluant : CH_2Cl_2 80 / MeOH 20)

Rendement : 90% (0,579 g d'un solide noir)

Mp ($^\circ\text{C}$) : > 230 $^\circ\text{C}$

MS (MALDI⁺) : $(M + \text{Cl} + \text{EtOH})^+ = 435,3$

IR (KBr ; $\nu \text{ cm}^{-1}$) : 3400 (OH) ; 1620 (imine) ; 1600 ; 1560 ; 1540 ; 1470 ; 1440 ; 1380 ; 1320 ; 1280 ; 1250 ; 1220 ; 1160 ; 1020 ; 880 ; 820 ; 800

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 ETIENNE J.
Biochimie Génétique et Biologie Moléculaire
Masson (4^{ème} édition) – 1998
- 2 LIPPARD S.J. et BERG J.M.
Principes de Biochimie Minérale
De Boek Université – 1997
- 3 BOCCARA M. et VERDIERE – SAHUQUE M.
Les Acides Nucléiques
Diderot Editeur – 1998
- 4 DICKERSON R.
Les Doubles Hélices d'ADN et les Informations Génétiques
Pour la Science, 1984, 76, 20-37
- 5 KENNARD O. and HUNTER W.N.
Single-Crystal X-Ray Diffraction Studies of Oligonucleotides and
Oligonucleotide-Drug Complexes
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1991, 30, 1254-1277
- 6 CHOW C.S. and BOGDAN F.M.
A Structural Basis for RNA-Ligand Interactions
Chem. Rev., 1997, 97, 1489-1513
- 7 OIVANEN M., KUUSELA S., LÖNNBERG H.
Kinetics and Mechanisms for the Cleavage and Isomerization of the
Phosphodiester Bonds of RNA by Brønsted Acids and Bases
Chem. Rev., 1998, 98, 961-990
- 8 PERREAULT D.M. and ANSLYN E.V.
Unifying the Current Data on the Mechanism of Cleavage-Transesterification of
RNA
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1997, 36, 432-450
- 9 RAWN J.D.
Traité de Biochimie
De Boek, 1990, 693-697
- 10 KESSLER C. and MANTA V.
Specificity of Restriction Endonucleases and DNA Modification
Methyltransferases : a Review (edition 3)
Gene, 1990, 92 (1-2), 1-248

- 11 COWAN J.A.
Metal Activation of Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry
Chem. Rev., 1998, 98, 1067-1087
- 12 RAINES R.T.
Ribonuclease A
Chem. Rev., 1998, 98, 1045-1065
- 13 WILCOX D. E.
Binuclear Metallohydrolases
Chem. Rev., 1996, 96, 2449-2453
- 14 PRATVIEL G., BERNADOU J., MEUNIER B.
DNA and RNA Cleavage by Metal Complexes
Adv. Inorg. Chem., 1998, 45, 251-312
- 15 STEITZ T.A. and STEITZ J.-A.
A General Two-Metal-Ion Mechanism for Catalytic RNA
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90 (14), 6498-6502
- 16 KUIMELIS R. G. and McLAUGHLIN L.W.
Mechanisms of Ribosyme-Mediated RNA Cleavage
Chem. Rev., 1998, 98, 1027-1044
- 17 ZHOU D.M. and TAIRA K.
The Hydrolysis of RNA : from Theoretical Calculations to the Hammerhead
Ribozyme-Mediated Cleavage of RNA
Chem. Rev., 1998, 98, 991-1026
- 18 KOMIYAMA M. and SUMAOKA J.
Progress towards Synthetic Enzymes for Phosphoester Hydrolysis
Curr. Opin. Chem. Biol., 1998, 2 (6), 751-757
- 19 TRAWICK B.N., DANIHER A.T., BASHKIN J.K.
Inorganic Mimics of Ribonucleases and Ribozymes : from Random Cleavage to
Sequence-Specific Chemistry to Catalytic Antisense Drugs
Chem. Rev., 1998, 98, 938-960
- 20 BASHKIN J.K., SAMPATH U., FROLOVA E.
Ribozyme Mimics as Catalytic Antisense Reagents
Appl. Biochem. Biotechnol., 1995, 54 (1-3), 43-56
- 21 MORROW J.R.
Hydrolytic Cleavage of RNA Catalysed by Metal Ion Complexes
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 561-592
- 22 MORROW J.R.
Artificial Ribonucleases
Adv. Inorg. Biochem., 1994, 9, 41-74

- 23 BRESLOW R.
Enzyme Mimics
Ciba Found Symp., 1991, 158, 115-122
- 24 CHIN J.
Developping Artificial Hydrolytic Metalloenzymes by a Unified Mechanistic Approach
Acc. Chem. Res., 1991, 24, 145-152
- 25 BASHKIN J.K. and JENKINS L.A.
The Role of Metals in the Hydrolytic Cleavage of DNA and RNA
Comments Inorg. Chem., 1994, 16 (1-2), 77-93
- 26 KUUSELA S. and LÖNNBERG H.
Effect of Metal ions on the Hydrolytic Reactions of Nucleosides and their Phosphoesters
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 32, 271-300
- 27 POGOZELSKI W.K. and TULLIUS T.D.
Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids : Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety
Chem. Rev., 1998, 98, 1089-1107
- 28 BREEN A.P. and MURPHY J.A.
Reactions of Oxyl Radicals with DNA
Free Rad. Biol. Med., 1995, 18 (6), 1033-1077
- 29 COLSON A.O. and SEVILLA M.D.
Structure and Relative Stability of Deoxyribose Radicals in a Model DNA Backbone : ab Initio Molecular Orbital Calculations
J. Phys. Chem., 1995, 99, 3867-3874
- 30 PRATVIEL G., BERNADOU J., MEUNIER B.
Carbon-Hydrogen Bonds of DNA Sugar Units as Targets for Chemical Nucleases and Drugs
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1995, 34, 746-769
- 31 STUBBE J. and KOZARICH J.W.
Mechanisms of Bleomycin-Induced DNA Degradation
Chem. Rev., 1987, 87, 1107-1136

- 32 BECKWITH A.L.J., CRICH D., DUGGAN P.J., YAO Q.
Chemistry of β -(acyloxy)alkyl and β -(phosphatoxy)alkyl Radicals and Related Species : Radical and Radical Ionic Migrations and Fragmentations of Carbon-Oxygen Bonds
Chem. Rev., 1997, 97, 3273-3312
- 33 KUWABARA M., OHSHIMA H., SATO F., ONO A., MATSUDA A.
Spin-Trapping Detection of Precursors of Hydroxyl-radical-induced DNA Damage : identification of Precursor Radicals of DNA Strand Breaks in oligo(dC)₁₀ and oligo(dT)₁₀
Biochemistry, 1993, 32 (40), 10599-10606
- 34 BURROWS C.J. and MULLER J.G.
Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission
Chem. Rev., 1998, 98, 1109-1151
- 35 STEENKEN S.
Purine Bases, Nucleosides and Nucleotides : Aqueous Solution Redox Chemistry and Transformation Reactions of their Radical cations and e⁻ and OH Adducts
Chem. Rev., 1989, 89, 503-520
- 36 SUGIYAMA H. and SAITO I.
Theoretical Studies of GG-Specific Photocleavage of DNA via Electron Transfer : Significant Lowering of Ionization Potential and 5'-Localisation of HOMO of Stacked GG Bases in B form DNA
J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 7063-7068
- 37 PRAT F., HAUK N.K., FOOTE C.S.
Effects of Guanine Stacking on the Oxidation of 8-oxoguanine in B-DNA
J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 845-846
- 38 STEMP E.D. and BARTON J.K.
Electron Transfer between Metal Complexes Bound to DNA : is DNA a Wire ?
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 325-365
- 39 LIPPERT B.
From Cisplatin to Artificial Nucleases : the Role of Metal Ion-nucleic acid Interaction in Biology
Biometals 1992 Winter, 1992, 5 (4), 195-208
- 40 McMILLIN D.R. and McNETT K.M.
Photoprocesses of Copper Complexes that Bind to DNA
Chem. Rev., 1998, 98, 1201-1219

- 41 DUPUREUR C.M. and BARTON J.K.
Site-Specific Nucleic Acid Recognition
Compr. Supramol. Chem., 1996, 5, 295-315
- 42 TURRO N.J., BARTON J.K., TOMALIA D.A.
Molecular Recognition and Chemistry in Restricted Reaction Spaces.
Photophysics and Photoinduced Electron Transfer on the Surfaces of Micelles,
Dendrimers and DNA
Acc. Chem. Res., 1991, 24, 332-340
- 43 LONG E.C.
The DNA Helical Biopolymer : a Template for the Binding, Assembly and
Reactivity of Metal Ions Complexes
J. Inorg. Organomet. Polym., 1993, 3 (1), 3-39
- 44 THORP H.H.
Electron, Energy and Atom Transfer Reactions between Metal Complexes and
DNA
Adv. Inorg. Chem., 1998, 43, 127-175
- 45 BREGADZE V.G.
Metal Ion Interactions with DNA : Considerations on Structure, Stability and
Effects from Metal Ion Binding
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 32, 419-451
- 46 NORDEN B., LINCOLN P., ACKERMAN B., TUIE E.
DNA Interactions with substitution-inert Transition Metal Ion Complexes
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 177-252
- 47 SIGEL H.
Interactions of Metal Ions with Nucleotides and Nucleic Acids and their
Constituents
Chem. Soc. Rev., 1993, 22 (4), 255-267
- 48 KATSUYUKI A.
Metal Binding Effects on Nucleic Acid Structures
Compr. Supramol. Chem., 1996, 5, 249-294
- 49 DOUFHERTHY G. and PILBROW J.R.
Physico-Chemical Probes of Intercalation
Int. J. Biochem., 1984, 16 (12), 1179-1192
- 50 NIELSEN P.E.
Sequence-selective DNA Recognition by Synthetic Ligands
Bioconjug. Chem., 1991, 2 (1), 1-12

- 51 BLACKBURN G.M. and GAIT M.J.
Nucleic Acids in Chemistry and Biology, 1992, 297-327
- 52 SIGMAN D.S., BRUCE T.W., MAZUMDER A., SUTTON C.L.
Targeted Chemical Nucleases
Acc. Chem. Res., 1993, 26, 98-104
- 53 PINDER U., HABER M., SATTLER K.
Antitumor Drugs as Intercalators of Deoxyribonuclease Acid
J. Chem. Ed., 1993, 70 (4), 263-272
- 54 FRAU S., BERNADOU J., MEUNIER B.
Hoechst 33258, un Agent de Reconnaissance du Petit Sillon
Bull. Soc. Chim. Fr., 1996, 133, 1053-1070
- 55 THUONG N.T. and HELENE C.
Sequence-Specific Recognition and Modification of Double-Helical DNA by Oligonucleotide
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1993, 32, 666-690
- 56 HELENE C.
Sequence-Selective and Cleavage of Double-Helical DNA
Curr. Opin. Biotechnol., 1993, 4 (1), 29-36
- 57 LONG E.C., EASON P.D., LIANG Q.
Synthetic Metallopeptides as Probes of Protein-DNA Interactions
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 427-452
- 58 PAN C.Q., LANDGRAF R., SIGMAN D.S.
DNA-Binding Proteins as Site-specific Nucleases
Mol. Microbiol., 1994, 12 (3), 335-342
- 59 ARMITAGE B.
Photocleavage of Nucleic Acids
Chem. Rev., 1998, 98, 1171-1200
- 60 MEUNIER B., PRATVIEL G., BERNADOU J.
Active Species Involved in Oxidative DNA Cleavage
Bull. Soc. Chim. Fr., 1994, 131, 933-943
- 61 SCANDOLA F. and BALZANI V.
Energy-Transfer Processes of Excited States of Coordination Compounds
J. Chem. Ed., 1983, 60 (10), 814-823

- 62 SCUTIN N. and GRUTZ C.
Electron-Transfer Reactions of Excited States
J. Chem. Ed., 1983, 60 (10), 809-814
- 63 WATTS R.J.
Ruthenium Polypyridins
J. Chem. Ed., 1983, 60 (10), 834-842
- 64 JOHNSTON D.H., WELCH T.W., THORP H.H.
Electrochemically Activated Nucleic Acid Oxidation
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 297-324
- 65 FONTECAVE M. and PIERRE J.L.
Activation et Toxicité de l'Oxygène. Principes des Thérapeutiques Antioxydantes
Bull. Soc. Chim. Fr., 1991, 128, 505-520
- 66 SAWYER D.T. and VALENTINE J.S.
How Super is Superoxyde ?
Acc. Chem. Res., 1981, 14, 393-400
- 67 DIX T.A., HESS K.M., MEDINA M.A., SULLIVAN R.W., TLLY S.L., WEBB T.L.
Mechanism of Site-selective DNA Nicking by the Hydrodioxy (perhydroxyl) Radical
Biochemistry, 1996, 35 (14), 4578-4583
- 68 PRYOR W.A.
Why is the Hydroxyl radical the only Radical that Commonly Adds to DNA ?
Hypothesis : it has a Rare Combination of High Electrophilicity, High Thermochemical Reactivity and a Mode of Production that can Occur near DNA
Free Rad. Biol. Med., 1988, 4, 219-223
- 69 BREEN A.P. and MURPHY J.A.
Vinyl Epoxides : Reagents for Radical-Induced DNA Cleavage
J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 1993, 2979-2983
- 70 SIMANDAN T., SUN J., DIX T.A.
Oxidation of DNA Bases, Deoxyribonucleosides and Homopolymers by Peroxyl Radicals
Biochem. J., 1998, 335, 233-240
- 71 PAILLOUS N. and VICENDO P.
Mechanisms of Photosensitized DNA Cleavage
J. Photochem. Photobiol. B : Biol., 1993, 20, 103-209
- 72 OHARA A.
Alkylation and Cleavage of DNA by Carbon-Centered Radical Metabolites
Free Rad. Biol. Med., 1993, 15, 329-336

- 73 NICOLAOU K.C. and DAI W.M.
Chemistry and Biology of the Eneidyne Anticancer Antibiotics
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1991, 30, 1387-1416
- 74 BLAZEK E.R., PEAK J.G., PEAK M.
Singlet Oxygen Induces Frank Strand Breaks as well as Alkali and Piperidine –
Labile Sites in Supercoiled Plasmid DNA
Photochem. and Photobiol., 1989, 49 (5), 607-613
- 75 EPE B.
Genotoxicity of Singlet Oxygen
Chem. Biol. Interact., 1991, 80 (3), 239-360
- 76 PIETTE J.
Biological Consequences Associated with DNA Oxidation Mediated by Singlet
Oxygen
J. Photochem. Photobiol. B : Biol, 1991, 11(3-4), 241-260
- 77 MEUNIER B.
Metalloporphyrins as Versatile Catalysts for Oxidation Reactions and Oxidative
DNA Cleavage
Chem. Rev., 1992, 92, 1411-1456
- 78 SAWYER D.T., SOBKOWIAK A., MATSSHITA T.
Metal (ML_x, M = Fe, Cu, Co, Mn)/Hydroperoxyde-Induced Activation of
Dioxygen for the Oxygenation of Hydrocarbon : Oxygenated Fenton Chemistry
Acc. Chem. Res., 1996, 29, 409-416
- 79 GOLDSTEIN S., MEYERSTEIN D., CSAPSKI G.
The Fenton Reagents
Free Rad. Biol. Med., 1993, 15, 435-445
- 80 MAYER J.M.
Hydrogen Atom Abstraction by Metal-Oxo Complexes : Understanding the
Analogy with Organic Radical Reactions
Acc. Chem. Res., 1998, 31, 441-450
- 81 NEYHART G.A., KALSBECK W.A., WELCH T.W., GROVER N., THORP
H.H.
Mechanisms of DNA Cleavage by High-valent Metal Complexes
Adv. Chem. Ser., 1995, 246, 405-429
- 82 HOLM R.H.
Metal-Centered Oxygen Atom Transfer Reactions
Chem. Rev., 1987, 87, 1401-1449
- 83 NIELSEN P.E.
Chemical and Photochemical probing of DNA Complexes
J. Mol. Recognit., 1990, 3 (1), 1-25

- 84 PAPAVALASSILIOU A.G.
Chemical Nucleases as Probes for Studying DNA-protein Interactions
Biochem. J., 1995, 305, 345-357
- 85 HUBER P. W.
Chemical Nucleases : their Use in Studying RNA Structure and RNA-protein interactions
FASEB, 1993, 7, 1367-1375
- 86 TULLIUS T.D.
Physical Studies of Protein-DNA Complexes Footprinting
Annu. Rev. Biophys. Chem., 1989, 18, 213-237
- 87 DIXON W.J., HAYES J.J., LEVIN J.R., WEIDNER M.F., DOMBROSKI B.A., TULLIUS T.D.
Hydroxyl Radical Footprinting
Methods Enzymol., 1991, 208, 380-413
- 88 TULLIUS T.D.
Footprinting of Nucleic Acids by Iron Based Reagents
Compr. Supramol. Chem., 1996, 5, 317-342
- 89 SIGMAN D.S. and CHEN C.H.B.
Chemical Nucleases : New Reagents in Molecular Biology
Annu. Rev. Biochem., 1990, 59, 207-236
- 90 PERRIN D.M., MAZUMDER A., SIGMAN D.S.
Oxidative Chemical Nucleases
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 1994, 49, 123-151
- 91 NIELSEN P.E.
Uranyl Photofootprinting of DNA-protein Complexes
Methods Mol. Biol., 1994, 30, 141-149
- 92 PYLE A.M. and BARTON J.K.
Probing Nucleic Acids with Transition Metal Complexes
Prog. Inorg. Chem., 1990, 38, 413-475
- 93 LILLEY D.M.J.
Probes of DNA Structure
Methods Enzymol., 1992, 212, 133-139
- 94 TULLIUS T.D.
The Use of Chemical Probes to Analyse DNA and RNA Structures
Curr. Opin. Struct. Biol., 1991, 1(3), 428-434
- 95 THEIL E.C.
Coordination Complexes as Probes of mRNA Structure : the IRE (Iron Regularory Element) of Ferritin mRNA as a Case Study
New J. Chem., 1994, 18(3), 435-441

- 96 DRAGANESCU A. and TULLIUS T.D.
Targeting of Nucleic Acids by Iron Complexes
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 453-484
- 97 PRICE M.A. and TULLIUS T.D.
Using Hydroxyl Radical to Probe DNA Structure
Methods Enzymol., 1992, 212, 194-219
- 98 CHOW C.S. and BARTON J.K.
Transition Metal Complexes as Probes of Nucleic Acids
Methods. Enzymol., 1992, 212, 219-242
- 99 CHEN X., BURROWS C.J., ROKITA S.E.
Conformation-Specific Detection of Guanine in DNA : Ends, Mismatches,
Bulges and Loops
J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 322-325
- 100 SIGMAN D.S., KUXABARA M.D., CHEN C.H.B. and BRUICE T.W.
Nuclease Activity of 1,10-phenanthroline copper in Study of Protein-DNA
Interaction
Methods Enzymol., 1991, 208, 414-433
- 101 DERVAN P.B.
Characterization of Protein-DNA Complexes by Affinity Cleaving
Methods Enzymol., 1991, 208, 497-515
- 102 NICOLAOU K.C. and SMITH A.
Molecular Design, Chemical Synthesis and Biological Action of Eneidyne
Acc. Chem. Res., 1992, 25, 497-503
- 103 SMITH A.L. and NICOLAOU K.C.
The Eneidyne Antibiotics
J. Med. Chem., 1996, 39 (11), 2103-2117
- 104 NICOLAOU K.C., SMITH A.L., YUE E.W.
Chemistry and Biology of Natural and Designed Eneidyne
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5881-5888
- 105 GOLDBERG I.H.
Mechanisms of Neocarzinostatin Action : Role of DNA Microstructure in
Determination of Chemistry of Bistranded Oxidative Damage
Acc. Chem. Res., 1991, 24 (7), 191-198

- 106 LEE M.D., ELLESTAD G. A., BORDERS D.B.
Calicheamicins : Discovery, Structure, Chemistry and Interaction with DNA
Acc. Chem. Res., 1991, 24 (8), 235-242
- 107 SAITO I. and NAKATANI K.
Design of DNA-Cleaving Agents
Bull. Chem. Soc. Jpn., 1996, 69, 3007-3019
- 108 BURGER R.M.
Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin
Chem. Rev., 1998, 98, 1153-1169
- 109 STUBBE J., KOZARICH J.W., WU W., VANDERWALL D.E.
Bleomycins : a Structural Model for Specificity, Binding and Double Strand
Cleavage
Acc. Chem. Res., 1996, 29, 322-330
- 110 PETERING D.H., MAO Q., Li W., DEROSE E., ANTHOLINE W.E.
Metallobleomycin-DNA Interactions : Structures and Reactions Related to
Bleomycin-Induced DNA Damage
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 619-648
- 111 PETERING D.H., BYRNES R.W., ANTHOLINE W.E.
The Role of Redox-active Metals in the Mechanism of Action of Bleomycin
Chem. Biol. Interact., 1990, 73, 133-182
- 112 KANE S.A. and HECHT S.M.
Polynucleotide Recognition and Degradation by Bleomycin
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 1994, 49, 313-352
- 113 MARUSAK R.A. and MEARES C.F.
Metal-complex-catalysed cleavage of Biopolymers,
Active Oxygen in Biochemistry, Search Series vol 3, 1995, 337-400
- 114 BATIGELLO J.M., CUI M., CARTER B.J.
RNA Recognition and Cleavage by Iron (II)-bleomycin
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 593-617
- 115 CHIOU S.H.
DNA-scission Activities of Ascorbate in the Presence of Metal Chelates
J. Biochem., 1984, 96, 1307-1310
- 116 TULLIUS T.D. and DOMBROSKI B.A.
Iron (II) EDTA Used to Measure the Helical Twist along any DNA Molecule
Science, 1985, 230, 679-681
- 117 DERVAN P.B.
Design of Sequence-Specific DNA-Binding Molecule
Science, 1986, 232, 464-471

- 118 LU M., GUO Q., WINK D.J., KALLENBACH N.R.
Charge Dependence of Fe(II)-catalysed DNA Cleavage
Nucleic Acids Res., 1990, 18 (11), 3333-3337
- 119 POGOZELSKI W.K., McNEESE T.J., TULLIUS T.D.
What Species is Responsible for Strand Scission in the Reaction of
[Fe^{II}(EDTA)]²⁻ and H₂O₂ with DNA
J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 6428-6433
- 120 SIGMAN D.S.
Nuclease Activity of 1,10-phenanthroline-copper Ion
Acc. Chem. Res., 1986, 19, 180-186
- 121 SIGMAN D.S.
Chemical Nucleases
Biochemistry, 1990, 29 (39), 9097-9105
- 122 SIGMAN D.S., LANDGRAF R., PERRIN D.M., PEARSON L.
Nucleic Acid Chemistry of the Cuprous Complexes of 1,10-phenanthroline and
Derivatives
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 485-513
- 123 SIGMAN D.S.
Chemical Nucleases
Chem. Rev., 1993, 93, 2295-2316
- 124 SIGMAN D.S., GRAHAM D.R., D'AURORA V., STERN A.M.
Oxygen-Dependant Cleavage of DNA of the 1,10-phenanthroline Cuprous
Complexes – Inhibition of E. Coli DNA Polymerase
J. Biol. Chem., 1979, 254, 12269-12272
- 125 SAMMES P.G. and YAHIOGLU G.
1,10-phenanthroline : a Versatile Ligand
Chem. Soc. Rev., 1994, 327-334
- 126 HIRAI M., SHINOZUKA K., SAWAI H., OGAWA S.
Synthesis of a New Copper Complex of a Macrocyclic Compound Consisting of
1,10-phenanthroline and its DNA Binding and Cleaving Activity
Bull. Chem. Soc. Jpn, 1994, 67, 1147-1155
- 127 PITIE M., DONNADIEU B., MEUNIER B.
Preparation of the new bis(phenanthroline) Ligand « clip-phen » and Evaluation
of the Nuclease Activity of the Corresponding Copper Complex
Inorg. Chem., 1998, 37, 3486-3489
- 128 WILLIAMS L.D., THVIERGE J., GOLDBERG I.H.
Specific Binding of o-phenanthroline at a DNA Structural Lesion
Nucleic Acids Res., 1988, 16, 11606-11615

- 129 KUWABARA M., YOON C., GOYNE T., THEDERAHN, SIGMAN D.S.
Nuclease Activity of 1,10-phenanthroline Copper Ion : Reaction with
CGCAATTCGCG and its Complexes with Netropsin and EcoRI
Biochemistry, 1986, 25, 7401-7408
- 130 BARTON J.K.
Metals and DNA : Molecular Left-Handed Complements
Science, 1986, 233, 727-733
- 131 COURY J.E., ANDERSON J.R., McFAIL-ISOM L., WILLIAMS L.D.,
BOTTOMLEY L.A.
Scanning Force Microscopy of Small Ligand-nucleic Acid Complexes :
tris(o-phenanthroline)ruthenium(II) as a Test for a New Assay
J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 3792-3796
- 132 PYLE A.M., REHMANN J.P., MESHOYRU R., KUMAR C.V., TURRO N.J.,
BARTON J.K.
Mixed-Ligand Complexes of Ruthenium (II) : Factors Governing Binding
J. Am. Chem. Soc., 1997, 111, 3051-3058
- 133 ROUTIER S., JOANNY V., ZAPARUCHA A., VEZIN H., CATTEAU J.P.,
BERNIER J.L., BAILLY C.
Synthesis of Metal Complexes of 2,9-bis(2-hydroxyphenyl)-phenanthroline and
their DNA Binding and Cleaving Activities
J. Chem. Soc., Perkin Trans 2, 1998, 863-868
- 134 PRATVIEL G., BERNADOU J., MEUNIER B.
Selective DNA Cleavage by Metalloporphyrin Derivatives
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 399-426
- 135 MARZILLI L.G.
Medical Aspects of DNA -Porphyrin Interactions
New J. Chem., 1990, 14, 409-420
- 136 WARD B., SKOROBOGATY A., DABROWIAK J.C.
DNA Binding Specificity of a Serie of Cationic Metalloporphyrin Complexes
Biochemistry, 1986, 25 (24), 7827-7833
- 137 FIEL R.J.
Porphyrin-Nucleic Acid Interactions : a Review
J. Biomol. Struct. Dyn., 1989, 6 (6), 1259-1274
- 138 SEHLSTEDT U., KIM S.K., CARTER P., GOODISMAN J., VLLANO J.F.,
NORDEN B., DABROWIAK J.C.
Interaction of Cationic Porphyrins with DNA
Biochemistry, 1994, 33, 417-426
- 139 PASTERNAK and GIBBS E.J.
Porphyrin and Metalloporphyrin Interactions with Nucleic Acids
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 367-397

- 140 CROKE D.T., PERROUVAULT L., SARI M.A., BATTIONI J.P., MANSUY D., HELENE C., LE DOAN T.
Structure-Activity Relationships for DNA Photocleavage by Cationic Porphyrins
J. Photochem. Photobiol. B : Biol, **1993**, 18, 41-50
- 141 PRASEUTH D., GAUDEMER A., VERLHAC J.B., KRALJIC I., SISSOËFF I., GUILLE E.
Photocleavage of DNA in the Presence of Synthetic Water-soluble Porphyrins
Photochem. Photobiol., **1986**, 44 (6), 717-724
- 142 WARD B., SKOROBOGATY A., DABROWIAK J.C.
DNA Cleavage Specificity of a Group of Cationic Metalloporphyrins
Biochemistry, **1986**, 25 (22), 6875-6883
- 143 HARFORD C. and SARKAR B.
Amino Terminal Cu(II) and Ni(II) Binding (ATCUN) Motif of Proteins and Peptides : Metal Binding, DNA Cleavage and other Properties
Acc. Chem. Res., **1997**, 30, 123-130
- 144 LIANG Q., EASON D., LONG E.C.
Metallopeptides-DNA Interactions : sites Selectivity Based on Amino Acid Composition and Chirality
J. Am. Chem. Soc., **1995**, 117, 9625-9631
- 145 BRITTAIN I.J., HUANG X., LONG E.C.
Selective Recognition and Cleavage of RNA Loop Structures by NiXGH Metallopeptides
Biochemistry, **1998**, 37 (35), 12113-12120
- 146 BURROWS C.J., PERREZ R.J., MULLER J.G., ROKITA S.E.
Oxidative DNA Damage Mediated by Metal-peptide Complexes
Pure Apl. Chem., **1998**, 70 (2), 275-278
- 147 MULLER J.G., HICKERSON R.P., PERREZ R.J., BURROWS C.J.
DNA Damage from Sulfite Autooxidation Catalysed by a Nickel(II) Peptide
J. Am. Chem. Soc., **1997**, 119 (7), 1501-1506
- 148 CHEN X. ROKITA S.E., BURROWS C.J.
DNA Modification : Intrinsic Selectivity of Nickel (II) Complexes
J. Am Chem. Soc., **1991**, 113, 5884-5886
- 149 BURROWS C.J. and ROKITA S.E.
Nickel Complexes as Probes of Guanine Sites in Nucleic Acid Folding
Met. Ions Biol. Syst., **1996**, 33, 537-560
- 150 BURROWS C.J. and ROKITA S.E.
Recognition of Guanine Structure in Nucleic Acids by Nickel Complexes
Acc. Chem. Res., **1994**, 27, 295-301

- 151 BURROWS C.J., MULLER J.G., POULTER G.T., ROKITA S.E.
Nickel Catalysed Oxidations : from Hydrocarbons to DNA
Acta Chem. Scand., 1996, 50, 337-344
- 152 MULLER J.G., CHEN X., DADIZ A.C., ROKITA S.E., BURROWS C.J.
Ligand Effects Associated with the Intrinsic Selectivity of DNA Oxidation
Promoted by Nickel (II) Macrocyclic Complexes
J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 322-325
- 153 MCLACHLAN G.A., MULLER J.G., ROKITA S.E., BURROWS C.J.
Metal-mediated Oxidation of Guanines in DNA and RNA : a comparison of
Cobalt II, Nickel II, and Copper II Complexes
Inorg. Chim. Acta, 1996, 251, 193-199
- 154 SRINIVASAN K. , MICHAUD K., KOCHI J.K.
Epoxydation of Olefins with Cationic (salen)Mn^{III} Complexes. The Modulation
of Catalytic Activity by Substituents
J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, 2309-2320
- 155 MANDAL S.S., VARSHNEY U., BHATTACHARYA S.
Role of the Central Metal Ion and Ligand Charge in the DNA Binding and
Modification by Metallosalen Complexes
Bioconjug. Chem., 1997, 8, 798-812
- 156 MANDAL S.S., KUMAR N.V., VARSHNEY U., BHATTACHARYA S.
Metal Ion Dependant Oxidative DNA Cleavage by Transition Metal Complexes
of a New Water-Soluble Salen Derivative
J. Inorg. Bioch., 1996, 63, 265-272
- 157 GRAVERT D.J. and GRIFFIN J.H.
Steric and Electronic Effects Enantiospecificity and Reactive Orientation in DNA
Binding/Cleaving by Substituted Derivatives of [salenMn^{III}]⁺
Inorg. Chem., 1996, 35 , 4837-4857
- 158 SATO K., CHIKIRA M., FUJII Y., KOMATSU A.
Stereospecific Binding of Chemically Modified Salen-type Schiff Base
Complexes of Copper (II) with DNA
J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1994, 625-626
- 159 ROUTIER S., BERNIER J.L., WARING M.J., COLSON P., HOUSSEIER C.,
BAILLY C.
Synthesis of a Functionalised Salen-Copper Complex and its Interaction with
DNA
J. Org. Chem., 1996, 61, 2326-2331
- 160 ROUTIER S., BERNIER J.L., CATTEAU J.P., COLSON P., HOUSSEIER C.,
RIVALLE C., BISAGNI E., BAILLY C.
Synthesis, DNA Binding and Cleaving Properties of an Ellipticine-Salen Copper
Conjugate
Bioconjugate Chem., 1997, 8, 789-792

- 161 ROUTIER S., BERNIER J.L., CATTEAU J.P., BAILLY C.
Recognition and Cleavage of DNA by a Distamycin-salen Copper Conjugate
Bioorg. Med. Chem. Lett., 1997, 7 (13), 1729-1732
- 162 ROUTIER S., COTELLE N., CATTEAU J.P., BERNIER J.L., WARING M.J.,
RIOU J.F., BAILLY C.
Salen-anthraquinone Conjugates. Synthesis, DNA Binding and Cleaving
Properties, Effects on Topoisomerasess and Cytotoxicities
Bioorg. Med. Chem., 1996, 4 (8), 1185-1196
- 163 MULLER J.G., PAIKOFF S.J., ROKITA S.E., BURROWS C.J.
DNA Modification Promoted by Water-Soluble Nickel (II) Salen Complexes : a
Switch to DNA Alkylation
J. Inorg. Biochem., 1994, 54, 199-206
- 164 ROUTIER S., BERNIER J.L., CATTEAU J.P., BAILLY C.
Highly Preferential Cleavage of Unpaired Guanines in DNA by a Functionalized
salen-nickel Complex
Bioorg. Med. Chem. Lett., 1997, 7 (1), 63-66
- 165 GOLDSBY K.A.
Symmetric and Unsymmetric Nickel(II) Schiff Base Complexes : Metal-
Localized versus Ligand-Localized Oxidation
J. Coord. Chem., 1998, 19, 83-90
- 166 GRAVERT D.J. and GRIFFIN J.H.
Specific DNA Cleavage Mediated by [salenMn^{III}]⁺
J. Org. Chem., 1993, 58, 820-822
- 167 GRAVERT D.J. and GRIFFIN J.H.
Similarities and Differences in the DNA Binding/Cleaving Specificities and
Mechanisms of [salenMn^{III}]⁺ and [TMPPMn^{III}]⁵⁺
Bioorg. Med. Chem. Lett., 1995, 6 (7), 889-892
- 168 GRIFFIN J.H.
Correlations among the DNA Binding/Cleaving Specificities of Small Molecules
Revealed by Double-strand Affinity Cleaving
Bioorg. Med. Chem. Lett., 1995, 5 (1), 73-76
- 169 GRAVERT D.J. and GRIFFIN J.H.
Specific DNA Cleavage by Manganese (III) Complexes
Met. Ions Biol. Syst., 1996, 33, 515-536

- 170 BHATTACHARYA S. and MANDAL S.S.
Ambiant Oxygen Activating Water Soluble Cobalt-Salen Complex for DNA Cleavage
J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1995, 2489-2490
- 171 CHENG C.C. AND LU Y.L.
Novel Water-soluble 4,4'-disubstituted Ruthenium (III) Salen Complexes in DNA Stranded Scission
J. Chin. Chem. Soc., 1998, 45, 611-617
- 172 NIELSEN S.S., HIORT C. SÖNNICHSEN S.H., BUCHARDT O., DAHL O., NORDON B.
DNA Binding and Photocleavage by Uranyl (VI) (UO_2^{2+}) Salts
J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 4967-4975
- 173 BREINER K.M., DAUGHERTY M.A., OAS T.G., THORP H.H.
An Anionic Diplatinum DNA Photocleavage Agent : Chemical Mechanism and Footprinting of λ -Repressor
J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 11673-11679
- 174 NEYHART G.A., CHENG C.C., THORP H.H.
Kinetics and Mechanism of the Oxidation of Sugars and Nucleotides by Oxoruthenium (IV) : Model Studies for Predicting Cleavage Patterns in Polymeric DNA and RNA
J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 1463-1471
- 175 NEYHART G.A., GROVER N., SMITH S.R., KALSBECK W.A.
Binding and Kinetics Studies of Oxidation of DNA by Oxoruthenium (IV)
J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 4423-4428
- 176 RIORDAN C.G. and WEI P.
Methyl Radical-Initiated DNA Cleavage Facilitated by a Discrete Organometallic Complex
J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 2189-2190
- 177 KANE S.A., SASAKI H., HECHT S.M.
Guanosine-specific DNA Damage by a Co(II) bithiazole Complex
J. Am. Chem. Soc., 1995, 9107-9118
- 178 HU Y. and HU H.
A Novel Selective Oxidation of 5-Substituted 2-Hydroxy-3-hydroxymethylbenzaldehydes
Synthesis, 1991, 4, 325-326
- 179 BÔTCHER A., ELLIAS H., MÜLLER L., PAULUS H.
Oxygen Activation on Nickel (II) Tetrahydrosalen Complexes with the Formation of Nickel (II) Dihydrosalen Complexes
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1992, 31 (5), 623-625

- 180 SRINIVASAN K., MICHAUD P., KOCHI J.K.
Epoxydation of Olefins with Cationic SalenMnIII
The Modulation of catalytic Activity by Substituents
J. Am. Chem. Soc., 1986, 108, 2309-2320
- 181 ZHANG W. and JACOBSEN E.N.
A Novel in Vivo Nitric Oxide Sensor
J. Org. Chem., 1991, 56, 2296-2298
- 182 LEUNG E., CRAGG P.J., O'HARE D., O'SHEA M.
A Novel in Vivo Nitric Oxide Sensor
Chem. Commun., 1996, 1, 23-24
- 183 SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T.
Molecular Cloning : A Laboratory Manual
ColdSpring Harbor Laboratory Press (New York), 1989
- 184 HEGG E.L. and BURSTYN J.N.
Copper (II) Macrocycles Cleave Single-Stranded and Double Stranded DNA
under both Aerobic and Anaerobic Conditions
Inorg. Chem., 1996, 35, 7474-7481
- 185 PAMATONG F.V., DETMER C.A., BOCARSLY J.R.
Double-Strand Cleavage of DNA by a Monofunctional Transition Metal
Cleavage Agent
J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 5339-5345
- 186 CHEVION M.
A Site-Specific Mechanism for Free Radical Induced Biological Damage : The
Essential Role of Redox-Active Transition Metals
Free. Rad. Biol. Med., 1988, 5, 27-37
- 187 ARNOVICH J., GODINGER D., SAMUNI A., CZAPSKI G.
Ascorbic Acid Oxidation and DNA Scission Catalysed by Iron and Copper
Chelates
Free Rad. Res. Commun., 1987, 2, 241-258
- 188 MOTOMURA T., ARAKI K., KOBAYACHI K., TOI H., AOYAMA Y.
Artificial Metallonuclease. Cu(II)-Promoted DNA Strand Scission as Effected by
Bisresorcinol Derivatives Having a Metal-Ion Binding Site
Chem. Lett., 1992, 6, 963-966
- 189 SINGH U.S., SCANNELL R.T., AN H., CARTER B.J., HECHT S.M.,
DNA Cleavage by di and trihydroxyalkylbenzenes. Characterization of Products
and the Roles of O₂, Cu(II) and alkali
J. Am. Chem. Soc., 1995, 117, 12691-12699

- 190 HASHIMOTO S., YAMASHITA R., NAKAMURA Y.
DNA Strand Scissions by Hydroxamic Acids-Copper(II) Ion under Aerobic Conditions
Chem. Lett., 1992, 1639-1642
- 191 BORAH S., MELVIN M.S., LINDQUIST N., MANDERVILLE R.
Copper-Mediated Nuclease Activity of a Tambjamine Alkaloid
J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 4557-4562
- 192 BAUDOIN O., TEULADE-FICHOU M.-P., VIGNERON J.P., LEHN J.M.
Efficient Copper (II)-Mediated Nuclease Activity of ortho-quinacridine
Chem. Commun., 1998, 2349-2350
- 193 LI Y. and TRUSCH M.A.
DNA Damage Resulting from the Oxydation of Hydroquinone by Copper : Role for Cu(II)/Cu(I) Redox Cycle and Reactive Oxygen Generation
Carcinogenesis, 1993, 14 (7), 1303-1311
- 194 LI Y. and TRUSCH M.A.
Oxidation of Hydroquinone by Copper : Chemical Mechanism and Biological Effects
Arch. Biochem. Biophys., 1993, 300 (11), 346-355
- 195 SPENCER J.P.E., JENNER A., ARUOMA O.I., EVANS P.J., KAUR H. DEXTER D.T., JENNER P., LEES A.J., MARDEN D.C., HALLIWELL B.
Intense Oxidative DNA Damage Promoted By L-DOPA and Its Metabolites. Implication for Neurodegenerative Disease
FEBS Lett., 1994, 353, 246-250
- 196 INOUE S., YAMAMOTO K., KAWANISHI S.
DNA Damage Induced by Metabolites of o-Phenylphenol in the presence of Copper (II) Ion.
Chem. Res. Toxicol., 1990, 3 (2), 144-149
- 197 ABRAGAM A. and BLEANY B.
Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions
Clarendon Press, Oxford UK, 1970
- 198 PILBROW J.R.
Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance
Clarendon Press, Oxford UK, 1990
- 199 WERTZ J.E and BOLTON J.R
Electron Spin Resonance
McGraw-Hill Book Company, 1972
- 200 BLONDIN G. and FRAPART Y.-M.
La Résonance Paramagnétique Electronique
L'Act. Chim. (Ec), 1996, 7, 112-124

- 201 SOLOMON E.I., SUNDARAMAN U.M., MACHONKIN T.E
Multicopper Oxidases and Oxygenases
Chem. Rev., 1996, 96, 2563-2567
- 202 PILBROW J.R.
Transition Ion Electron Paramagnetic Resonance
Clarendon Press, Oxford UK, 1990, 30-31, 154-167, 624-628
- 203 TALLEC A.
Electrochimie Organique : Synthèses et Mécanismes
Masson, Paris, 1985, 23-39, 58-63, 97-106
- 204 EVANS D.H., O'CONNELL K.M., PETERSEN R.A., KELLY M.J.
Cyclic Voltammetry
J. Chem. Ed., 1983, 60 (4), 290-292
- 205 MABBOT G.A.
An Introduction to Cyclic Voltammetry
J. Chem. Ed., 1983, 60 (9), 697-701
- 206 KISSINGER P.-T. and HEINEMAN W.R.
Cyclic Voltammetry
J. Chem. Ed., 1983, 60 (9), 702-706
- 207 Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements
Organic Section
Volume XI : Hydrocarbons – Hydroxy Compounds
Marcel Decker, inc, New-York and Baser, 1978, 272-275
- 208 Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements
Organic Section
Volume XII : Carbonyl Compounds, Carboxylic Acids, Esters, Anhydrides,
Organic Sulfur Compounds
Marcel Decker, inc, New-York and Baser, 1978, 198-205
- 209 GUPTA N. and LINSCHITZ H.
Hydrogen-Bonding and Protonation Effects in Electrochemistry of Quinones in
Aprotic Solvents
J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 6384-6391
- 210 KAPTURKIEWICZ A. and BEHR B.
The Electrode Kinetic of Transition Metal Salene Complexes
Effects of Electrolyte Concentration in Acetonitrile and Dimethylformamide
Solutions
J. Electroanal. Chem., 1984, 163, 189-198

- 211 HOFERKAMP L.A. and GOLDSBY K.A.
Surface-Modified Electrodes Based on Nickel (II) and Copper (II)
Bis(salicylaldimine)complexes
Chem. Materials, 1989, 1, 348-352
- 212 HOLM R.H., KENEPOHL P., SOLOMON E.I.
Structural and Functionnal Aspects of Metal Sites in Biology
Chem Rev., 1996, 96, 2259-2263
- 213 ANSOM F.C., COLLINS T.J., RICHMOND T.G., SANTARSIERO B.D., TOTH
J.E., TRECO B.G.R.T.
Highly Stabilized Copper (III) Complexes
J. Am. Chem. Soc., 1987, 109, 2974-2979
- 214 MARGERUM D.W. and OWENS G.D.
Copper (III) Complexes and their Reactions
Met. Ions Biol. Syst., 1981, 12, 75-132
- 215 COLLINS T.J.
Designing Ligands for Oxidizing Complexes
Acc. Chem. Res., 1994, 27, 279-285
- 216 RUIZ R., BARLAND-SURVILLE C, AUKAULOO A., ANXOLABEHERE-
MALLART E., JOURNEAUX Y., CANO J., MUNOZ M.C.
Stabilization of Copper (III) Complexes by Disubstituted Oxamides and Related
Ligands
J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1997, 745-751
- 217 KOU F., ZHU S., LIN H., KEQUIN M., CHEN Y.
Studies on the Formation and Decomposition of Copper (III) and Nickel (III)
Complexes with Macrocyclic Ligands Containing Amide Groups
Polyhedron, 1997, 16 (4), 741-747
- 218 McDONALD M.R., SCHEPER W.M., LEE H.D., MARGERUM D.W.
Copper III Complexes of Tripeptides with Histidine and Histamine as the Third
Residue
Inorg. Chem., 1995, 34, 229-237
- 219 BOSSU F.P., CHELLAPA K.L., MARGERUM D.W.
Ligand Effects on the Thermodynamic Stabilization of Copper (III)-Peptide
Complexes
J. Am. Chem. Soc., 1977, 99, 2195-2203
- 220 YONGBLOOD M.P. and MARGERUM D.W.
Reaction Entropies of Copper (III, II) and Nickel (III, II) Peptide Redox Couples
and the Role of Axial Solvent Coordination
Inorg. Chem., 1980, 19, 3068-3072

- 221 BENCINI A. and GATTESCHI D.
EPR of Exchange Coupled Systems
Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1990
- 222 STUBBE J. and VAN DER DONK W. A.
Protein Radicals in Enzymes Catalysis
Chem. Rev., 1998, 98, 705-762
- 223 FONTECAVE M. and PIERRE J.L.
Protein Tyrosyl Free Radicals as Active Species in Metalloenzyme Catalysis
Bull. Soc. Chim. Fr., 1996, 133, 653-660
- 224 WANG Y. and STACK T.D.P.
Galactose Oxidase Complexes Catalytic Reactivities
J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 13097-13098
- 225 ZURITA D., SCHEER C., PIERRE J.L., SAINT-AMAN E.
Solution Studies of Copper (II) Complexes as Models for the Active Site in Galactose Oxydase
J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1996, 4331-4336
- 226 ZURITA D., GAUTIER-LUNEAU I., MENAGE S., PIERRE J.L., SAINT-AMAN E.
A First Model for the Oxidized Active Form of the Active Site in Galactose Oxydase : a Free Radical Copper Complex
J. Biol. Inorg. Chem., 1997, 2, 46-55
- 227 SAINT-AMAN E., MENAGE S., PIERRE J.L., DEFRANCQ E., GELLON G.
A Fonctionnal Model of Galactose Oxidase : Catalytic Oxidation of Primary Alcohols with One-Electron Oxidized Copper (II) Complex
New J. Chem., 1998, 22 (5), 393-394
- 228 MENAGE S., GELLON G., PIERRE J.L., ZURITA D., SAINT-AMAN E.
A Class of Ligands Designed as Model for Apogalactose Oxydase
Bull. Soc. Chim. Fr., 1997, 785-791
- 229 HALFEN J.A., JAZDZEWSKI B.A., MAHAPATRA S., BERREAU L.M., WILKINSON E.C., QUE L., TOLMAN W.B.
Synthetic Models of the Inactive Copper (II)-Tyrosinate and Active Copper (II)-Tyrosyl Radical Forms of Galactose and Glyoxal Oxidase
J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 8217-8227
- 230 HALFEN J.A., YOUNG V. G., TOLMAN W.B.
Modeling of the Chemistry of the active Site of Galactose Oxydase
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1996, 35 (15), 1687-1690
- 231 WHITTAKER M.M., DUNCAN W.R., WHITTAKER J.W.
Synthesis, Structure and Properties of a Model for Galactose Oxidase
Inorg. Chem., 1996, 35, 382-386

- 232 EVANS C.A.
Spin-Trapping
Aldrichimica Acta, 1979, 12 (2), 182-188
- 233 HAMILTON D.E., DRAGO R.S., TELSER J.
Spin-Trapping of a Cobalt-Dioxygen Complex
J. Am. Chem. Soc., 1984, 106, 5353-5355
- 234 BAKAC A.
Mechanistic and Kinetic Aspects of Transition Metal Oxygen Chemistry
Prog. Inorg. Chem., 1995, 43, 267-352
- 235 KITAJIMA N. and MORO-OKA Y.
Copper-Dioxygen Complexes . Inorganic and Bioinorganic Perspectives
Chem. Rev., 1994, 94, 737-757
- 236 KIMURA E., MACHIDA R., KODAMA M.
Macrocyclic Dioxo pentaamines : Novel Ligands for 1 : 1 Ni(II)-O₂ Adduct Formation
J. Am. Chem. Soc., 1984, 106, 5497-5505
- 237 RALL J. and KAIM W.
Ligand-Controlled Oxidation State Ambivalence in Copper-Quinone Complexes
J. Chem. Soc., Faraday Trans, 1994, 90 (19) , 2905-2908
- 238 PIERPONT C.G. and LANGE C.W.
The Chemistry of Transition Metal Complexes Containing Catechol and semi-quinone Ligands
Prog. Inorg. Chem., 1994, 41, 331-442
- 239 CHENG C.C., ROKITA S.E., BURROWS C.J.
Nickel (III)-Promoted DNA Cleavage with Ambient Dioxygen
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1993, 32 (2) , 277-278
- 240 WILLIAMS N. H., TAKASAKI B., WALL M., CHIN J.
Structure and Nuclease Activity of Simple Dinuclear Complexes : Quantitative Dissection of the Role of Metal Ions
Acc. Chem. Res., 1999, 32, 485-493
- 241 ERKKILA K. E., ODOM D.T. and BARTON J.K.
Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA
Chem. Rev., 1999, 99 (9), 2777-2796
- 242 CLAUSSEN C. A. and LONG E. C.
Nucleic Acid Recognition by Metal Complexes of Bleomycin
Chem. Rev., 1999, 99 (9), 2797-2816

- 243 USUI Y. and FUJII Y.
Cationic Schiff Base Complexes of Copper (II) and Nickel (II) as new selective binder
J. Inorg. Biochem., 1997, 67 (1-4), 347-347
- 244 TANAKA T., TSURUTANI K., KOMATSU A., ITO T., IIDA K., FUJII Y., NAKANO Y., USUI Y., FUKUDA Y., CHIKIRA M.
Synthesis of New Cationic Schiff Base Complexes of Copper (II) and their Selective Binding
Bull. Chem. Soc. Jpn, 1997, 70, 615-629
- 245 MORROW J. R. and KOLASA K. A.
Cleavage of DNA by Nickel Complexes
Inorg. Chim. Acta, 1992, 195 (2), 245-248
- 246 STEMMLER A. J. and BURROWS C. J.
The Sal-XH Motif for Metal-Mediated Oxidative DNA-Peptide Cross-Linking
J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 6956-6957
- 247 MULLER J. G., KAYSER L. A., PAIKOFF S. J., DUARTE V., TANG N., PEREZ R. J., ROKITA S. E. and BURROWS C. J.
Formation of DNA adducts using Nickel (II) complexes of redox-active ligands : a comparaison of salen and peptide complexes
Coord. Chem. Rev., 1999, 185-186, 761-774
- 248 CHAUDHURI P., HESS M., WEYHERMULLER T. and WIEGHARDT K.
Aerobic Oxidation of Primary Alcohols by a New Mononuclear Cu^{II}-Radical Catalyst.
Angew. Chem. Int. Ed., 1999, 38 (8), 1095-1098

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

PUBLICATIONS

Oxidation of Cu^{II} to Cu^{III}, free radicals production and DNA cleavage by hydroxysalens-copper complexes. Isomeric effects studied by ESR and electrochemistry.

Lamour E., Routier S., Bernier J-L., Catteau J-P., Bailly C. and Veziin H.
J. Am. Chem. Soc., **1999**, 121, 1862-1869

DNA Cleavage by hydroxy-salicylidene-ethylenediamine-iron complexes

Routier S., Veziin H., Lamour E., Bernier J.-L., Catteau J.-P. and Bailly C.
Nucleic Acids Res., **1999**, sous presse

COMPTE-RENDU

Nucleasic activity improvement of salen-copper complexes by hydroquinonic system insertion.

Lamour E., Routier S., Bernier J-L., Catteau J-P., Bailly C. and Veziin H.
C.R. Soc. Biol., **1998**, 192(3), 574.

Study by cyclic voltammetry and ESR spectroscopy of copper salens with a hydroquinone moiety: evidence of Cu³⁺.

Lamour E., Routier S., Bernier J-L., Catteau J-P., Bailly C., Veziin H.
C.R. Soc. Biol., **1999**, sous presse.

COMMUNICATIONS (ORALES et/ou POSTERS)

Fonctionalized salen-complexes containing hydroquinonic systems : synthesis, EPR, nucleasic activity.

Lamour E., Routier S., Bernier J-L., Catteau J-P., Bailly C. and Veziin H.

Polyphenol Communications 98, XIXth International Conference on Polyphenols, Lille, 1-4 septembre 1998.

Etude d'une famille de complexes cuivriques de salènes polyhydroxylés : production de radicaux libres oxygénés et coupure d'ADN.

Lamour E., Routier S., Bernier J-L., Catteau J-P., Bailly C., Vezin H.

« 3^{ème} journée des jeunes chercheurs » de la Société Chimique de France, Lille, 10 décembre 1998.

Study by cyclic voltammetry and ESR spectroscopy of copper salens with a hydroquinone moiety: evidence of Cu³⁺.

Lamour E., Routier S., Bernier J-L., Catteau J-P., Bailly C., Vezin H.

Journées Françaises de Recherches sur les Radicaux Libres, Paris, 15 janvier 1999.

Complexes fonctionnalisés de salènes-fer contenant des systèmes hydroquinoniques : synthèses, RPE et activité nucléasique

Routier S., Vezin H., Lamour E., Bernier J.-L., Catteau J.-P., Bailly C.

Groupe d'étude de Chimie Organique (GECO), La Rochelle, 28/09/99 au 03/09/99

Oxidation of Cu^{II} to Cu^{III}, Free Radical Production, and DNA Cleavage by Hydroxy-salen–Copper Complexes. Isomeric Effects Studied by ESR and Electrochemistry

Eric Lamour,[†] Sylvain Routier,[†] Jean-Luc Bernier,[†] Jean-Pierre Catteau,[†] Christian Bailly,[‡] and Hervé Vezin^{*†}

Contribution from the Laboratoire de Chimie Organique Physique, URA CNRS 351, USTL Bât. C3, 59655 Villeneuve d'Ascq, and INSERM U124 et Laboratoire de Pharmacologie Moléculaire Antitumorale du Centre Oscar Lambret, IRCL, Place de Verdun, 59045 Lille, France

Received June 25, 1998

Abstract: A series of copper complexes of bis(hydroxysalicylidene)ethylenediamine (hydroxy-salens) have been synthesized. The hydroxy group in the *ortho*, *meta*, or *para* position on each salicylidene unit was added to reinforce the stability of the copper complex and to create a hydroquinone system cooperating with the copper redox system to facilitate the spontaneous formation of oxidizing Cu^{III} species. Cyclic voltammetry and ESR spectroscopy in combination with electrochemistry and spin trapping experiments have been used to characterize the structure and the redox state of the hydroxy-salen–copper complexes and to evidence the production of oxygen-based free radicals. A complete set of magnetic values were determined. In addition, we studied the capacity of complexes 3a,b,c to cleave DNA in the absence of activating agents. The *meta* isomer 3b does not generate oxygen radicals, and as a result it cannot cleave DNA. In sharp contrast, the *para* isomer 3c and to a lower extent the *ortho* isomer 3a exhibit nuclease activities in relation to their capacities to produce oxygen radicals. Electrochemistry provides unequivocal evidence for the formation of Cu^{III} species with compounds 3a and 3c, but not with 3b. The nuclease activity correlates well with the ability of the hydroxy-salens to form the oxidizing Cu^{III} species. The redox properties and therefore the DNA cleaving activities of the complexes depend crucially on the position of the OH groups which contribute significantly to stabilize the square planar copper complexes. The present work supports the hypothesis that a hydroquinone system can cooperate with a redox metal system to trigger DNA cleavage. The design of metallo(hydroxy-salens) provides an original route for the development of self-activated chemical nucleases.

Introduction

The trivalent state of copper is generally considered to be an uncommon oxidation state; however, it occurs in reactions relevant to biological processes. A few naturally occurring chelating peptides can decrease sufficiently the oxidation potential of Cu^{III} in order to enable its formation by mild oxidants.^{1–5} Low electrode potential (E°) values ranging from 0.45 to 1.05 V/SHE have been measured for various peptides^{6–8}

containing deprotonated nitrogens as strong σ donors in order to stabilize the higher oxidation state of copper.^{9–11} Low values of the Cu^{III}/Cu^{II} electrode potential were also determined for macrocyclic complexes such as cyclo[G- β A-G- β A]-Cu ($E^\circ = 0.48$ V in aqueous solution).¹² High oxidation state transition complexes represent useful models of redox enzymes such as galactose oxidase^{13,14} and may serve in nucleic acid chemistry as oxidative DNA damaging agents. With this idea in mind, we designed a strategy to construct a new chemical nuclease which can generate oxidizing Cu^{III} species to trigger DNA cleavage.

A number of copper complexes capable of inducing double-stranded DNA lesions have already been developed.^{15–17} Phenanthroline–Cu^{II} and a few related copper complexes have

* To whom correspondence should be addressed.

[†] CNRS.

[‡] INSERM.

(1) Margerum, D. W.; Scheper, W. M.; McDonald, M. R.; Fredericks, F. C.; Wang, L.; Lee, H. D. In *Bioorganic Chemistry of Copper*; Karlin, K. D., Tyeklar, Z., Eds.; Chapman & Hall: New York, 1993; p 213.

(2) Margerum, D. W. In *Oxidases and related Redox-systems*; King, T. E., Mason, H. S., Morrison, M., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1982; p 193.

(3) Kou, F.; Zhu, S.; Lin, H.; Ma, K.; Chu, Y. *Polyhedron* 1997, 16, 741.

(4) Margerum, D. W.; Wang, L.; Scheper, W. M.; Wang, L.; Lee, H. D. *J. Inorg. Biochem.* 1991, 43, 211.

(5) McDonald, M. R.; Scheper, W. M.; Lee, H. D.; Margerum, D. W. *Inorg. Chem.* 1995, 34, 229.

(6) Bossu, F. P.; Chellappa, K. L.; Dak, W.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, 99, 2195.

(7) Ruiz, R.; Surville-Barland, C.; Ankanloo, A.; Anxolabehere-Mallart, E.; Journaux, Y.; Cano, J.; Carmen Muñoz, M. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1997, 745.

(8) Margerum, D. W.; Chellappa, K. L.; Bossu, F. P.; Burce, G. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 6894.

(9) Margerum, D. W.; Owens, G. D. In *Metal Ions in Biological Systems*; Sigel, H., Eds.; Marcel Dekker: New York, 1981; p 75.

(10) Youngblood, M. P.; Margerum, D. W. *Inorg. Chem.* 1980, 19, 3068.

(11) Bossu, F. P.; Chellappa, K. L.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 2195.

(12) Rybka, J. S.; Margerum, D. W. *Inorg. Chem.* 1981, 20, 1453.

(13) Ito, N.; Phillips, S. E. V.; Stevens, L.; Ogel, Z. B.; McPherson, M. S.; Yadav, K. D. S.; Knowles, P. F. *Nature* 1991, 350, 87.

(14) Sokolowski, A.; Müller, J.; Weyhermüller, T.; Schnepf, R.; Hildebrandt, P.; Hildenbrand, K.; Bothe, E.; Wieghardt, K. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 8889.

(15) Huber, P. W. *FASEB J.* 1994, 7, 1367–1375.

(16) Pratiel, G.; Bernadou, J.; Meunier, B. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 746–769.

(17) Burrows, C. J.; Muller, J. G. *Chem. Rev.* 1998, 98, 1109.

Hydroxy-salen-Cu Complexes

J. Am. Chem. Soc., Vol. 121, No. 9, 1999 1863

been extensively exploited for the study of nucleic acid structure and function as well as to investigate drug and protein binding.^{18,19} However, in most cases, if not all, the cleavage reaction must be initiated by a reducing agent such as dithiothreitol or mercaptopropionic acid. The DNA cleavage reaction is oxygen-dependent and mediated by reactive oxygen species produced concomitantly with the reduction of Cu^{II} to Cu^I. For example, in a typical DNA cleavage experiment, the reaction of Cu^{II} with the reducing agent generates Cu^I which then can react with molecular oxygen and/or hydrogen peroxide to produce hydroxyl radicals responsible for DNA breakage. Alternatively, a transient Cu^{II}-oxo intermediate may form.^{18,19} It would be of interest to find a self-activated system that would not require reductive activation to generate free radicals and to exert DNA cleavage.

For the past few years our interest has focused on the synthesis of simple, peptidic and nonpeptidic molecules that mimic structural and/or functional aspects of nucleases.^{20–25} Our approach exploits the potential of metal complexes of *N,N*-bis(salicylidene)ethylenediamine compounds, usually referred to as metallosalens, which have been used for a long time as catalysts for selective epoxidation of olefins and oxidation of hydrocarbons.^{26,27} Salens complexed with various metals (Cu^{II} but also Ni^{II}, Co^{II}, and Mn^{III}) can be used as probes for the cleavage of DNA or RNA.^{17,28–33} In a recent study, we showed that salen-Cu complexes can efficiently induce nonspecific DNA damages upon activation with mercaptopropionic acid.²⁰ Here we report a new type of salen-Cu complex which can give spontaneously the oxidant species Cu^{III} and cleave DNA without an activating agent. This is a new copper-containing self-activated chemical nuclease.^{34–36} Only a few nucleases of this type have been reported so far. A variety of methods including ESR and cyclic voltammetry have been employed to characterize the structure of the complexes and their redox state and the production of free radicals and their DNA cleaving activities.

To obtain copper complexes with a low Cu^{III}/Cu^{II} electrode

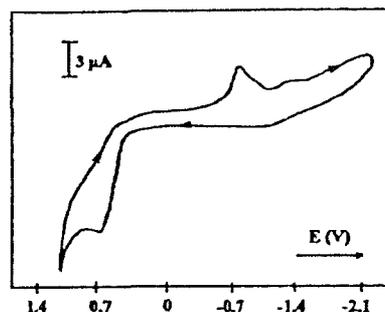
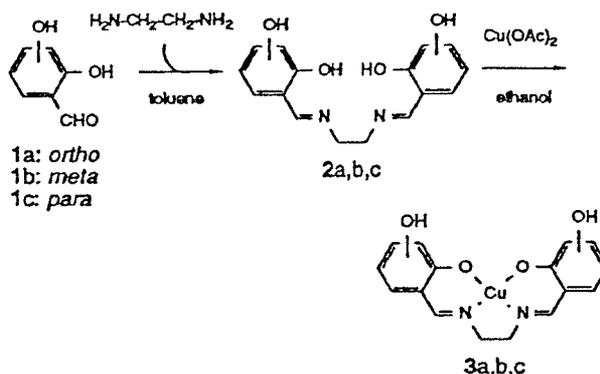


Figure 1. Cyclic voltammogram for the *ortho* ligand 2a in DMSO containing 0.1 N tetraethylammonium perchlorate. A similar curve was obtained with the *para* analogue 2c.

Scheme 1



potential, we incorporated a hydroquinone system on the *N,N*-bis(salicylidene)ethylenediamine-copper complex (Scheme 1). We reasoned that the addition of hydroxyl groups in the *ortho*, *meta*, or *para* position on the aromatic ring of the salen moiety would activate the nuclease activity of the copper complexes. On one hand, the newly introduced OH groups should increase the electronic density on the metal by their σ donor effects and lower the Cu^{II}/Cu^{III} electrode potential E° . On the other hand, the presence of a hydroquinone may alter the redox properties of the molecule, favoring the formation of an equilibrium in electron transfer through the complex, leading to a semiquinone radical.

The electrochemical and spectroscopic studies reported here reveal that, depending on the positions of the hydroxyl groups, the redox and structural properties of the copper complexes differ significantly. The *para* isomer 3c and to a lower extent the *ortho* isomer 3a, which can form Cu^{III} species, can spontaneously cleave DNA whereas neither the *meta* isomer 3b nor the non-hydroxylated derivative 3d have any effect.

Results

Cyclic Voltammetry. For the *ortho* (2a) and *para* (2c) ligands, the strong oxidation wave ($E_{pa} = +0.56$ V/SCE at 50 mV s⁻¹) was attributed to a two-electron oxidation of the hydroquinone moiety. No reversible or quasi-reversible oxidation was observed for any of the ligands. Cathodic peaks were detected at -0.74 V after oxidation (Figure 1). No significant oxidation or reduction wave was detected with the *meta* ligand (2b).

The cyclic voltammogram of 3a is shown in Figure 2 as a typical example of the reduction and subsequent oxidation of the hydroxy-salen complexes. A similar curve was obtained with 3c. Starting from zero potential, a quasi-reversible reduction

- (18) Sigman, D. S.; Chen, C.-H. B. *Annu. Rev. Biochem.* 1990, 59, 207–236.
 (19) Sigman, D. S.; Mazumder, A.; Perrin, D. M. *Chem. Rev.* 1993, 93, 2295–2316.
 (20) Routier, S.; Bernier, J. L.; Waring, M. J.; Colson, P.; Houssier, C.; Bailly, C. *J. Org. Chem.* 1996, 61, 2326.
 (21) Routier, S.; Bernier, J. L.; Catteau, J. P.; Bailly, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 1, 63.
 (22) Routier, S.; Cotellet, N.; Catteau, J. P.; Bernier, J. L.; Waring, M. J.; Riou, J. F.; Bailly, C. *Bioorg. Med. Chem.* 1996, 4, 1185.
 (23) Routier, S.; Bernier, J. L.; Catteau, J. P.; Colson, P.; Houssier, C.; Rivalle, C.; Bisagni, E.; Bailly, C. *Bioconjugate Chem.* 1997, 6, 7789.
 (24) Routier, S.; Bernier, J. L.; Catteau, J. P.; Bailly, C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 13, 1729.
 (25) Routier, S.; Joanny, V.; Zaparucha, A.; Vezin, H.; Catteau, J. P.; Bernier, J. L.; Bailly, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* 1998, 4, 863.
 (26) Breslow, R.; Zhang, X.; Xu, R.; Maletic, M.; Mergler, R. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 11678.
 (27) Adam, W.; Fell, R. T.; Stegmann, V. R.; Saha-Möllner, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 708.
 (28) Müller, J. G.; Chen, X.; Dadiz, A. C.; Rokita, S. E.; Burrows, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 6407.
 (29) Gravert, D. J.; Griffin, J. H. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 820.
 (30) Müller, J. G.; Paikoff, S. J.; Rokita, S. E.; Burrows, C. J. *J. Inorg. Biochem.* 1994, 54, 199.
 (31) Gravert, D. J.; Griffin, J. H. *Inorg. Chem.* 1996, 35, 4837.
 (32) Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Acc. Chem. Res.* 1994, 27, 295.
 (33) Bhattacharya, S.; Mandal, S. S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1995, 24, 2489.
 (34) Lyollis, W.; Scannell, R. T.; An, H.; Murty, V. S.; Reddy, K. S.; Barr, J. R.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 12683.
 (35) Singh, U. S.; Scannell, R. T.; An, H.; Carter, B. J.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 12691.
 (36) Borah, S.; Melvin, M. S.; Lindquist, N.; Manderville, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 4557.

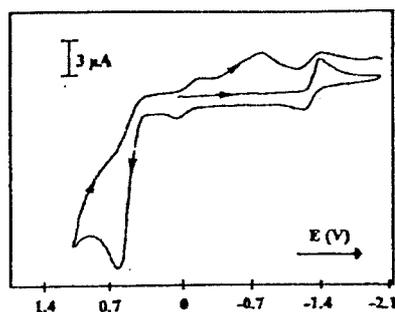


Figure 2. Cyclic voltammogram for the *ortho* copper complex 3a in DMSO containing 0.1 N tetraethylammonium perchlorate. A similar curve was obtained with the *para* analogue 3c.

and subsequent oxidation ($\Delta E = 130$ mV) assigned to the one-electron transfer $\text{Cu}^{\text{I}} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ was observed at $E_{1/2} = -1.33$ V/SCE. Another quasi-reversible wave ($\Delta E = 200$ mV) observed at $E_{1/2} = -0.100$ V/SCE was assigned to oxidation of $\text{Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{Cu}^{\text{III}}$. The strong oxidation wave at $+0.55$ mV and reduction wave at -0.82 V are representative of the oxido-reduction of the quinone moiety as mentioned above (Figure 1). Similar experiments were carried out with the non-hydroxylated salen-Cu^{II} complex. In this case, only one quasi-reversible oxido-reduction wave was observed at -1.0 V. It is assigned to the one-electron transfer $\text{Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{Cu}^{\text{I}}$ (Figure 2). The cyclic voltammogram of complex 3b did not show any oxido-reduction wave.

Electron Spin Resonance. Figure 3 displays the ESR spectra of compounds 3a,b,c obtained in liquid nitrogen (77 K, Figure 3a) and at room temperature (20 °C, Figure 3b). The three equally spaced ESR peaks, shown in Figure 3a and observed at low magnetic field, are related to the hyperfine coupling of Cu^{II}. The parallel components g_{\parallel} and A_{\parallel} were determined from the spectrum at low temperature. The perpendicular region is more difficult to interpret due to the absence of superhyperfine structure in the g_{\perp} region. Therefore, the perpendicular components cannot be precisely determined. However, the ESR spectrum in free tumbling motion at room temperature (Figure 3b,c) enabled us to determine the average value of the isotropic components g_0 and A_0 from which the perpendicular components g_{\perp} and A_{\perp} can be calculated using the relationships $g_0 = (g_{\parallel} + 2g_{\perp})/3$ and $A_0 = (A_{\parallel} + 2A_{\perp})/3$. The ESR parameters of the hydroxysalen-Cu^{II} complexes are reported in Table 1. Figure 3c displays the ESR signal of compound 3c obtained after addition of a small amount of NaOH (1 M) in order to activate the hydroquinonic system. In this case, the Cu^{II} ESR signal is strongly decreased (up to 60%). The same phenomenon was observed with 3a but not with 3b, which cannot form a semiquinone.

ESR spectra of Cu^{II} ions can be described by the spin Hamiltonian³⁷

$$H_{\text{Cu}} = \mu_B \bar{H} \bar{g}_{\text{Cu}} \cdot \bar{S}_{\text{Cu}} + \bar{S}_{\text{Cu}} \cdot \bar{A}_{\text{Cu}} \cdot \bar{I}_{\text{Cu}} + \sum_{\text{Ni}} \bar{S}_{\text{Cu}} \cdot \bar{A}_{\text{Ni}} \cdot \bar{I}_{\text{Ni}}$$

where $\bar{S}_{\text{Cu}} = 1/2$ and $\bar{I}_{\text{Cu}} = 3/2$ are the electronic and nuclear spins of copper, respectively. The two hyperfine tensors \bar{g}_{Cu} and \bar{A}_{Cu} of copper expressed the coupling strength of its electronic spin with the applied magnetic field and nuclear magnetic moment associated with \bar{I}_{Cu} . The last term refers to the superhyperfine interaction resulting from the coupling of

(37) Abragam, A.; Bleaney, B. *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*; Clarendon Press: Oxford, U.K., 1970.

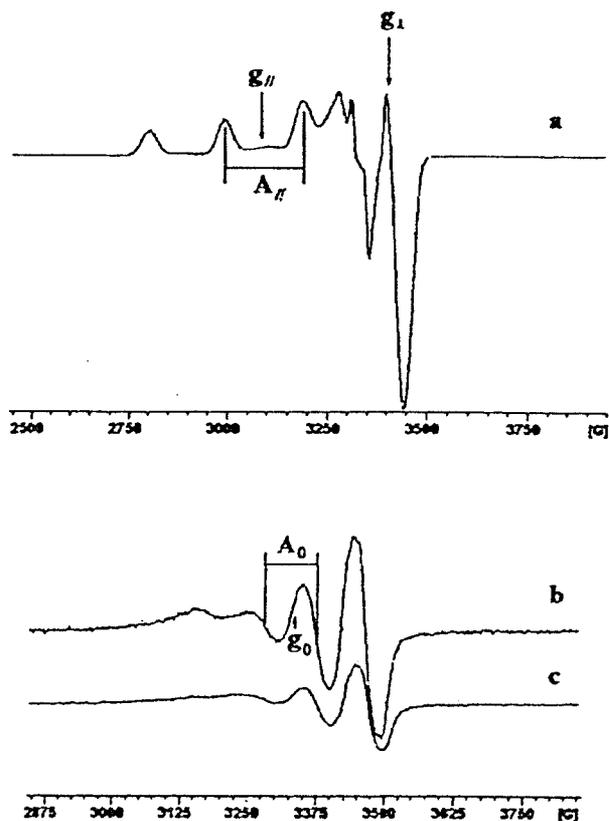


Figure 3. Experimental X-band ESR spectra of the *para* copper complex 3c at 2 mM in DMSO (a) at liquid nitrogen temperature (77 K), (b) at room temperature, and (c) in the presence of NaOH. The receiver gain was 1.25×10^4 . Magnetic parameters are reported in Table 1.

Table 1. ESR Parameters of the Salen-Cu Complexes

	g values			A values (^{63}Cu , $\times 10^4 \text{ cm}^{-1}$)			α^2	k
	g_{iso}	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{iso}	A_{\parallel}	A_{\perp}		
Without NaOH								
<i>ortho</i> (3a)	2.100	2.207	2.046	-83.5	-181.1	-34.73	0.69	0.33
<i>meta</i> (3b)	2.098	2.207	2.043	-85.6	-181.1	-37.88	0.68	0.33
<i>para</i> (3c)	2.098	2.207	2.043	-86.7	-182.4	-38.86	0.69	0.34
3d	2.050	2.210	1.970	-83.0	-178.6	-35.20	0.72	0.28
With NaOH								
<i>ortho</i> (3a)	2.094	2.230	2.026	-86.5	-185.2	-37.20	0.73	0.33
<i>meta</i> (3b)	2.092	2.210	2.033	-88.3	-183.3	-40.90	0.69	0.33
<i>para</i> (3c)	2.095	2.220	2.033	-88.4	-191.7	-36.70	0.74	0.34

copper electronic spin with nuclear spin \bar{I}_{Ni} of the nitrogen ligand. Figure 4a displays the experimental second-derivative spectrum of 100 G expansion of the $m_I = +3/2$ line of the isotropic spectrum of Figure 3b. The spectrum exhibits 10 lines which can be attributed to the superhyperfine interactions of the two equivalent nitrogen nuclei of the complex with the nuclear spin of isotopes ^{63}Cu and ^{65}Cu with identical intensities of 1:2:3:2:1. The simulated spectrum (Figure 4b) was determined using a hyperfine coupling splitting constant of 14.25 G for both nitrogens. The result gives a good fit with the experimental spectrum.

The g values and hyperfine splitting constants are related to the matrixes g and A, respectively. From the experimental data, we measured for all complexes the g_{\parallel} values which are in agreement with the relation $g_{\parallel} > g_{\perp}$, indicating that we are in the presence of a $d_{x^2-y^2}$ ground state. This arrangement is

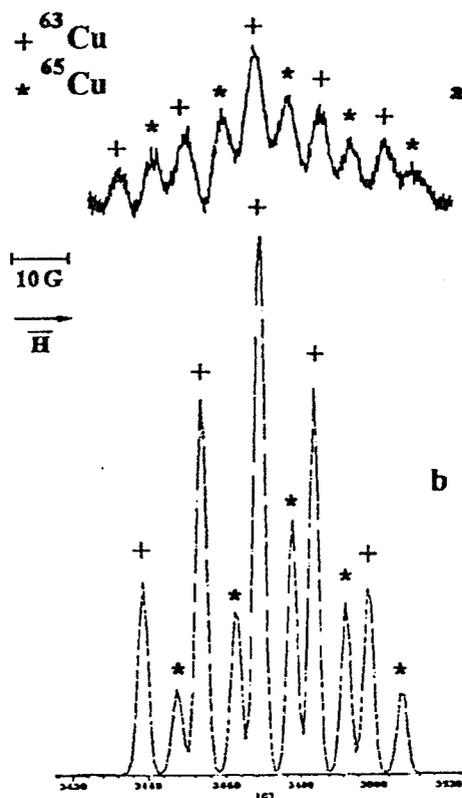


Figure 4. Experimental (a) and simulated (b) ESR spectra of the copper complex 3c in DMSO solution at room temperature. The experimental spectrum (a) corresponds to a 100 G expansion of the second harmonic 90° out of phase $m_l = +3/2$ copper component. The theoretical spectrum (b) was simulated considering two equivalent nitrogen nuclei coupled to ^{63}Cu and ^{65}Cu nuclear spin at relative natural isotopic abundance. $A_{\text{iso}}^N = -0.0013 \text{ cm}^{-1}$.

characteristic of a square-planar, a square base pyramidal, or an octahedral geometry.^{38,39} From the equation describing the molecular antibonding orbitals, which are related to the Hamiltonian spin parameters, we can write the magnetic parameters as follows:

$$A_{\parallel} = P \left(-k - \frac{4\alpha^2}{7} + (g_{\parallel} - 2.0023) + \frac{3(g_{\parallel} - 2.0023)}{7} \right)$$

$$A_{\perp} = P \left(-k + \frac{2\alpha^2}{7} + \frac{11(g_{\perp} - 2.0023)}{14} \right)$$

We used these two equations together with the g and A values previously calculated to measure the extent of ionic bonding α^2 and the extent contact term k .⁴⁰ The α^2 factor is related to the unpaired electron density on the d -orbital of Cu^{II} . This factor results from the dipole-dipole interaction between magnetic moments associated with the spin of the electron and the nucleus and is closely related to the A_{\parallel} value.

The α^2 values for the complexes 3a,b,c are lower than that calculated for the non-hydroxylated complex (Table 1). This can be attributed to an increase of covalency due to the donor effect of the hydroxyl groups. It is important to note that when the hydroquinonic system is activated by addition of small

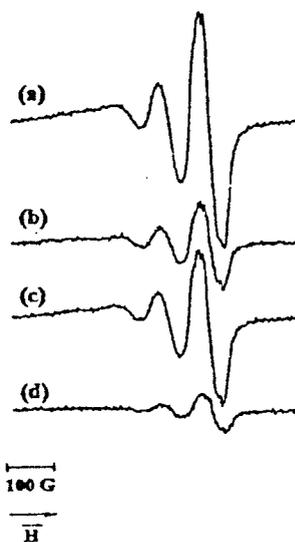


Figure 5. Experimental ESR spectra in combination with electrochemistry of compound 3c at 2 mM in DMSO and at room temperature: (a) reference spectrum, (b) -1.4 V , (c) 0 V , and (d) $+0.5 \text{ V}$. The receiver gain was 1.25×10^4 .

amounts of NaOH , we observed a significant increase of α^2 for 3a and 3c complexes, suggesting an increase of ionic copper ligand bonding most likely due to the formation of a semiquinone radical. In the case of the 3b complex, the semiquinone radical cannot form, and as a result, the α^2 value remains almost unchanged. The k value arises from the Fermi contact interaction. Its origin comes from the nonvanishing probability of finding the unpaired electron at the nucleus site.⁴⁰ The k values obtained with compounds 3a,b,c in the presence or absence of NaOH (i.e., independently of the semiquinonic system) are higher than that obtained with the non-hydroxylated complex. The k value for the non-hydroxylated compound is consistent with a tetrahedral distortion of the symmetry around the metal ion explained by the reduction of the anisotropic hyperfine term.

Coupling to Electrochemistry. To investigate further the redox state of the copper complexes, we performed a series of experiments by combining electrochemistry with ESR measurements. The ESR signals were measured under potential at the characteristic values found by cyclic voltammetry. Figure 5 shows the results obtained with 3c using DMSO as a solvent. The reference signal in Figure 5a corresponds to the complex in the absence of current. Imposed potentials of -1.4 , -0.01 , and $+0.5 \text{ V}$ gave the signals represented in parts b-d, respectively, of Figure 5. At the lowest potential (-1.4 V) a strong decrease ($\sim 60\%$) of the copper(II) ESR signal is observed, resulting from a reduction of Cu^{II} to Cu^{I} . When the potential is brought back to a value near 0 V , the typical Cu^{II} signal is partially restored (Figure 5c). The incomplete restoration of the signal may be due to the fact that at $\sim 0 \text{ V}$, we are approaching the potential of Cu^{III} which is an ESR silent species. For a potential of $+0.5 \text{ V}$, a strong drop of the ESR signal is observed ($> 80\%$), suggesting an almost complete oxidation of Cu^{II} to Cu^{III} (Figure 5d). At this stage, a very weak and unstable signal of 20 G sweep width was detected. It may be attributable to the formation of a semihydroquinone radical (Figure S4 in the Supporting Information).

Spin trapping experiments were performed to detect reactive oxygen species produced upon variation of the redox state of copper. These experiments were also performed in combination with electrochemistry. Both DMSO and ethanol were used as

(38) Hathaway, B. J.; Tomlinson, A. A. G. *Coord. Chem. Rev.* 1970, 5, 1.

(39) Hathaway, B. J.; Billing, D. E. *Coord. Chem. Rev.* 1970, 5, 143.

(40) Maki, A. H.; McGarvey, B. R. *J. Chem. Phys.* 1958, 29, 31.

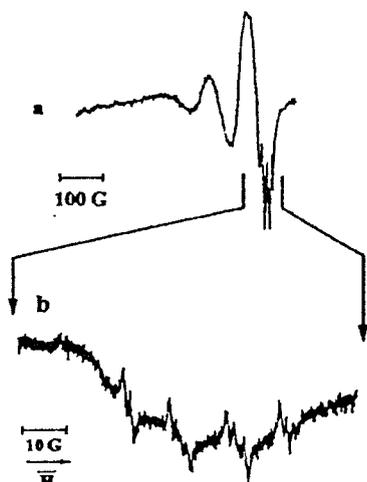


Figure 6. Experimental X-band ESR spectra of compound **3c** at 2 mM in DMSO and at room temperature in the presence of 3.2 mM DMPO (a). Spectrum (b) corresponds to a 100 G expansion of the $m_l = +3/2$ copper component of the DMPO-OOH spin adduct. The hyperfine splitting constants are $a_N = 14.35$, $a_H = 12.75$, and $a_{H\beta} = 1.5$ G.

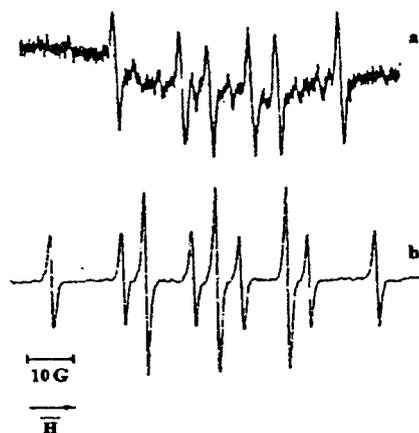


Figure 7. Experimental ESR spectra of (a) the DMPO-CH₃ spin adduct ($a_N = 14.7$ and $a_H = 21$ G) and (b) the DMPO-H spin adduct ($a_N = 15.75$ and $a_H = 20.37$ G). The ESR spectra were obtained in combination with electrochemistry using a 2 mM solution of compound **3c** at room temperature in the presence of 3.2 mM DMPO. The applied potentials were (a) -1.4 V and (b) +0.5 V.

solvents, and 5,5'-dimethylpyrroline *N*-oxide (DMPO) provided the spin trapping agent. Figure 6 displays the spectra recorded in a pure DMSO solution. A typical Cu^{II} ESR signal with four lines superimposed on the $m_l = +3/2$ line was observed (Figure 6a). A closer view of the spectrum (100 G sweep width in Figure 6b) revealed the presence of an ESR signal corresponding to the DMPO adduct of the superoxide anion radical O₂⁻ produced by compounds **3a** and **3c**. The hyperfine splitting constants $a_N = 14.35$, $a_H = 12.75$, and $a_{H\beta} = 1.5$ G are characteristic of a DMPO-OOH spin adduct (simulated spectrum in Figure S1 in the Supporting Information). Moreover, there is a modification of the spectrum line shape, indicating the presence of overlapped Cu^{II} species.

With the coupling of electrochemistry (Figure 7), two different spin adducts were detected depending on the reductive (-1.4 V) or oxidative (+0.5 V) conditions. When a potential of -1.4 V was applied to the solution, the spin adduct DMPO-CH₃ was detected (ESR parameters for hyperfine splitting

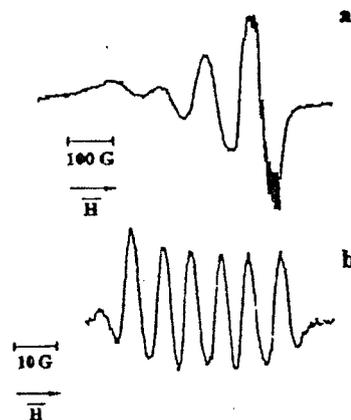


Figure 8. (a) ESR spectrum of compound **3c** in ethanol at room temperature. A 100 G expansion of the second derivative of the $m_l = +3/2$ copper component is shown in (b). DMPO-copper complex adduct with hyperfine splitting constants $a_N = 13$ G and $a_{H\beta} = 7.7$ G.

constants $a_N = 14.7$ and $a_H = 21$ G in Figure 7a, simulated spectrum in Figure S2 in the Supporting Information). The DMPO-CH₃ spin adduct is a well-known signature for the production of hydroxyl radicals which decompose in DMSO.^{41,42} At a higher potential (+0.5 V), a drastic change in trapped species occurs. Indeed, the spectrum shown in Figure 7b can be attributed to the spin adduct DMPO-H with hyperfine splitting constants $a_N = 15.75$ and $a_H = 20.37$ G (simulated spectrum in Figure S3 in the Supporting Information). This spectrum is consistent with the formation of a semiquinone radical by a homolytic cleavage of the OH groups, producing H[•] radicals trapped by DMPO.

The ESR spectra obtained with compounds **3a** and **3c** recorded in ethanol show a six-line superimposed spectrum on the $m_l = 3/2$ line of the Cu^{II} species (Figure 8a). The second-derivative 100 G expansion spectrum gave $a_N = 13$ G and $a_{H\beta} = 7.7$ G (Figure 8b). The relative magnitude of the A value with $a_N > a_{H\beta}$ indicates that an oxygen-centered radical has been trapped. We can speculate the formation of a Cu^{II}-O₂ complex which has one unpaired electron and that this species is trapped to yield the spin adduct shown in Figure 8. Magnetic nuclei more than three bond lengths away from the nitroxide usually do not cause resolvable splitting. Therefore, hyperfine splitting due to the copper nucleus is not expected.

DNA Cleavage. The ESR data reported above revealed clear differences between the hydroxy-salen derivatives depending on the presence and the position of the OH groups. Accordingly, the DNA cleaving capacities of the compounds differ substantially. DNA cleavage was analyzed by monitoring the conversion of supercoiled plasmid DNA (form I) to the nicked circular molecules (form II) and linear DNA (form III). The experiments were performed in the absence of an activating agent (no MPA) in order to satisfy the imposed conditions. It can be seen in Figure 9 that neither the non-hydroxylated compound nor the *meta* derivative **3b** causes any detectable cleavage of nucleic acid. The extent of nicked DNA is identical to that of the control with no ligand present in it. In sharp contrast, the *ortho* (**3a**) and *para* (**3c**) derivatives significantly promote DNA cleavage in the absence of activator. **3c** is more effective than **3a**. Under the conditions specified in the caption of Figure 9a, compound **3c** causes substantial DNA cleavages with a nearly complete

(41) Britigan, B. E.; Rosen, G. M.; Chai, Y.; Cohen, M. S. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 4426.

(42) Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. *Arch. Biochem. Biophys.* 1980, 200, 1.

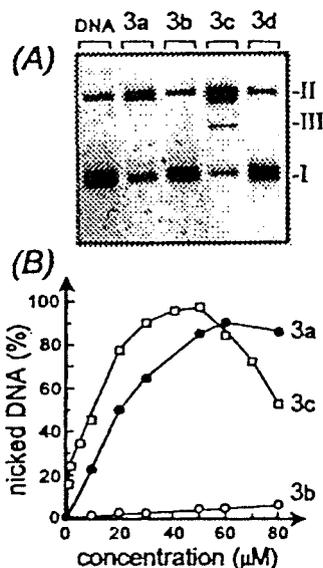


Figure 9. (A) Cleavage of closed circular DNA. Supercoiled DNA (0.6 μg) was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h with the copper complexes 3a,b,c at 50 μM . Forms I, II, and III refer to the supercoiled, nicked, and linear DNA forms, respectively. (B) Comparison of the cleavage efficiency of the *ortho*, *meta*, and *para* complexes. The plots show the formation of nicked DNA (form II) as a function of the ligand concentration.

conversion of form I to the nicked form II and the appearance of linearized DNA molecules (form III; excess single-strand breaks enhance the probability of double-strand scissions). The dose-dependent curves in Figure 9b corroborate these observations. No cleavage can be detected with 3a and its non-hydroxylated counterpart, even at a concentration as high as 1 mM. 3c is the most efficient nuclease in the series. It can convert supercoiled DNA into nicked DNA at low concentrations in the absence of MPA. Parenthetically, we noted that all four ligands induce roughly similar extents of DNA cleavage in the presence of 100 μM mercaptopropionic acid (MPA) as a reducing agent ($\text{Cu}^{\text{II}} \rightarrow \text{Cu}^{\text{I}}$ reductive pathway, data not shown). The biochemical results are in perfect agreement with the voltammetry and ESR data.

Discussion

The *para* isomer 3c exhibits a remarkable nuclease activity. The cleavage of DNA arises most likely from the attack by reduced oxygen species which can be identified by spin trapping experiments (Figures 6 and 7). The ESR and voltammetry data with 3c (and 3a as well) are consistent with the reaction pathway indicated in Figure 10. Two main chemical routes can be envisaged for the reaction of the Cu^{II} -hydroquinone complex with molecular oxygen. The first pathway involves direct activation of the quinone system. Indeed, we cannot exclude the possibility that the production of $\text{O}_2^{\cdot-}$ radicals results from the activation of the hydroquinone into a semiquinone. In this case, the Cu^{II} -quinone $^{\cdot-}$ species initially formed would then transform into the corresponding Cu^{III} -quinone $^{\cdot-}$ form.⁴³ The second pathway is more likely to occur and involves the formation of a dioxygen-Cu $^{\text{II}}$ complex (as judged from the typical ESR spectrum in Figure 8) in equilibrium with a Cu^{III} - $\text{O}_2^{\cdot-}$ intermediate preceding the formation of the Cu^{III} -hydroquinone species. Such metal-dioxygen complexes have been

described with cobalt complexes.^{43,44} Additional experiments performed under oxygenation conditions also agree with the formation of a dioxygen-metal complex. Indeed, under oxygen we detected a strong ESR signal characteristic of the DMPO-OOH adduct when the ligand was dissolved in DMSO, and a dioxygen-metal complex spin adduct was detected when the ligand was dissolved in ethanol. At the same time, the signal of the Cu^{II} complex disappeared almost completely (spectra not shown). All the data concur that a superoxo- Cu^{III} intermediate does form prior to the production of superoxide anions. The voltammogram of 3a,c attests that both complexes can form Cu^{III} species at low potential values (Figure 2). The effect is directly attributable to the presence on the aromatic ring of two hydroxyl groups in the *ortho* or *para* positions. The formation of a Cu^{III} intermediate is new but not entirely surprising since it is known that the $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{III}}$ potential of copper complexes is strongly reduced near 0 V versus a standard calomel electrode and is significantly influenced by ligation geometry and solvation.^{45,46} Therefore, it is logical to observe that the hydroxy-salen compounds adopt a square-planar geometry whereas the *k* value for the non-hydroxylated salen-Cu complex is more consistent with a tetrahedral distortion (Table 1). The square-planar anionic coordination environment inhibits axial interaction and favors the d^8 Cu^{III} oxidation state.⁴⁷

An additional interesting issue of this work concerns the production of H^{\cdot} radicals. As indicated in Figure 10, it is plausible that the hydroquinone-Cu $^{\text{III}}$ complex evolves into a semiquinone-Cu $^{\text{III}}$ complex with concomitant production of H^{\cdot} radicals. The characterization of the DMPO- H^{\cdot} adducts attests that this reaction occurs, at least under relatively high potential conditions (between 0 and 500 mV). The increase of the potential value facilitates the production of the Cu^{III} species and the formation of the semiquinone radical (at +0.566 V), but there is no direct evidence that the same reaction takes place under the conditions employed for the DNA cleavage experiments. The detection of H^{\cdot} and $\text{O}_2^{\cdot-}$ radicals by spin trapping is consistent with the formation of a semiquinone radical when the hydroxyl groups are positioned in the *para* position (3c). In theory the semiquinone system cannot function with the hydroxyl in the *meta* position, and this is exactly what we observe. The hydroxyl groups in the *ortho* or *para* positions reinforce the σ donor effect of the oxygen atoms involved in the metal complexation. There is no doubt that the position of the OH is crucial in order to activate the copper complex.

In conclusion, the experimental data suggest that the hydroquinone system cooperates with the copper moiety to facilitate the formation of Cu^{III} species and free radicals responsible for DNA cleavage. We intend to use the original hydroquinone/semiquinone system described here with other metal-salen complexes, in particular with Fe-hydroxy-salens which efficiently mimic the activity of nucleases.

Experimental Section

Synthesis. The purity of all compounds was assessed by TLC, ^1H and ^{13}C NMR, and mass spectroscopy. TLC was carried out using silica gel 60F-254 (0.25 mm thick) precoated UV-sensitive plates. Spots were visualized by inspection under visible or UV light at 254 nm. Melting points were determined in a hot plate microscope and are uncorrected.

(44) Bertini, I.; Luchinat, C.; Brown, R. D.; Koenig, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 3532.

(45) Cole, A. P.; Root, D. E.; Mukherjee, P.; Solomon, E. I.; Stack, T. D. P. *Science* 1996, 273, 1848.

(46) Coleman, B.; Conrad, N. D.; Baum, M. W.; Jones, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101, 7744.

(47) Hamilton, D. E.; Drago, R. S.; Telser, J. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 5353.

(43) Kitajima, N.; Moro-oka, Y. *Chem. Rev.* 1994, 94, 737.

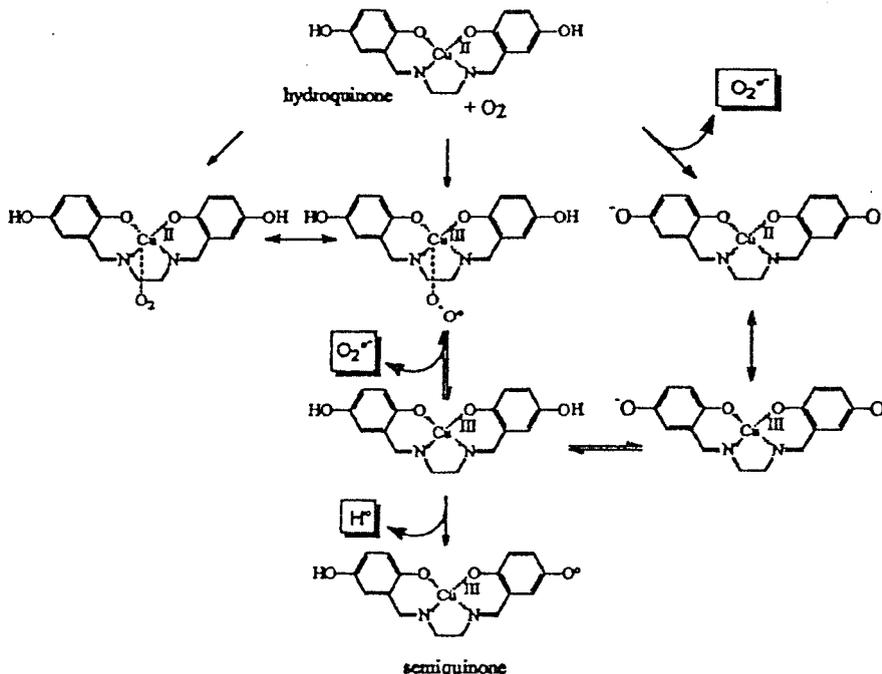


Figure 10. Proposed mechanism for the production of free radicals by compound **3c**. Reaction of the hydroquinone **3c** with oxygen leads to the oxidation of Cu^{II} to Cu^{III} . The transient Cu^{III} -superoxo complex then dissociates, producing superoxide anions and the Cu^{III} -hydroquinone complex, which in turn can provide hydrogen radicals and the Cu^{II} -semiquinone complex. The free radicals (detected by spin trapping) would be responsible for DNA cleavage.

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker AC300. Chemical shifts (δ) are referenced to internal solvent and reported relative to SiMe_4 . IR spectra were obtained using KBr pellets, and only the principal sharp peaks are given. MALDI (mass-assisted laser desorption/ionization) mass spectra were determined on a Finigan MAT Vision 2000 (Bremen). The matrix used was dihydroxybenzoic acid/water.

Hydroxy-salen-copper complexes **3a,b,c** were obtained using a conventional procedure for salen synthesis based on the condensation of hydroxysalicylaldehyde with ethylenediamine (Scheme 1).²⁰ The copper complex formation was achieved with **2a,b,c** in the presence of cuprous acetate monohydrate. The synthesis of the non-hydroxylated analogue **3d** has been reported.²⁰

N,N'-Bis(hydroxysalicylidene)ethylenediamine (**2a,b,c**). A solution of 1.88 g (13.61 mmol) of dihydroxybenzaldehyde (**1a,b,c**) (Sigma Chemical Co., France) and 0.40 g (6.66 mmol) of ethylenediamine in toluene (150 mL) was refluxed under vigorous stirring with a Dean-Stark apparatus for 3 h. The resulting solution was kept at room temperature for 1 h prior to being filtered and washed successively with ethanol (2 \times 10 mL) and ethyl ether (2 \times 10 mL) to afford compounds **2a,b,c**.

Data for compound **2a** (1.96 g; 98%): orange solid; mp > 230 °C; IR (KBr, cm^{-1}) ν 3400, 1540, 1460, 1380, 1360, 1280, 1240, 1200, 1020, 900, 860, 790, 740; MS (MALDI⁺) m/z 301.4 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, 323.5 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺; R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 8:2) 0.78; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3.92 (s, 4H), 6.64 (t, $J = 7.6\text{--}7.8$ Hz, 2H), 6.83 (m, 4H), 8.54 (s, 2H), 12.8 (s, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 58.04 (CH_2), 117.69 (CH), 117.76 (CH), 118.2 (Cq), 121.86 (CH), 145.85 (Cq), 151.10 (Cq), 167.19 (CH).

Data for compound **2b** (1.94 g; 97%): orange solid; mp > 230 °C; IR (KBr, cm^{-1}) ν 2800, 1640, 1580, 1500, 1480, 1360, 1280, 1240, 1210, 1160, 1120, 1000, 980, 840, 800, 610; MS (MALDI⁺) m/z 301.4 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 8:2) 0.56; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3.76 (s, 4H), 6.14 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 6.24 (dd, $J = 2.2, 8.3$ Hz, 2H), 7.15 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.35 (s, 2H), 12.6 (s, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 57.66 (CH_2), 102.58 (CH), 106.96 (CH), 111.12 (Cq), 133.39 (CH), 161.97 (Cq), 164.63 (Cq), 165.8 (CH).

Data for compound **2c** (1.93 g; 97%): orange solid; mp > 230 °C; IR (KBr, cm^{-1}) ν 3320, 1640, 1600, 1510, 1450, 1410, 1310, 1260, 1220, 1180, 1040, 970, 860, 840, 800, 680; MS (MALDI⁺) m/z 301.4

($\text{M} + \text{H}$)⁺, 323.5 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, 339.4 ($\text{M} + \text{K}$)⁺; R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 8:2) 0.90; ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 3.86 (s, 4H), 6.64–6.79 (m, 6H), 8.46 (s, 2H), 12.51 (s, 2H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ 59.03 (CH_2), 116.47 (CH), 116.85 (CH), 118.5 (Cq), 119.88 (CH), 149.27 (Cq), 152.99 (Cq), 166.33 (CH).

[*N,N'*-Bis(hydroxysalicylidene)ethylenediamine]copper (**3a,b,c**). A solution of **2a,b,c** (0.250 g, 0.83 mmol) in dry ethanol (20 mL) and cuprous acetate monohydrate (0.170 g, 0.83 mmol) in water (2 mL) was refluxed under vigorous stirring for 2 h. After this time, the resulting solution was kept at room temperature, filtered, and then washed successively with water, methanol, and ethyl ether (3 \times 10 mL) to afford compounds **3a,b,c**. NMR spectra of complexes **3a,b,c** exhibit a broadened line in the aromatic region due to the paramagnetism of Cu^{II} (this well-known phenomenon leads to poor resolution of the spectra).

Data for compound **3a** (0.211 g; 70%): brown solid; mp > 230 °C; IR (KBr, cm^{-1}) ν 3400, 1620, 1550, 1450, 1400, 1310, 1280, 1220, 870, 740, 620; MS (MALDI⁺) m/z 362.3 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, 384.4 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, 301.4 ($\text{M} + 3\text{H} - \text{Cu}$)⁺; R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 80:20) 0.74.

Data for compound **3b** (0.268 g; 89%): purple solid; mp > 230 °C; IR (KBr, cm^{-1}) ν 3400, 1620, 1540, 1440, 1340, 1220, 1180, 1130, 990, 850, 800, 650; MS (MALDI⁺) m/z 362.1 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, 384.2 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺, 400.2 ($\text{M} + \text{K}$)⁺, 301.2 ($\text{M} + 3\text{H} - \text{Cu}$)⁺; R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 80:20) 0.74.

Data for compound **3c** (0.259 g; 86%): black solid; mp > 230 °C; IR (KBr, cm^{-1}) ν 3200, 1630, 1540, 1460, 1400, 1370, 1320, 1220, 1150, 1080, 970, 860, 840, 800; MS (MALDI⁺) m/z 361.5 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, 301.3 ($\text{M} + 3\text{H} - \text{Cu}$)⁺; R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 80:20) 0.52.

Voltammetry. Cyclic voltammetry measurements were performed with a SOLEA TACUSSEL PJT 120 potentiostat equipped with a programmable interface SOLEA TACUSSEL IMT1. Working and auxiliary electrodes were a platinum CTV 101T and a platinum wire, respectively. The standard calomel reference electrode was separated from the bulk of the solution by a KCl saturated solution with a glass frit. A scan rate of 50 mV s^{-1} gave the best results.

The electrolyte support salt was tetraethylammonium perchlorate (0.1 N), and prior to use, all solutions were made in DMSO freshly distilled with calcium hydride (CaH_2) under an inert atmosphere. The complex

Hydroxy-salen-Cu Complexes

mixtures (1 mM) were deoxygenated by means of a stream of dry nitrogen. A nitrogen stream was maintained above the solutions during the electrochemical measurements.

Electron Spin Resonance. X-band ESR spectra were obtained with both a Bruker ESC 106 and a Varian E-9 operating at 100 kHz modulation frequency at room temperature (20 °C) or at liquid nitrogen temperature (77 K). The *g* factor measurements were related to the "strong pitch", *g* = 2.0028. For spin trapping experiments, DMPO (5,5'-dimethylpyrroline *N*-oxide, Sigma Chemical Co.) was added to the mixtures.

ESR measurements coupled to electrochemistry were performed in a TM cavity mode with 0.1 cm flat quartz cell. The anodic and cathodic platinum electrodes were connected to a SOLEA TACUSSEL PJT 120 potentiostat to monitor the imposed voltage. Calomel electrodes were used as references.

Simulations of isotropic nitrogen superhyperfine interactions in the complex were performed with the Bruker WINSIMFONIA software.

DNA Cleavage. Each reaction mixture contained 9 μ L of supercoiled pUC12 DNA (0.5 μ g in a Tris-HCl, 10 mM NaCl buffer at pH 7.0) and 1 μ L of the test compound at the desired concentration in DMSO. After 1 h of incubation at 37 °C, 4 μ L of loading buffer (0.25%

J. Am. Chem. Soc., Vol. 121, No. 9, 1999 1869

bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol in H₂O) was added to each tube and the solution was loaded onto a 1% agarose gel. The electrophoresis was carried out for about 2 h at 100 V in TBE buffer (89 mM, Tris-borate, pH 8.3, 1 mM EDTA). Gels were stained with ethidium bromide (1 μ g/mL) and then destained for 30 min in water prior to being photographed under UV light.

Acknowledgment. The authors thank Hélène Jary for her significant contribution to the synthesis of the complexes. This work was supported by grants (to C.B.) from the Association pour la Recherche sur le Cancer and (to J-L.B. and J-P.C.) from the CNRS.

Supporting Information Available: Figures showing the simulated spectra of DMPO-OOH, DMPO-CH₃, and DMPO-H and the experimental spectrum of the semiquinone species (PDF). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA982221Z

Topic 2 : Chemical and Biochemical Synthesis of Polyphenols

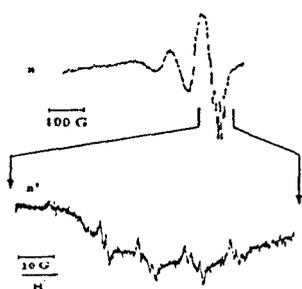


Figure 2.

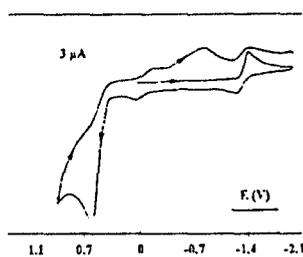


Figure 3.

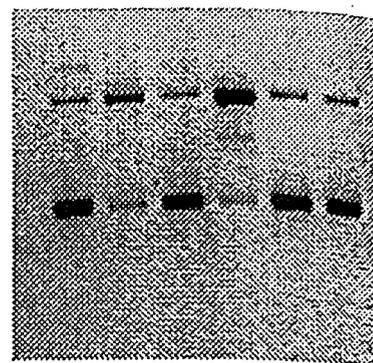


Figure 4.

A complete set of magnetic values were determined. In addition, we studied the capacity of complexes 3a,b,c to cleave DNA in the *absence* of activating agents (Figure 4).

The *meta* isomer 3b does not generate oxygen radicals and as a result it cannot cleave DNA. In sharp contrast, the *para* isomer 3c and to a lower extent the *ortho* isomer 3a, exhibit nuclease activities in relation to their capacities to produce oxygen radicals. Electrochemistry provides unequivocal evidences for the formation of Cu^{III} species with compounds 3a and 3c, but not with 3b. The nuclease activity correlates well with the ability of the hydroxy-salens to form the oxidizing Cu^{III} species.

The present work supports the hypothesis that a hydroquinone system can cooperate with a redox metal system to trigger DNA cleavage. The design of metallo-(hydroxy-salens) provides an original route for the development of self-activated chemical nucleases.

References

- ROUTIER S., BERNIER J.L., WARING M.J., COLSON P., Houssier C., and Bailly C., 1996. Synthesis of a functionalized salen-copper complex and its interaction with DNA. *J. Org. Chem.*, 61, 2326.
- ROUTIER S., COTELLE N., CATTEAU J.P, BERNIER J.L., WARING M.J., RIOU J.F., and BAILLY C., 1996. Salen-anthraquinone conjugates. Synthesis, DNA-binding and cleaving properties, effects on topoisomerases and cytotoxicity, *Bioorg. Med. Chem.*, 4, 1185.
- ROUTIER S., BERNIER J. L, CATTEAU J. P and BAILLY C., 1997, Recognition and cleavage of DNA by a distamycin-salen copper conjugate, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 1, 63-66.

Polyphenol Communications 98, XIXth International Conference on Polyphenols
Lille (France) 1-4 September 1998

Functionalized salen-complexes containing hydroquinonic systems : synthesis, EPR, nucleasic activity.

LAMOUR Eric ¹, ROUTIER Sylvain ¹, JARY Hélène ¹, BERNIER Jean-Luc ¹,
CATTEAU Jean Pierre ¹, BAILLY Christian ², VEZIN Hervé ¹

¹USTL, Laboratoire de Chimie Organique Physique, URA CNRS 351, Bât. C3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France.

²INSERM U124 et Laboratoire de Pharmacologie Moléculaire Antitumorale du Centre Oscar Lambret, IRCL, Place de Verdun, 59045 Lille, France.

In previous studies we have shown the potentiality of salen copper conjugate to recognize and to cleave DNA molecules (Routier *et al.*, 1996, 1997). We present here the synthesis of a series of copper complexes of bis(hydroxysalicylidene)ethylenediamine (hydroxy-salens) (Figure 1).

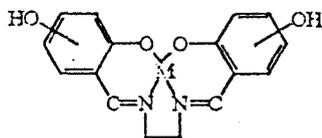


Figure 1.

The hydroxy group in *ortho*, *meta* or *para* position on each salicylidene unit was added to reinforce the stability of the copper complex and to create a hydroquinone system cooperating with the copper redox system. Cyclic voltammetry (Figure 2) and ESR spectroscopy in combination with electrochemistry and spin trapping experiments have been used to characterize the structure and the redox state of the hydroxy-salen-copper complex and to evidence the production of oxygen-based free radicals (Figure 3).

Etude par voltamétrie cyclique et RPE de complexes cuivriques du salène comportant un système hydroquinonique : mise en évidence de la formation de Cu^{3+}

Lamour E.¹, Routier S.¹, Bernier J-L.¹, Catteau J-P.¹, Bailly C.² et Vezin H.¹

¹Laboratoire de Chimie Organique Physique, URA CNRS 351, USTL Bât. C3, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

²INSERM U124 et Laboratoire de Pharmacologie Moléculaire Antitumorale du Centre Oscar Lambret, IRCL, Place de Verdun, 59045 Lille, France

Nous nous sommes intéressés à la synthèse et l'étude de complexes cuivriques du bis(hydroxysalicylidène)éthylènediamine : la fonction hydroxyle a été introduite en position ortho, méta et para du squelette salicylidène afin, d'une part, de renforcer la stabilité du complexe de cuivre et, d'autre part, d'introduire un système hydroquinonique pouvant interagir avec le centre métallique pour former l'espèce oxydée Cu^{III} . La structure et l'état d'oxydoréduction de ces complexes de cuivre ont été mis en évidence par voltamétrie cyclique et par RPE couplée à l'électrochimie. Des études par spin trapping ont également montré la production de radicaux libres de l'oxygène. Nous avons de plus étudié l'activité nucléasique de ces complexes en l'absence d'agents activateurs. L'espèce méta, qui ne produit pas de radicaux libres de l'oxygène, ne coupe pas l'ADN, alors que l'espèce para et, dans une moindre mesure, l'espèce ortho, qui produisent des radicaux libres oxygénés, coupent l'ADN. L'électrochimie montre indéniablement une formation de Cu^{III} corrélée à l'activité nucléasique dans le cas de l'espèce ortho et para, mais non pour l'espèce méta. Les salènes de complexes polyhydroxylés constituent une nouvelle voie originale pour le design de nucléases chimiques ne nécessitant pas d'activateur.

Study by cyclic voltametry and ESR spectroscopy of copper salens with a hydroquinone moiety : evidence of Cu^{3+}

We were interested in synthesis of copper complexes of bis(hydroxysalicylidene)ethylenediamine : the hydroxy group was added in ortho, meta or para position on each salicylidene unit in order to, firstly, reinforce the stability of copper complexes and, secondly, to create a hydroquinone system cooperating with the copper redox system to facilitate the spontaneous formation of oxidizing Cu^{III} species. Cyclic voltammetry and ESR spectroscopy have been used to characterize the structure and the redox state of the hydroxy-salen copper complexes. Spin trapping experiments evidence the production of oxygen-based free radicals. In addition, we studied the ability of complexes to cleave DNA in the absence of activating agents. The meta isomer does not generate oxygen radicals and as a result it cannot cleave DNA. The para isomer and to a lower extent the ortho isomer exhibit nuclease activities in relation to their capacities to produce oxygen radicals. Electrochemistry provides unequivocal evidence for the formation of Cu^{III} species for the para and ortho isomer but not for the meta isomer. The design of metallo-hydroxysalens provides an original route for the development of self-activated chemical nucleases.

Amélioration de l'activité nucléasique des complexes cuivriques du salène par introduction de systèmes hydroquinoniques

LAMOUR E., ROUTIER S., VEZIN H., BAILLY C., CATTEAU J.-P., et BERNIER J.-L.

Laboratoire de Chimie Organique Physique, URA 351, 59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex

Dans la littérature, il a été décrit que les complexes cuivriques de salène (bis(salicylidène)éthylènediamine) ne présentaient aucune activité nucléasique.

Dans nos travaux précédents, nous avons montré qu'un salène, sous forme de complexe cuivrique et fonctionnalisé par une chaîne amino alkyle, pouvait couper l'ADN en présence d'un agent réducteur. Suite à ces travaux, nous avons préparé de nouveaux salènes sur lesquels ont été greffées des fonctions hydroxyle en *ortho*, *méta* et *para*.

De telles molécules, associant un complexe cuivrique à des systèmes *ortho* ou *para* hydroquinoniques, s'inspirent des systèmes enzymatiques de type amine-oxydase à cuivre, dans lesquelles des transferts d'électron s'effectuent entre le métal et les hydroquinones. Nous avons étudié la capacité de ces salènes à couper l'ADN. Ainsi, les salènes bis hydroxylés en *ortho* et *para* coupent l'ADN en absence de tout agent activateur. Le salène hydroxylé en *para* se montre plus efficace que celui hydroxylé en *ortho*. En revanche le salène hydroxylé en *méta* ne possède pas d'activité nucléasique. Il semble donc fort probable que ces coupures résultent d'un échange électronique entre le cuivre et le système hydroquinonique comme postulé précédemment.

Nucleasic activity improvement of salen-copper complexes by hydroquinonic system insertions

LAMOUR E., ROUTIER S., VEZIN H., BAILLY C., CATTEAU J.-P., et BERNIER J.-L.

Laboratoire de Chimie Organique Physique, URA 351, 59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex

Bis(salicylidene)ethylenediamine, usually referred to as salen, is unable to cleave nucleic acids via its copper complex. Recently we reported that a functionalized salen(Cu^{II} complex is capable of inducing DNA cleavages after activation with appropriate reducing agents. In this later case the salen moiety was substituted with a butyl amino side chain.

Here we report the DNA cleaving properties of new salen copper-complexes with added hydroxyl groups in *ortho*, *meta* and *para*. Salens substituted on *ortho* or *para* position induce DNA breaks in absence or in presence of activating agents, with a better efficiency for the *para* position. Under the same conditions, salen substituted on *meta* does not exhibit any DNA cleaving properties.

It can be proposed that attaching a *para* or *ortho* hydroquinone system to the copper complex is capable of triggering DNA cleavage via an electron exchange. Such electron transfers are naturally found in copper-amine oxidases in which the copper is activated by an orthoquinone system.

