

**Martin GILLARD et Benjamin ELIAS***

Université catholique de Louvain (UCLouvain),
 Institut de la Matière Condensée et des Nanosciences (IMCN),
 Molecular Chemistry, Materials and Catalysis (MOST),
 Place Louis Pasteur 1, bte L4.01.02, B-1348 Louvain-la-Neuve,
 Belgium.
 Benjamin.Elias@uclouvain.be

Vers des applications théranostiques anticancer Complexes métalliques photo-activables se liant à l'ADN télomérique

Résumé

Depuis la découverte du mode d'action du gaz moutarde par Gilman en 1946, l'ADN est la cible de prédilection des agents de chimiothérapie. Au cours des dernières décennies, la recherche d'anticancéreux plus sélectifs a conduit au développement de nouveaux médicaments capables de cibler des sous-structures de l'ADN non-conventionnelles qui sont plus abondantes dans les cellules cancéreuses, telles que les quadruplexes de guanine (G-quadruplexe). Des études se basant sur cette stratégie sont déjà au stade d'essais cliniques mais les composés se révèlent encore trop toxiques envers les tissus sains. C'est pourquoi la conception de nouvelles molécules possédant la particularité d'être photo-activables est d'un intérêt majeur. En effet, de tels composés permettraient à la fois de localiser les cellules cancéreuses et de les attaquer spécifiquement grâce à une irradiation précise de la zone tumorale. Ils auraient donc à la fois le rôle d'agent de thérapie et de diagnostic, on parle alors d'agents théranostiques. L'étude que nous présentons ici porte sur des complexes photo-activables à base de ruthénium (II) et de platine (II) comportant un ligand salphène base de Schiff. Ces travaux de recherche, menés dans le cadre de ma thèse de doctorat à l'UCLouvain (IMCN/MOST, Pr. Benjamin Elias), sont le résultat d'une

étroite collaboration avec l'Institut de Duve (Pr. Anabelle Decottignies) et l'Université Grenoble-Alpes (Pr. Eric Defrancq et Dr. Jérôme Dejeu). Ils ont été publiés dans *Chemistry – A European Journal* [1].

Towards anticancer theranostic applications Photoactivatable metal complexes binding to telomeric DNA

Abstract

Since Gilman's discovery of the mode of action of mustard gas in 1946, DNA has been one of the main targets of chemotherapy agents. In recent decades, the search for more selective anticancer drugs has led to the development of new drugs capable of targeting unconventional DNA substructures that are more abundant in cancer cells, such as guanine quadruplexes (G-quadruplexes). Studies based on this strategy are already in clinical trials, but the compounds often prove to be too toxic to healthy tissues. Therefore, the design of new photoactivatable molecules targeting G-quadruplex DNA is of major interest. Indeed, such compounds would allow both the localization and specific attack of cancer cells through precise irradiation of the tumor area. They would thus have both

therapeutic and diagnostic roles, known as theranostic agents. The study presented here focuses on photoactivatable ruthenium (II) and platinum (II) complexes containing a Schiff base salphen ligand. These research works, carried out as part of my doctoral thesis at UCLouvain (IMCN/MOST, Prof. Benjamin Elias), are the result of a close collaboration with the de Duve Institute (Prof. Anabelle Decottignies) and the Université Grenoble-Alpes (Prof. Eric Defrancq and Dr. Jérôme Dejeu). They were published in Chemistry - A European Journal [1].

Keywords

G-quadruplex DNA; Ruthenium; Schiff Base; bio-layer interferometry; theranostics

1. Introduction

1.1. L'immortalité – Sur les origines d'une caractéristique intrigante de la cellule cancéreuse

La quête de l'immortalité a de tous temps éveillé les passions dans l'histoire de l'humanité. Dans la mythologie grecque, l'immortalité était la première caractéristique des dieux de l'Olympe et était obtenue grâce à la consommation d'un savant mélange de nectar et d'ambrosie. Le mythe de l'immortalité est présent dans presque toutes les cultures et religions, avec notamment la quête de la fontaine de Jouvence, de la pierre philosophale ou du Saint Graal qui ont fait et font encore l'objet de nombreux fantasmes. Même si les progrès majeurs réalisés en sciences, avec notamment l'avènement de la médecine moderne, ont déjà eu un impact substantiel sur l'espérance de vie qui a plus que doublé au cours des 200 dernières années en Occident [2], les sciences n'ont toujours pas trouvé le moyen de stopper le vieillissement des cellules et sont loin d'avoir atteint le Graal de l'immortalité, si tant est qu'il puisse être considéré comme tel. Dans ce contexte, on peut dire que la découverte et la compréhension du fonctionnement des cellules HeLa au début des années 1950 ont marqué le début d'une percée majeure dans l'étude des processus de vieillissement et de mort.

1.2. Les cellules HeLa - Entre quête du progrès et questionnements éthiques

Les cellules HeLa sont probablement la lignée cellulaire la plus célèbre du monde scientifique, ayant été impliquées dans plus de 70 000 études (**Figure 1**). Leur rôle dans le développement du vaccin contre la poliomyélite dans les années 1950, la découverte du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ainsi que dans la fécondation in vitro dans les années 1980, et plus récemment dans la recherche d'un vaccin contre la COVID-19, est inestimable. Cependant, bien que ces découvertes scientifiques soient légion, l'origine controversée de ces célèbres cellules est souvent méconnue du grand public. En effet, la découverte et les premières utilisations de cette lignée cellulaire ont suscité l'indignation lorsque leurs circonstances exactes ont été divulguées dans les années 1960 [3].



Figure 1. Photographie de Henrietta Lacks © [4]

Les cellules dites HeLa ont été nommées d'après les initiales de Henrietta Lacks. Henrietta était une femme afro-américaine, née en 1920 et décédée en 1951 à l'âge de 31 ans, quelques mois seulement après avoir été diagnostiquée d'une forme extrêmement sévère de cancer du col de l'utérus. La particulière agressivité du cancer

contracté par Henrietta a poussé les médecins de l'hôpital Johns-Hopkins du comté de Baltimore (USA) où elle était soignée à procéder à une biopsie et à mettre ensuite les cellules obtenues en culture. Leur comportement a alors provoqué la stupéfaction. En effet, les cellules en question se divisaient à un rythme extraordinairement élevé. Plus étonnant encore, la lignée cellulaire ne cessait jamais de croître, elle semblait être immortelle, ce qui n'avait encore jamais été observé pour des cellules humaines. En effet, contrairement aux lignées cellulaires diploïdes normales qui cessent de se diviser après avoir atteint une certaine limite d'environ 20 à 90 divisions (connue sous le nom de limite de Hayflick), les cellules HeLa se multiplient sans interruption et sans fin [5]. Cette découverte, qui était considérée comme une percée majeure dans la recherche médicale en 1951, a fait l'objet des gros titres dans les journaux à l'époque. De manière très cynique, le premier article de presse faisant état de la «formidable découverte qui devrait permettre de venir à bout du cancer d'ici quelques années» a été publié le jour des funérailles de Henrietta Lacks. Une septantaine d'années plus tard, nous savons que ces gros titres étaient bien trop enthousiastes. Le destin tragique de Henrietta Lacks accompagné des conditions qui entourent la découverte des cellules HeLa ont fait l'objet de nombreux ouvrages. Elle est notamment enseignée comme un cas d'étude des questions éthiques et raciales aux Etats-Unis en raison de l'absence de consentement d'Henrietta quant à l'utilisation de sa biopsie. Les descendantes des cellules récoltées lors de cette dernière sont aujourd'hui présentes dans pratiquement l'ensemble des instituts de recherche du monde qui utilisent la culture cellulaire [6, 7].

1.3. *Le rôle des télomères dans le développement du cancer*

L'origine du caractère immortel de la lignée cellulaire cancéreuse HeLa pourrait être considérée comme la quête du Saint Graal au niveau cellulaire. Il aura fallu plus de trois décennies aux scientifiques pour commencer à comprendre les mécanismes impliqués dans le processus d'immortalisation intervenant chez la plupart des lignées de cellules cancéreuses. En effet, c'est seulement dans les

années 1980 que le rôle central des télomères dans ce processus a été révélé.

Comme illustré dans la **Figure 2**, des travaux conjoints ont révélé qu'au sein de nos cellules saines somatiques, des régions particulières de notre génome se trouvant à l'extrémité des chromosomes, les télomères, se raccourcissent à chaque cycle de division jusqu'à atteindre la limite de Hayflick. Au-delà de cette limite, les cellules ne sont plus à même de se diviser, ce qui conduit à la sénescence et à l'extinction de la lignée. Au cours de notre vie, la taille moyenne des télomères diminue de ce fait continuellement, avec deux accélérations majeures observées avant l'âge de 20 ans et après 65 ans [8]. En revanche, chez 80-85 % des lignées cancéreuses, la télomérase, une enzyme capable de maintenir la longueur des télomères, est réactivée par un mécanisme spécifique. Ce phénomène conduit à l'immortalisation des lignées de cellules cancéreuses et a été observé pour la première fois par Jerry W. Shay et ses collaborateurs en 1994, soit plus de 40 ans après la première mise en culture des cellules HeLa [9].

Les télomères humains sont pour la plupart monocaténaires et particulièrement riches en guanines, étant composés d'une répétition (5'-TTAGGG-3'). Cette haute teneur en guanine donne lieu à un repliement sous la forme d'une tétra-hélice appelée quadruple de guanines (G4). Les télomères représentent moins de 0,1 % du génome humain (2-50 kilobases d'environ 300-8 000 répétitions de la séquence (5'-TTAGGG-3') par télomère), sont non codants et jouent un rôle dans la protection du génome [10-12].

Les G4 sont donc des structures secondaires non conventionnelles de l'ADN au sein desquelles l'oligonucléotide n'est pas replié en double hélice mais s'assemble en une structure à quatre brins (**Figure 3**). Le génome humain compte environ 700.000 séquences susceptibles de former des assemblages G4. Ces derniers sont non seulement présents dans les télomères, mais également dans des zones associées à la régulation de l'expression des gènes ou encore dans les oncogènes, gènes dont la réactivation

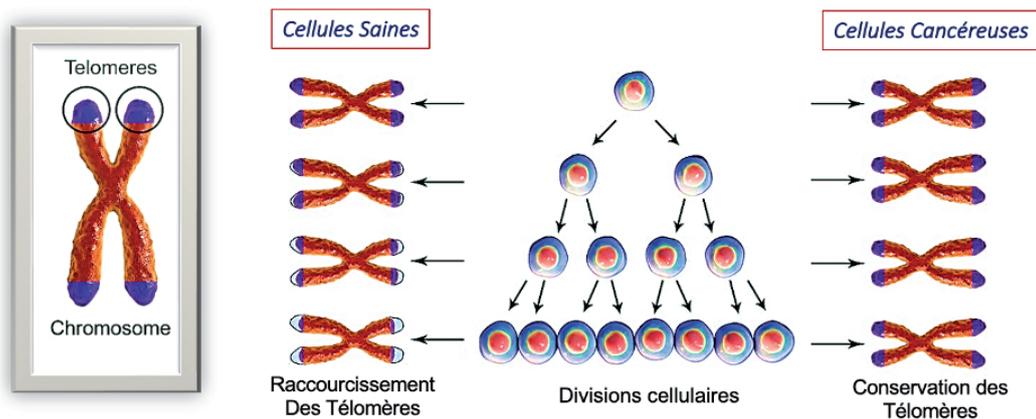


Figure 2. Illustration des phénomènes de sénescence chez les lignées cellulaires saines et d'immortalisation chez les lignées cellulaires cancéreuses

permet notamment l'accélération du processus de cancérisation des cellules [13]. La sous-unité du G4 appelée G-quartet consiste en un assemblage planaire de quatre guanines stabilisé par un appariement de bases de type Hoogsteen et des cations monovalents, un à quatre brins d'ADN pouvant s'assembler pour former la tétrade. La structure G4 est ensuite formée par l'empilement d'au moins deux quartets de guanines [14]. Classiquement, la répétition (5'-TTAGGG-3') qui forme la séquence télomérique humaine va donner lieu à la formation d'un assemblage G4 à trois empilements. Ces structures mesurent environ 6 nm de long et leur formation a été mise en évidence *in vivo* il y a peu [15, 16].

1.4. Cibler l'ADN G4

En vertu du rôle majeur joué par les G4 des régions télomériques dans la prolifération des cellules cancéreuses et de leur plus grande abondance au sein de ces cellules, plusieurs composés ont déjà été décrits pour leur capacité à se lier à l'ADN de type G4 *in vitro*, et pour certains d'entre eux, les essais cliniques sont déjà à un stade avancé [17, 18]. Parmi les molécules étudiées, des squelettes dérivés d'acridine, de phénanthroline ou, plus récemment, de quinazoline ont montré une très bonne sélectivité pour l'ADN de type G4 par rapport à l'ADN double brins [19-23]. En ce qui concerne les complexes métalliques, de nombreux métallosalphènes et métalloporphyrines ont également démontré des affinités et des sélectivités élevées pour l'ADN de type G4 [24-

28]. Par ailleurs, des complexes de ruthénium (II) mono et dinucléaires portant un ligand plan étendu rigide et polyazaaromatique ont été développés et se sont révélés capables de se lier fortement à la structure G4 [29-34]. La haute affinité de ces composés provient essentiellement d'interactions par empilement π avec le quartet extérieur de la tétrade. Des interactions supplémentaires avec les sillons de la structure G4 semblent également jouer un rôle important dans l'interaction de certains complexes et leur procurent une sélectivité accrue en faveur du G4 [35-37].

Alors que l'action anti-cancer des ligands de G4 développés précédemment repose sur le ralentissement de la croissance des tumeurs en stabilisant les télomères, empêchant ainsi l'action de la télomérase et donc l'immortalisation des lignées cancéreuses, les complexes de Ru^{II} développés notamment au sein de notre laboratoire vont irréversiblement endommager les télomères sous irradiation lumineuse et mener à la mort des cellules cancéreuses. Cette approche reprise schématiquement ci-après (**Schéma 1**) se caractérise par la conception de ligands spécifiques du G4 qui agissent comme photosensibilisateurs pour la photothérapie dynamique (PDT) en vue de provoquer la mort des cellules cancéreuses par la formation de dommages photo-induits. Ces derniers sont dans ce cas dirigés envers les G4 qui, en vertu de leur plus grande abondance dans les cellules cancéreuses sont susceptibles de fournir une nouvelle stratégie pour la PDT, à savoir la PDT à ciblage moléculaire (mtPDT) [38].

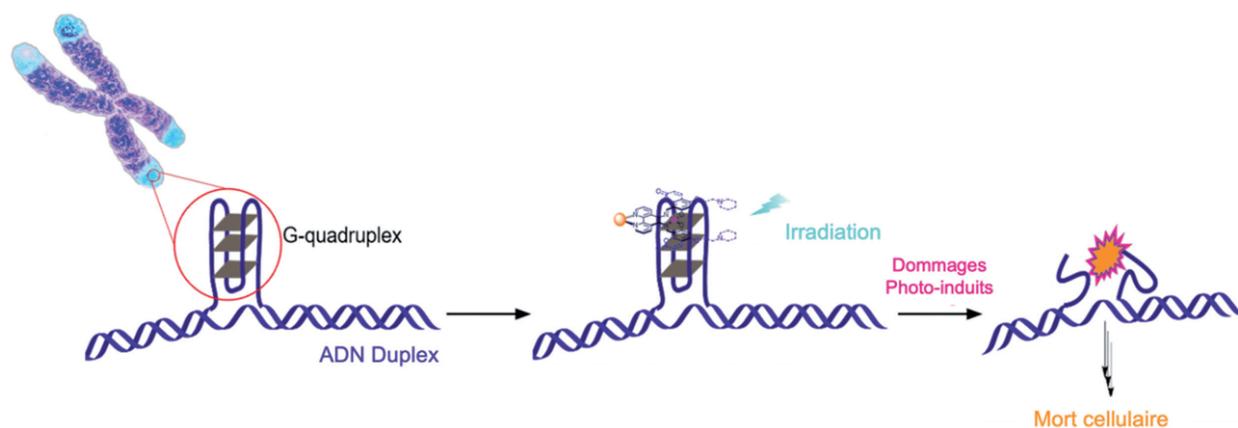


Schéma 1. Principe général de la photo-chimiothérapie ciblant l'ADN G-quadruplex télomérique. Un complexe métallique photo-activable possédant une affinité élevée pour l'ADN G4 est capable d'entraîner la mort cellulaire sous irradiation lumineuse.

Cette approche se basant sur un double ciblage des tumeurs est particulièrement intéressante car elle pourrait mener au développement de traitements plus spécifiques qui permettraient de combattre le cancer au stade métastatique. Une étude récemment menée par le service d'entérologie et de cancérologie de l'hôpital Lariboisière à Paritech sur l'action de drogues ciblées en PDT a démontré une certaine activité envers les métastases du tissu péritonéal chez la souris. L'étude met en lumière l'intérêt de cibler les cellules cancéreuses par une irradiation précise et contrôlée dans le temps des tumeurs du péritoine ainsi que via l'action d'un photosensibilisateur s'accumulant dans les tissus tumoraux. En plus de la réduction significative des effets secondaires, une activation de l'immunité antitumorale a également été remarquée suite à la série de traitements administrés par PDT [39].

Dans la littérature, les ligands des complexes de Ru^{II} décrits précédemment, tels que le cpip ou le dph, présentent une importante rigidité qui limite leur interaction à la partie supérieure des tétrades de l'ADN G4, par empilement [31, 32]. Des études plus récentes ont permis de mettre en évidence l'importance de concevoir des ligands plus flexibles afin de mieux reconnaître la structure G4 de l'ADN par rapport à l'ADN double-brins, en particulier grâce à la présence d'interactions privilégiées avec les sillons [40, 41].

Dans le cadre de nos travaux de recherche doctorale, de nouveaux composés de Ru^{II} comportant des ligands d'interaction plus flexibles ont été synthétisés dans le but d'améliorer la sélectivité des complexes envers l'ADN de type G4. Cette approche a été guidée par la mise en évidence du fait que la plupart des ligands organiques présentant une forte sélectivité envers l'ADN G4, tels que le BRACO-19 ou le PhenDC3 (**Figure 3**), contiennent des fragments flexibles de type pyrrolidinium ou quinolinium [42, 21].

1.5. Les complexes étudiés

Dans cette étude, des ligands flexibles de type salphène base de Schiff ont été choisis car ce motif est présent chez plusieurs ligands G4 précédemment étudiés, notamment sur des complexes de nickel(II) non-actifs chimiquement mais qui ont montré des résultats prometteurs in vitro. En revanche, jamais ce motif n'avait encore été greffé sur des complexes de Ru^{II} pour obtenir des photosensibilisateurs ciblant l'ADN de type G4. L'un des intérêts majeurs des composés présentés dans cette étude (**Figure 4**) repose notamment sur la présence du site de chélation salphène qui peut soit (i) être libre et donner des ligands flexibles, tel que dans les complexes **1** et **2**, ou (ii) qui peut également être occupé par un cation plan carré Pt^{II}, ce dernier forme un motif d'interaction planaire et rigide à l'image des ligands polyaaromatiques des complexes de Ru^{II} décrits précédemment. Les

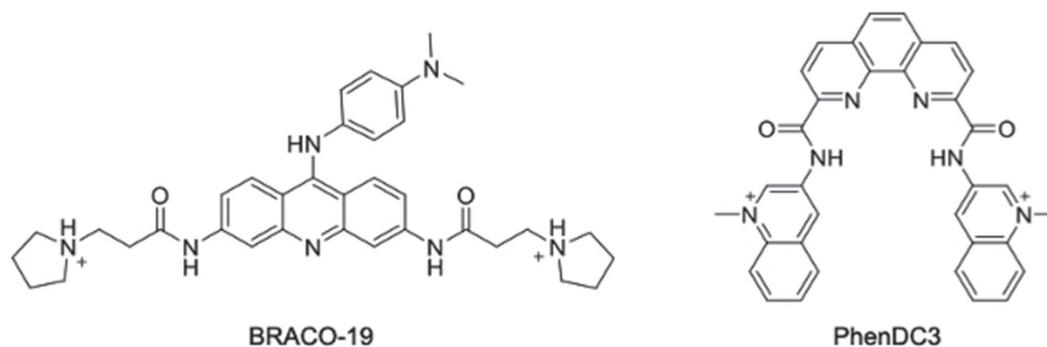


Figure 3. Structures des ligands G4 BRACO-19 et PhenDC3

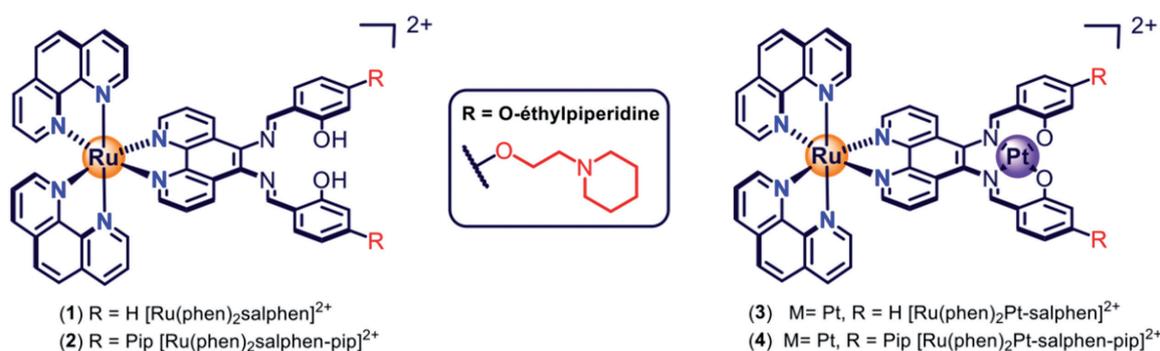


Figure 4. Structures des complexes 1-4 synthétisés pour cette étude

chaînes latérales de type pipéridine, protonées en milieu biologique, ont quant à elles attiré notre attention en raison de l'affinité supplémentaire qu'elles semblent conférer aux complexes de Ni^{II} salphène envers l'ADN G4 [27].

2. Résultats et discussion

2.1. Synthèse et études photophysiques

Les composés bimétalliques de Ru-Pt basés sur le motif salphène sont les premiers composés de ce type à avoir été préparés et étudiés. Ils sont obtenus grâce à une réaction *one-pot* au départ d'un complexe précurseur de type $[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{5,6-diaminophen}]^{2+}$ mis en présence d'une solution d'acétate de platine (II) dans le DMSO à 100°C . L'addition subséquente de l'aldéhyde adéquat, dans ce cas soit le salicylaldéhyde ou le 2-hydroxy-4-(2-(pipéridin-1-yl) ethoxy)

benzaldéhyde conduit aux complexes finaux. Comme illustré dans les spectres d'absorption des composés 1-3 repris dans la Figure 5, les complexes monométalliques de Ru^{II} absorbent principalement la lumière bleue jusqu'à 500 nm ce qui leur confère une couleur orange caractéristique. Les composés bimétalliques de Ru^{II} - Pt^{II} de couleur rouge montrent une plus grande absorption dans le visible qui s'étend dans le vert et le jaune jusqu'à 550-600 nm, ce qui est encourageant pour la conception de photosensibilisateurs efficaces. En effet, les longueurs d'onde de plus faible énergie ont une meilleure capacité de pénétration des tissus. Les spectres d'absorption des différents composés dans l'eau confirment le déplacement bathochrome de l'absorption ainsi qu'une augmentation des coefficients d'absorption molaire provoqués par l'addition du cation Pt^{II} dans le site de chélation salphène.

Les propriétés d'émission de lumière des complexes ont également été analysées dans l'acétonitrile et dans l'eau afin d'avoir une idée rapide de l'activité photochimique potentielle des complexes à l'état excité, et ce principalement en termes de durée de vie. Cette dernière joue un rôle important dans l'efficacité du processus de transfert d'énergie du photosensibilisateur vers le dioxygène. En effet, des durées de vie de l'état excité supérieures à 100 ns sont généralement requises afin d'obtenir des rendements quantiques de photoproduction d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) propices à la confection de composés actifs pour la photothérapie dynamique. Une luminescence intense des complexes monométalliques de Ru^{II} base de Schiff **1-2** a été observée avec des longueurs d'onde, des rendements quantiques et des durées de vie des états excités similaires à ceux du $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Ces caractéristiques indiquent que les complexes **1-2** ont un état d'émission de type $^3\text{MLCT}$, l'état excité correspondant à un transfert de charge du centre métallique vers le ligand, à l'instar du composé de référence $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$. Les composés bimétalliques émettent quant à eux aux environs de 650 nm (**Figure 5**), une longueur typique des complexes Pt^{II} salphène. Les durées de vie à l'état excité de ces composés sont comprises entre 250 et 700 ns ce qui valide leur potentielle efficacité en tant que photosensibilisateur du dioxygène.

2.2. Etudes d'interactions

Afin d'étudier la capacité des composés à se lier aux G4 de manière sélective et avec des affinités élevées, leur interaction avec l'ADN double brins et l'ADN G4 a été étudiée à l'aide d'oligonucléotides modèles. Ces études ont été réalisées en étroite collaboration avec les Prof. E. Defrancq et J. Dejeu de l'Université Grenoble Alpes (UGA). La séquence télomérique humaine composée de la répétition (-TTAGGG-) donne lieu au repliement de l'ADN sous forme de G4. Une seconde séquence présentant une abondance en guanine similaire a été imaginée pour donner lieu au repliement de l'ADN sous forme de duplex en forme d'épingle à cheveux (voir **Figure 6**, modèles utilisés). Les interactions entre les complexes et les deux oligonucléotides synthétisés ont été étudiées via trois techniques complémentaires : les titrages en luminescence, le dichroïsme circulaire (CD) et la *bio-layer interferometry* (BLI). Le BLI est une technique optique qui permet d'étudier la vitesse d'association et de dissociation des complexes aux oligonucléotides immobilisés sur un support. Les paramètres cinétiques de l'association et de la dissociation qui en sont retirés permettent une mesure précise de la constante d'équilibre de dissociation. Les deux premières techniques mentionnées étudient quant à elle l'influence de

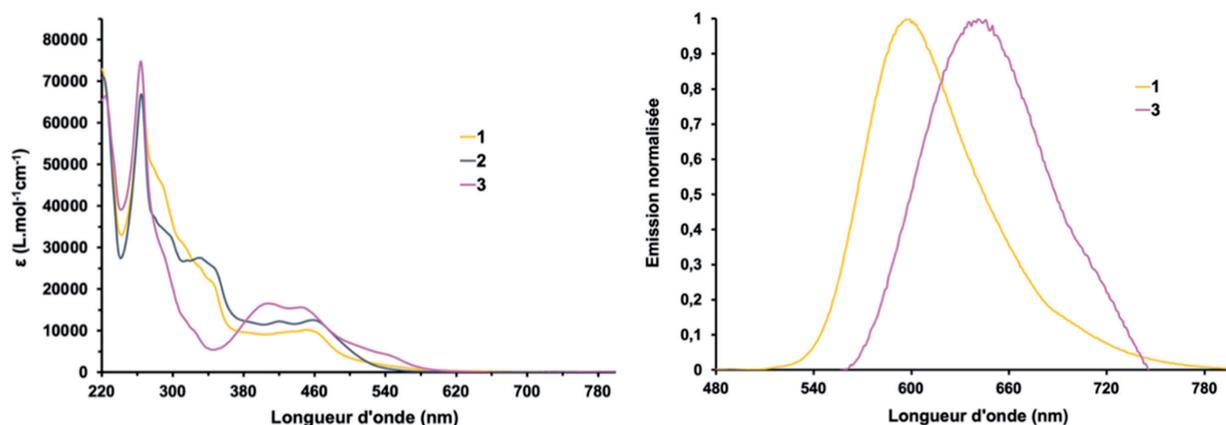


Figure 5. Spectres d'absorption des composés **1-3** (gauche) et spectres d'émission des composés **1** et **3** (droite) réalisés dans l'acétonitrile sous air à des concentrations en complexes de 5 mM

l'association des complexes aux différentes cibles en solution, respectivement sur l'intensité de luminescence des complexes et sur la température de dénaturation des oligonucléotides.

Comme présenté dans la **Figure 6** (titrage en luminescence), l'association des complexes avec les cibles mène à une plus forte augmentation de leur luminescence en présence des structures G4 comparativement aux structures double brins, probablement en raison d'une meilleure protection de l'état excité en interaction avec le G4 vis-à-vis de sources de désexcitation non-radiatives (chocs avec les molécules de solvant, transfert d'énergie au dioxygène, ...). Un fitting des courbes de titrage basé sur le modèle de McGhee-von Hippel donne accès à une estimation des constantes d'équilibre de dissociation (K_D) de l'interaction. Le complexe **1** a démontré une sélectivité de près d'un ordre de grandeur envers l'ADN G4 par rapport au duplex ($K_D = 15.10^{-6}$ vs. 101.10^{-6}). L'incorporation de chaînes latérales pipéridine ainsi que du cation Pt^{II} dans le site salphène a tendance à augmenter l'affinité envers le G4 notamment avec le composé

4 passant sous la barre des 10^{-6} ($K_D = 0,88.10^{-6}$ pour **4** vs G4). La sélectivité par rapport à l'ADN double brin est quant à elle réduite passant de près d'un ordre de grandeur à un facteur 3.

Des analyses par CD ont donc également été réalisées pour étudier l'impact de la liaison des complexes sur la stabilité des structures d'ADN doubles brins et G4 en utilisant les mêmes séquences que pour les titrages en luminescence. Les courbes de dénaturation des oligonucléotides par suivi CD ont été enregistrées en présence et en absence du complexe pour les différentes séquences. Comme montré dans la **Figure 6** (dichroïsme circulaire) les températures de dénaturation mesurées montrent une forte stabilisation de la structure G4 par les complexes avec des ΔT_m allant de + 5,1 à + 10,3 °C. Il est intéressant de noter que la stabilisation des G4 était moins efficace pour les composés bimétalliques par rapport aux monométalliques. Les complexes **1** et **3** ont montré un effet de stabilisation plus faible sur l'ADN duplex que sur l'ADN G4, ce qui est en accord avec les différences observées

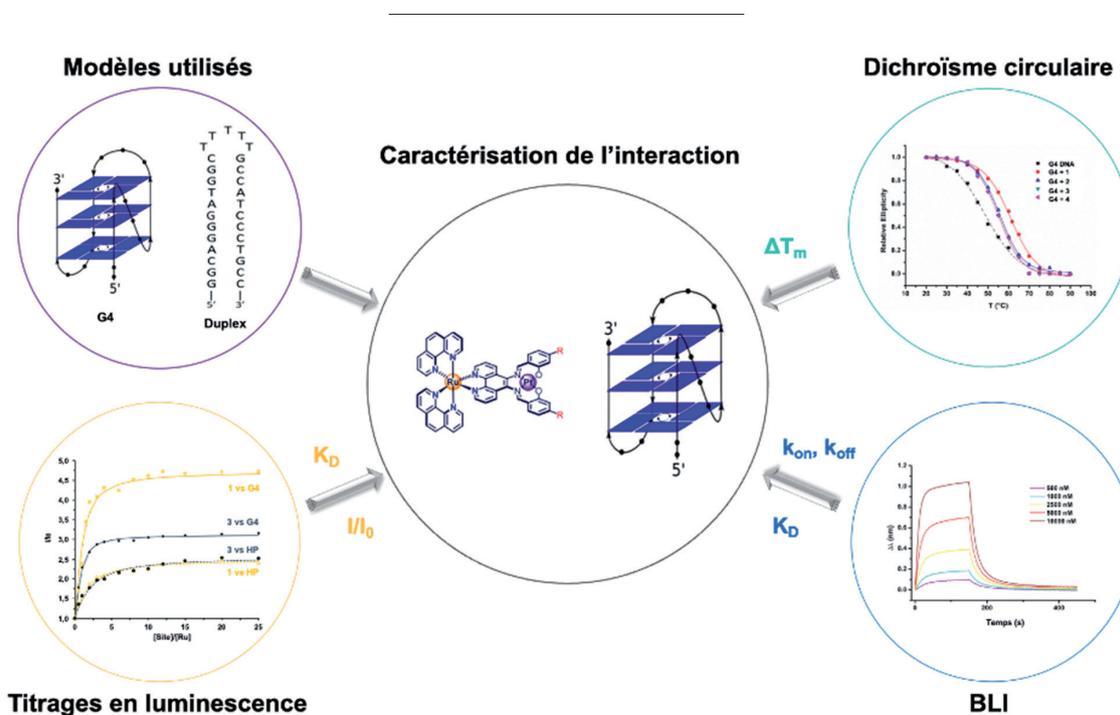


Figure 6. Résumé de l'étude de caractérisation de l'interaction entre les complexes et les ADN de type duplex et G-quadruplex reprenant les différents modèles d'oligonucléotides utilisés ainsi que les apports des différentes techniques mises en œuvre

lors des titrages en luminescence. Cependant, il convient de noter que les analyses CD ainsi que les titrages en luminescence ne sont pas les méthodes les plus appropriées pour les mesures directes des constantes d'affinité avec l'ADN G-quadruplex bien qu'elles permettent une première approche et ont l'avantage d'être des techniques en solution. Le *bio-layer interferometry* a donc été utilisé pour permettre une détermination plus précise des paramètres de l'interaction.

Le *bio-layer interferometry* (BLI) est une technique optique que nous avons récemment utilisée pour étudier les interactions biomoléculaires entre les petites molécules et différentes structures secondaires de l'ADN, telles que les mésappariements, les G4 et les G4 contenant des lésions 8-oxo-guanine [43-47]. Le BLI permet de suivre l'association et la dissociation des complexes **1-4** sur les séquences d'ADN 3'-biotinylées au cours du temps (voir les exemples de sensogrammes en **Figure 6, BLI**). Les résultats montrent que les constantes d'équilibre de dissociation des complexes pour les G4 couvrent deux ordres de grandeur allant de $0,24 \cdot 10^{-6}$ pour le complexe **1** à $21 \cdot 10^{-6}$ pour le complexe **2**. L'ajout de chaînes pipéridine chargées positivement sur la partie salphène a augmenté significativement l'affinité pour les G4 d'un facteur 10-50. De plus, la rigidification des systèmes par l'addition de Pt^{II} dans le site salphène a conduit à des affinités améliorées d'un facteur 2-5. Le complexe **1** a montré une sélectivité significative pour les G4 par rapport à l'ADN duplex, mais cette sélectivité diminue pour les analogues bimétalliques **3** et **4** qui sont en revanche plus affins. Les constantes cinétiques des interactions entre les complexes et les oligonucléotides ont également été étudiées. Cela a essentiellement montré que des vitesses de dissociation plus faibles des complexes **2-4** par rapport au complexe **1** sont à l'origine de leurs affinités plus élevées pour les G4.

En conclusion, la majorité des complexes de Ru^{II} étudiés a montré des affinités pour les G4 avec des ordres de grandeur similaires à d'autres complexes de Ru^{II} publiés dans la littérature, avec le complexe **1** montrant une sélectivité intéressante vis-à-vis du duplex. Les résultats de cette étude ont permis de révéler le potentiel des complexes de Ru^{II} de type

salphène base de Schiff comme ligands de l'ADN G4 et fournissent de nouvelles informations sur la relation structure-activité de ce type de composés.

2.3. Études *in cellulo*

En raison de leurs propriétés photophysiques prometteuses, la capacité des complexes **1-4** à pénétrer les cellules et à cibler le matériel génétique a été étudiée par microscopie confocale en utilisant la lignée cellulaire d'ostéosarcome U2OS comme modèle. Cette lignée cellulaire a été préférée aux cellules HeLa notamment en raison de la longueur plus importante de leurs télomères. Ces études ont été menées en collaboration avec le laboratoire du Prof. A. Decottignies (Institut de Duve – UCLouvain). Les composés sélectionnés ont permis d'étudier l'impact des chaînes latérales pipéridine et de la présence du Pt^{II} chélaté dans le site salphène sur la localisation intracellulaire des composés. Les complexes ont pénétré les cellules de manière efficace en 1h30 d'incubation à la concentration de 20 mM avec une localisation intracellulaire différenciée. En effet, dans ces conditions, les composés **1** et **3** se localisent à la fois à l'extérieur et à l'intérieur du noyau. La présence de fragments pipéridine dans les complexes **2** et **4** a renforcé la capacité des complexes à cibler le noyau cellulaire. La **Figure 7** montre sans ambiguïté une colocalisation du composé **4** (en jaune) avec le marqueur de noyau (DRAQ5, en rouge). En outre, le complexe **4** semble s'accumuler dans les nucléoles, zones qui présentent une forte densité en acides nucléiques.

Au vu de la capacité des composés **1-4** à pénétrer au sein des cellules et à se localiser dans le noyau cellulaire, leur capacité à tuer les cellules sous irradiation lumineuse a également été étudiée en utilisant la même lignée cancéreuse U2OS. La concentration requise pour tuer 50% des cellules (IC₅₀) a été mesurée dans le noir et sous irradiation lumineuse (405 nm; 15.7 Wm⁻²) pour chaque complexe, en testant une gamme de concentrations allant de 50 nM à 100 μM. Les résultats ont montré une faible toxicité dans le noir pour tous les composés, mais une diminution importante de la viabilité cellulaire sous irradiation lumineuse en présence des complexes avec des

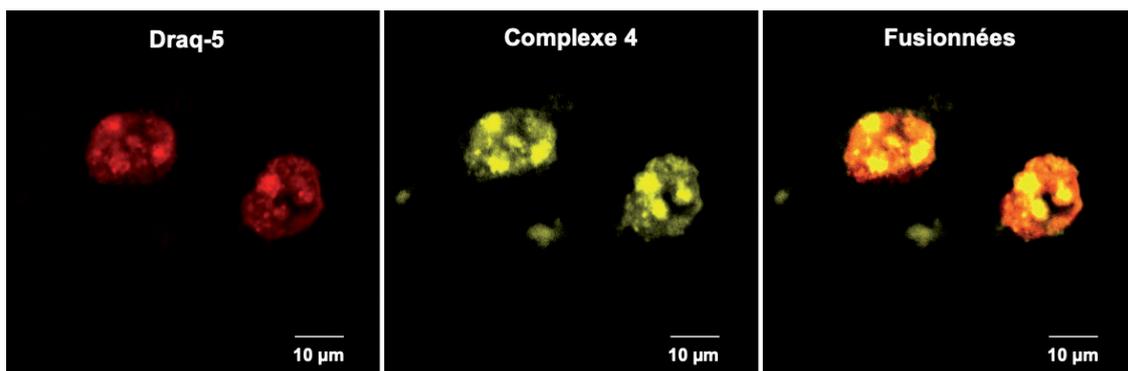


Figure 7. Étude de la pénétration cellulaire. Images au microscope confocal de cellules cancéreuses U2OS après incubation dans du milieu de culture (DMEM) contenant une concentration de 20 μM en complexe 4 pendant 1,5 heure. Le noyau a été coloré en rouge par un marqueur, le DRAQ5 (gauche) ; le complexe 4 apparaît en jaune (centre). Les zones en orange sur l'image de droite (fusionnée)s représentent les zones de colocalisation. Barre d'échelle 10 μm .

valeurs d' IC_{50} dans la gamme de micromolaire voire moins. L'incorporation des chaînes latérales pipéridine dans les systèmes **2** et **4** a conduit à une photo-cytotoxicité accrue (IC_{50} submicromolaire), mais aussi une toxicité plus élevée dans le noir. La présence de Pt^{II} dans les composés **3** et **4** a conduit à des valeurs d' IC_{50} similaires à celles de leurs analogues **1** et **2** (Tableau 1). En conclusion, tous les composés testés ont montré des photo-indexes ($\text{PI} = \text{IC}_{50 \text{ noir}} / \text{IC}_{50 \text{ irradiation}}$) élevés (>37) et une faible cytotoxicité dans le noir, soulignant l'importance de l'excitation lumineuse pour l'activation des composés.

Tableau 1. Valeurs des IC_{50} et des photo-indexes déterminés pour les complexes 1-4 à partir de courbes d'inhibition de la croissance de cultures de cellules U2OS sous irradiation lumineuse et dans le noir.

Complexe	$\text{IC}_{50}^{\text{[a]}}$ [μM] Irradiation (Noir)	$\text{PI}^{\text{[b]}}$
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{salicyl}]^{2+}$ 1	2.1 ± 0.6 (>100)	> 47
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{salicylpip}]^{2+}$ 2	0.33 ± 0.06 (47 ± 7)	142
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Pt-salicyl}]^{2+}$ 3	2.7 ± 0.6 (>100)	> 37
$[\text{Ru}(\text{phen})_2\text{Pt-salicylpip}]^{2+}$ 4	0.73 ± 0.20 (33 ± 7)	45

[a] Les valeurs d' IC_{50} sont issues d'une moyenne \pm l'erreur standard calculée au départ d'un doublet de mesures (3 expériences indépendantes, 4 puits par condition). [b] $\text{PI} = \text{photo-indexe} = \text{IC}_{50 \text{ noir}} / \text{IC}_{50 \text{ irradiation}}$

3. Conclusions

Le but de cette étude était d'étudier le potentiel des complexes de Ru^{II} et de Ru-Pt comportant le motif salphène base de Schiff en tant qu'outils

théranostiques par ciblage des G-quadruplexes. Les complexes de Ru-Pt salphène sont les premiers à avoir été reportés et ont démontré une luminescence intense et centrée sur le motif Pt^{II} salphène. Les résultats obtenus via trois techniques d'analyse d'interaction ont montré que les complexes monométalliques de Ru^{II} préparés étaient capables de se lier sélectivement à la structure de l'ADN G4 alors que la présence d'un cation Pt^{II} dans le site salphène et l'intégration de chaînes latérales pipéridine ont permis d'augmenter l'affinité envers l'ADN G4 de deux ordres de grandeur. De plus, les quatre complexes ont été testés in cellulo et ont montré une forte capacité de pénétration dans le noyau des cellules cancéreuses U2OS. Ils ont également été à l'origine de photo-cytotoxicités prometteuses, avec certains composés révélant des valeurs d' IC_{50} dans la gamme submicromolaire. Les complexes ont également montré une faible toxicité cellulaire dans le noir donnant lieu à des photo-indexes supérieurs à 37, ce qui est important pour éviter les effets secondaires indésirables en PDT. En comparaison avec les complexes de Ru^{II} développés précédemment, les composés étudiés s'accumulent davantage au sein du noyau des cellules cancéreuses et en particulier les composés comportant des chaînes latérales pipéridine. Le composé modèle **1** a également montré une plus grande sélectivité pour l'ADN G4 (facteur 10) vis-à-vis des composés de Ru^{II} possédant des ligands d'interaction plus rigides reportés dans la littérature. Enfin, à la suite de la mise en évidence d'une importante augmentation

de la luminescence des complexes en présence d'ADN de type G4, nous pouvons affirmer que les complexes polyazaaromatiques de Ru^{II} salphène constituent des candidats intéressants pour le développement de nouvelles applications thérapeutiques par ciblage des G-quadruplexes.

Références

- [1] M. Gillard, J. Weynand, H. Bonnet, F. Loiseau, A. Decottignies, J. Dejeu, E. Defrançq, B. Elias, *Chemistry - A European Journal* **2020**, *26*, 13849-60.
- [2] J. Oeppen, J. W. Vaupel, *Science* **2002**, *296*, 1029-31.
- [3] J. R. Masters, *Nature Reviews Cancer* **2002**, *2*, 315-9.
- [4] Copyright, *National Academy of Sciences, USA* **2001**, *98*, 7656.
- [5] L. Hayflick, P. S. Moorhead, *Experimental Cell Research* **1961**, *25*.
- [6] L. Hayflick, P. S. Moorhead, *Experimental Cell Research* **1961**, *25*.
- [7] I. N. Lyapun, B. G. Andryukov, M. P. Bynina, *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* **2019**, *34*, 195-200.
- [8] C. L. Lucas, Y. Zhang, A. Venida, Y. Wang, J. Hughes, J. Mcelwee, M. Butrick, H. Matthews, S. Price, M. Biancalana, X. Wang, M. Richards, T. Pozos, I. Barlan, A. Ozen, V. K. Rao, H. C. Su, M. J. Lenardo, *Journal of Experimental Medicine* **2014**, *211*, 2537-47.
- [9] N. W. Kim, M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. C. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich, J. W. Shay, *Science* **1994**, *266*, 2011-5.
- [10] T. De Lange, L. Shiue, R. M. Myers, D. R. Cox, S. L. Naylor, A. M. Killery, H. E. Varmus, *Molecular and Cellular Biology* **1990**, *10*, 518-27.
- [11] C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider, *Nature* **1990**, *345*, 458-60.
- [12] G. Aubert, P. M. Lansdorp, *Physiological Reviews* **2008**, *88*, 557-79.
- [13] J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Research* **2005**, *33*, 2908-16.
- [14] J. T. Davis, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, *43*, 668-98.
- [15] K. Paeschke, T. Simonsson, J. Postberg, D. Rhodes, H. J. Lipps, *Nature Structural & Molecular Biology* **2005**, *12*, 847-54.
- [16] A. Kar, N. Jones, N. Ö. Arat, R. Fishel, J. D. Griffith, *Journal of Biological Chemistry* **2018**, *293*, 9473-85.
- [17] D. Drygin, A. Siddiqui-Jain, S. O'Brien, M. Schwaebe, A. Lin, J. Bliesath, C. B. Ho, C. Proffitt, K. Trent, J. P. Whitten, J. K. C. Lim, D. Von Hoff, K. Anderes, W. G. Rice, *Cancer Research* **2009**, *69*, 7653-61.
- [18] H. Xu, M. Di Antonio, S. McKinney, V. Mathew, B. Ho, N. J. O'neil, N. D. Santos, J. Silvester, V. Wei, J. Garcia, F. Kabeer, D. Lai, P. Soriano, J. Banáth, D. S. Chiu, D. Yap, D. D. Le, F. B. Ye, A. Zhang, K. Thu, J. Soong, S.-C. Lin, A. H. C. Tsai, T. Osako, T. Algara, D. N. Saunders, J. Wong, J. Xian, M. B. Bally, J. D. Brenton, G. W. Brown, S. P. Shah, D. Cescon, T. W. Mak, C. Caldas, P. C. Stirling, P. Hieter, S. Balasubramanian, S. Aparicio, *Nature Communications* **2017**, *8*, 14432.
- [19] M.-P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Guittat, C. Bailly, P. Alberti, J.-L. Mergny, A. David, J.-M. Lehn, W. D. Wilson, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4732-40.
- [20] M. J. B. Moore, C. M. Schultes, F. Cuesta, F. Cuenca, M. Gunaratnam, F. A. Tanius, W. D. Wilson, S. Neidle, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 582-99.
- [21] A. De Cian, E. Delemos, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou, D. Monchaud, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 1856-7.
- [22] I. M. Dixon, F. Lopez, A. M. Tejera, J.-P. Estève, M. A. Blasco, G. Pratviel, B. Meunier, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 1502-3.
- [23] J. Jamroskovic, M. Doimo, K. Chand, I. Obi, R. Kumar, K. Brännström, M. Hedenström, R. Nath Das, A. Akhunzianov, M. Deiana, K. Kasho, S. Sulis Sato, P. L. Pourbozorgi, J. E. Mason, P. Medini, D. Öhlund, S. Wanrooij, E. Chorell, N. Sabouri, *Journal of the American Chemical Society* **2020**.
- [24] C. Romera, O. Bombarde, R. Bonnet, D. Gomez, P. Dumy, P. Calsou, J. F. Gwan, J. H. Lin, E. Defrançq, G. Pratviel, *Biochimie* **2011**, *93*, 1310-7.
- [25] L. Lecarme, E. Prado, A. De Rache, M.-L. Nicolau-Travers, G. Gellon, J. Dejeu, T. Lavergne, H. Jamet, D. Gomez, J.-L. Mergny, E. Defrançq, O. Jarjays, F. Thomas, *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1133-6.
- [26] S. Bandeira, J. Gonzalez-Garcia, E. Pensa, T. Albrecht, R. Vilar, *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, *57*, 310-3.
- [27] A. Łęczkowska, J. Gonzalez-Garcia, C. Perez-Arnaiz, B. Garcia, A. J. P. White, R. Vilar, *Chemistry - A European Journal* **2018**, *24*, 11785-94.
- [28] J. Berrones Reyes, M. K. Kuimova, R. Vilar, *Current Opinion in Chemical Biology* **2021**, *61*, 179-90.
- [29] Q. Yu, Y. Liu, C. Wang, D. Sun, X. Yang, Y. Liu, J. Liu, *PLoS One* **2012**, *7*, e50902.
- [30] T. Wilson, P. J. Costa, V. Félix, M. P. Williamson, J. A. Thomas, *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 8674-83.
- [31] G. Piraux, L. Bar, M. Abraham, T. Lavergne, H. Jamet, J. Dejeu, L. Marcéls, E. Defrançq, B. Elias, *Chemistry - A European Journal* **2017**, *23*, 11872-80.
- [32] J. Weynand, A. Diman, M. Abraham, L. Marcéls, H. Jamet, A. Decottignies, J. Dejeu, E. Defrançq, B. Elias, *Chemistry - A European Journal* **2018**, *24*, 19216-27.
- [33] S. A. Archer, A. Raza, F. Dröge, C. Robertson, A. J. Auty, D. Chekulaev, J. A. Weinstein, T. Keane, A. J. H. M. Meijer, J. W. Haycock, S. Macneil, J. A. Thomas, *Chemical Science* **2019**, *10*, 3502-13.
- [34] V. Sanchez-Martin, M. Soriano, J. A. Garcia-Salcedo, *Cancers* **2021**, *13*, 3156.
- [35] Q. Cao, Y. Li, E. Freisinger, P. Z. Qin, R. K. O. Sigel, Z.-W. Mao, *Inorg Chem Front* **2017**, *4*, 10-32.
- [36] S. Asamitsu, T. Bando, H. Sugiyama, *Chemistry - A European Journal* **2019**, *25*, 417-30.
- [37] K. Mcquaid, H. Abell, S. P. Gurung, D. R. Allan, G. Winter, T. Sorensen, D. J. Cardin, J. A. Brazier, C. J. Cardin, J. P. Hall, *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58*, 9881-5.
- [38] K. Kawauchi, R. Urano, N. Kinoshita, S. Kuwamoto, T. Torii, Y. Hashimoto, S. Taniguchi, M. Tsuruta, D. Miyoshi, *Genes* **2020**, *11*, 1340.
- [39] A. Pinto, I. Marangon, J. Méreaux, A. Nicolás-Boluda, G. Lavieue, C. Wilhelm, L. Sarda-Mantel, A. K. A. Silva, M. Pocard, F. Gazeau, *ACS Nano* **2021**, *15*, 3251-63.
- [40] B. Prasad, J. Jamroskovic, S. Bhowmik, R. Kumar, T. Romell, N. Sabouri, E. Chorell, *Chemistry - A European Journal* **2018**, *24*, 7926-38.
- [41] H. Ihmels, M. Karbasiyou, K. Löhl, C. Stremmel, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2019**, *17*, 6404-13.
- [42] A. M. Burger, F. Dai, C. M. Schultes, A. P. Reszka, M. J. Moore, J. A. Double, S. Neidle, *Cancer Res* **2005**, *65*, 1489-96.
- [43] M. Gillard, B. Laramée-Milette, Q. Deraedt, G. S. Hanan, F. Loiseau, J. Dejeu, E. Defrançq, B. Elias, L. Marcéls, *Inorganic Chemistry Frontiers* **2019**, *6*, 2260-70.
- [44] H. Bonnet, M. Morel, A. Devaux, J. Boissier, A. Granzhan, B. Elias, T. Lavergne, J. Dejeu, E. Defrançq, *Chemical Communications* **2022**, *58*, 5116-9.
- [45] M. Gillard, G. Piraux, M. Daenen, M. Abraham, L. Troian-Gautier, L. Bar, H. Bonnet, F. Loiseau, H. Jamet, J. Dejeu, E. Defrançq, B. Elias, *Chemistry - A European Journal* **2022**, *28*, e202202251.
- [46] J. Weynand, H. Episkopou, G. Le Berre, M. Gillard, J. Dejeu, A. Decottignies, E. Defrançq, B. Elias, *RSC Chemical Biology* **2022**, *3*, 1375-9.
- [47] M. Gillard, H. Bonnet, R. Lartia, H. Yacoub, J. Dejeu, E. Defrançq, B. Elias, *Bioconjugate Chemistry* **2023**, *34*, 414-21.