



HAL
open science

Vers la synthèse et l'étude d'oligonucléotides modifiés Développement de sondes chimiques ciblant le ribose de l'ARN

Laura Nodin

► **To cite this version:**

Laura Nodin. Vers la synthèse et l'étude d'oligonucléotides modifiés Développement de sondes chimiques ciblant le ribose de l'ARN. Autre. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2015. Français. NNT : 2015DENS0039 . tel-01258894

HAL Id: tel-01258894

<https://theses.hal.science/tel-01258894>

Submitted on 19 Jan 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT
DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Présentée par

Mademoiselle Laura NODIN

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Domaine : Chimie

Sujet de la thèse :
Vers la synthèse et l'étude d'oligonucléotides modifiés
Développement de sondes chimiques ciblant le ribose de l'ARN

Thèse présentée et soutenue à Cachan le 17 septembre 2015 devant le jury composé de :

Sylvie POCHET	Directrice de Recherche, Institut Pasteur	Rapporteur
Rachida ZERROUKI	Professeur, Université de Limoges	Rapporteur
Nadège LUBIN-GERMAIN	Professeur, Université de Cergy-Pontoise	Examinatrice
Philippe FOSSÉ	Directeur de Recherche, ENS Cachan	Co-directeur de thèse
Olivier MAUFFRET	Directeur de Recherche, ENS Cachan	Co-directeur de thèse
Joanne XIE	Professeur, ENS Cachan	Directrice de thèse

Laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires
ENS CACHAN/CNRS/UMR 853 I
61, avenue du Président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX (France)

REMERCIEMENTS

J'adresse ma profonde reconnaissance au Professeur Keitaro Nakatani puis au Professeur Fabien Miomandre pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Vous m'avez permis d'effectuer ce travail dans d'excellentes conditions et au sein d'une bien sympathique équipe et je vous en remercie. Je remercie également Isabelle Leray pour son implication dans le laboratoire et dans l'Ecole Doctorale.

Ces travaux ont été effectués au laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (PPSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Cachan (ENSC) sous la direction du Professeur Joanne Xie, du Docteur Philippe Fossé et du Docteur Olivier Mauffret. Je tiens à les remercier pour le temps qu'ils m'ont consacré, pour les conseils qu'ils m'ont donnés, pour l'intérêt porté à mes travaux, pour leur disponibilité et pour la confiance qu'ils m'ont accordée.

Le Professeur Rachida Zerrouki et le Docteur Sylvie Pochet ont accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteur. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude. Le Professeur Nadège Lubin-Germain a accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinatrice et je la remercie chaleureusement.

Le travail sur les Ribosondes n'aurait pu se concrétiser sans les travaux de Françoise Chaminade, de Loussiné Zargarian, d'Ouardia Maskri et d'Akli Ben Imeddourene qui ont su se mettre au niveau d'une « chimiste ». Cette collaboration a permis de donner une tournure plus « bio » à ma thèse et je les en remercie.

Je remercie Christie Aroulanda de l'ICMMO d'Orsay, qui m'a encadrée dans les études structurales des *N*-oxy PNA alors que je ne connaissais rien au sujet. Etienne et Nicolas ont accompagné mes premiers pas en DFT et je les en remercie. Je remercie également Gilles Clavier et Rémi Métiver qui ont pris sur leur temps pour répondre à mes questions sur Gaussian.

Stéphane m'a permis de travailler dans un laboratoire très bien entretenu. Et, même si nous n'étions pas tout le temps d'accord sur les manières de faire, ton travail si consciencieux a grandement contribué aux travaux présentés dans ce manuscrit. Passionné, réactif (ou hyperactif ?), notre nouvel IE n'économise ni son temps, ni son énergie pour aider les stagiaires et les doctorants... et pour une soirée plus ou moins arrosée ! Pour tout cela, merci.

Mon collègue de bureau Nicolas n'a jamais été avare en conseils sur les « réactions chimiques » ou sur l'enseignement, le tout dans la bonne humeur et l'accessibilité. La « petit rat nodin » te remercie pour avoir pris le temps de répondre aux questions de son esprit torturé ! Je te remercie également pour le bout de pain que tu as laissé quotidiennement sur mon bureau lors de ma première année de thèse...

J'adresse un grand merci à tous les doctorants et anciens doctorants de l'équipe JX ! Je n'oublierai pas Yanhua Hu (Sophie), Na Chen et Nhi-Ha Nguyen. Sandrine Peyrat a pris le temps de me former sur la synthèse de nucléosides modifiés et je la remercie. Bonne route à elle dans le sud. Claire a partagé avec moi un côté du labo pendant 2 ans, exploitant la couleur de ses complexes métalliques pour finir une colonne bien plus rapidement que moi.

Merci à tous mes collègues doctorants. Corentin, nous avons partagé le magistère et la thèse ensemble, ce qui fait un petit paquet d'année. Clarisse nous a régalé avec de succulents gâteaux et je regrette de n'avoir pas été davantage disponible pour les pauses goûter de 16 h. Merci à Charlotte pour sa gentillesse et son accueil régulier à Ivry. Merci à Paul pour sa bonne humeur et je lui souhaite bon courage pour la préparation de l'agreg. Merci également à Meriam. Je remercie également Eva pour nos longues discussions sur la recherche et l'enseignement. Je remercie enfin les stagiaires, les doctorants ou post-doctorants que je n'ai parfois fait que croiser dans le laboratoire : Marine, Cassandre, Olivier G., Thanh, Aurélie, Chloé, Johan, Clément, Djibril, Guillaume F., Guillaume, Muriel, Emile. Un spécial remerciement au trio infernal (Jérémy B., Jérémy M. et Alexis) qui ont bien animé mes premiers mois de thèse. Merci à toutes les collègues chinoises (Yuan Li, Jia Su, Yang Si, Haitao Zhang et Yuanyuan Liao) pour vos sourires, votre sympathie et vos cadeaux de Chine.

Durant ces trois années, j'ai eu l'occasion de participer à l'organisation de différents évènements. Je remercie les équipes organisatrices des RCO, des RED et de l'inauguration du nouveau laboratoire du département de chimie pour ces collaborations.

Merci à Jacky qui m'a toujours secouru lorsque mon ordinateur faisait la grève. Ton aide a été indispensable pour mener à bien mes calculs. Je te félicite pour ta patience devant mon agacement vis-à-vis de l'outil informatique. Bien que n'ayant pas fait beaucoup de spectro, je remercie Arnaud pour sa disponibilité dans les études IR.

Je tiens aussi à remercier mes deux stagiaires de L3 Adeline Forget et Clément Polese. Ils ont contribué à une partie des travaux présentés dans cette thèse.

Durant ces trois années, j'ai eu la très grande chance de pouvoir enseigner au sein du département de chimie de l'Ecole. Merci à Rachel Méallet Renault et à Joanne Xie de m'avoir donné ma chance dans ce poste d'agrégé préparateur. Cela a été l'occasion de participer à des enseignements très variés dans d'excellentes conditions. Merci aux 3 promos d'agrégatifs qui ont eu le courage d'aller au bout de mes devoirs à rallonge.

Merci à Jonathan qui, malgré un emploi du temps surchargé, m'a guidé dans mon enseignement. Tu as enrichi mon parcours professionnel mais pas que...Nous t'attendons de pied ferme au Mans. Merci à Jean-Pierre, venu me rejoindre à Cachan pour partager des discussions et impressions sur l'enseignement. Certains de nos TD/TP resteront mémorables ! J'espère de tout cœur que tu vas le décrocher ce poste....

Je remercie Cécile, qui a été un appui indispensable et qui m'a fait confiance en me donnant la responsabilité de certains enseignements. Bravo pour ton efficacité dans tes nombreuses tâches.

Merci à la sympathique Valérie Génot et bravo pour être si consciencieuse dans un enseignement trop « chimique ». Merci à Carine qui m'a guidé dans mon premier TP sur l'azote et le soufre. Merci à Valérie Alain-Rizzo qui m'a aidée lors de ma première année d'enseignement et qui n'a pas hésité à me donner ses bases de cours. Merci également à Clémence Allain pour sa grande gentillesse. Je remercie enfin Jean-Pierre Lefèvre, Robert Pansu, Guillaume Laurent, Jean-Frédéric Audibert et Minh-Huong Ha-Thi. En tant qu'ancien élève, je remercie Jacques Delaire pour la qualité de son enseignement. Je remercie enfin Pierre Audebert, que j'aurais probablement dû écouter davantage...

Merci à Catherine, Clément, Franck, Hélène et Sandrine pour m'avoir aidé dans ma mission d'enseignement. Je dois maintenant me débrouiller sans équipe technique... Je suis prête pour une nouvelle livraison de rillettes très prochainement. Je n'oublie pas non plus Christian et Andrée, toujours efficace dans les paperasses et toujours de bonne humeur. Christian, nous te croiserons peut être sur une course ou un trail.

Les chimistes de Cachan m'ont permis de profiter pleinement de ces 7 années passées à l'ENS et ont partagé avec moi les galères du RER B. Merci à mes « copines » de Cachan Aurore, Fanny, Lydie, Morgane L. (ou plutôt Morgane P.) et Morgane V. Ces années sont passées bien trop vite et même si nous sommes maintenant éparpillées aux 4 coins de la France (ou même d'Angleterre !), j'attends avec impatience nos « weekends filles ». Un grand merci à Pierre (un chimiste mayennais qui ne supporte pas la vision d'un bécher et qui n'a pas chem draw sur son ordinateur !), Charlotte (je croise les doigts pour toi cette année), Célia, Cécilia, Eric et Benjamin. Avec mes collègues agrégatifs, nous sommes venus au bout d'une bien éprouvante (mais enrichissante !) année. Merci à Olivier C. qui nous a permis d'être calés sur la synthèse du taxol et qui a trouvé le moyen de mettre cette synthèse en ouverture de tous les LO/MO. Merci à Véro, pour sa bonne humeur et sa simplicité et à qui je souhaite bon vent dans l'est (rassure-toi, ce n'est pas encore le grand est !). Merci également à Thibaut (qui y aura laissé son poignet), Marion et Alexandre. Je suis bien contente de vous avoir comme collègues ! Enfin, un immense merci à ma collègue TZR sarthoise Vanessa, qui m'a guidée dans l'univers des mutations de l'EN et pour ma première rentrée et qui est toujours prête pour une sortie vélo. Merci à Villier, pour nos très nombreuses coinches autour d'un bon petit foie gras. J'attends toujours que JP convertisse Maela aux jeux de carte ;-)

Un grand merci à l'« amicale des TGVistes sympas » qui m'a permis de démarrer chaque journée du bon pied. Après tout, un sourire, un bonjour sincère, une bonne humeur partagée, une discussion quotidienne sur le thermos de café et la viennoiserie du jeudi changent votre journée. 7h33 (bon, ça, c'est l'horaire théorique...) quai 2, voiture 5, places 91, 92, 93, 94, cela va bien me manquer. Bien sûr, je remercie la SNCF qui, malgré des obstacles sur les voies, des problèmes de signalisation, des « nous avons perdu notre conducteur » (?), des conditions climatiques exceptionnelles hebdomadaires, des difficultés lors de l'acheminement du personnel ou lors de la préparation du train, des pannes de train, des travaux sur le réseau, des suicides de sangliers, des grèves (je vais m'arrêter là !) a toujours su nous ramener à la maison (on ne précisera pas l'heure d'arrivée...). Un remerciement bien spécial à Laurent.... pour tout ce que tu sais.

Nicolette et Bruno ont su m'accueillir dans un petit coin de paradis. Merci à vous pour avoir partagé votre passion des chevaux, de la nature et du vtt, pour prendre si bien soin de nos compagnons à 4 sabots (mais non ferrés !) et pour m'avoir permis de m'échapper chaque weekend... à dos de Mélo ou à vélo ! Merci Pierre pour la confiance que tu m'as accordée. Bien entendu, merci à Mélo qui a su si bien exploiter mes moments de faiblesse ! J'en profite pour remercier toute l'équipe « Au petit galop » d'Altrippe qui m'a transmis sa passion (et surtout son respect) des chevaux et sa camaraderie depuis ma plus jeune enfance, le tout dans la bonne humeur et le partage.

Cette thèse a été un énorme investissement et m'a régulièrement empêchée d'être disponible pour mes proches. Je remercie mes parents, mes cousins/cousines et mes oncles et tantes pour leur soutien durant ces longues années d'étude. Merci également à ma belle-famille, qu'elle

Remerciements

soit en Sarthe, à Chartres, à Montpellier, à Lyon, dans le Sud Ouest, dans le Nord, en Belgique ou en Louisiane...

Merci à ma petite sœur Mylène qui a accepté de me partager tant d'années avec des bouquins ou un ordinateur. Je suis contente que tu aies pu faire de ta passion (notre passion ?) ton futur métier et que malgré la distance, nous nous retrouvions régulièrement pour un petit galop dans les bois !

Enfin, je remercie Olivier pour son soutien quotidien indéfectible lors de ce travail et lors de mes études et pour m'avoir appris le dépassement de soi. Marcher, pagayer, pédaler, sauter, nager, grimper, skier, plonger, escalader, ramper (si, si....), etc. Merci pour ces milliers de kilomètres parcourus. Je sais que nous en avons encore des millions à parcourir... Après tout, "*courage is very important. Like a muscle, it is strengthened by use.*" Promis, je vais améliorer très vite mon temps au 10 km ;-)

J'oublie certainement de très nombreuses personnes et je m'en excuse....

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS ET ACRONYMES	13
INTRODUCTION GENERALE	23
CHAPITRE 1 : LES OLIGONUCLEOTIDES EN TANT QU'AGENTS THERAPEUTIQUES	27
I. INTRODUCTION	29
II. STRUCTURES ET FONCTIONS DES OLIGONUCLEOTIDES.....	29
II.1. LES ACIDES RIBONUCLEIQUES	29
II.1.a. Nucléosides et nucléotides	29
II.1.b. Oligonucléotides.....	30
II.2. STRUCTURE DE L'ADN ET DE L'ARN	31
II.2.a. Interactions mises en jeu	31
II.2.b. Structure en double hélice	34
II.2.c. Structure en triple hélice	38
II.2.d. G-quadruplexes	39
II.3. FONCTIONS DE L'ADN ET DE L'ARN	40
II.3.a. Réplication de l'ADN.....	40
II.3.b. Synthèse de protéines.....	41
II.3.c. Différentes classes d'ARN	42
III. LES OLIGONUCLEOTIDES EN TANT QU'AGENTS THERAPEUTIQUES	43
III.1. INTERETS DES OLIGONUCLEOTIDES COMME AGENTS THERAPEUTIQUES	43
III.1.a. Enjeux dans la recherche de médicaments.....	43
III.1.b. Les oligonucléotides thérapeutiques	44
III.1.c. Modes d'actions des oligonucléotides thérapeutiques.....	45
III.2. CIBLAGE D'ADN : LA STRATEGIE ANTIGENE	47
III.3. CIBLAGE D'ARN : LA STRATEGIE ANTISENS	48
III.3.a. Ciblage des ARN _m	48
III.3.b. Saut d'exon	49
III.3.c. Ciblage des miRNA.....	50
III.3.d. Interférence ARN	52
III.3.e. Les ribozymes et les DNazymes	53
III.4. AUTRES STRATEGIES THERAPEUTIQUES	55
III.4.a. Les aptamères	55
III.4.b. Les oligonucléotides leurres.....	58
III.4.c. Les oligonucléotides CpG	61
III.4. CONCLUSION : AVANTAGES DES OLIGONUCLEOTIDES EN TANT QU'AGENTS THERAPEUTIQUES.....	62
IV. CONCEPTION ET SYNTHESE D'OLIGONUCLEOTIDES THERAPEUTIQUES.....	62
IV.1. CAHIER DES CHARGES	62
IV.1.a. Administration in vivo d'oligonucléotides thérapeutiques.....	62
IV.1.b. Propriétés des oligonucléotides thérapeutiques	64
IV.2. POURQUOI ET COMMENT MODIFIER LES OLIGONUCLEOTIDES NATURELS ?	64
IV.2.a. Intérêts de la modification des oligonucléotides.....	64
IV.2.b. Modifications envisageables	64
IV.2.c. Modes d'action des RNases H.....	65
IV.2.d. Méthodes de synthèse des oligonucléotides	66

IV.3. OLIGONUCLEOTIDES MODIFIES : EXEMPLES	70
IV.3.a. Les oligonucléotides antisens de première génération	70
IV.3.b. Les oligonucléotides antisens de seconde génération.....	71
IV.3.c. Les oligonucléotides antisens de troisième génération	74
IV.3.d. Les gapmères	77
IV.3.e. Résumé.....	77
IV.4. COMMENT ADMINISTRER CES OLIGONUCLEOTIDES ?	78
IV.4.a. Vectorisation par des méthodes physiques.....	78
IV.4.b. Vectorisation biologique	78
IV.4.c. Présentation des outils de vectorisation chimique	79
IV.4.d. Exemples de vectorisation chimique	81
IV.5. VECTORISATION DES OLIGONUCLEOTIDES : CONCLUSION.....	89
V. CONCLUSION.....	90
CHAPITRE 2 : LA LIAISON N-O DANS LES NUCLEOSIDES, DINUCLEOSIDES ET OLIGONUCLEOTIDES	91
I. INTRODUCTION	93
II. LES NUCLEOSIDES A LIAISON N-O	94
II.1. LES NUCLEOSIDES ISOXAZOLIDINES.....	94
II.1.a. Une grande variété de nucléosides isoxazolidines.....	95
II.1.b. Méthodes de préparation des nucléosides isoxazolidines	101
II.2. AUTRES NUCLEOSIDES A LIAISON N-O	106
III.2.a. Les nucléosides oximes	106
III.2.b. Les nucléosides hydroxylamines et alkoxyamines	108
III.2.c. Les nucléosides N-oxyamines.....	114
III.2.d. Les N,O-nucléosides bicycliques.....	117
III.2.e. Les nucléosides acides hydroxamiques.....	119
III.2.f. Les nucléosides nitroxydes	121
III. LES DINUCLEOSIDES ET LES OLIGONUCLEOTIDES A LIAISON N-O	123
III.1. LES DINUCLEOSIDES A LIAISON N-O	123
III.1.a. Les dinucléosides liés par liaison hydroxylamine	123
III.1.b. Les dinucléosides liés par liaison N-oxyamide	128
III.1.c. Les dinucléosides liés par liaison hydroxamate ou N-hydroxycarbamate.....	129
III.1.d. Autres exemples de dinucléosides liés par liaison N-O	131
III.2. LES OLIGONUCLEOTIDES A LIAISON N-O.....	133
III.2.a. Les BNA à liaison N-O	133
III.2.b. Les oligonucléotides circulaires à liaison N-O.....	137
III.2.c. Les oligonucléotides nitroxydes	138
IV. CONJUGAISON D'OLIGONUCLEOTIDES VIA LA LIAISON OXIME	140
IV.1. CHOISIR LA LIAISON OXIME EN BIOCONJUGAISON ?	140
IV.1.a. Conjugaison par liaison oxime : formation et intérêts	140
IV.1.b. Multiples positions de conjugaison	143
IV.1.c. Conjugaison sur support solide ou post-synthèse.....	145
IV.1.d. Conjugaison multiple.....	148
IV.1.e. Difficultés de la conjugaison par liaison oxime	151
IV.2. PRINCIPAUX EXEMPLES D'OLIGONUCLEOTIDES CONJUGUES PAR UNE LIAISON OXIME	151
IV.2.a. Oligonucléotides conjugués à des petites molécules	151
IV.2.b. Oligonucléotides conjugués à des peptides.....	152

IV.2.c. Oligonucléotides conjugués à des carbohydrates.....	154
IV.2.d. Oligonucléotides conjugués à des complexes métalliques.....	155
V. CONCLUSION.....	156
CHAPITRE 3 : VERS LA SYNTHÈSE D'OLIGOMÈRES DE NUCLEOSIDES AMINOXY ACIDES VIA LA MODIFICATION DU NUCLEOSIDE.....	159
I. INTRODUCTION.....	161
II. APPROCHE RETROSYNTHÉTIQUE DES OLIGOMÈRES D'URIDINES AMINOXY ACIDES.....	161
III. VERS LA SYNTHÈSE DES OLIGOMÈRES D'URIDINES AMINOXY ACIDES.....	164
III.1. SYNTHÈSE ET DEPROTECTION DU BOC-AMINOXY ESTER U9.....	164
III.1.a. Synthèse du Boc-aminoxy ester U9.....	164
III.1.b. Déprotection de la fonction N-oxyamine et de la fonction ester de U9.....	171
III.2. CHOIX D'UN AUTRE GROUPEMENT PROTECTEUR.....	173
III.2.a. Synthèse et déprotection du phthalimidooxy ester U14.....	173
III.2.b. Synthèse et déprotection du N-penténylaminoxy ester U17.....	178
IV. VERS LA SYNTHÈSE DE DINUCLEOSIDES D'URIDINE ET DE THYMIDINE.....	180
IV.1. APPROCHE RETROSYNTHÉTIQUE DES DINUCLEOSIDES CIBLES.....	181
IV.2. SYNTHÈSE DES DINUCLEOSIDES CIBLES.....	183
IV.2.a. Préparation du monomère thymidine U21.....	183
IV.2.b. Préparation des monomères uridines U31 et U32.....	183
IV.2.c. Réactions de couplage.....	191
V. CONCLUSION ET BILAN.....	192
CHAPITRE 4 : VERS LA SYNTHÈSE D'OLIGOMÈRES DE NUCLEOSIDES AMINOXY ACIDES A PARTIR DU GLUCOSE.....	195
I. INTRODUCTION.....	197
II. APPROCHE RETROSYNTHÉTIQUE DES OLIGOMÈRES DE NUCLEOSIDES AMINOXY ACIDES CIBLES.....	198
III. SYNTHÈSE DES RIBOFURANOIDES AMINOXY ACIDES.....	200
III.1. SYNTHÈSE ET DEPROTECTION DU PHTHALIMIDOOXY ESTER G10.....	200
III.1.a. Synthèse du phthalimidooxy ester G10.....	200
III.1.b. Déprotection de la fonction aminoxy et de la fonction acide carboxylique du phthalimidooxy ester G10.....	211
III.2. SYNTHÈSE ET DEPROTECTION DU N-PENTÉNOYLAMINOXY ESTER G15.....	214
III.2.a. Synthèse du N-penténylaminoxy ester G15.....	214
III.2.b. Déprotection de la fonction aminoxy et de la fonction acide carboxylique du N-penténylaminoxy ester G15.....	215
III.3. SYNTHÈSE DU PHTHALIMIDOOXY ESTER G24.....	216
III.4. CONCLUSION.....	219
IV. PRÉPARATION DES NUCLEOSIDES PHTHALIMIDOOXY ESTERS.....	219
IV.1. DEPROTECTION DE L'ACETONIDE G10.....	219
IV.2. PRÉPARATION DES MONOMÈRES PYRIMIDIQUES.....	219
IV.3. PRÉPARATION DES MONOMÈRES PURIQUES.....	221
V. ANALYSE DES DIFFICULTÉS RENCONTRÉES.....	222
V.1. BILAN ET POURSUITE D'AUTRES TRAVAUX DU LABORATOIRE : SYNTHÈSE D'OLIGOMÈRES DE N-OXY PNA.....	222

V.1.a. Bilan des travaux de thèse d'Olivier Noel.....	222
V.1.b. Poursuite de la synthèse de dimères et de tétramères	222
V.2. ANALYSE PARALLELE DE CES DIFFERENTES SYNTHESES	224
V.2.a. Aperçu des difficultés rencontrées	224
V.2.b. Hypothèses avancées	226
V. CONCLUSION ET BILAN.....	229
CHAPITRE 5 : ANALYSE STRUCTURALE DES OLIGOMERES DE RIBOFURANOIDES AMINOXY ACIDES ET DE N-OXY PNA	233
I. INTRODUCTION	235
II. TECHNIQUES D'ANALYSE STRUCTURALE D'OLIGOMERES DE RIBOFURANOIDES AMINOXY ACIDES ET DE N-OXY PNA	235
II.1. LA SPECTROSCOPIE RMN	235
II.1.a. La spectroscopie RMN à deux dimensions.....	236
II.1.b. Dilutions et dosages en RMN ¹ H.....	237
II.2. LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE	238
II.3. MODELISATION THEORIQUE	240
II.3.a. Mécanique moléculaire ou méthodes quantiques.....	240
II.3.b. Méthodes de recherches de conformères.....	241
II.4. AUTRES TECHNIQUES D'ANALYSE STRUCTURALE.....	243
III. CONFORMATIONS D'OLIGOMERES D'AMINOXY ACIDES DECRITES DANS LA LITTERATURE	243
III.1. LES A-AMINOXY ACIDES	243
III.2. LES B-AMINOXY ACIDES	244
III.3. LES Γ-AMINOXY ACIDES.....	245
IV. ETUDES CONFORMATIONNELLES DES OLIGOMERES DE N-OXY PNA.....	245
IV.1. ETUDE DES MONOMERES DE N-OXY PNA	245
IV.1.a. Etude du monomère thymine.....	246
IV.1.b. Etude du monomère cytosine.....	252
IV.1.c. Etude du monomère adénine	255
IV.2. ETUDE DE DIMERES	257
IV.2.a. Etude du dimère TT	258
IV.2.b. Etude du dimère AA.....	260
IV.2.c. Etude du dimère TC.....	262
V. ETUDES CONFORMATIONNELLES DES OLIGOMERES DE RIBOFURANOIDES AMINOXY ACIDES.....	264
V.1. ETUDE DU DIMERE O3.....	264
V.1.a. Méthode d'étude.....	264
V.1.b. Résultats.....	264
V.2. ETUDE DU TRIMERE O3.....	265
VI. CONCLUSION.....	267
CHAPITRE 6 : RIBOSONDES : DEVELOPPEMENT DE SONDAS CHIMIQUES CIBLANT LE RIBOSE DE L'ARN. ETUDE DU MECANISME SHAPE	269
I. INTRODUCTION	271
II. DETERMINATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE D'ARN	271
II.1. RELATIONS STRUCTURE-FONCTION DES ARN	271

II.1.a. Rappels sur la structure des ARN.....	271
II.1.b. Importance de la structure des ARN pour leur fonction biologique	272
II.2. METHODES DE DETERMINATION PHYSIQUES ET ALGORITHMIQUES DE LA STRUCTURE DES ARN	272
II.2.a. Détermination de la structure des ARN par RMN.....	273
II.2.b. Détermination de la structure des ARN par diffraction des rayons X.....	273
II.2.c. Détermination de la structure des ARN par des algorithmes	274
II.3. DETERMINATION DE LA STRUCTURE DES ARN PAR DES SONDAS CHIMIQUES OU ENZYMATIQUES.....	274
II.3.a. Présentation des sondes chimiques et des enzymes permettant la détermination de structure d'ARN	274
II.3.b. « In line probing ».....	276
II.3.c. L'apport de la méthode SHAPE	276
II.3.d. Stratégies d'identification des adduits.....	282
III. NOUVELLES SONDAS CHIMIQUES : DE LEUR CONCEPTION A LA MODULATION DE LEUR PROPRIETES PAR L'UTILISATION DE CATALYSEURS.....	283
III.1. CONCEPTION DE NOUVELLES SONDAS CHIMIQUES	283
III.1.a. Structures de ces nouvelles sondes chimiques.....	283
III.1.b. Etude théorique de la réactivité de ces nouvelles sondes chimiques.....	285
III.2. MODULATION DE LA REACTIVITE/SELECTIVITE PAR L'AJOUT D'UN CATALYSEUR.....	286
IV. ETUDE DES NOUVELLES SONDAS CHIMIQUES SUR L'EXTREMITÉ 5' DU GENOME DU VIH-1	287
IV.1. SYNTHÈSE ET ETUDE DES SONDAS CHIMIQUES	287
IV.1.a. Préparation des sondes	287
IV.1.b. Etude de la réactivité des sondes	289
IV.2. TESTS DES SONDAS CHIMIQUES SUR L'EXTREMITÉ 5' DU GENOME DU VIH-1	292
IV.2.a. Tests des ribosondes sans catalyseur.....	292
IV.2.b. Tests des ribosondes avec catalyseur.....	293
V. ETUDE APPROFONDIE DES SONDAS R1 ET R5 EN PRESENCE DES CATALYSEURS DMAP ET SUPERDMAP SUR LA REGION SL1(-) DU GENOME DU VIRUS DE L'HEPATITE C	296
V.1. TESTS DES RIBOSONDAS AVEC LE CATALYSEUR DMAP	296
V.2. TESTS DES RIBOSONDAS AVEC LE CATALYSEUR SUPERDMAP	298
VI. ETUDE DU MECANISME SHAPE	299
VI.1. MISE EN EVIDENCE DES FAILLES DU MECANISME SHAPE.....	299
VI.1.a. Fondements du mécanisme SHAPE	299
VI.1.b. Sites nucléophiles de l'ARN.....	299
VI.2. DETERMINATION DES SITES REACTIFS DE L'ARN	302
VI.2.a. Stratégie d'étude.....	302
VI.2.b. Réaction entre le NMIA et les NMPC	303
VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	306
PARTIE EXPERIMENTALE	333
ANNEXE : STRUCTURE DES GROUPEMENTS UTILISES	401
ANNEXE : ACIDES AMINES	403
ANNEXE : BASES NUCLEIQUES	404
ANNEXE : INDEX DES COMPOSES	405
ANNEXE : PUBLICATIONS.....	411

ABREVIATIONS ET ACRONYMES

A, B, C	
A	Adénine
Abs	Absorbance
Ac	Acétyle
ADDP	1,1'-(Azodicarbonyl)dipipéridine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AE	Acétate d'Ethyle
AMBER	De l'anglais <i>Assisted Model Building with Energy Refinement</i>
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMV	De l'anglais <i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ARN_m	Acide RiboNucléique messenger
ARN_r	Acide RiboNucléique ribosomique
ARN_t	Acide RiboNucléique de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATR	De l'anglais <i>Attenuated Total Reflectance</i>
AZT	Azidothymidine
9-BBN	9-BoraBicyclo[3.3.1]Nonane
B3LYP	Becke, three-parameter, Lee-Yang-Parr
B	Base nucléique
BAIB	Bis(Acétoxy)-IodoBenzene
BMA	Méthacrylate de butyle
Bn	Benzyle
BNA	De l'anglais <i>Bicyclic Nucleic Acids</i>
Boc	<i>Tert</i> -butyloxycarbonyle
BSA	<i>N,O</i> -Bis(triméthylSilyl)Acétamide
Bu	Butyle
BV	Basse Vacante

Bz	Benzoyle
C	Cytosine
Cbz	Benzyloxycarbonyle
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDR	Couplage Dipolaire Résiduel
CMPc	Cytidine MonoPhosphate cyclique
COSY	De l'anglais <i>COrrelation SpectroscopY</i>
CpG	Cytidine phosphate Guanosine
CPG	De l'anglais <i>Controlled Porosity Glass</i>
CPP	De l'anglais <i>Cell-Penetrating Peptide</i>
CTP	Cytidine TriPhosphate
Cy	Cyclohexyle

D, E, F

d	Doublet ou désoxy
DBAD	Azodicarboxylate de di- <i>tert</i> -butyle
DBU	1,8-DiazaBicyclo[5.4.0]Undéc-7-ène
DC	Dichroïsme Circulaire
DCC	DiCyclohexylCarbodiimide
dd	Doublet dédoublé
DEAD	Azodicarboxylate de diéthyle
DEPC	Diéthylcyanophosphonate
DEPT	De l'anglais <i>Distortionless Enhanced Polarization Transfer</i>
DFT	De l'anglais <i>Density Functional Theory</i>
DHAA	2'-Désoxy-2'-HydroxylAminoAdénine
DHAC	2'-Désoxy-2'-HydroxylAminoCytidine
DHAU	2'-Désoxy-2'-HydroxylAminoUridine
DIAD	Azodicarboxylate de diisopropyle
DIBAL-H	Hydrure de diisobutylaluminium
DIPEA	<i>N,N</i> -DiisopropylEthylAmine
DMAEMA	Méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle

DMAOE	2'-O-[2-[(<i>N,N</i> -Diméthylamino)oxyéthyle]
DMAP	4-(Diméthylamino)pyridine
DMDC	1-(2-Désoxy-2-méthylène-β-D-érythro-pentofuranosyl)cytosine
DMEAD	Azodicarboxylate de di-2-méthoxyéthyle
DMF	<i>N,N</i> -DiMéthylFormamide
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DMS	DiMéthylSulfate
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DMT	4,4'-DiMéthoxyTrityle
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DTT	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-1,4-Dimercaptobutane-2,3-diol
EA	De l'anglais <i>Ethyl Acetate</i>
E_c	Energie cinétique
ed	Excès diastéréoisomérique
EDC	<i>N</i> -(3-Diméthylaminopropyl)- <i>N'</i> -éthylcarbodiimide
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ENA	De l'anglais <i>Ethylene bridge Nucleic Acid</i>
EP	Ether de Pétrole
E_p	Energie potentielle
éq.	Equivalent molaire
ESI-HRMS	De l'anglais <i>Electron Spray Ionisation Hight Resolution Mass Spectroscopy</i>
ESP	De l'anglais <i>ElectroStatic Potential</i>
Et	Ethyle
E_{tot}	Energie totale
FAI	Acide 2-méthyl-3-furoïque imidazolide
FDA	De l'anglais <i>Food and Drug Administration</i>

G, H, I, J

G	Guanine
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
GTP	Guanosine TriPhosphate

HBTU	Hexafluorophosphate de <i>O</i> -benzotriazole- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium
HEPES	Acide 2-(4-(2-hydroxyéthyl)pipérazin-1-yl)éthanesulfonique
HetCor	De l'anglais <i>Heteronuclear Correlation</i>
Hex	Hexyle
HF	Hartree-Fock
HMBC	De l'anglais <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
HMQC	De l'anglais <i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
HMX	De l'anglais <i>2'-Hydroxyl molecular interference</i>
HO	Haute Occupée
HOAt	1-Hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazole
HPLC	De l'anglais <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	De l'anglais <i>High Resolution Mass Spectroscopy</i>
HSQC	De l'anglais <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HxNA	De l'anglais <i>Hydroxamate bridged Nucleic Acid</i>
ICAM	De l'anglais <i>InterCellular Adhesion Molecules</i>
IEFPCM	De l'anglais <i>Integral Equation Formalism Varian Polarizable Continuum Model</i>
<i>i</i>Pr	<i>Iso</i> -propyle
IR	Infrarouge
IUPAC	De l'anglais <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Constante de couplage scalaire

K, L, M, N, O, P

<i>l</i>	Large
LNA	De l'anglais <i>Locked Nucleic Acid</i>
1M7	Anhydride 1-méthyl-7-nitroisatoïque
<i>m</i>	Massif
<i>m</i>	Méta
MALDI	De l'anglais <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
Me	Méthyle

min.	Minute
miRNA	De l'anglais <i>micro-RiboNucleic Acid</i>
MM	Mécanique Moléculaire
MMI	Méthylène(MéthylImino)
MOE	2'-O-(2-méthoxyéthyle)
MOMI	MéthylèneOxy(MéthylImino)
MP	MéthylPhosphonate ou de l'anglais <i>Melting Point</i>
MPE	De l'anglais <i>Methidiumpropyl-EDTA</i>
MPLC	De l'anglais <i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
Ms	Mésyle
MS	De l'anglais <i>Mass Spectroscopy</i>
NAI	Acide 2-méthylnicotinique imidazolidide
NBS	<i>N</i> -BromoSuccinimide
NCS	<i>N</i> -ChloroSuccinimide
ncRNA	De l'anglais <i>non-coding RiboNucleic Acid</i>
NIS	<i>N</i> -IodoSuccinimide
NLS	De l'anglais <i>Nuclear Localization Signal</i>
NMIA	Anhydride <i>N</i> -méthylisatoïque
NMO	<i>N</i> -Méthyl- <i>N</i> -oxyde-morpholine
NMPc	Nucléotide MonoPhosphate cyclique
NOE	De l'anglais <i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	De l'anglais <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NTP	Nucléoside TriPhosphate
<i>o</i>	Ortho
<i>p</i>	Para
Pac	Phénoxyacétyle
PCNA	De l'anglais <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	De l'anglais <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDC	De l'anglais <i>Pyridinium DiChromate</i>
PDSEMA	Méthacrylate de (pyridyldisulfide)éthyle

PE	De l'anglais <i>Petroleum Ether</i>
PEG	PolyEthylène Glycol
PELDOR	De l'anglais <i>Pulsed electron-electron double resonance spectroscopy</i>
Pen	Pent-4-énoyle
Ph	Phényle
pH	Potentiel hydrogène
Phen	Phénanthrène
Phth	Phthaloyle
PM3	De l'anglais <i>Parametric Method 3</i>
PMO	De l'anglais <i>Phosphoramidate morpholino</i>
PNA	De l'anglais <i>Peptide Nucleic Acid</i>
ppm	Parties par million
PPTS	Paratoluènesulfonate de pyridinium
PPY	4-(Pyrrolidin-1-yl)pyridine
PS	Phosphorothioate
pyr	Pyridine

Q, R, S, T

R	Groupe chimique quelconque
RAFT	De l'anglais <i>Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer</i>
Rdt	Rendement
R_f	Rapport frontal
RGD	Arginine-glycine-acide aspartique
RISC	De l'anglais <i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMS	De l'anglais <i>Root Mean Square</i>
RNase H	Ribonucléase H
RT	De l'anglais <i>Room Temperature</i>
RTB	De l'anglais <i>Reverse Transcription Buffer</i>
s	Singulet
sDMAP	Super 4-(diméthylamino)pyridine

SELEX	De l'anglais <i>Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment</i>
SHAPE	De l'anglais <i>Selective 2'-Hydroxyl acylation Analyzed by Primer Extension</i>
shRNA	De l'anglais <i>short-hairpin RiboNucleic Acid</i>
siDNA	De l'anglais <i>small interfering DeoxyRibonucleic Acid</i>
siRNA	De l'anglais <i>small interfering RiboNucleic Acid</i>
SNALP	De l'anglais <i>Stable Nucleic Acid Lipid Particle</i>
snRNA	De l'anglais <i>small nuclear RiboNucleic Acid</i>
t	Triplet
tBu	<i>Tert</i> -butyle
T	Thymine
TA	Température Ambiante
TAP	1,4,5,8-TétraAzaPhénanthrène
TBAF	Fluorure de tétra- <i>n</i> -butyl ammonium
TBDMS ou TBS	<i>Tert</i> -butyldiméthylsilyle
TBDPS	<i>Tert</i> -butyldiphénylsilyle
TBE	Tris-borate-EDTA
TEMPO	(2,2,6,6-Tétraméthyl-1-pipéridinyl)oxy
T_f	Température de fusion
TF	De l'anglais <i>Transcription Factor</i>
TFA	Acide trifluoroacétique
TFO	De l'anglais <i>Triplex Forming Oligonucleotide</i>
THF	TétraHydroFurane
TIPS	TrilsoPropylSilyle
TLR	De l'anglais <i>Toll-Like Receptors</i>
TMS	TriMéthylSilyle ou TétraMéthylSilane (RMN)
TOF	De l'anglais <i>Time Of Flight</i>
Tr	Trityle
Tris	2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol
tRNA	De l'anglais <i>Transfer RiboNucleic Acid</i>

U, V, W, X, Y, Z

U	Uracile
UMPC	Uridine MonoPhosphate cyclique
UTP	Uridine TriPhosphate
UV	Ultra-Violet
VEGF	De l'anglais <i>Vascula Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	De l'anglais <i>Vascula Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VHC	Virus de l'Hépatite C

Unités et Symboles

C	Concentration volumique exprimée en mol.L ⁻¹
°C	Unité métrique de la température exprimée en degrés Celsius
cal	Unité métrique de l'énergie exprimée en calorie
g	Unité métrique du poids exprimée en gramme
h	Heure
Hz	Unité de mesure de la fréquence exprimée en Hertz (SI)
kB	Unité de mesure de la longueur d'oligonucléotides en kilobase
l	Longueur du chemin optique exprimé en dm
L	Unité métrique du volume exprimée en litre (peut être précédée de m, μ, n, p)
m	Unité métrique de longueur exprimée en mètre (peut être précédée de m, μ, n, p) ou <i>milli-</i> (10 ⁻³)
M	Unité de la molarité exprimée en mol.L ⁻¹ (peut être précédée de m, μ, n, p)
n	<i>Nano-</i> (10 ⁻⁹) ou doublet non liant
mol	Unité de mesure de la quantité de matière exprimée en mole (SI)
p	<i>Pico-</i> (10 ⁻¹²)
s	Unité de mesure du temps exprimée en seconde (SI)
SI	Relatif aux unités de mesure du Système International
v/v	Volume à volume
w/v	De l'anglais <i>Weight for volume</i>
w/w	De l'anglais <i>Weight for weight</i>

δ	Déplacement chimique exprimé en ppm
λ	Longueur d'onde exprimée en nm
π^*	Orbitale « pi » antiliante
μ	<i>Micro-</i> (10^{-6})

INTRODUCTION GENERALE

En 1978, Zamecnik et Stephenson ont utilisé dans des thérapies antisens des séquences oligonucléotidiques inhibant spécifiquement la réplication d'un virus. Depuis, un très grand nombre de travaux ont fait état de l'intérêt des oligonucléotides en tant qu'agents thérapeutiques. Les modes d'actions envisageables sont très variés (thérapies antisens, antigène, interférence ARN, etc.). Malheureusement, les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des oligonucléotides naturels ne sont pas satisfaisantes pour de telles applications. Pour remédier à cette difficulté, de nombreuses modifications des oligonucléotides naturels ont été proposées.

Dans le cadre de cette thèse, un nouveau type d'oligonucléotides modifiés est présenté : les oligomères de nucléosides aminoxy acides. Dans ces composés, la liaison phosphodiester de l'ADN ou de l'ARN est remplacée par une liaison *N*-oxyamide -CONHO-. Cette liaison a été choisie en raison de sa résistance aux hydrolases et de sa capacité à former des liaisons hydrogène. Nous avons conçu deux séries d'oligomères de nucléosides aminoxy acides. Cette thèse a pour objectif de les synthétiser et d'étudier leurs structures et leurs propriétés biologiques. En parallèle de ces travaux, nous nous intéresserons aux propriétés d'un autre type d'oligonucléotides modifiés présentant également une liaison *N*-oxyamide : les acides nucléiques *N*-oxyamides (*N*-oxy PNA).

Le premier chapitre porte sur les oligonucléotides en tant qu'agents thérapeutiques. Après avoir présenté les modes d'actions possibles des oligonucléotides et la nécessité de modifier les oligonucléotides naturels, nous détaillerons les modifications des oligonucléotides décrites dans la littérature et les méthodes de vectorisation de ces oligonucléotides.

Un grand nombre de composés comporte une liaison oxygène-azote : hydroxylamine, acide hydroxamique, oxime, etc. Le deuxième chapitre s'attache à présenter les nucléosides, dinucléosides et oligonucléotides présentant une liaison N-O. Une attention particulière sera portée à la conjugaison d'oligonucléotides via une liaison oxime.

Le troisième chapitre détaille la synthèse des oligomères de nucléosides aminoxy acides à partir de l'uridine.

Le quatrième chapitre présente la synthèse des oligomères de nucléosides aminoxy acides à partir du D-(+)-glucose. Ce sera l'occasion de s'intéresser à la synthèse des oligomères de ribofuranoides aminoxy acides.

Le cinquième chapitre s'intéresse à l'analyse structurale des monomères et des dimères de *N*-oxy PNA ainsi que d'un dimère et d'un trimère de ribofuranoides aminoxy acides. Différentes techniques d'analyse structurale ont été utilisées : modélisation (mécanique moléculaire, théorie de la fonctionnelle densité), spectroscopie infrarouge en solution, RMN (2D, dilution, dosage). Ce travail est effectué en collaboration avec Christie Aroulanda de l'ICMMO (Université Paris Sud XI).

Le dernier chapitre présente un projet effectué en collaboration avec Philippe Fossé et Olivier Mauffret du Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée (LBPA) de l'ENS Cachan. Développer des techniques permettant de déterminer à haut débit et de manière fiable les structures secondaires d'ARN est un défi actuel. Dans ce but, nous avons développé et étudié des sondes chimiques ciblant les riboses des nucléotides non appariés d'un ARN.

CHAPITRE 1
LES OLIGONUCLEOTIDES EN TANT QU'AGENTS THERAPEUTIQUES

I. INTRODUCTION

Dès 1978, Zamecnik et Stephenson¹ ont réussi à utiliser dans des thérapies des séquences d'oligonucléotides inhibant spécifiquement la réplication d'un virus. Depuis, les oligonucléotides sont étudiés comme possibles agents thérapeutiques dans de nombreuses maladies (cancers, maladies vasculaires, maladies génétiques, infections virales...). Grâce à leurs propriétés uniques de reconnaissance base nucléique-base nucléique, ils peuvent cibler de manière très sélective l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou l'acide ribonucléique (ARN). Les modes d'action envisageables sont très variés. Ce chapitre va mettre en avant les raisons de l'engouement pour les oligonucléotides thérapeutiques mais aussi les difficultés rencontrées dans leur utilisation. Après avoir présenté la structure et les fonctions des acides nucléiques, nous nous intéresserons aux différents modes d'action possibles des oligonucléotides thérapeutiques. Nous en déduirons la nécessité de modifier les oligonucléotides naturels et nous terminerons par la présentation des différentes méthodes de vectorisation de ces oligonucléotides thérapeutiques.

II. STRUCTURES ET FONCTIONS DES OLIGONUCLEOTIDES

II.1. Les acides ribonucléiques

L'une des découvertes les plus passionnantes de la science concerne la nature et le fonctionnement du code génétique.² Toute l'information héréditaire est stockée dans les acides désoxyribonucléiques (ou ADN). Quant aux acides ribonucléiques (ou ARN), ils jouent des rôles très divers : transfert de l'information (ARN messenger), traduction de l'ARN messenger en peptide (ARN de transfert), etc.

II.1.a. Nucléosides et nucléotides

Les nucléosides sont des molécules constituées d'un sucre associé par une liaison β -N-glycosidique à une base purique ou pyrimidique (Figure 1). Cette liaison se fait entre le carbone C_{1'} du pentose et l'azote N₁ de la base pyrimidique ou N₉ de la base purique. La base nucléique est ainsi en position cis par rapport au groupement en position 5'. Un nucléotide est un nucléoside portant un ou plusieurs groupements phosphate sur une ou plusieurs fonctions hydroxyle du sucre (souvent l'hydroxyle en position 3' ou 5').

¹ M. L. Stephenson, P. C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, 75, 285-288.

² K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, *Organic Chemistry. Structure and function*, 4th edition, publié initialement aux Etats-Unis par W. H. Freeman and Coll., New York et Basingstoke, **2003**, 1203 p.

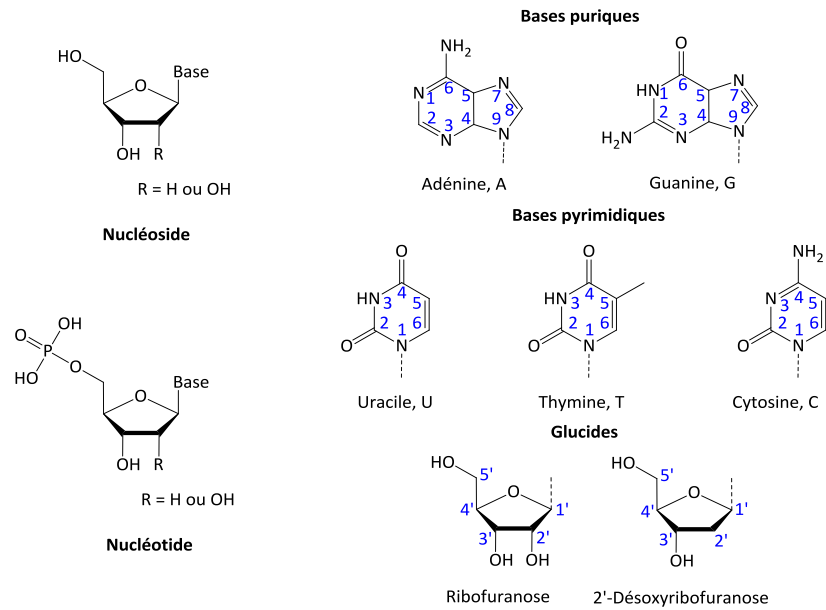


Figure 1 : A gauche : Structure des nucléosides et exemple de nucléotide. A droite : Structure du ribose et des bases nucléiques. Les numérotations usuellement employées pour le ribose et les bases nucléiques sont indiquées en bleu.

II.1.b. Oligonucléotides

Les acides nucléiques sont constitués d'un enchaînement (parfois extrêmement long) de nucléotides reliés entre eux par des liaisons phosphodiesteres. Deux nucléotides successifs sont ainsi liés par un groupement phosphoryle estérifiant l'hydroxyle en position 3' de l'un des nucléotides et l'hydroxyle en position 5' de l'autre des nucléotides (Figure 2). On appelle oligonucléotides des segments d'acides nucléiques (ARN ou ADN) longs de quelques dizaines de nucléotides.

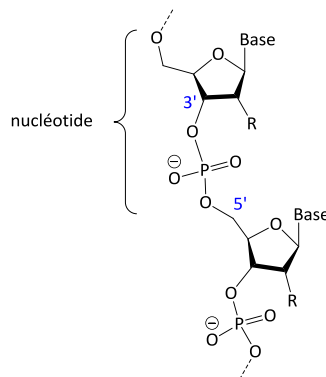


Figure 2 : Structure des oligonucléotides avec R = H ou OH.

Dans le cas de l'ADN, la partie sucre est le 2'-désoxyribose et la base nucléique azotée est la cytosine (C), la thymine (T), l'adénine (A) ou la guanine (G). Dans le cas de l'ARN, la partie sucre est le ribose et la thymine est remplacée par l'uracile (U). La partie sucre est le 2'-désoxyribofuranose pour l'ADN et le ribofuranose pour l'ARN (Figure 1). La structure d'un brin d'ADN ACGT et celle d'un brin d'ARN ACGU sont données sur la Figure 3.

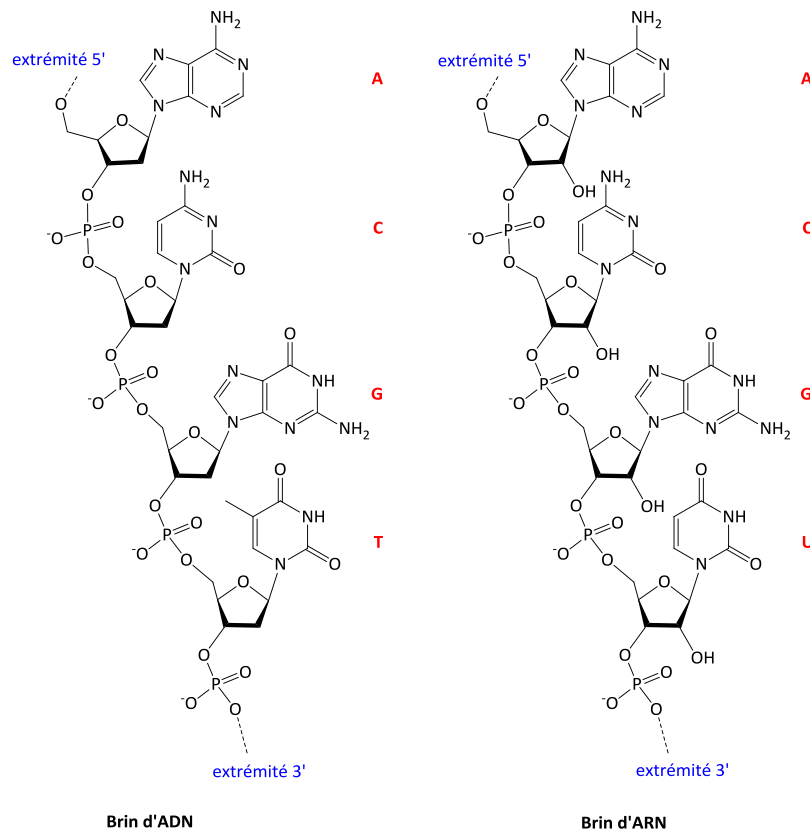


Figure 3 : Structure d'un brin d'ADN ACGT (à gauche) et d'un brin d'ARN ACGU (à droite).

II.2. Structure de l'ADN et de l'ARN

II.2.a. Interactions mises en jeu

Dans les acides nucléiques, la présence d'atomes porteurs de doublets non liants (N, O) et d'atomes d'hydrogène liés à des atomes électronégatifs (N, O), permet la formation de nombreuses liaisons hydrogène.

II.2.a.i. Appariement de type Watson-Crick

Deux chaînes d'ADN sont maintenues entre elles par des liaisons hydrogène entre les bases nucléiques complémentaires. Une base adénine portée par un brin d'ADN forme deux liaisons hydrogène avec une thymine portée par le brin complémentaire (énergie d'interaction totale de 3,5 kcal/mol). Une cytosine d'un brin réalisera quant à elle trois liaisons hydrogène avec une guanine située sur le brin d'en face (énergie d'interaction totale de 5,5 kcal/mol). La distance entre les atomes impliqués dans ces liaisons hydrogène est de l'ordre de 2,8 Å. Cet appariement porte le nom d'appariement de Watson-Crick (Figure 4). En raison de leurs trop grandes tailles, deux bases purines ne peuvent se faire face sans introduire de distorsion importante. De même, deux bases pyrimidines sont trop petites pour se faire face. De plus, deux purines ou deux pyrimidines ne sont pas complémentaires.

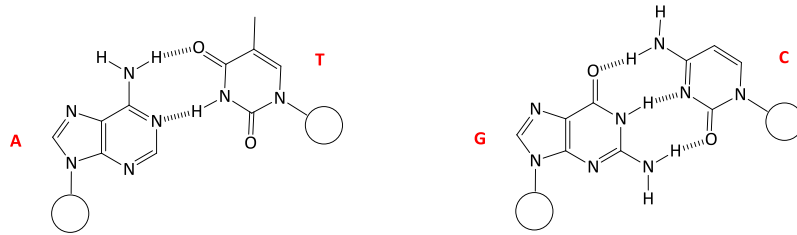


Figure 4 : Appariement des bases par liaisons hydrogène selon Watson-Crick.

Cet appariement de Watson-Crick a des conséquences sur la composition en bases nucléiques de l'ADN. En effet, l'ADN de n'importe quelle cellule de tout organisme doit avoir un rapport de 1 pour 1 entre la quantité de bases puriques et celle de bases pyrimidiques. De plus, une molécule d'ADN double brin comporte l'égalité suivante entre les pourcentages de paires de base nucléique : %A = %T et %G = %C. La validation rigoureuse de cette règle constitue la base de l'hypothèse des paires Watson-Crick dans la double hélice d'ADN. Ces caractéristiques ont été découvertes par le chimiste autrichien Erwin Chargaff en 1940 et sont désignées sous le nom de règles de Chargaff. On notera que les proportions des bases nucléiques A + T et C + G ne sont pas égales et varient de 35 à 75% selon l'ADN étudié.

II.2.a.ii. Appariement de Hoogsteen

Une fois que les bases nucléiques sont appariées selon le mode Watson-Crick, il reste des atomes (H, N, O) disponibles pour des liaisons hydrogène notamment du côté du grand sillon des purines (position N₇ des purines, O₆ des guanines et N₆ des adénines). Ces derniers peuvent alors être impliqués dans un autre type d'appariement qui est l'appariement de Hoogsteen. Il s'agit d'un type d'appariement par liaison hydrogène impliquant pour l'une des bases la face Watson-Crick et pour l'autre la face Hoogsteen qui est située sur le grand sillon de la purine reconnue (Figure 5). Selon l'orientation relative des deux brins appariés par interaction de Hoogsteen, la paire Hoogsteen sera dite parallèle (directe) ou antiparallèle (inverse).³

³ M. Faria, C. Giovannangelo, *J. Gene Med.* **2001**, 3, 299-310.

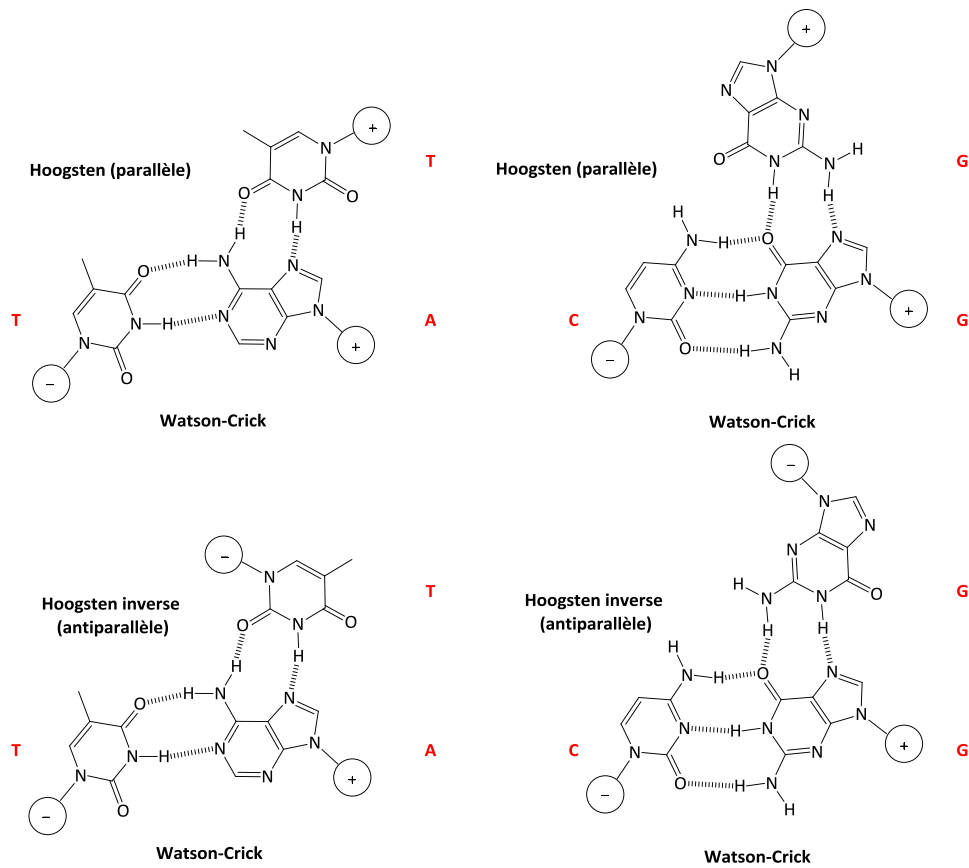


Figure 5 : Représentation des triplets de nucléotides T*A.T et C*G.G (« * » désigne l'appariement de Watson-Crick et « . » celui de Hoogsteen). La position du C_{1'} du ribose est indiquée par une croix « + » ou un tiret « - » (orientation parallèle et antiparallèle).

II.2.a.iii. π -stacking

En plus de ces appariements médiés par des liaisons hydrogène, il existe pour les acides nucléiques des interactions de π -stacking responsables de l'empilement des bases nucléiques les unes sur les autres (Figure 6).

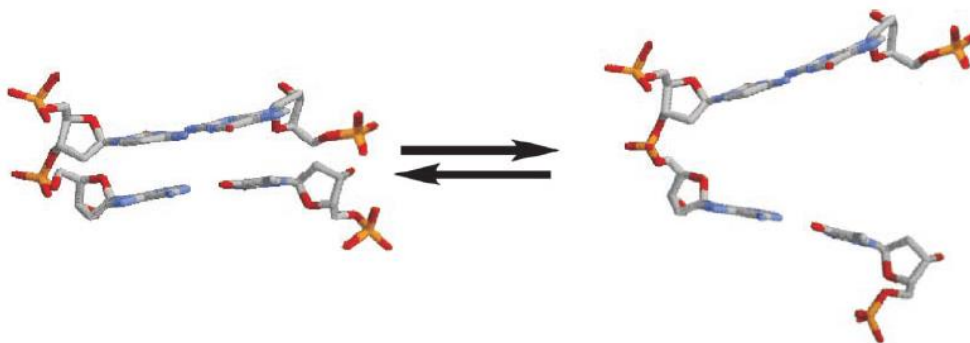


Figure 6 : Equilibre d'empilement dû aux interactions de π -stacking dans un dinucléotide d'ADN associé par interactions de Watson-Crick.⁴

Le π -stacking fait référence à une interaction entre cycles aromatiques et apparaît très nettement en regardant la structure spatiale de différents acides nucléiques. Plusieurs interactions⁵ non covalentes sont responsables de ce π -stacking :

⁴ P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 564-574.

- les forces de Van der Waals de type dipôle-dipôle induit et dipôle induit-dipôle induit. Ces interactions de Van der Waals sont importantes pour les bases nucléiques (en comparaison par exemple des acides aminés) en raison de leur grande polarisabilité et de leur surface plane permettant une proximité spatiale sur une vaste région.
- les forces de Van der Waals de type dipôle-dipôle. Selon les composés, ces effets seront stabilisants ou non. Les bases nucléiques ont une distribution du potentiel électrostatique dipolaire (Figure 7) si bien qu'ils cherchent à s'orienter pour minimiser leur énergie d'interaction.

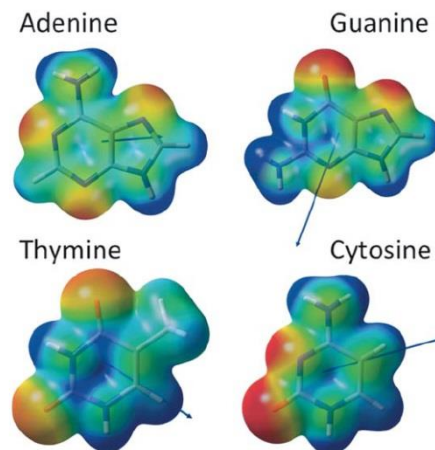


Figure 7 : Surface de potentiel électrostatique (ESP) et moment dipolaire en bleu. La couleur rouge indique les valeurs d'ESP faibles (négatives) et bleu élevées.⁶

- les effets de solvation. L'interaction de π -stacking sera d'autant plus favorable que le composé préfère être entouré de la surface π de son partenaire ou du solvant (comme l'eau).

II.2.b. Structure en double hélice

En 1953, James Watson et Francis Crick formulèrent l'idée que l'ADN présente une structure en double hélice, composée de deux brins dont la séquence de bases nucléiques est complémentaire. La description de la structure en double hélice de l'ADN leur valut le prix Nobel de Médecine en 1962.

II.2.b.i. Description de la double hélice d'ADN

Les deux brins d'ADN sont enroulés en double hélice^{7,8,9} (type B) de manière antiparallèle autour d'un axe imaginaire. Les deux chaînes évoluent dans des directions opposées (l'une en 5'→3' et l'autre en 3'→5') et toutes les bases nucléiques se trouvent du côté intérieur de la double hélice tandis que les deux squelettes pentose/phosphate sont localisés sur les bords extérieurs de l'hélice. Les plans des bases nucléiques sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice et chacune des bases nucléiques d'une chaîne est appariée à celle de l'autre chaîne par des liaisons hydrogène, les deux bases nucléiques étant situées dans un même plan (Figure 8).

⁵ E. T. Kool, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 1-22.

⁶ J. Sponer, J. E. Sponer, A. Mládek, P. Jurečka, P. Banáš, M. Otyepka, *Biopolymers* **2013**, *99*, 978-988.

⁷ J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.

⁸ J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964-967.

⁹ F. H. C. Crick, J. D. Watson, *Proc. R. Soc. London, A* **1954**, *223*, 80-96.

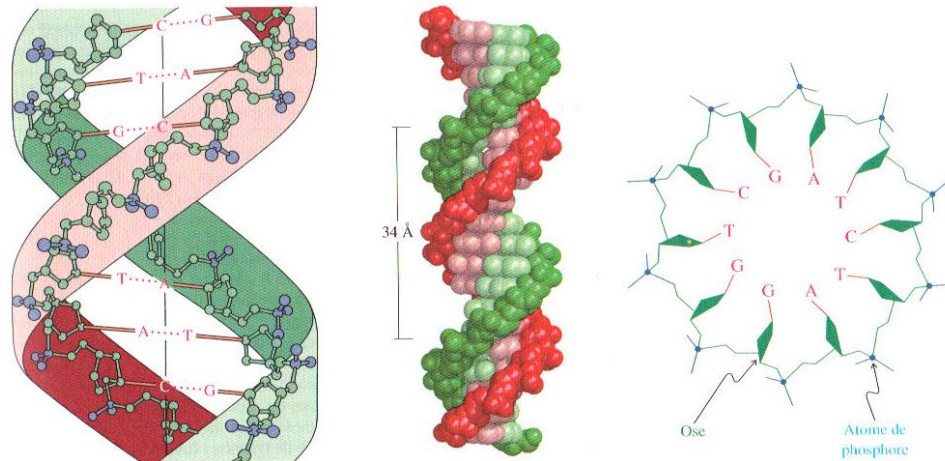


Figure 8 : Structure en double hélice de l'ADN (à gauche). Modèle compact d'une double hélice d'ADN (au milieu). Un des brins d'une double hélice d'ADN, vu selon l'axe de l'hélice (à droite).²

Les brins d'ADN n'étant pas positionnés de façon symétrique par rapport à l'axe de la double hélice, les sillons qui courent le long de la colonne cylindrique formée par la double hélice ne sont pas de même taille : on peut distinguer un grand sillon et un petit sillon (Figure 9).

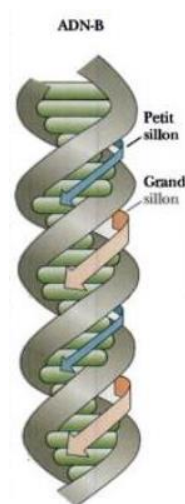


Figure 9 : Grand et petit sillons de la molécule d'ADN.¹⁰

Plusieurs structures d'ADN ont été mises en évidence et diffèrent, entre autres, par le sens d'enroulement, le pas de l'hélice ou le nombre de résidus par tour (Figure 10). Par exemple, l'ADN A et B diffèrent par la conformation du ribose, l'inclinaison des bases par rapport à l'axe de l'hélice, la position des paires de bases par rapport à l'axe central de la double hélice, la taille des sillons, etc.

¹⁰ R. H. Garrett, C. M. Grisham, *Biochimie*, De Boeck Supérieur, **2000**, 1292 p.

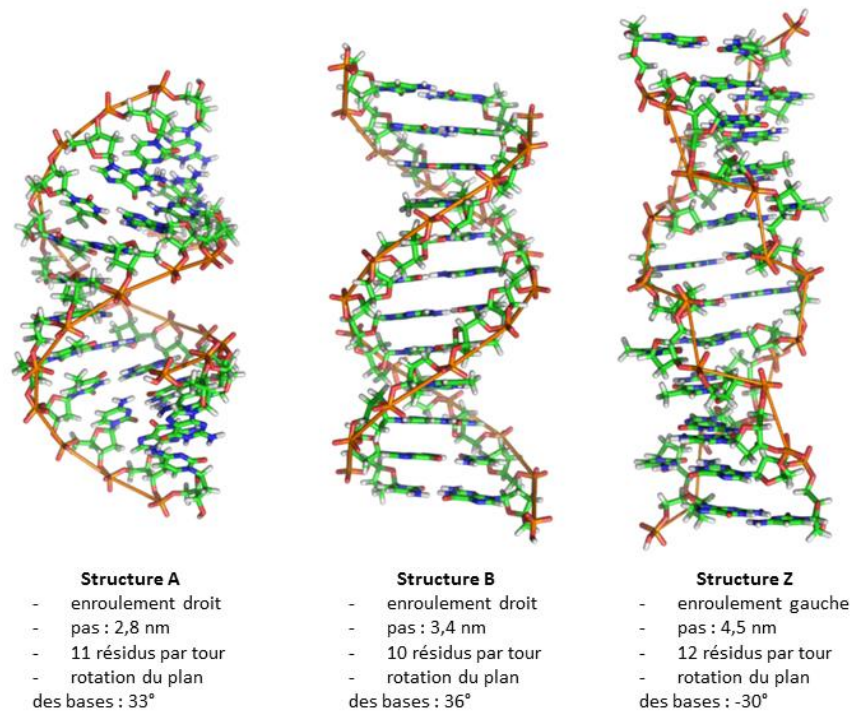


Figure 10 : Représentations et caractéristiques des structures A, B et Z de la molécule d'ADN.¹¹

II.2.b. ii. Stabilité de la double hélice d'ADN

La stabilité de cette double hélice d'ADN est due à différents facteurs :

- les liaisons hydrogène internes et externes. Les liaisons hydrogène internes correspondent aux interactions entre bases complémentaires (appariement de Watson-Crick). Les liaisons hydrogène externes sont dues aux groupes phosphate qui forment, vers l'extérieur, des liaisons hydrogène avec les molécules d'eau environnantes. On peut aussi noter qu'il a été observé que les atomes des bases nucléiques forment des liaisons hydrogène avec des molécules d'eau.
- les charges négatives des groupements phosphates. Elles sont situées au niveau de la surface externe de l'hélice, ce qui minimise les interactions électrostatiques et permet des interactions avec les cations du milieu physiologique (Mg^{2+} par exemple).
- les interactions de π -stacking. Dans la majorité des structures d'ADN, les bases nucléiques empilées face à face grâce à des interactions de π stacking. La distance entre les plans des bases nucléiques est généralement autour de 3,4 Å dans l'ADN B, ce qui détermine, connaissant le nombre de paires de bases par tour, le pas de l'hélice.

¹¹ Wikipédia, DNA. Disponible sur <http://en.wikipedia.org/wiki/DNA> (Page consultée le 03/04/2015).

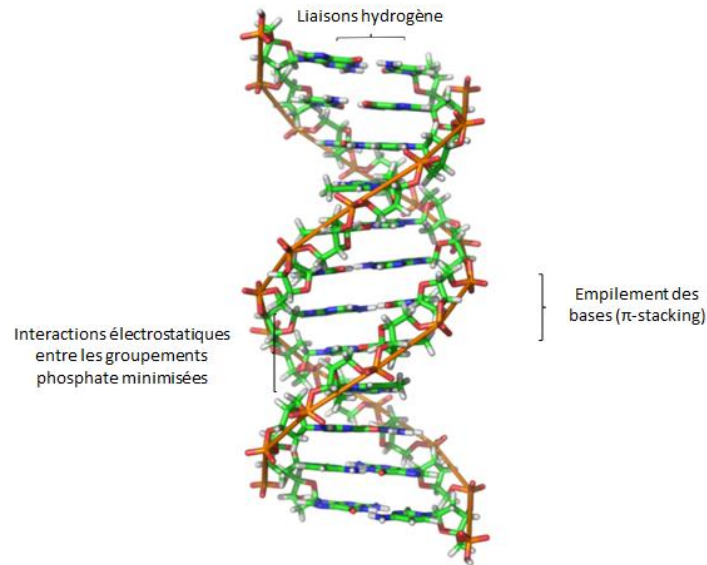


Figure 11 : Structure B de l'ADN stabilisée par différents facteurs.¹¹

On notera que ces brins d'ADN peuvent être séparés par chauffage.¹²

II.2.b. iii. Structure de l'ARN

Les brins d'ARN sont, d'une manière générale, nettement plus courts que les brins d'ADN (de quelques dizaines à quelques milliers de nucléotides pour le premier et de quelques milliers à quelques milliards pour le second). La taille des différents ARN est en fait très variable selon le type d'ARN impliqué (de 20 bases nucléiques à plusieurs milliers de bases nucléiques).

Lors de leur découverte en 1953, Watson et Crick ont supposé que cette structure en double hélice ne s'appliquait pas à l'ARN. L'ARN double brin est en effet assez rarement rencontré en tant que matériel génétique viral. Cependant, en 1956, Rich et Davies ont publié un article¹³ stipulant que le simple brin d'ARN peut s'hybrider et former une double hélice grâce à l'appariement entre bases nucléiques complémentaires (adénine et uracile d'une part, cytosine et guanine d'autre part). La différence avec l'ADN vient du fait que ces interactions se forment entre deux bases nucléiques d'une même chaîne et que ces liaisons sont moins régulières. Il en résulte une topologie particulière¹⁴ composée de régions en hélices (tiges) parfois hélicoïdales et de régions non appariées (boucles) (Figure 12). On notera par ailleurs que ces structures sont fortement dépendantes de l'interaction de l'ARN avec des protéines. La double hélice d'ARN se distingue aussi de la double hélice d'ADN par le fait qu'elle est de type A alors que la seconde est de type B.

¹² J. Marmur, P. Doty, *J. Mol. Biol.* **1962**, 5, 109-118.

¹³ A. Rich, D. R. Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 3548-3549.

¹⁴ P. Doty, H. Boedtker, J. R. Fresco, R. Haselkorn, M. Litt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1959**, 45, 482-499.

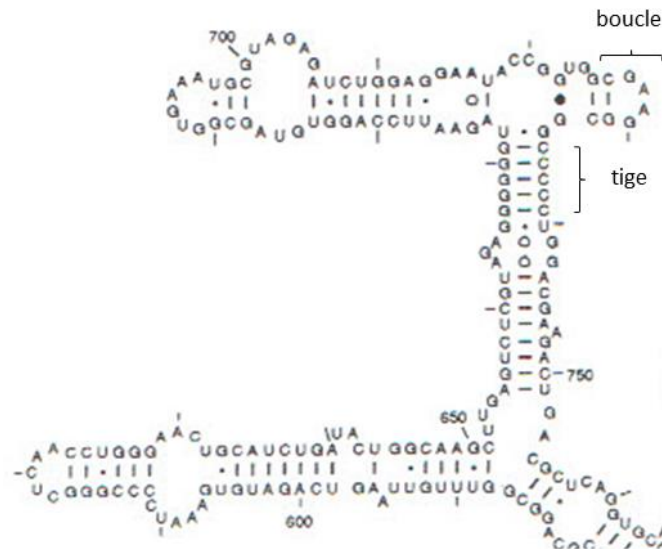


Figure 12: Structure secondaire partielle de l'ARN ribosomique (ARN,) 16S d'*E. coli*.¹⁵

II.2.c. Structure en triple hélice

Les acides nucléiques peuvent également former des ensembles plus complexes tels que des triples hélices et des tétrades.

Peu après la découverte de la double hélice de l'ADN, une triple hélice a été décrite. En effet, en 1957, l'équipe de Felsenfeld¹⁶ a mis en évidence la possibilité pour un brin poly(dA) de s'hybrider *in vitro* avec un duplex poly(dA)-poly(U) en présence d'ions Mg^{2+} . Il faut cependant attendre 1987 pour que deux équipes^{17,18} s'y intéressent à nouveau et démontrent la possibilité de former des triples hélices avec de courts oligonucléotides.

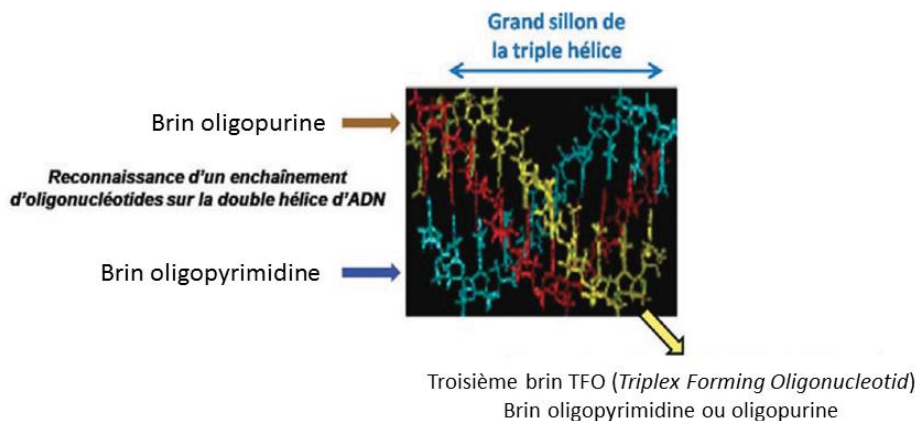


Figure 13 : Formation de triples hélices.¹⁹

Cette triple hélice comporte deux brins appariés par interaction de Watson-Crick et deux brins appariés par interaction de Hoogsteen (Figure 13). Cela est possible avec un brin homopurique

¹⁵ J. H. Weil, *Biochimie générale*, Dunod, **2001**, 657 p.

¹⁶ G. Felsenfeld, D. R. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2013-2014.

¹⁷ H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645-650.

¹⁸ T. Le Doan, L. Perrouault, D. Praseuth, N. Habhouj, J. L. Decout, N. T. Thuong, J. Lhomme, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 7749-7760.

¹⁹ C. Giovannangeli, « Cibler l'ADN : pour la compréhension du vivant » dans M. T. Dinh-Audouin, R. A. Jacquesy, D. Olivier, P. Rigny, *La chimie et la santé*, EDP Sciences **2010**, 41-48.

et deux brins homopyrimidiques ou bien deux brins homopuriques et un brin homopyrimidique. Ceci provient du fait que c'est toujours la purine A ou G qui, dans la paire Watson-Crick, est reconnue par un troisième brin qui peut être de nature homopurique ou homopyrimidique.

La formation de triple hélice a suscité de nombreuses recherches,^{20,21,22,23} que ce soit pour le contrôle de l'expression des gènes, le développement de nucléases artificielles spécifiques ou pour le diagnostic. Ce point sera approfondi dans le paragraphe portant sur l'utilisation des oligonucléotides en tant qu'agents thérapeutiques.

II.2.d. G-quadruplexes

Pour des acides nucléiques riches en guanines, des structures particulières contenant de un à quatre brins peuvent se former. Ces structures sont nommées quadruplexes ou tétrades de guanines et sont formées par des plateaux appelés quartets et composés de quatre résidus de guanine se trouvant dans le même plan et liés par des appariements Hoogsteen (Figure 14).

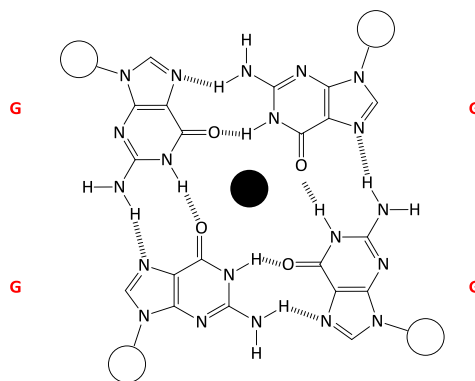


Figure 14 : Arrangement des guanines dans le quartet avec le cation métallique central en noir.

La présence d'ions alcalins Na^+ ou K^+ complexés dans le « tunnel » du quadruplex est indispensable à leur formation (Figure 15).

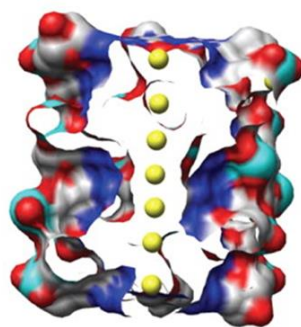


Figure 15 : Représentation de la surface d'un quadruplex comportant 8 quartets avec le tunnel central abritant des ions métalliques (en jaune).²⁴

Plusieurs quadruplexes de diverses molécularités ont été mis en évidence (Figure 16).

²⁰ J. S. Sun, C. Hélène, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, 3, 345-356.

²¹ M. D. Frank-Kamenetskii, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 65-95.

²² J. S. Sun, T. Garestier, C. Hélène, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, 6, 327-333.

²³ M. Duca, P. Vekhoff, K. Oussedik, L. Halby, P. B. Arimondo, *Nucleic Acid Res.* **2008**, 36, 5123-5138.

²⁴ S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 5402-5415.

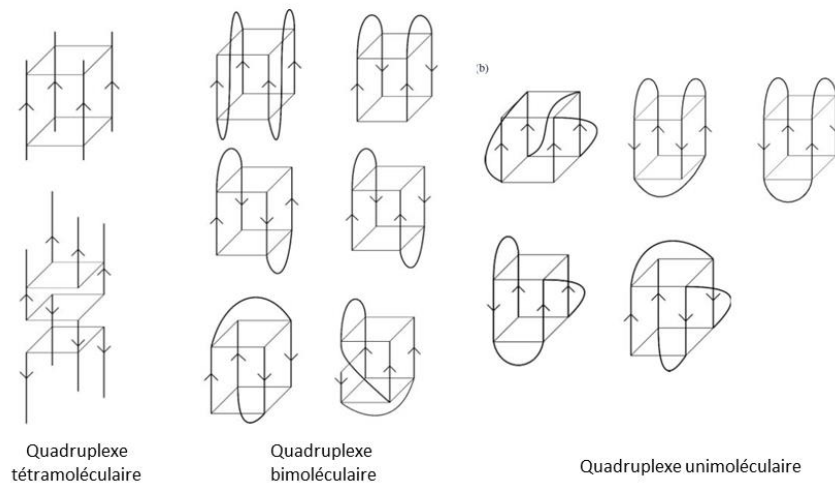


Figure 16 : Topologies de différents quadruplexes de différentes moléularités.²⁴

Ces structures ont été caractérisées pour la première fois en 1962 par diffraction de rayon X.²⁵ Les études montrent qu'elles sont d'une importance biologique capitale. Ainsi, chez l'Homme et chez d'autres vertébrés, le télomère, constitué par la répétition de la séquence d(GGTTAG), forme des quadruplexes.²⁶ La formation de ces quadruplexes au niveau des télomères diminue l'activité de l'enzyme télomérase, qui est responsable du maintien de la longueur des télomères et qui est impliquée dans de nombreux cancers. Des séquences formant des quadruplexes seraient également présentes dans les promoteurs de nombreux gènes et joueraient un rôle essentiel dans leur expression.²⁷

II.3. Fonctions de l'ADN et de l'ARN

Watson et Crick ont émis l'idée que l'ADN (et en particulier l'enchaînement des bases nucléiques) contient toute l'information nécessaire au développement et au fonctionnement d'un organisme.

II.3.a. Réplication de l'ADN

L'ADN est le dépositaire du patrimoine génétique. La duplication cellulaire impose la duplication de l'ADN (appelé réplication) avec une fidélité absolue afin de maintenir le génotype.

La complémentarité de la structure en double hélice de l'ADN a amené Watson et Crick à réfléchir à la manière selon laquelle l'ADN pouvait se dupliquer. Les expériences de Meselson et Stahl²⁸ sur *Escherichia coli* ont montré que la réplication de l'ADN se fait selon un mode semi-conservatif, c'est-à-dire que lors de la réplication de la double hélice, chacune des deux nouvelles hélices est constituée d'un brin néoformé et d'un brin issu de la double hélice d'origine (Figure 17).

²⁵ M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1962**, *48*, 2013-2018.

²⁶ J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2909-2916.

²⁷ G. H. Nguyen, W. Tang, A. I. Robles, R. P. Beyer, L. T. Gray, J. A. Welsh, A. J. Schetter, K. Kumamoto, X. Wei Wang, I. D. Hickson, N. Maizels, R. J. Monnat, C. C. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2014**, *111*, 9905-9910.

²⁸ M. Meselson, F. W. Stahl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44*, 671-682.

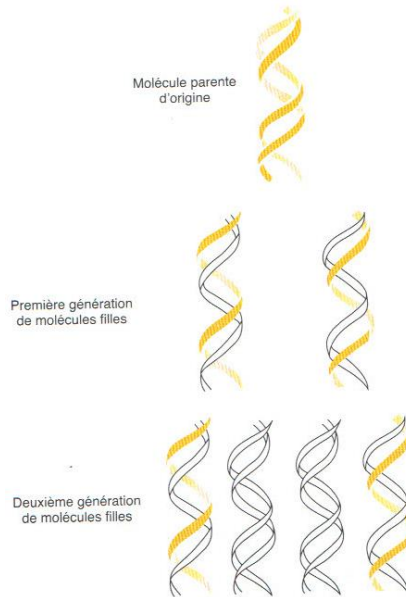


Figure 17 : Réplication semi-conservative de l'ADN.²⁹

Lors de la réplication, la double hélice se défait partiellement. Chaque brin sert ensuite de modèle à la formation d'un nouveau brin : les enzymes (ADN-polymérase) construisent le brin en assemblant les nucléotides selon une séquence complémentaire à celle de la matrice (Figure 18). Le brin direct (ou précoce), complémentaire au brin parental orienté de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' est créé de façon continue, dans le sens 5' vers 3'. Le brin indirect (ou retardé ou tardif), complémentaire au brin parental orienté de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' est créé, de façon discontinue, sous forme de fragments d'Okazaki, dans le sens 5' vers 3'.

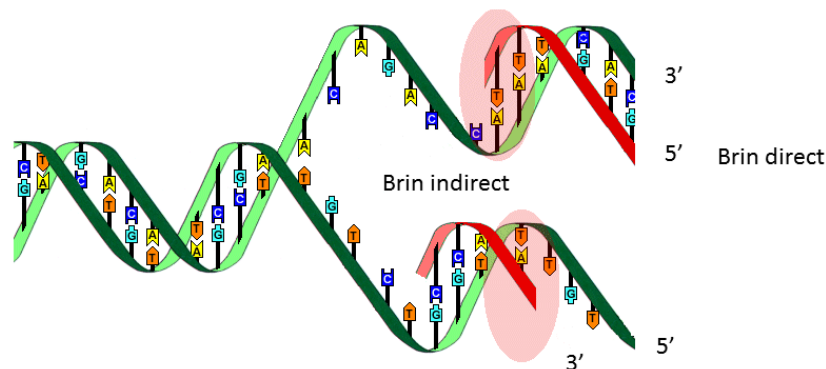


Figure 18 : Mécanisme simplifié de la réplication de l'ADN.³⁰

II.3.b. Synthèse de protéines

Un des mécanismes biologiques les plus importants est la synthèse des protéines, guidée par l'information contenue dans l'ADN.

²⁹ R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, A. Weil, *Harper's illustrated biochemistry*, 28th ed., McGraw-Hill Medical, 2009, 693 p.

³⁰ C. Lièvre, La réplication de la molécule d'ADN. Disponible sur http://www.ac-rennes.fr/pedagogie/svt/cartelec/cartelec_lyc/premiere_s/vegetal/adn/adn.htm (Page consultée le 07/05/2015).

L'ADN des chromosomes est situé dans le noyau de la cellule. Or la fabrication des protéines a lieu dans le cytoplasme. Il doit donc exister un intermédiaire, support de l'information génétique contenue dans l'ADN, capable de passer du noyau au cytoplasme pour commander la synthèse d'une protéine. Dès le début des années 1960, J. Monod et F. Jacob³¹ ont émis l'idée qu'un ARN messenger (ARN_m) jouait ce rôle. La synthèse des protéines peut être schématiquement décomposée en trois étapes principales (Figure 19) :

- la transcription dans le noyau des gènes de l'ADN en ARN pré-messenger par une ARN polymérase ;
- la maturation dans le noyau de l'ARN pré-messenger. Lors de cette maturation, il se produit, outre des modifications chimiques de l'ARN pré-messenger évitant sa dégradation, une excision des introns (les parties du gène qui ne codent pas un peptide) de l'ARN pré-messenger et un épissage des exons (les parties codantes) de l'ARN pré-messenger. L'ARN pré-messenger ainsi mature devient l'ARN messenger (ARN_m) qui est ensuite exporté vers le cytoplasme via les pores nucléaires ;
- la traduction dans le cytoplasme au niveau des ribosomes de l'ARN_m en protéines. Cela nécessite la présence d'un ARN de transfert (ARN_t) chargés avec les acides aminés correspondants et de l'énergie sous forme de guanosine triphosphate GTP.

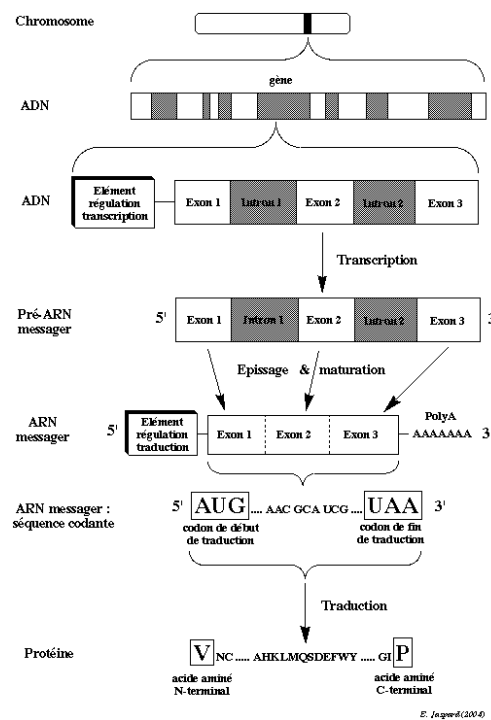


Figure 19 : Mécanisme de la synthèse protéique.³²

II.3.c. Différentes classes d'ARN

Chez les eucaryotes et les procaryotes, il existe plusieurs classes principales de molécules d'ARN : les ARN messagers (ARN_m), les ARN de transfert (ARN_t), les ARN ribosomiques (ARN_r), les ARN

³¹ S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson, *Nature* **1961**, *190*, 576-581.

³² E. Jaspard, La synthèse des protéines. Disponible sur <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/1SyntheseProteines/1SyntheseProt.htm> (Page consultée le 01/05/2015).

régulateurs, les ribozymes, les ARN guides, etc. Ils diffèrent les uns des autres par leur abondance, leur taille et leur stabilité générale.

3 de ces classes d'ARN jouent un rôle fondamental lors de la synthèse des protéines :

- l'ARN messager (ARN_m), c'est-à-dire le « transcripteur d'ARN » ;
- l'ARN de transfert (ARN_t), c'est-à-dire l'« adaptateur » entre l'ARN_m et les acides aminés ;
- le ribosome jouant le rôle de catalyseur permettant la formation des liaisons peptiques et qui consiste en un assemblage de protéines et d'ARN ribosomal.

De plus, les cellules eucaryotes contiennent un grand nombre (entre 100.000 et 1.000.000 copies par cellule) d'espèces de molécules d'ARN distinctes dont la taille varie entre 20 et plusieurs milliers de nucléotides. Il en existe différents types :

- les petits ARN nucléaires (snRNA pour *small nuclear RNA*), impliqués dans la maturation des ARN_r et dans la régulation de l'expression des gènes (excision des introns, maturation post-transcriptionnelle des précurseurs des ARN_m, etc.).
- les micro-ARN (miRNA pour *micro-RNA*) et les petits ARN interférents (siRNA pour *small interfering RNA*). Presque tous les miRNA et les siRNA connus causent l'inhibition de l'expression d'un gène mais avec des mécanismes distincts.
- Les ARN non codants (ncRNA pour *non-coding RNA*). 90% de tout l'ADN génomique eucaryote est transcrit et les ncRNA constituent une part significative de cette transcription. Ces derniers jouent des rôles structuraux, des rôles de régulation de la transcription des gènes, etc.

De longs ARN non codants (lnc RNA pour *long non-coding RNA*) comportant plus de 200 nucléotides ont aussi été mis en évidence. Ils ont un rôle clef dans de nombreuses fonctions biologiques (fonction neuronale, développement, etc.).

III. LES OLIGONUCLEOTIDES EN TANT QU'AGENTS THERAPEUTIQUES

L'ADN et l'ARN sont des éléments centraux du fonctionnement d'une cellule. Cela a conduit rapidement à l'idée que pour lutter contre certaines maladies, le ciblage de l'ADN ou de l'ARN était une option intéressante. Les oligonucléotides constituent les objets parfaits pour cet objectif en raison de leur propriété unique de reconnaissance base nucléique-base nucléique.

III.1. Intérêts des oligonucléotides comme agents thérapeutiques

III.1.a. Enjeux dans la recherche de médicaments

Le médicament idéal est celui qui cible le plus efficacement possible la maladie tout en minimisant les effets secondaires indésirables. La cible de la majorité des médicaments est une protéine (enzyme, récepteur membranaire ou nucléaire, pompes et canaux ioniques...) jouant un rôle clef dans la maladie. Par exemple, l'azidothymidine (AZT ou zidovudine) qui est un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse du Virus de l'Immunodéficience Humaine.

Cependant, malgré de nombreuses recherches^{33,34} pour trouver des molécules se liant spécifiquement avec leur cible, beaucoup de médicaments se lient également à d'autres cibles,³⁵ générant ainsi des effets secondaires indésirables. De plus, l'identification des médicaments potentiels prend beaucoup de temps et est souvent voué à l'échec. Or, nous savons que les oligonucléotides peuvent s'hybrider sélectivement à d'autres acides nucléiques de séquence complémentaire. Ainsi, on pourrait augmenter la sélectivité des médicaments en ciblant non plus les protéines elles-mêmes mais les acides nucléiques (ADN ou ARN) responsables de leurs formations par des oligonucléotides dont la séquence a été judicieusement choisie.

III.1.b. Les oligonucléotides thérapeutiques

Dès 1977,³⁶ Paterson *et al* ont montré la possibilité de moduler l'expression des gènes grâce à des acides nucléiques. Un an plus tard, Zamecnik et Stephenson^{1,37} ont identifié une séquence répétitive de 21 nucléotides cruciale dans le fonctionnement du virus du Sarcome de Rous. Un oligodésoxynucléotide de 13 unités de séquence d(AATGGTAAAATGG) complémentaire à la séquence clef du virus a été synthétisé puis introduit dans une culture cellulaire infectée par le virus. Cela a provoqué une inhibition *in vitro* de la réplication du virus. Ils en ont conclu que l'hybridation de l'oligonucléotide à la séquence clef de l'ARN du virus bloque sa prolifération et qualifièrent cet oligonucléotide d'« hybridon ». Dans ce remarquable travail, ils ont montré que le même oligonucléotide était beaucoup moins efficace sur d'autres virus et que d'autres oligonucléotides de même taille n'avaient pas la même spécificité. Malgré d'autres travaux effectués simultanément,^{38,39} il y a eu, pour diverses raisons que nous aborderons ultérieurement, peu d'avancés dans ce domaine dans les années 1980.

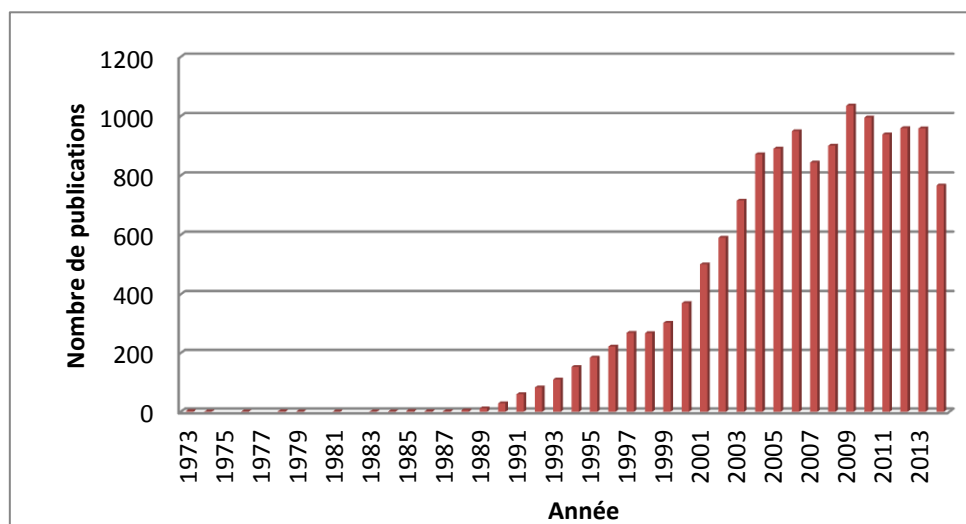


Figure 20 : Nombre de publications depuis 1973 portant sur les oligonucléotides thérapeutiques (recherche Web of Science portant sur les mots clefs « therapeutic* oligonucleotid* » en « topic »).

³³ H. Ye, Q. Liu, J. Wei, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87864.

³⁴ J. Skolnick, M. Gao, A. Roy, B. Srinivasan, H. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1163-1170.

³⁵ A. Gaulton, L. J. Bellis, A. P. Bento, J. Chambers, M. Davies, A. Hersey, Y. Light, S. McGlinchey, D. Michalovich, B. Al-Lazikani, J. P. Overington, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1100-1107.

³⁶ B. M. Paterson, B. E. Roberts, E. L. Kuff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 4370-4374.

³⁷ P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 280-284.

³⁸ R. W. Tennant, J. G. Farrelly, J. Ihle, B. C. Pal, F. T. Kenney, A. Brown, *J. Virol.* **1973**, *12*, 1216-1225.

³⁹ P. S. Miller, L. T. Braiterman, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry* **1977**, *16*, 1988-1996.

Il faut attendre les années 1990 pour que, grâce aux progrès en biologie moléculaire (séquençage des génomes, amplification par PCR (*polymerase chain reaction*)) et dans la synthèse d'oligonucléotides, se développe l'utilisation des oligonucléotides comme agents thérapeutiques (Figure 20). Cela aboutit en 1998 à l'approbation par la FDA (*Food and Drug Administration*) du Fomivirsén⁴⁰ (nom commercial VitraveneTM) qui est un oligodésoxynucléotide constitué de 21 motifs liés par liaison phosphorothioate (Figure 21), utilisé pour le traitement de rétinite à cytomégalo virus.

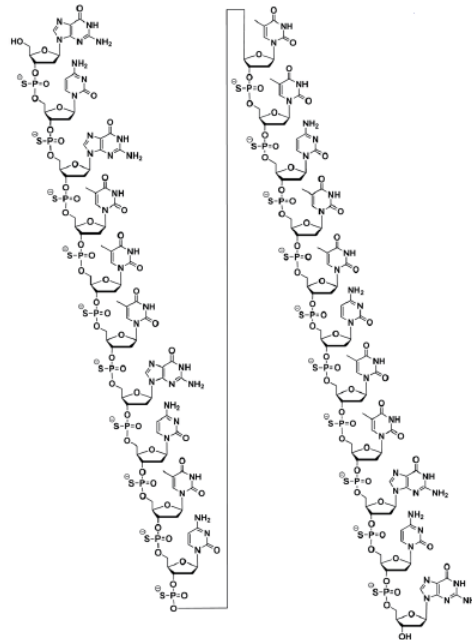


Figure 21 : Structure du VitraveneTM.⁴²

Suite aux nombreuses recherches sur les oligonucléotides thérapeutiques, d'autres composés ont été approuvés par la FDA :

- Le MacugenTM (pegaptanib sodium) approuvé par la FDA en 2004 et indiqué dans le traitement de la forme néovasculaire (humide) de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).
- Le KynamroTM (mipomersen sodium) approuvé par la FDA en 2013 et indiqué dans le traitement de l'hypercholestérolémie familiale homozygote.

III.1.c. Modes d'actions des oligonucléotides thérapeutiques

La thérapie génique est l'introduction délibérée de matériel génétique dans les cellules somatiques dans le but de corriger un défaut génétique ou de pallier le manque d'une protéine en apportant le gène responsable de sa synthèse.⁴¹ Cela passe par l'introduction de longs fragments d'ADN codants, posant ainsi des problèmes de synthèse et de vectorisation. Ce point ne sera pas abordé ici et notre étude se limitera aux oligonucléotides thérapeutiques de courte taille (quelques dizaines de bases nucléiques).

⁴⁰ M. D. de Smet, C. Meenken, G. J. van den Horn, *Ocul. Immunol. Inflamm.* **1999**, 7, 189-198.

⁴¹ R. Ardaillou, *Bull. Acad. Natle Méd.* **2001**, 185, 1539-1560.

Les oligonucléotides peuvent cibler l'ADN (stratégie antigène), l'ARN (stratégie antisens et dérivés) ou d'autres composés comme des protéines.⁴² Ces principales stratégies sont indiquées ci-dessous (Figure 22).⁴³

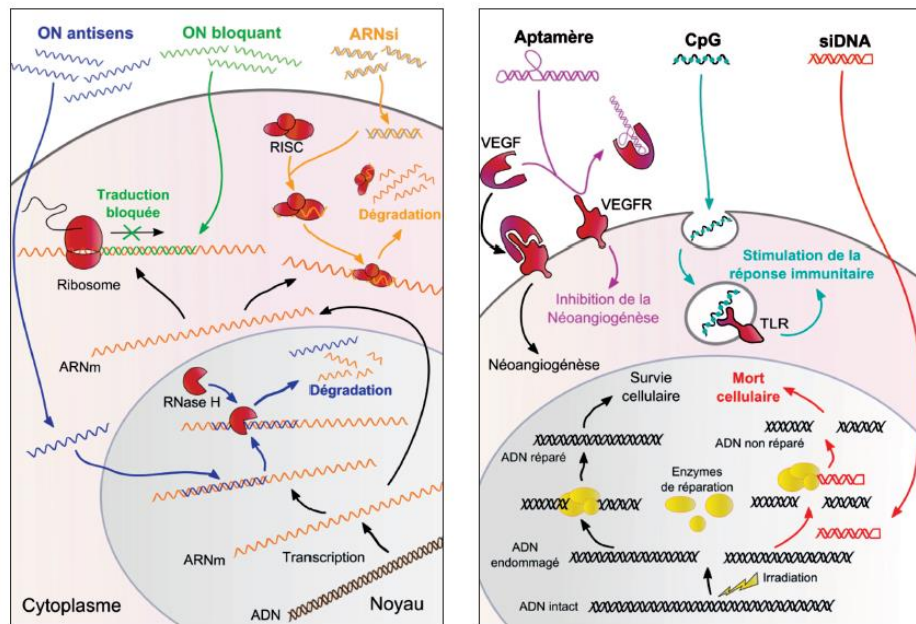


Figure 22 : Modes d'action et cibles envisageables des oligonucléotides thérapeutiques. Les flèches noires représentent les mécanismes cellulaires normaux. Les flèches de couleur représentent ce qui se déroule dans les cellules traitées par les différents oligonucléotides thérapeutiques.⁴³

Une étude bibliographique (Figure 23) montre que l'utilisation des oligonucléotides thérapeutiques a commencé avec les stratégies antigène et antisens. Plus récemment, de nouvelles stratégies comme l'interférence ARN, les oligonucléotides leurres ou les aptamères ont vu le jour.

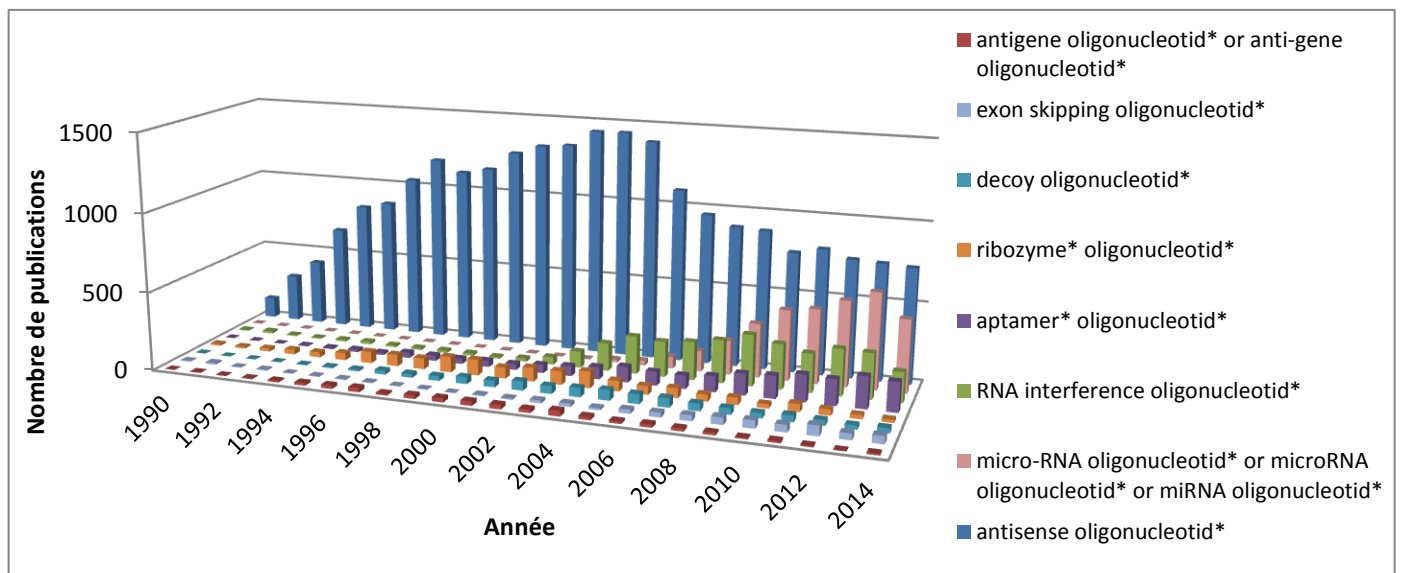


Figure 23 : Nombre depuis 1990 de publications portant sur les oligonucléotides antisens, les oligonucléotides antigène, les oligonucléotides leurres, les ribozymes, les aptamères, le saut d'exon et l'interférence ARN (recherche Web of ScienceTM portant sur les mots clefs indiqués en légende).

⁴² V. K. Sharma, P. Rungta, A. K. Prasad, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 16618-16631.

⁴³ M. Dutreix, F. Devun, *Biofutur* **2013**, 30-34.

Actuellement, un certain nombre d'oligonucléotides basés sur ces différentes stratégies sont en phase d'essais cliniques (Tableau 1).^{44,45}

	Nom	Maladies ciblées	Phase clinique	Développeur	Identifiant Clinicaltrials.gov
Antisens	ISIS-TTR _{RX}	Cardiomyopathie amyloïde familiale	Phase III	Isis Pharmaceuticals®	NCT01737398
Saut d'exon	Drisapersen	Dystrophie musculaire de Duchenne	Phase III	Prosense Therapeutics®	NCT01803412
Ciblage des miRNA	Mitavirsén	Transplantation du foie (hépatite C)	Phase II	Santaris Pharma A/S®	NCT01200420, NCT01872936
Interférence ARN	Patisiran (ALN-TTR02)	Polyneuropathie amyloïde familiale	Phase III	Alnylam® Pharmaceuticals	NCT01960348
	Atu-027	Tumeurs solides avancées	Phase II	Silence Therapeutics®	NCT01808638
	FANG™ Vaccine	Cancer des ovaires, mélanome, cancer colorectal	Phase II	Gradalis®	NCT01551745, NCT01309230, NCT01061840
Aptamères	ACT-GRO-777	Leucémie aiguë myéloïde, cancer des reins, tumeurs solides	Phase II	Advanced Cancer Therapeutics®	NCT01034410, NCT00740441
Ribozymes	Angiozyme	Cancer des reins	Phase II	Merck®	NCT00021021
Oligonucléotides leurres	STAT3 decoy	Cancer de la tête et du cou	Phase 0	Université de Pittsburg	NCT01153646

Tableau 1 : Exemples d'oligonucléotides thérapeutiques en phase clinique en 2015.⁴⁴

Nous allons maintenant regarder plus en détail les différentes possibilités d'utilisation des oligonucléotides comme agents thérapeutiques.

III.2. Ciblage d'ADN : la stratégie antigène

Nous avons vu que des oligonucléotides bien choisis sont capables de reconnaître l'ADN double brin en formant une triple hélice au niveau du grand sillon. Cela a conduit à la naissance de la stratégie antigène (signifiant « anti-ADN »).

Dans l'approche antigène, l'oligonucléotide simple brin pénètre dans le noyau de la cellule et se fixe sélectivement sur l'ADN double brin via la formation d'une triple hélice stabilisée par des appariements de Hoogsteen.⁴⁶ Cette formation de triples hélices peut conduire à différentes applications (Figure 24) que ce soit dans la modulation de l'expression des gènes, dans la mutagenèse spécifique ou dans la modification de l'ADN.⁴⁷ Cette stratégie a ainsi été utilisée pour bloquer la transcription et induire des mutations spécifiques *in vivo* et *in vitro*.^{48,49,50}

⁴⁴ K. T. Shum, J. J. Rossi, *Adv. Genet.* **2015**, *89*, 153-177.

⁴⁵ P. M. D. Moreno, A. P. Pêgo, *FCHEM* **2014**, *2*, 1-7.

⁴⁶ C. Hélène, J. J. Toulmé, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1049*, 99-125.

⁴⁷ A. Mukherjee, K. Vasquez, *Biochimie* **2011**, *93*, 1197-1208.

⁴⁸ D. Praseuth, A. L. Guieysse, C. Hélène, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 181-206.

⁴⁹ V. Dahmen, R. Kriehuber, *Int. J. Radiat. Biol.* **2012**, *88*, 972-979.

⁵⁰ R. Tonelli, A. McIntyre, C. Cameri, Z. S. Walters, K. Di Leo, J. Selfe, S. Purgato, E. Missiaglia, A. Tortori, J. Renshaw, A. Astolfi, K. R. Taylor, S. Serravalle, R. Bishop, C. Nanni, L. J. Valentijn, A. Faccini, I. Leuschner, S. Formica, J. S. Reis-Filho, V. Ambrosini, K. Thway, M. Franzoni, B. Summersgill, R. Marchelli, P. Hrelia, G. Cantelli-Forti, S. Fanti, R. Corradini, A. Pession, J. Shipley, *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 796-807.

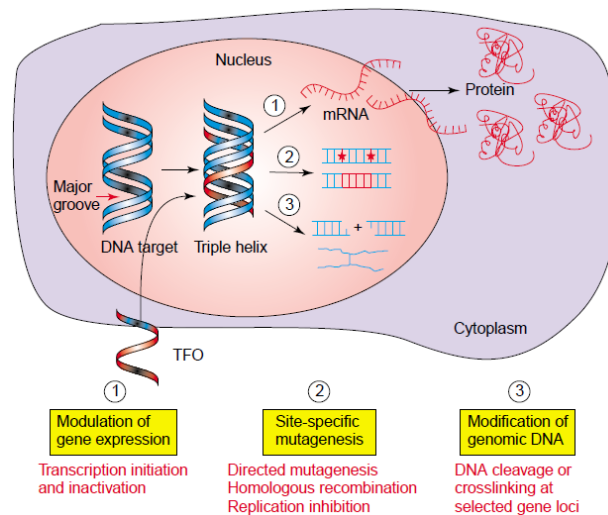


Figure 24 : Stratégie antigène et applications possibles.⁵¹

L'étude bibliographique (Figure 23) montre que la technologie antigène s'est finalement peu développée. En effet, la formation de triples hélices avec l'ADN implique des contraintes fortes sur la séquence des bases nucléiques, ce qui restreint le champ d'applications de cette thérapie. Depuis peu, une base de données⁵² compilant les sites de l'ADN du génome humain susceptibles de former des triplex existe, ce qui pourra faciliter l'utilisation des oligonucléotides antigène.

III.3. Ciblage d'ARN : la stratégie antisens

La plus ancienne des approches utilisant les oligonucléotides en tant qu'agents thérapeutiques est l'approche antisens. Basée sur l'appariement entre l'oligonucléotide antisens et l'ARN cible, cette approche ressurgit périodiquement au travers de ses variantes comme l'interférence ARN.

III.3.a. Ciblage des ARN_m

Les oligonucléotides antisens sont des oligonucléotides (ou oligodésoxynucléotides) capables de s'hybrider par interaction de Watson-Crick à un ARN et en particulier à un ARN_m. Une fois l'oligonucléotide antisens fixé sur l'ARN_m cible,⁵³ il se produit alors :

- soit une activation des ribonucléases H (RNases H) (Figure 25). La RNase H, qui intervient entre autres dans le mécanisme de réplication de l'ADN, est une enzyme qui hydrolyse le brin d'ARN dans un double brin hybride ADN-ARN. Ces RNases H dégradent ainsi l'ARN_m, ce qui empêche sa traduction en protéines.
- soit un blocage stérique de la traduction de l'ARN_m en protéines (Figure 25). L'oligonucléotide antisens empêche physiquement la traduction.

⁵¹ S. Buchini, C. J. Leumann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 717-726.

⁵² P. Jenjaroenpun, C. S. Chew, T. P. Yong, K. Choowongkamon, W. Thammasorn, V. A. Kuznetsov, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 110-116.

⁵³ I. Zalachoras, M. M. Evers, W. M. C. vanRoon-Mom, A. M. Aartsma-Rus, O. C. Meijer, *Front. Mol. Neurosci.* **2011**, *10*, 1-12.

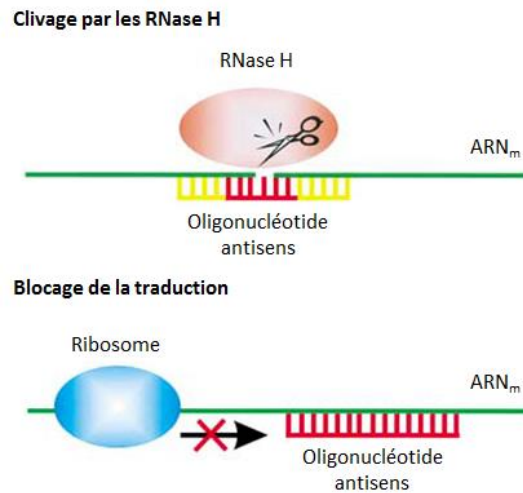


Figure 25 : En haut : activation des RNases H par des oligonucléotides antisens. La fixation de l'oligonucléotide antisens forme un hybride ADN-ARN, qui active les RNases H. Ces dernières coupent alors l'ARN_m et empêchent ainsi la traduction en protéine. En bas : blocage de la traduction sans intervention des RNases H. Les oligonucléotides ciblant le site de départ de la traduction empêchent la traduction et l'élongation.⁵⁴

La majorité des oligonucléotides antisens repose sur l'intervention d'une RNase H. Ce mécanisme, plutôt efficace (80-95% d'inhibition de traduction), peut, au contraire des oligonucléotides bloquants, empêcher la formation de la protéine en ciblant n'importe quelle région de l'ARN_m.⁵⁵

Grâce à leur capacité à réguler sélectivement l'expression de leur cible, de nombreux oligonucléotides antisens ont été développés, par exemple contre l'hypercholestérolémie,⁵⁶ des infections virales,⁵⁷ le diabète,⁵⁸ des cancers⁵⁹ ou des maladies cardiovasculaires.⁶⁰ Certains sont en phase d'essai clinique.⁶¹ Le VitraveneTM et le KynamroTM sont deux oligonucléotides antisens approuvés par la FDA (cf. III.1.b. Les oligonucléotides thérapeutiques).

Un inconvénient majeur de la stratégie antisens par rapport à la stratégie antigène est la quantité d'oligonucléotides nécessaire. En effet, il n'y a que deux copies d'un gène tandis qu'un seul gène peut conduire à des milliers d'ARN_m. Par ailleurs, on note que la stratégie antisens dégradant l'ARN_m connaît actuellement une certaine désaffectation après avoir suscité un grand engouement, sans doute déraisonnable (Figure 23). En effet, les oligonucléotides antisens peuvent exercer leurs actions à travers d'autres modes d'action que ceux mentionnés plus haut (comme des manipulations lors de l'épissage). Ces nouvelles approches semblent, à l'heure actuelle, prometteuses.

III.3.b. Saut d'exon

Une autre application des oligonucléotides antisens est la thérapie du saut d'exon (en anglais *exon-skipping*). Cette technique, qui s'apparente à une chirurgie du gène consiste à « sauter » la

⁵⁴ J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 1628-1644.

⁵⁵ N. Dias, C. A. Stein, *Mol. Cancer Ther.* **2002**, 1, 347-355.

⁵⁶ T. Yamamoto, M. Harada-Shiba, M. Nakatani, S. Wada, H. Yasuhara, K. Narukawa, K. Sasaki, M. A. Shibata, H. Torigoe, T. Yamaoka, T. Imanishi, S. Obika, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, 1, e22.

⁵⁷ K. B. Spurgers, C. M. Sharkey, K. L. Warfield, S. Bavari, *Antivir. Res.* **2008**, 78, 26-36.

⁵⁸ P. Hnik, D. S. Boyer, L. R. Grillone, J. G. Clement, S. P. Hery, E. A. Green, *J. Diabetes Sci. Technol.* **2009**, 3, 924-930.

⁵⁹ N. M. Dean, C. F. Bennett, *Oncogene* **2003**, 22, 9087-9096.

⁶⁰ J. A. Saonere, *J. Med. Genet. Genomics* **2011**, 3, 77-83.

⁶¹ V. K. Sharma, R. K. Sharma, S. K. Singh, *Med. Chem. Commun.* **2014**, 5, 1454-1471.

partie du gène qui porte la mutation responsable de la maladie (exon 2 sur la Figure 26). Au lieu d'une protéine non fonctionnelle, il se formera alors une protéine plus courte que la protéine normale mais fonctionnelle. Cette « chirurgie » est possible avec des oligonucléotides antisens ne faisant pas intervenir les RNases H. Ces derniers masquent sans dégrader des motifs impliqués dans la maturation des pré-ARN_m, ce qui permet l'élimination des exons porteurs de mutations et mène à la formation de protéines modifiées.

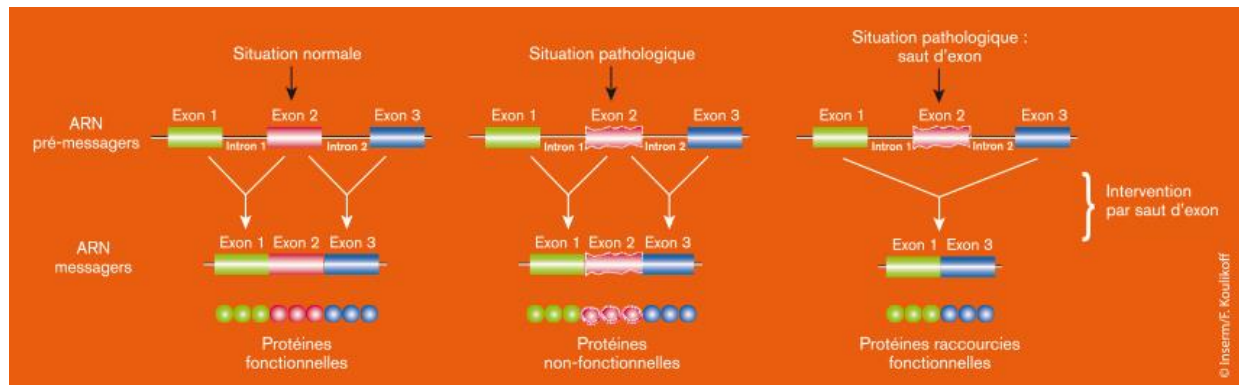


Figure 26 : Saut d'exon.⁶²

Cette technique du saut d'exon a fait ses preuves,^{63,64} en particulier dans la maladie de Duchenne,^{65,66} dans des maladies neuromusculaires,⁶⁷ dans l'amyotrophie spinale,⁶⁸ etc.

Une autre possibilité est l'inclusion d'exon qui est une technique prometteuse (pour l'amyotrophie spinale par exemple).⁶⁹

III.3.c. Ciblage des miRNA

Les micro-ARN (ou miRNA) sont de courts acides ribonucléiques simple brin de 21 à 24 nucléotides propres aux cellules eucaryotes qui jouent le rôle de régulateurs post-transcriptionnels de l'expression de plusieurs gènes. Les miRNA sont les produits de longs ARN synthétisés dans le noyau. Ces transcrits primaires (pri-miRNA) sont traités par une RNase nucléaire (Drosha-DGCR8) pour former le pré-miRNA. Le pré-miRNA est ensuite exporté (par Exportin 5) dans le cytoplasme où la RNase cytosolique Dicer le transforme en duplex miRNA mature. Ce dernier fait partie d'un complexe RISC (en anglais *RNA-induced silencing complex*) contenant DICER et d'autres protéines. Le complexe RISC avec le miRNA incorporé est appelé miRISC. Le miRNA mature, en action concertée avec la protéine Argonaute, régule la traduction des ARN_m cibles via le blocage de la traduction ou via la dégradation de cet ARN_m (Figure 27). Le miRNA reconnaît l'ARN_m cible grâce au 6-8 premiers nucléotides de la portion 5' du miRNA ce qui fait qu'un seul miRNA régule plusieurs ARN_m partageant tous la même séquence complémentaire. Rien que pour le génome humain, il y aurait au moins 800

⁶² Inserm, Thérapie génique. Disponible sur <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/therapie-genique> (Page consultée le 09/05/2015).

⁶³ M. Veltrop, A. Aartsma-Rus, *Exp. Cell Res.* **2014**, 325, 50-55.

⁶⁴ P. Järver, L. O'Donovan, M. Gait, *Nucleic Acid Ther.* **2014**, 24, 37-47.

⁶⁵ A. Goyenvalle, A. Vulin, F. Fougereuse, F. Leturcq, J. C. Kaplan, L. Garcia, O. Danos, *M. S. Méd. Sci.* **2004**, 20, 1163-1165.

⁶⁶ S. D. Wilton, A. M. Fall, P. L. Harding, G. McClorey, C. Coleman, S. Fletcher, *Mol. Ther.* **2007**, 15, 1288-1296.

⁶⁷ M. A. J. Wood, M. J. Gait, H. Yin, *Brain* **2010**, 133, 957-972.

⁶⁸ J. Seo, M. D. Howell, N. N. Singh, R. N. Singh, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1832, 2180-2190.

⁶⁹ Y. Hua, A. R. Krainer, *Methods Mol. Biol.* **2012**, 867, 307-323.

gènes à l'origine de la transcription de miRNA,⁷⁰ et ces derniers cibleraient environ 60% des gènes. Leur conservation au cours de l'évolution est la preuve de leur importance biologique.

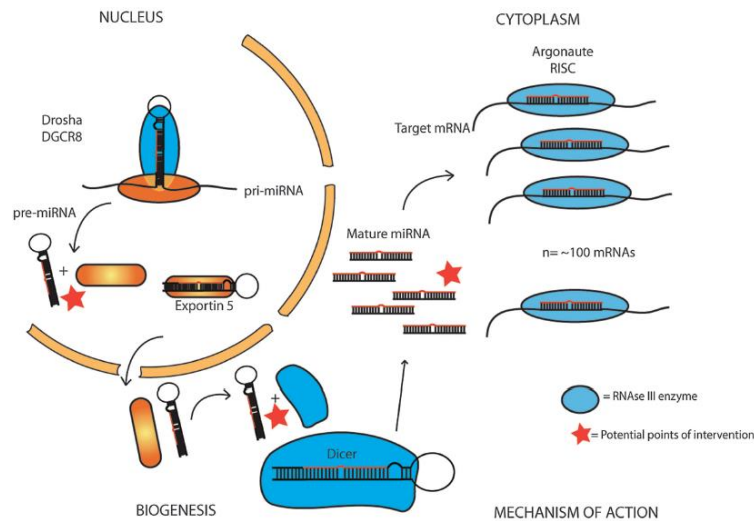


Figure 27 : Biogénèse et mode d'action des miRNA.⁷¹

Actuellement, des centaines de miRNA ont été identifiés et leurs rôles dans le développement de maladies s'éclairent de jour en jour. Cibler ces miRNA offre ainsi de nombreuses possibilités thérapeutiques.⁷² On constate en regardant de près la biogénèse et le mode d'action des miRNA (Figure 27), qu'il existe plusieurs points d'intervention potentiels⁷³ (étoiles rouges de la Figure 27) que ce soit dans la restauration ou dans l'inhibition de la fonction des miRNA. De petites molécules inhibitrices peuvent cibler plusieurs étapes de l'assemblage et du fonctionnement des miRNA : transcription du pri-miRNA (initiation de la transcription, élongation ou épissage d'intron), étapes impliquant Dicer et Argonaute, interaction entre le complexe RISC et l'ARN_m cible, etc. Nous ne nous intéresserons pas à ces petites molécules par la suite.

Des oligonucléotides simple brin antisens appelés anti-miR et conçus pour être complémentaires au miRNA cible se fixent à ce dernier avec une très bonne affinité. Le miRNA ne peut alors se fixer sur l'ARN_m cible, ce qui entraîne un arrêt de l'inhibition de l'expression du gène cible.

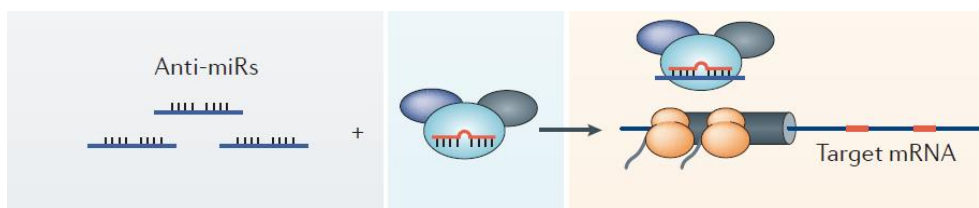


Figure 28 : Principe des anti-miR.⁷³

Des ARN_m produits à partir de transgènes et contenant plusieurs sites artificiels de fixation au miRNA servent de leurres. Ils sont appelés miRNA « éponges ». ⁷⁴ La surexpression de ces éponges

⁷⁰ I. Bentwich, A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector, Z. Bentwich, *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 766-770.

⁷¹ G. G. Jayaraj, S. Nahar, S. Maiti, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 820-831.

⁷² N. W. Gibson, *J. R. Coll. Physicians Edinb.* **2014**, *44*, 196-200.

⁷³ Z. Li, T. M. Rana, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 622-638.

⁷⁴ M. S. Ebert, J. R. Neilson, P. A. Sharp, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 721-726.

séquestre les miRNA endogènes cibles, ce qui inhibe leur activité et permet la traduction de l'ARN_m cible.

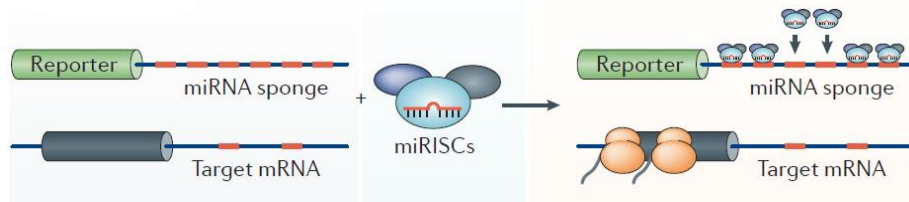


Figure 29 : Principe des miRNA « éponges ». ⁷³

Des oligonucléotides double brin (appelés *miR-mimic* en anglais) ⁷⁵ peuvent mimer un miRNA endogène grâce à un des brins (le brin guide ou antisens) qui est identique à celui du miRNA correspondant. Cela permet de mimer l'action de miRNA défaillants.

Ces thérapies faisant intervenir des miRNA sont intéressantes contre la fibrose hépatique, ⁷⁶ des cancers, ⁷⁷ des maladies cardiovasculaires, ⁷⁸ etc. Les résultats étant très encourageants, plusieurs thérapies faisant intervenir des miRNA sont en phase d'essais cliniques. ^{73,79}

III.3.d. Interférence ARN

En 1990, l'équipe de R. Jorgensen, ⁸⁰ qui cherchait à obtenir des pétunias de couleur mauve intense en introduisant plusieurs copies du gène mauve, a obtenu des pétunias blancs. Ce phénomène inattendu où le gène endogène et le transgène introduit ne s'expriment plus, fut appelé co-suppression. En 1998, Andrew Z. Fire et Craig C. Mello ⁸¹ ont montré que l'introduction d'ARN double brin inhibait l'expression du gène correspondant chez *Caenorhabditis elegans* et expliquèrent ce phénomène d'interférence ARN ⁸² qui prit très vite de l'importance. ⁸³ Andrew Z. Fire et Craig C. Mello ont reçu le prix Nobel de Médecine en 2006 pour cette découverte majeure. ⁸⁴

L'interférence ARN est un mécanisme cellulaire fondamental d'inhibition de l'expression des gènes. Les ARN double brin présents dans une cellule sont tout d'abord pris en charge par l'enzyme Dicer (qui intervient aussi dans le mécanisme de production des miRNA, cf. ci-dessus). Celle-ci clive l'ARN double brin toutes les 21 à 25 paires de bases nucléiques et transfère alors les petits ARN interférents (siRNA pour *small interfering RNA* en anglais) au complexe multi protéique RISC. Le brin dit « passager » du siRNA est éliminé tandis que l'autre brin « guide » dirige le complexe RISC vers les ARN_m possédant une séquence complémentaire au brin guide. L'ARN_m cible est ensuite dégradé par l'enzyme Argonaute ⁸⁵ et n'est donc plus traduit en protéine (Figure 30).

⁷⁵ E. van Rooij, S. Kauppinen, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 851-864.

⁷⁶ V. Kumar, R. I. Mahato, *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 341-361.

⁷⁷ R. Garzon, G. Marcucci, C. M. Croce, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 775-789.

⁷⁸ E. M. Small, R. J. A. Frost, E. N. Olson, *Circulation* **2010**, *121*, 1022-1033.

⁷⁹ E. van Rooij, A. L. Purcell, A. A. Levin, *Circ Res.* **2012**, *110*, 481-482.

⁸⁰ C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant Cell*, **1990**, *2*, 279-289.

⁸¹ A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.

⁸² M. K. Montgomery, S. Xu, A. Fire, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 15502-15507.

⁸³ P. A. Sharp, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 139-141.

⁸⁴ A. Harel-Bellan, *M. S. Méd. Sci.* **2006**, *21*, 993-994.

⁸⁵ T. A. Rand, K. Ginalski, N. V. Grishin, X. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14385-14389.

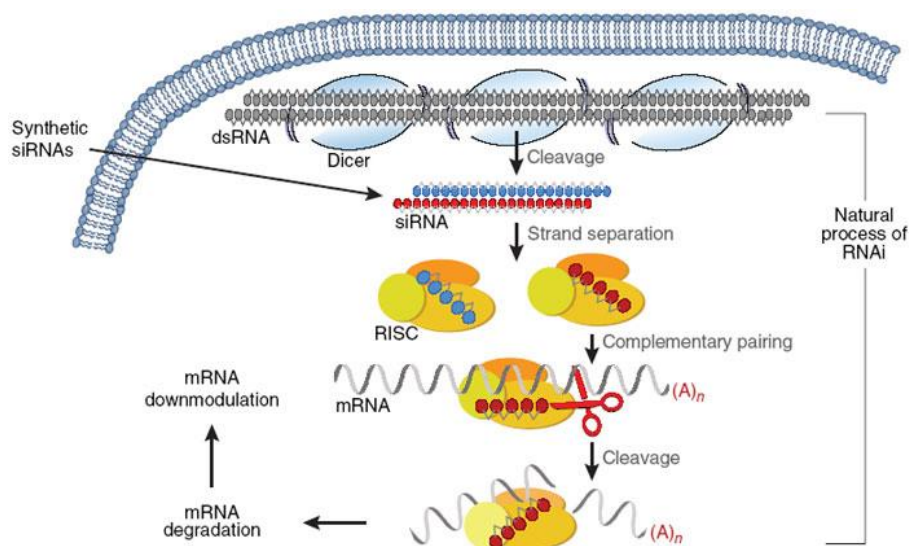


Figure 30 : Mécanisme cellulaire d'interférence ARN.⁸⁶

En déclenchant ce processus d'interférence ARN, l'introduction d'un ARN double brin étranger initie une cascade de dégradations sélectives de l'ARN_m endogène complémentaire. En raison de la facilité avec laquelle il est possible d'« éteindre » un gène spécifique dans n'importe quel organisme (ce qui permet d'ailleurs de déterminer le rôle de chaque gène),⁸⁶ les recherches sur le sujet sont particulièrement dynamiques depuis les années 2000. Elles offrent en effet la possibilité d'éteindre un gène défectueux. Il suffit pour cela de trouver l'ARN interférent adéquat. Ce phénomène d'interférence ARN peut être déclenché⁸⁷ par différents types d'ARN double brin :

- Des petits ARN interférents siRNA. Il s'agit de courts fragments d'ARN double brin formés de 21 à 23 nucléotides et dont la séquence est complémentaire de celle de l'ARN_m codant la protéine ciblée. Ils provoquent ainsi la dégradation de cet ARN_m cible.
- Des petits ARN en épingle à cheveux (shRNA pour *short-hairpin RNA* en anglais). Il s'agit de régions d'ARN double brin formées de 19 à 29 paires de bases nucléiques (tige) avec deux brins du duplex connectés par une boucle de 9 nucléotides. En utilisant un vecteur viral, un gène qui code pour une séquence spécifique de shRNA peut être introduit dans le génome hôte et une fois transcrit, le shRNA résultant sert de substrat à Dicer et déclenche le phénomène d'interférence ARN.

Ces ARN double brin introduits influencent le processus normal d'interférence ARN de manière prédictible et fiable. Les siRNA ou les shRNA ont été utilisés pour inhiber l'expression de gènes responsables de nombreuses maladies.⁸⁶ Actuellement, il y a 22 siRNA ou shRNA en phase d'essai clinique pour des maladies très variées (maladies génétiques, infections virales, cancers...)⁴⁴.

III.3.e. Les ribozymes et les DNazymes

Les ribozymes sont des ARN non codants doués d'une activité catalytique. Ils peuvent catalyser des réactions chimiques comme l'hydrolyse de l'ARN et ce, en l'absence de tout cofacteur protéique. On sait maintenant que la catalyse par des ARN est essentielle dans de nombreuses réactions cellulaires. Cette polyvalence de l'ARN a même mené à l'idée que les molécules d'ARN ont

⁸⁶ D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Kotliansky, D. W. Y. Sah, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 711-719.

⁸⁷ J. W. Gaynor, B. J. Campbell, R. Cosstick, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4169-4184.

pu être parmi les molécules précurseurs des premiers stades du développement de la vie sur Terre.⁸⁸ Pour leur découverte de l'ARN catalytique, Sidney Altman et Thomas R. Cech ont reçu le prix Nobel de Chimie en 1989.⁸⁹

On notera qu'il existe deux types d'acides nucléiques catalytiques : les ribozymes et les DNAzymes.^{90,91} Les ribozymes sont des molécules d'ARN qui peuvent exécuter naturellement leur activité enzymatique sur elles-mêmes en l'absence de protéines (en cis) ou sur des cibles extrinsèques (en trans). Les ribozymes en « tête de marteau » (*hammerhead ribozyme*) et les ribozymes en « épingle à cheveux » sont les types de ribozymes les plus populaires. Les DNAzymes ont été générés par évolution *in vitro*. Ils ressemblent à des ribozymes mais n'existent pas dans la nature. Les ribozymes et les DNAzymes ont tous les deux pour cible l'ARN. Ces acides nucléiques catalytiques ont en commun le fait qu'ils sont constitués d'une séquence antisens reconnaissant le site cible et d'un domaine catalytique de clivage médiateur. Cette dualité leur permet de cibler avec une grande sélectivité leur cible tout en effectuant la catalyse. Tout se passe comme si une activité de dégradation par hydrolyse était ajoutée à des ARN antisens (Figure 31).

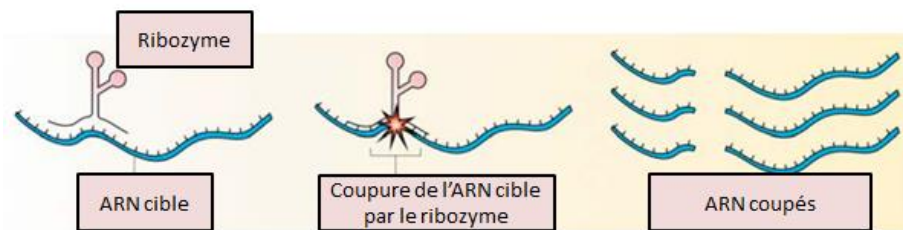


Figure 31 : Mécanisme d'action des ribozymes.⁹²

Les ribozymes en « tête de marteau » catalysent le clivage et la jonction d'un site spécifique sur une molécule d'ARN. Pour cela, ils possèdent un cœur catalytique responsable de la réaction de clivage et trois hélices dont deux jouxtent le cœur catalytique et se fixent sur l'ARN cible via des appariements de type Watson-Crick (Figure 32).⁹³ En général, les ribozymes en « tête de marteau » reconnaissent les ARN contenant la séquence NUH où N est n'importe quelle base nucléique et H est A, C ou U. Ce clivage mène à deux ARN plus courts qui, privés de la séquence stabilisante, sont dégradés. La synthèse protéique est alors inhibée. Une fois ce premier clivage effectué, le ribozyme hydrolyse un deuxième ARN et ainsi de suite.

⁸⁸ J. A. Doudna, T. R. Cech, *Nature* **2012**, *418*, 222-228.

⁸⁹ J. P. Perreault, *M. S. Méd. Sci.* **1989**, *5*, 703-704.

⁹⁰ S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 4262-4266.

⁹¹ J. Yi, C. Liu, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18629.

⁹² R. Robinson, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e28.

⁹³ M. Kashani-Sabet, *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *7*, 76-78.

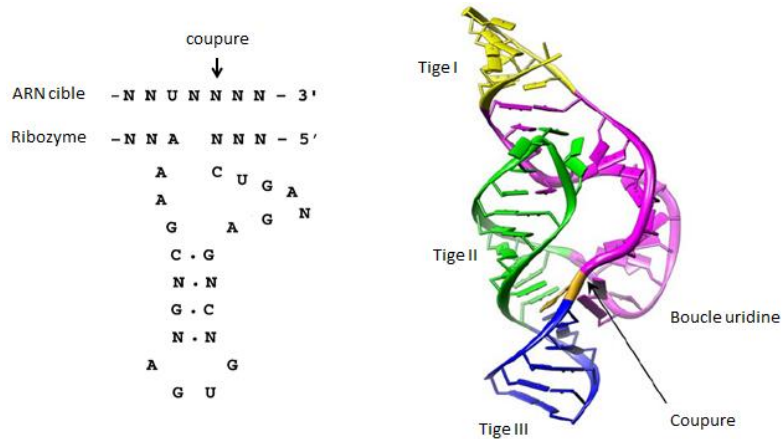


Figure 32 : A gauche : Structure secondaire du ribozyme en « tête de marteau » expliquant son mode d'action.⁹³ A droite : Structure tridimensionnelle du ribozyme en « tête de marteau » *Schistosoma mansoni*.⁹⁴

Etant donné que l'interférence ARN est susceptible de déclencher une réponse immunologique et n'est pas suffisamment sélective, les ribozymes fonctionnant de manière catalytique et dotés d'une excellente sélectivité⁹⁵ constituent une alternative intéressante avec de nombreuses applications possibles. Les ribozymes sont sélectionnés *in vitro* par une méthode qui ressemble à la méthode SELEX des aptamères (cf. ci-dessous). Bien qu'on note actuellement une diminution de l'intérêt porté aux ribozymes (Figure 23), de nombreux oligonucléotides ribozymes ont été mis au point. Par exemple, des acides nucléiques catalytiques ont ainsi été développés contre le cancer^{93,96} ou contre des infections virales (virus de l'hépatite B,⁹⁷ de l'hépatite D,⁹⁸ etc.). En plus de leurs applications dans des bactéries, des levures et des cellules de mammifère, une équipe a montré la possibilité d'utiliser des ribozymes en « tête de marteau » dans des champignons filamenteux.⁹⁹

III.4. Autres stratégies thérapeutiques

III.4.a. Les aptamères

Du latin *aptus* signifiant « adapter » et du grec *meros* signifiant « région », les aptamères sont des oligonucléotides ou oligodésoxynucléotides simple brin formant des structures tridimensionnelles stables capables de se lier avec une grande affinité à diverses molécules cibles comme des protéines. MacugenTM (Figure 33), un des oligonucléotides thérapeutiques approuvés par la FDA, est un aptamère¹⁰⁰ se fixant à la protéine VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor* pour facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). Cette interaction inhibe la néoangiogénèse responsable de la dégénérescence maculaire. Par ailleurs, plusieurs aptamères sont à l'heure actuelle en essai clinique.⁴⁴

⁹⁴ A. Mescalchin, T. Restle, *Molecules* **2011**, *16*, 1271-1796.

⁹⁵ L. Beigelman, J. A. McSwiggen, K. G. Draper, C. Gonzalez, K. Jensen, A. M. Karpeisky, A. S. Modak, J. Matulic-Adamic, A. B. DiRenzo, P. Haerberli, D. Sweedler, D. Tracz, S. Grimm, F. E. Wincott, V. G. Thackray, N. Usman, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 25702-25708.

⁹⁶ Z. Xu, L. Yang, L. Sun, Y. Cao, *Chin. Sci. Bull.* **2012**, *57*, 3404-3408.

⁹⁷ M. Gebbing, T. Bergmann, E. Schulz, A. Ehrhardt, *World J. Hepatol* **2015**, *7*, 150-164.

⁹⁸ M. Asif-Ullah, M. Lévesque, G. Robichaud, J. P. Perreault, *Curr. Gene Ther.* **2007**, *7*, 205-216.

⁹⁹ D. Mueller, U. Stahl, V. Meyer, *J. Microbiol. Meth.* **2006**, *65*, 585-595.

¹⁰⁰ E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, D. R. Guyer, A. P. Adamis, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 123-132.

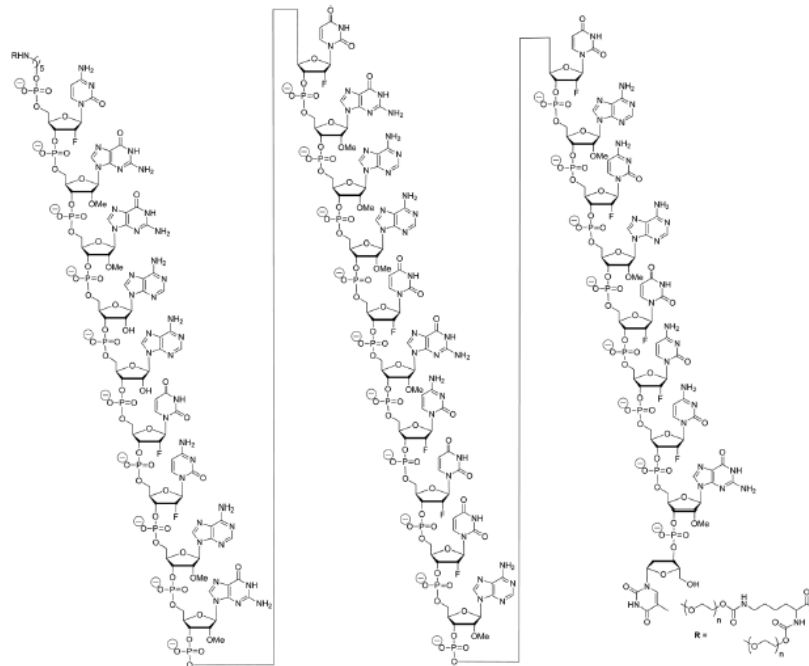


Figure 33 : Structure primaire de l'aptamère Macugen^{TM 42}.

Le travail sur les aptamères a commencé en 1990 (Figure 23), année durant laquelle deux équipes ont sélectionné des ARN se liant spécifiquement à une protéine¹⁰¹ ou à des colorants organiques.¹⁰²

Les aptamères étant des acides nucléiques simples brins constitués de 20 à 100 nucléotides, ils adoptent dans l'espace une structure tridimensionnelle complexe (tiges, boucles, pseudo-nœuds, quadruplexes...) dépendante de la séquence primaire, de l'environnement, etc. L'interaction¹⁰³ entre l'aptamère et sa cible résulte de la complémentarité entre leurs formes géométriques, du π -stacking entre composés aromatiques et bases nucléiques, d'interactions électrostatiques entre groupements chargés, d'interactions de Van Der Waals ou de liaisons hydrogène, etc (Figure 34). Cela offre aux aptamères une excellente sélectivité et ce même vis-à-vis de cibles de structure très proches ou de composés chiraux. Cette sélectivité justifie leur appellation d' « acides nucléiques anticorps ». ¹⁰⁴

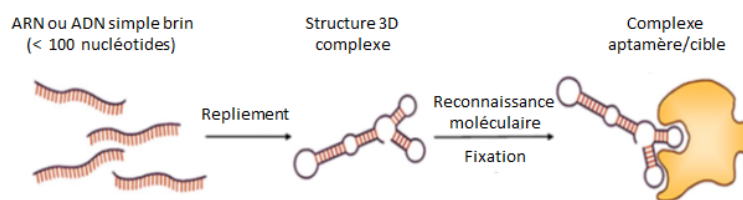


Figure 34 : Principe de reconnaissance moléculaire des aptamères.¹⁰⁵

L'équipe de Sadler¹⁰⁶ a étudié en détail l'interaction entre l'aptamère ARC1172 et le facteur de domaine A1 de Willebrand (VWF A1). Dans la structure cristalline du complexe ARC1172-VWF A1,

¹⁰¹ C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505-510.

¹⁰² A. E. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818-822.

¹⁰³ T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, *287*, 820-825.

¹⁰⁴ R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* **1994**, *263*, 1425-1429.

¹⁰⁵ C. Reinemann, B. Strehlitz, *Swiss Med. Wkly.* **2014**, *144*, w13908.

¹⁰⁶ R. H. Huang, D. H. Fremont, J. L. Diener, R. G. Schaub, J. E. Sadler, *Structure* **2009**, *17*, 1476-1484.

l'aptamère adopte une structure à 3 tiges de conformation ADN B avec trois paires de bases non canoniques et 9 résidus non appariés, dont 6 sont stabilisés par des interactions base nucléique-base nucléique ou d'empilement base nucléique-désoxyribose. L'interface aptamère-protéine est caractérisée par des interactions π -cations impliquant des résidues Arg, Lys et Gln, souvent stabilisés par des liaisons hydrogène avec des bases nucléiques adjacentes (Figure 35).

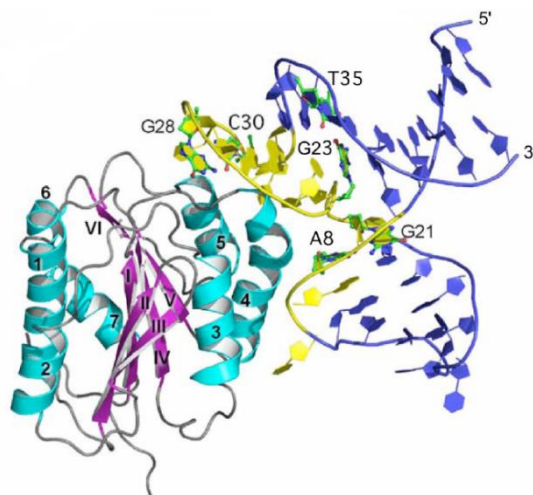


Figure 35 : Structure cristallisée de l'aptamère ARC1172 lié au domaine VWF A1. L'hélice α est indiquée par des chiffres arabes tandis que les feuillets β le sont par des chiffres romains. Les nucléotides de l'aptamère à moins de 4,2 Å du domaine VWF A1 sont indiqués en jaune et les nucléotides impliqués dans des appariements non-canoniques en vert.¹⁰⁶

Les aptamères sont identifiés dans des banques contenant jusqu'à 10^{15} séquences différentes par une méthode combinatoire de sélection *in vitro* appelée SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).^{101,102,107} Cette méthode combinatoire repose sur différentes étapes^{108,109} (Figure 36) :

- définition de la molécule cible ;
- synthèse d'une banque aléatoire de criblage composée d'environ 10^{15} oligonucléotides ;
- incubation de cette banque avec le composé cible ;
- élimination du milieu des oligonucléotides qui ne se sont pas liés au composé cible ;
- amplification des oligonucléotides liés par PCR ;
- plusieurs répétitions de ce cycle ;
- identification des candidats sélectionnés par les méthodes classiques (clonage, séquençage...).

¹⁰⁷ M. Famulok, G. Mayer, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1055-1058.

¹⁰⁸ J. J. Toulmé, S. Da Rocha, E. Dausse, L. Azéma, I. Lebars, S. Moreau, *Méd. Nucl.* **2007**, *31*, 478-484.

¹⁰⁹ Z. Szeitner, J. András, R. E. Gyurcsányi, T. Mészáros, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 58-65.

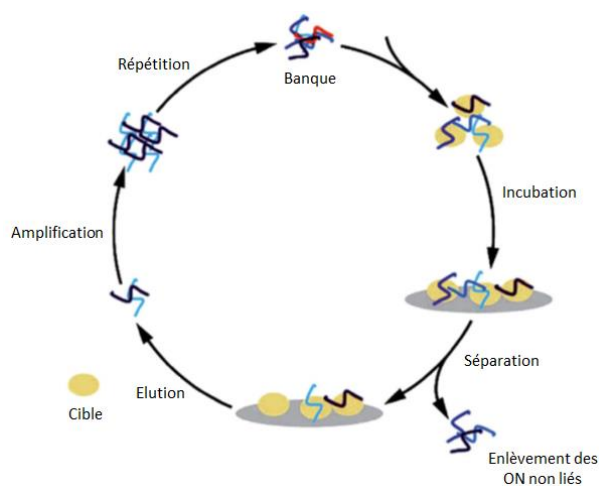


Figure 36 : Principe de la méthode SELEX.¹¹⁰

La littérature fournit de nombreux exemples, depuis la fin des années 1990 (Figure 23), d'utilisation en diagnostic et en thérapie des aptamères qui profitent de leur petite taille, de leur bonne stabilité chimique, de la possibilité de modifier leur spécificité en les fonctionnalisant, de la diversité de cibles (molécules organiques, peptides, protéines, acides nucléiques, cellule...), de leur possible immobilisation sur matrice et de leur faible immunogénicité. Ainsi, des travaux récents ont montré les possibilités offertes par les aptamères comme anticoagulants et antithrombotiques dans les maladies cardiovasculaires,¹¹¹ en traitement de maladies affectant le système nerveux,¹¹² en diagnostic et thérapie du cancer¹¹³ ou en recherche immunologique.¹¹⁴ Les aptamères peuvent même catalyser une réaction chimique sur le ligand cible.¹¹⁵

III.4.b. Les oligonucléotides leurres

Les facteurs de transcription sont des protéines nucléaires qui, en étant nécessaires à l'initiation et à la régulation de la transcription, jouent un rôle clef dans la régulation de l'expression des gènes. Ces protéines activent ou inhibent le complexe transcriptionnel constitué autour de l'ARN polymérase en se fixant sur l'ADN au niveau des séquences régulatrices situées en amont des gènes à transcrire. La stratégie d'oligonucléotides leurres consiste à bloquer l'activité du facteur de transcription (TF pour *transcription factor*) en introduisant un oligonucléotide double brin exogène qui contient la séquence nécessaire à la liaison avec le facteur de transcription cible. En l'absence de cet oligonucléotide leurre (Figure 37 à gauche), le facteur de transcription se fixe au niveau des régions promotrices du gène en question, provoquant ainsi la transcription de ces gènes. Lorsque l'oligonucléotide leurre est introduit dans la cellule cible (Figure 37 à droite), il interagit avec le facteur de transcription, empêchant alors ce dernier de se fixer au niveau des régions promotrices du gène et bloquant en conséquence la transcription. En ce sens, les oligonucléotides leurres qui ciblent des facteurs de transcription constituent une sous famille des aptamères.¹¹⁶

¹¹⁰ P. R. Bouchard, R. M. Hutabarat, K. M. Thompson, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 237-257.

¹¹¹ W. Li, K. Wang, M. Hao, X. Yang, M. Chen, X. Lan, *Thromb. Res.* **2014**, *134*, 769-773.

¹¹² E. M. McConnell, M. R. Holahan, M. C. DeRose, *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *6*, 388-404.

¹¹³ H. Ma, J. Liu, M. M. Ali, M. A. I. Mahmood, L. Labanieh, M. Lu, S. M. Iqbal, Q. Zhang, W. Zhao, Y. Wan, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1240-1246.

¹¹⁴ R. Nezlin, *Immunol. Lett.* **2014**, *162*, 252-255.

¹¹⁵ J. J. Toulmé, R. Giégé, *M. S. Méd. Sci.* **1998**, *14*, 155-166.

¹¹⁶ Y. Fichou, C. Férec, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 563-570.

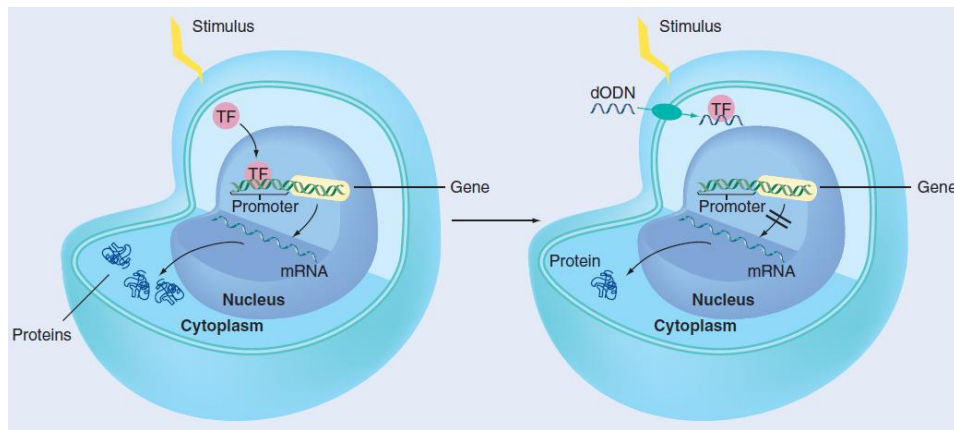


Figure 37 : Mode d'action des oligonucléotides leurres.¹¹⁷

Les facteurs de transcription de la famille E2F sont connus pour avoir un rôle clef dans la régulation des gènes impliqués dans l'hyperplasie néo-intimale, conduisant à l'athérosclérose et à la thrombose et qui a été proposée comme une raison d'échec de la greffe de veine suivant le pontage de l'artère coronaire. Un traitement envisageable serait l'inhibition du facteur de transcription E2F avec un oligonucléotide leurre comprenant la séquence nécessaire à la liaison au niveau du site de fixation du facteur de transcription. Ce site de fixation est composé de 8 nucléotides de séquence TTTCGCGC. Dès 1995, Morishita *et al*¹¹⁸ ont développé un oligonucléotide leurre double brin de 14 unités et ont montré son efficacité dans la suppression en 8 semaines du nouvel intima chez le rat (Figure 38).

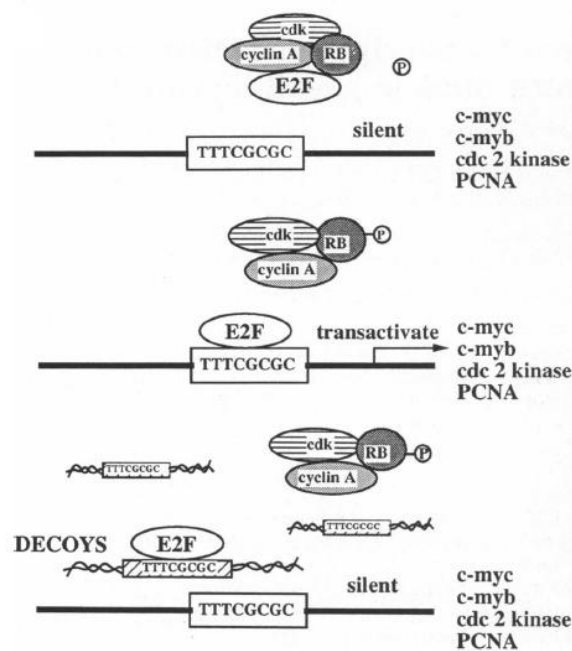


Figure 38 : Stratégie de l'oligonucléotide leurre.¹¹⁹ TTTCGCGC est la séquence du site de fixation de E2F. Normalement, E2F est piégé par une combinaison du produit du gène du rétinoblastome RB, de la cycline A et de la kinase dépendante des cyclines edk (en haut). La phosphorylation de RB libère E2F, qui se fixe aux séquences cis du gène de régulation du cycle cellulaire, entraînant une transactivation de ces gènes (au milieu). En présence de l'oligodésoxynucléotide double brin leurre (à gauche), ce dernier se fixe sur E2F, empêchant la transactivation par E2F du gène de régulation du cycle cellulaire.

¹¹⁷ N. Nogoy, *Therapy* 2007, 4, 171-173.

¹¹⁸ R. Morishita, G. H. Gibbons, M. Horiuchi, K. E. Ellison, M. Nakajima, L. Zhang, Y. Kanedat, T. Ogiharat, V. J. Dzau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995, 92, 5855-5859.

De nombreux autres facteurs de transcription sont susceptibles d'être ciblés (Tableau 2).

Facteur de transcription	Processus cellulaires	Applications thérapeutiques potentielles
AP1	croissance cellulaire, différenciation	hyperplasie néo-intimale, croissance des myocytes cardiaques / différenciation
NF-κB	expression des cytokines, réponse au stress oxydant, activation de l'AMPc et de la protéine kinase C	inflammation, réponse immunitaire, rejet de transplant, glomérulonéphrite
VP16	réplication virale	infection par le virus de l'herpès
MEF-2	différenciation des myocytes cardiaques et hypertrophie	cardiomyopathie, insuffisance cardiaque
HIF-1	réponse à l'hypoxie, angiogenèse	anti-angiogénique (néoplasie)
Élément de réponse sterol	modulation de l'expression du récepteur LDL	hypercholestérolémie

Tableau 2 : Facteurs de transcription comme cibles potentielles.¹¹⁹

En conséquence, la littérature fournit de nombreux exemples d'essais d'applications¹²⁰ de ces oligonucléotides leurres : suppression de la prolifération cellulaire et de la production de collagène dans une culture de fibroblastes humaines,¹²¹ suppression de la fibrose et des cicatrices chez la souris,¹²² traitement de tumeurs cancéreuses humaines dans la tête et au cou,¹²³ etc. En particulier, de nombreux oligonucléotides leurres ont été développés pour se lier à la protéine NF-κB (*nuclear factor-kappa B* cf. Tableau 2) qui est une protéine de la famille des facteurs de transcription impliqués dans la réponse immunitaire et au stress cellulaire.^{124,125,126}

Une sous-classe des oligonucléotides leurres a été développée plus récemment : il s'agit des petits ADN interférents (siDNA pour *small interfering DNA*). Ces siDNA servent de leurres et accaparent toute la cascade d'évènements cellulaires nécessaires à la prise en charge et à la réparation de l'ADN (Figure 39). Les véritables dommages subis par les chromosomes ne sont plus réparés, ce qui conduit à la mort de la cellule tumorale.

¹¹⁹ M. J. Mann, V. J. Dzau, *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 1071-1075.

¹²⁰ M. Z. Ahmad, S. Akhter, N. Mallik, M. Anwar, W. Tabassum, F. J. Ahmad, *Curr. Drug Discov. Technol.* **2013**, *10*, 71-84.

¹²¹ C. Deng, J. Zheng, W. Wan, S. Zhang, Z. Ding, G. Mao, S. Yang, *Mol. Med. Rep.* **2013**, *7*, 785-790.

¹²² H. F. Yuan, H. Huang, X. Y. Li, W. Guo, W. Xing, Z. Y. Sun, H. P. Liang, J. Yu, D. F. Chen, Z. G. Wang, J. Hao, X. Xu, *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, 1080-1087.

¹²³ M. Sen, S. M. Thomas, S. Kim, J. I. Yeh, R. L. Ferris, J. T. Johnson, U. Duvvuri, J. Lee, N. Sahu, S. Joyce, M. L. Freilino, H. Shi, Ch. Li, D. Ly, S. Rapireddy, J. P. Etter, P. K. Li, L. Wang, S. Chiosea, R. R. Seethala, W. E. Gooding, X. Chen, N. Kaminski, K. Pandit, D. E. Johnson, J. R. Grandis, *Cancer Discov.* **2012**, *8*, 694-705.

¹²⁴ V. G. Metelev, E. A. Kubareva, T. S. Oretskaya, *Biochemistry (Moscow)* **2013**, *78*, 867-878.

¹²⁵ D. De Stefano, *Discov. Med.* **2011**, *63*, 97-105.

¹²⁶ X. Xiao, Y. Gang, H. Wang, J. Wang, L. Zhao, L. Xu, Z. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *457*, 221-226.

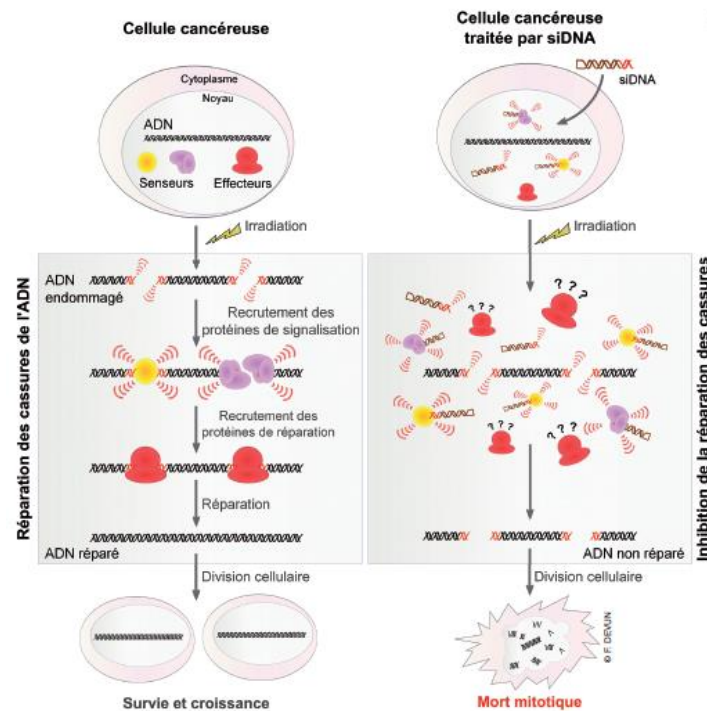


Figure 39 : Mode d'action des siDNA.⁴³ À gauche : L'irradiation d'une cellule cancéreuse est à l'origine de cassures dans l'ADN ; des protéines de signalisation puis de réparation interviennent pour effectuer la réparation avant la division de la cellule. À droite : Après un traitement avec un siDNA, les protéines de signalisation et de réparation sont recrutées directement par les siDNA nombreux et mobiles si bien qu'il y a une signalisation de dommage dans tout le noyau. Les protéines effectrices sont trompées et ne peuvent alors plus trouver les sites des dommages dus à l'irradiation. La cellule se divise avec un ADN fragmenté et meurt.

Ces siDNA inhibent les voies de réparations de l'ADN. Ces voies jouant un rôle majeur dans la résistance des traitements conventionnels des cancers (radiothérapie et chimiothérapie), les siDNA peuvent être utilisés en complément des traitements classiques de nombreux cancers.¹²⁷ Un laboratoire de l'Institut Curie a développé des molécules appelés Dbait de 32 paires de base nucléique qui inhibent la réparation des ADN endommagés.^{128,129,130}

III.4.c. Les oligonucléotides CpG

Les oligodésoxynucléotides CpG sont de courts ADN qui contiennent un désoxynucléotide cytosine triphosphate suivi par un désoxynucléotide guanine triphosphate. Le motif CpG fait partie des séquences oligonucléotidiques spécifiquement reconnues par les récepteurs de reconnaissance du système immunitaire. Ainsi, notre système immunitaire reconnaît une infection bactérienne par la présence de répétitions CpG typiques de l'ADN bactérien, notamment au niveau des « îlots » CpG (régions riches en CpG se trouvant fréquemment au niveau des séquences promoteurs). Ces répétitions se différencient des répétitions présentes dans le génome humain par l'absence de méthylation sur la cytidine.⁴³ Cela se fait via l'activation du récepteur TLR9 (*Toll-Like Receptor 9*). Ce récepteur fait partie d'un ancien mécanisme de réponse immunitaire eucaryote en réponse à l'ADN

¹²⁷ M. Quanz, N. Berthault, C. Roulin, M. Roy, A. Herbet, C. Agrario, C. Alberti, V. Josserand, J. L. Coll, X. Sastre-Garau, J. M. Cosset, L. Larue, J. S. Sun, M. Dutreix, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 1308-1316.

¹²⁸ M. Quanz, D. Chassoux, N. Berthault, C. Agrario, J. S. Sun, M. Dutreix, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6298.

¹²⁹ N. Coquery, N. Pannetier, R. Farion, A. Herbet, L. Azurmendi, D. Clarencon, S. Bauge, V. Josserand, C. Rome, J. L. Coll, J. S. Sun, E. L. Barbier, M. Dutreix, C. C. Remy, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40567.

¹³⁰ A. Croset, F. P. Cordelières, N. Berthault, C. Buhler, J. S. Sun, M. Quanz, M. Dutreix, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 7344-7355.

bactérien.¹³¹ Cette stimulation du système immunitaire se fait via l'activation du récepteur TLR9 (*Toll-Like Receptor 9*) (Figure 22).

Des oligonucléotides d'une vingtaine d'unités contenant des motifs CpG ont été développés pour diverses applications telles que le cancer,¹³² les maladies infectieuses, les allergies. Ils sont également utilisés comme adjuvants de vaccins¹³³ pour augmenter leur efficacité. Certains sont actuellement en phase d'essais cliniques.^{134,135}

III.4. Conclusion : avantages des oligonucléotides en tant qu'agents thérapeutiques

Un avantage considérable des oligonucléotides en tant qu'agents thérapeutiques est leur facilité de conception. Pour beaucoup de thérapies (à l'exception des aptamères et des ribozymes), il suffit de se baser sur les règles d'appariements de Watson-Crick. De plus, les oligonucléotides contiennent l'information nécessaire à leur copie. Ils font en général preuve d'une grande sélectivité et montrent une affinité pour leur cible de l'ordre du picomolaire ou du faible nanomolaire.⁹⁴

Connaissant la taille de l'oligonucléotide et sa séquence en bases nucléiques, il est possible de prédire ses propriétés pharmacocinétiques et physico-chimiques. Ces propriétés sont fondamentales dans la réussite de la thérapie.

IV. CONCEPTION ET SYNTHÈSE D'OLIGONUCLEOTIDES THERAPEUTIQUES

IV.1. Cahier des charges

IV.1.a. Administration *in vivo* d'oligonucléotides thérapeutiques

L'administration des oligonucléotides *in vivo* peut se faire par des administrations locales (gouttes dans les yeux, spray nasal, etc.). Dans ce cas, il y a peu de barrières biologiques à franchir et peu de difficultés pharmacocinétiques et l'oligonucléotide peut alors être administré seul.¹³⁶ Cependant, beaucoup de tissus cibles (foie, rate, etc.) sont soit confinés localement soit peu accessibles si bien qu'une administration systémique (générale) est nécessaire (Figure 40).

¹³¹ C. Wilson, A. D. Keefe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 607-614.

¹³² J. Scheiermann, D. M. Klinman, *Vaccine* **2014**, *32*, 6377-6389.

¹³³ C. Bode, G. Zhao, F. Steinhagen, T. Kinjo, D. M. Klinman, *Expert Rev. Vaccines* **2011**, *10*, 499-511.

¹³⁴ M. R. Weihrauch, H. Richly, M. S. von Bergwelt-Baildon, H. Jiro Becker, M. Schmidt, U. T. Hacker, A. Shimabukuro-Vornhagen, U. Holtick, B. Nokay, M. Schroff, B. Wittig, M. E. Scheulen, *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 146-156.

¹³⁵ T. E. Witzig, G. A. Wiseman, M. J. Maurer, T. M. Habermann, I. N. M. Micallef, G. S. Nowakowski, S. M. Ansell, J. P. Colgan, D. J. Inwards, L. F. Porrata, B. K. Link, C. S. Zent, P. B. Johnston, T. D. Shanafelt, C. Allmer, Y. W. Asmann, M. Gupta, Z. K. Ballas, B. J. Smith, G. J. Weiner, *Am. J. Hematol.* **2013**, *88*, 588-593.

¹³⁶ J. Zhou, K. T. Shum, J. C. Burnett, J. J. Rossi, *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 85-107.

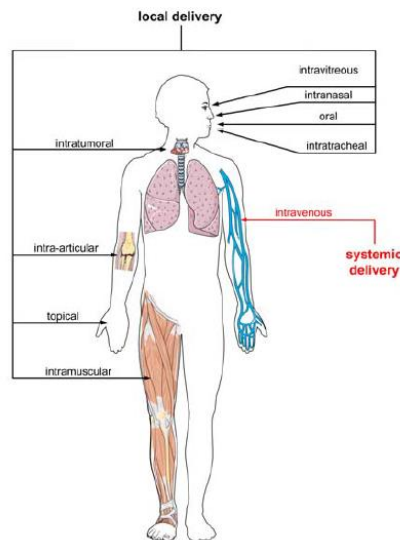


Figure 40: Différents modes d'administration *in vivo*.⁹⁴

Exploiter tout le potentiel thérapeutique des oligonucléotides demande une étude détaillée des barrières biologiques existantes entre le site d'administration initial et le site d'action à l'intérieur des cellules.¹³⁷ Pour atteindre sa cible après une administration systémique, un parcours semé d'embûches attend l'oligonucléotide thérapeutique.¹³⁸ Par exemple, dans le cas d'une administration dans la circulation sanguine (Figure 41 (1)), l'oligonucléotide est exposé à des composants du plasma (nucléases comme des RNases) qui peuvent le dégrader. En outre, ils doivent supporter l'excrétion rénale et la clairance du système réticulo-endothélial afin d'atteindre le tissu cible. Pour atteindre ensuite les cellules cibles, ils doivent surmonter la barrière vasculaire grâce à un processus d'extravasation (Figure 41 (2)), éviter le drainage lymphatique et pénétrer l'interstice soit par convection soit par diffusion. Ils doivent ensuite se lier à des récepteurs cellulaires et être transportés dans le cytoplasme par un processus d'endocytose commandé par un récepteur (Figure 41 (3)). A l'intérieur des cellules, les oligonucléotides doivent enfin s'échapper de l'endosome (Figure 41 (4)) afin d'être libérés dans le cytoplasme pour atteindre leurs cibles. Dans le cas où la cible est l'ADN, l'oligonucléotide doit encore pénétrer à l'intérieur du noyau cellulaire. Cela pose des difficultés supplémentaires (pénétration dans le noyau). L'ensemble de ces différentes barrières biologiques freinent l'emploi thérapeutique des oligonucléotides.

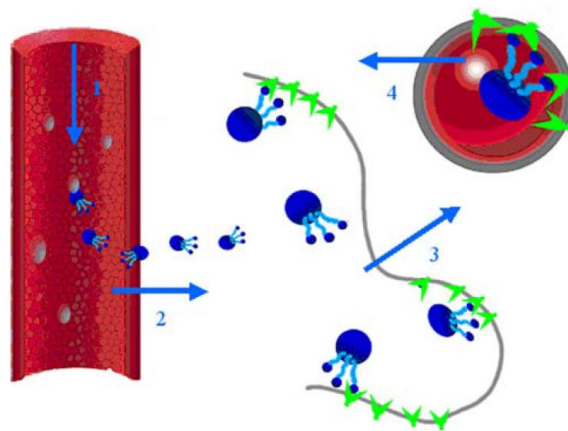


Figure 41 : Challenges dans la délivrance des oligonucléotides *in vivo*.¹³⁸

¹³⁷ R. Juliano, J. Bauman, H. Kang, X. Ming, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 686-695.

¹³⁸ B. Yu, X. Zhao, L. J. Lee, R. J. Lee, *AAPS J.* **2009**, *11*, 195-203.

De fait, le succès des oligonucléotides dans des applications thérapeutiques dépend davantage de leur capacité à atteindre leur cible que de leur efficacité propre.

IV.1.b. Propriétés des oligonucléotides thérapeutiques

Ainsi, pour leurs utilisations dans des thérapies, les oligonucléotides doivent respecter certaines contraintes concernant leurs propriétés pharmacocinétiques (étude du devenir d'une substance active dans l'organisme après l'administration) et pharmacodynamiques (action de cette substance sur l'organisme). Il leur faudra entre autres être solubles et stables en milieu physiologique, résister à la clairance (par les reins ou via les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial), pénétrer les membranes cellulaires hydrophobes et diffuser dans la cellule jusqu'à leur cible. Or, les oligonucléotides sont de grosses molécules polaires qui ne répondent pas aux règles empiriques de Lipinsky¹³⁹ statuant que les médicaments efficaces ont une masse moléculaire inférieure à 500 g/mol et sont solubles dans des solvants polaires et apolaires.¹⁴⁰

L'utilisation *in vivo* des oligonucléotides thérapeutiques nécessite par conséquent une réflexion approfondie sur leurs propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, sur leur biodistribution, sur leur capacité à pénétrer les tissus et les cellules, etc.^{141,142,143,144}

IV.2. Pourquoi et comment modifier les oligonucléotides naturels ?

IV.2.a. Intérêts de la modification des oligonucléotides

Un oligonucléotide naturel mis dans un environnement cellulaire sera dégradé rapidement par les nucléases (coupant la position 3' ou le lien internucléosidique) dans le plasma et les tissus. Son temps de demi-vie *in vivo* est très court et sa clairance est importante. De plus, la pénétration des membranes cellulaires hydrophobes et la diffusion de ces polyanions à l'intérieur de la cellule sont difficiles.

Afin d'améliorer les propriétés des oligonucléotides naturels, la solution la plus simple est la modification chimique des oligonucléotides naturels.

IV.2.b. Modifications envisageables

Etant donné la structure des oligonucléotides, des modifications peuvent être envisagées à différents niveaux (Figure 42) : base nucléique, ribose, liaison phosphodiester, etc.^{145,146} Ces

¹³⁹ C. A. Lipinski, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **2000**, *44*, 235-249.

¹⁴⁰ C. M. Greene, *MicroRNAs and Other Non-Coding RNAs in Inflammation (Progress in Inflammation Research)*, Springer, **2015**, 237 p.

¹⁴¹ C. Laxton, K. Brady, S. Moshos, P. Turnpenny, J. Rawal, D. C. Pryde, B. Sidders, R. Corbau, C. Pickford, E. J. Murray, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 3105-3114.

¹⁴² R. Shimizu, M. Kitade, T. Kobayashi, S. I. Hori, A. Watanabe, *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **2015**, *42*, 67-77.

¹⁴³ R. S. Geary, E. Wancewicz, J. Matson, M. Pearce, A. Siwkowski, E. Swayze, F. Bennett, *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 284-291.

¹⁴⁴ R. Z. Yu, H. Zhang, R. S. Geary, M. Graham, L. Masarjian, K. Lemonidis, R. Crooke, N. M. Dean, A. A. Levin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 388-395.

¹⁴⁵ A. J. A. Cobb, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3260-3275.

¹⁴⁶ G. F. Deleavey, M. J. Damha, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 937-954.

modifications vont influencer fortement sur la résistance aux nucléases de ces oligonucléotides mais aussi sur les capacités d'hybridation.¹⁴⁷

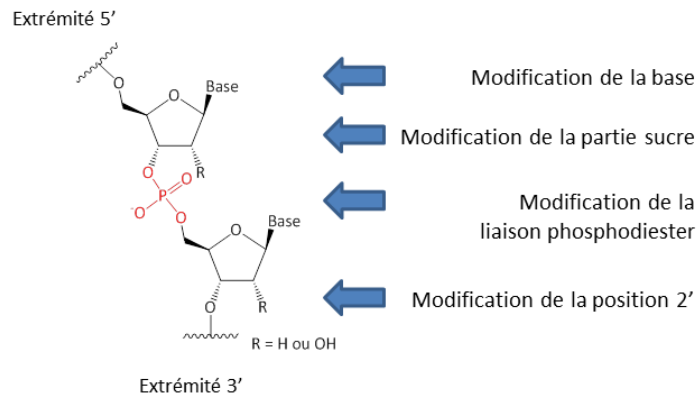


Figure 42 : Différentes modifications des oligonucléotides naturels.

Ainsi, le KynamroTM est un oligonucléotide modifié approuvé par la FDA.¹⁴⁸ Il correspond à la séquence 5'-GCCUCAGTCTGCTTCGCACC-3' (les résidus soulignés sont des nucléosides substitués en position 2' par des groupements méthoxyéthyles, les autres résidus sont des 2'-désoxynucléosides et les bases nucléiques C et U sont modifiées par des groupes méthyles en position 5). Ses propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques ont été étudiées dans des études précliniques et cliniques. Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris, le rat, le singe et l'Homme. Sa demi-vie d'élimination du plasma et des tissus terminaux est d'environ 30 jours et il atteint sa concentration stationnaire dans les tissus après 4 à 6 mois d'injections hebdomadaires.

IV.2.c. Modes d'action des RNases H

Avant de détailler des exemples de modification des oligonucléotides, il faut nous intéresser au mode de fonctionnement des RNases H. En effet, le mode d'action le plus efficace des oligonucléotides antisens passe par une dégradation de l'ARN cible par les RNases H. Or, la modification des oligonucléotides affecte leur capacité à déclencher la dégradation de l'ARN cible par les RNases H.

Les RNases H sont une famille d'endonucléases qui reconnaissent spécifiquement des duplexes ADN-ARN et qui clivent le brin d'ARN de ce duplexe, ce qui libère un 3'-OH et un 5'-phosphate.¹⁴⁹ Le terme « ribonucléase H » indique que le substrat doit être hybridé pour qu'il y ait dégradation. La spécificité des RNases H pour un duplex hybride ADN-ARN est excellente si bien que des doubles brins d'ADN ou d'ARN ne sont pas reconnus. Par ailleurs, un cation métallique divalent est nécessaire à son activité.

Il est fondamental de comprendre le principe de reconnaissance du duplexe hybride ADN-ARN.¹⁵⁰ Un modèle¹⁴⁹ suggère que l'enzyme reconnaît un hétéroduplex de forme A (conformation C_{3'}-endo pour les riboses des deux brins). L'enzyme interagit dans le sillon mineur du duplex et reconnaît

¹⁴⁷ S. M. Freier, K. H. Altmann, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *25*, 4429-4443.

¹⁴⁸ R. S. Geary, B. F. Baker, S. T. Crooke, *Clin. Pharmacokinet.* **2015**, *54*, 133-146.

¹⁴⁹ S. T. Crooke, B. Lebleu, *Antisense Research and Applications*, CRC Press **1993**, 624 p.

¹⁵⁰ H. Nakamura, Y. Oda, S. Iway, H. Inoue, E. Ohtsuka, S. Kanaya, S. Kimura, C. Katsuda, K. Katayanagi, K. Morikawa, H. Miyashiro, M. Ikehara, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 11535-11539.

le 2'-OH du brin d'ARN. La présence d'autres groupes 2'-OH dans le duplex créerait une gêne stérique. Cette gêne stérique apparaîtrait aussi avec des brins d'ADN modifiés en position 2'. L'absence de reconnaissance d'un brin d'ADN substitué en position 2' peut également provenir de changements conformationnels. Un double brin d'ADN n'est pas reconnu car le sillon mineur de l'ADN B est plus petit et car le 2'-OH nécessaire à la reconnaissance est absent.

On pourra retenir que la majorité des oligonucléotides modifiés pour être résistants aux nucléases ne permettent pas une activation de la voie faisant intervenir les RNases H.

IV.2.d. Méthodes de synthèse des oligonucléotides

La condition indispensable à l'utilisation des oligonucléotides comme agents thérapeutiques est la possibilité de les synthétiser en laboratoire. Ces méthodes de synthèse se doivent d'être les plus efficaces, les plus rapides et les moins coûteuses possibles et ce en fournissant de grandes quantités d'oligonucléotides.

IV.2.d.i. Présentation des méthodes de synthèse

Historiquement, les premières synthèses d'oligonucléotides se faisaient en phase homogène selon les méthodes phosphodiester, phosphotriester ou phosphite triester.¹⁵¹ Lors de ces synthèses, l'oligonucléotide en préparation doit être isolé à chaque étape si bien que ces méthodes sont très coûteuses en temps et conduisent à de très faibles rendements. Nous ne les détaillerons pas ici.

De nos jours, la synthèse des oligonucléotides se fait très majoritairement de manière automatisée en phase solide. Cette méthode présente l'avantage de permettre une purification rapide du produit. Une conversion totale (ou quasi-totale) peut être atteinte en utilisant un excès de réactifs. Tandis que les enzymes synthétisent l'ADN ou l'ARN de l'extrémité 5' à l'extrémité 3', la synthèse en phase solide se fait de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' (extrémité moins encombrée donc plus réactive). Elle nécessite la protection des bases nucléiques, du phosphate et de l'extrémité 5' du nucléotide ajouté. Deux grandes méthodes de synthèse en phase solide existent.

IV.2.d.ii. Méthode aux phosphoramidites

La technique a pour point de départ un support solide sur lequel est greffé le premier nucléotide. De nombreux supports existent (silice, cellulose, etc.).¹⁵² Le plus utilisé est à base de verre à porosité contrôlée (CPG pour *Controlled Porosity Glass* en anglais). La porosité sera choisie en fonction de la taille de l'oligonucléotide à synthétiser. Le verre est fonctionnalisé en faisant réagir les résidus hydroxyles de sa surface avec le 3-aminopropyltriéthoxysilane. Le premier nucléoside est ensuite introduit par formation d'une liaison ester (Figure 43).

¹⁵¹ C. B. Reese, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8893-8920.

¹⁵² S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223-2311.

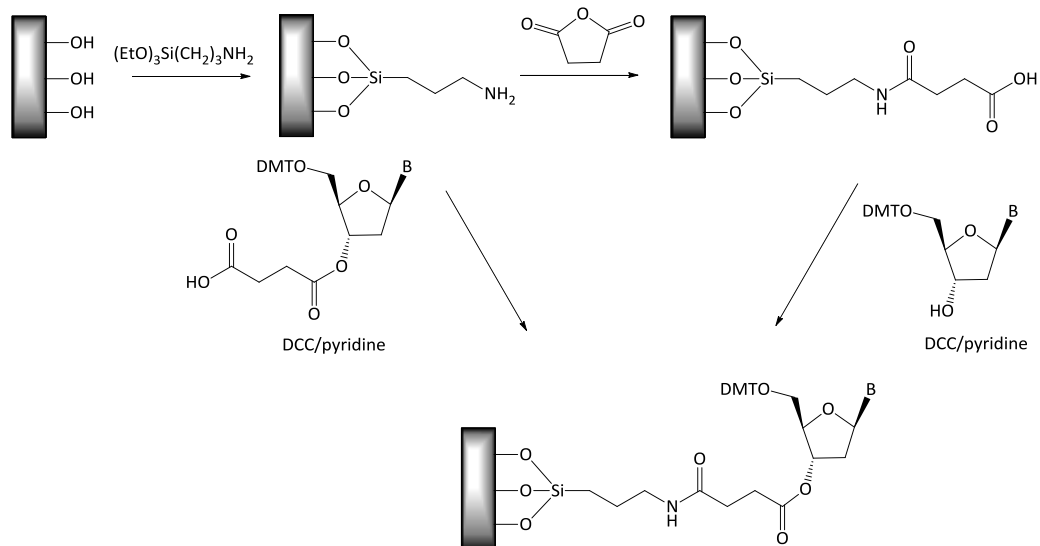


Figure 43 : Préparation du support.¹⁵²

Cette méthode nécessite un nucléoside réactif. Le choix s'est porté sur les dérivés 3'-O-(*N,N*-diisopropylphosphoramidite). Les autres groupements fonctionnels (hydroxyle, base nucléique) doivent être protégés. La Figure 44 présente les groupements protecteurs utilisés classiquement pour l'hydroxyle en position 5' et pour les bases nucléiques.

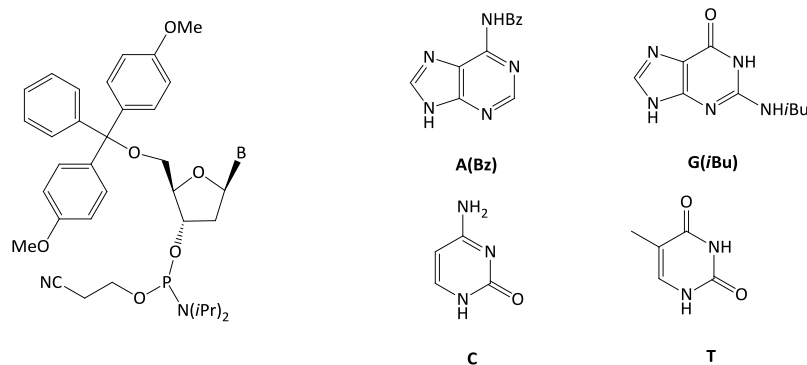


Figure 44 : Structure des monomères phosphoramidite prêts à être incorporés.

La synthèse de l'oligonucléotide se fait avec l'addition des nucléotides un à un jusqu'à obtenir la séquence désirée. Pour chaque addition d'un nucléotide, le même cycle se répète (Figure 45) :

- déprotection de l'hydroxyle en position 5' en milieu acide ;
- couplage pour former la liaison P-O ;
- coiffage qui consiste à acétyler des groupements hydroxyle en position 5' des oligonucléotides n'ayant pas réagi ce qui permet leur élimination ;
- oxydation du phosphite triester en phosphate triester.

Le cycle recommence jusqu'à obtention de la séquence désirée.

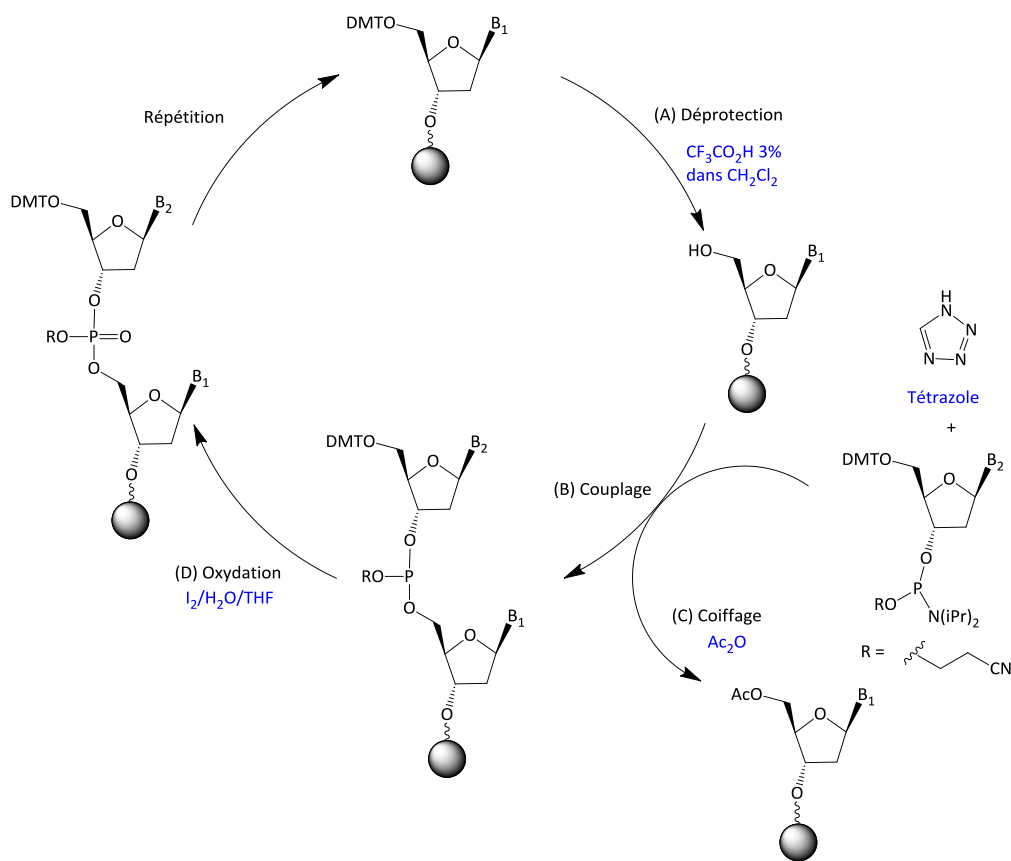


Figure 45 : Principe de la méthode aux phosphoramidites.¹⁵³

Une fois la séquence obtenue, il reste à déprotéger les groupes phosphate (protégés par des groupes cyanoéthyle) et les bases nucléiques (protégées par des groupes benzoyle ou isobutyle) et à décrocher l'oligonucléotide du support. Ce dernier est enfin purifié par HPLC (chromatographie en phase liquide haute performance).

IV.2.d.iii. Méthode aux H-phosphonate

Cette méthode, apparue en 1986,¹⁵⁴ utilise le fait qu'un nucléoside 3'-H-phosphonate peut être couplé après activation (par exemple avec le chlorure de pivaloyle) pour donner le H-phosphonate diester. Des conditions oxydantes mènent ensuite à la formation de la liaison phosphodiester. L'avantage de cette méthode est qu'en raison de la stabilité de la liaison 3-H-phosphonate durant la synthèse, une seule oxydation à la fin est suffisante.

¹⁵³ S. Roy, M. Caruthers, *Molecules* **2013**, *118*, 14268-14284.

¹⁵⁴ C. B. Reese, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3851-3868.

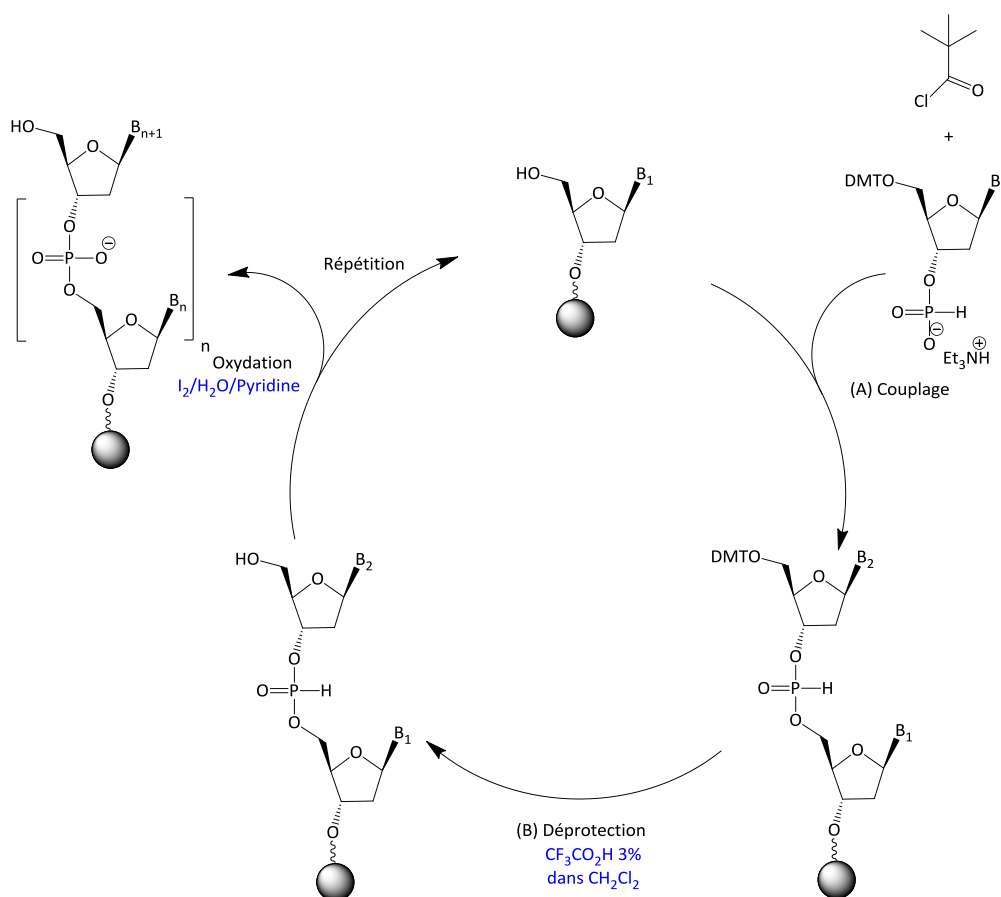


Figure 46 : Principe de la méthode aux H-phosphonate.¹⁵³

Différentes voies d'accès au composé protégé 3'-H-phosphonate-2'-désoxyribonucléoside ont été développées. Elles reposent par exemple sur l'utilisation du 2-chloro-4*H*-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one (Figure 47).

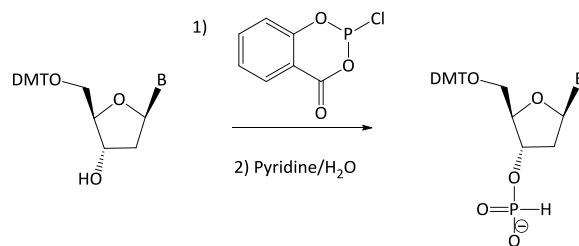


Figure 47 : Voies d'accès au 3'-H-phosphonate-2'-désoxyribonucléoside.¹⁵⁴

IV.2.d.iv. Inconvénients de ces méthodes de synthèse

La synthèse sur support solide présente certains inconvénients comme une échelle limitée, la nécessité d'avoir des étapes avec d'excellents rendements (> 98%) et l'utilisation de larges excès de réactifs. Pour remédier à ces problèmes, il existe des techniques de synthèse en phase liquide, en utilisant un support soluble à chaîne alkyle par exemple.¹⁵⁵

¹⁵⁵ S. Kim, M. Matsumoto, K. Chiba, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 8615-8620.

IV.3. Oligonucléotides modifiés : exemples

La littérature fournit de nombreux exemples de modifications des oligonucléotides. Pour l'instant, aucun oligonucléotide modifié ne répond à l'ensemble des critères vus précédemment.

IV.3.a. Les oligonucléotides antisens de première génération

Au pH physiologique, la liaison phosphodiester est chargée négativement ($pK_a \approx 2$) et est clivée facilement par des endonucléases et des exonucléases du sérum physiologique et des cellules. Afin de pallier cette faiblesse, la solution la plus simple consiste à remplacer cette liaison par un lien phosphorothioate PS ou méthylphosphonate MP (Figure 48). Ces modifications de la liaison phosphodiester présentent l'intérêt de permettre l'intervention des RNases H.

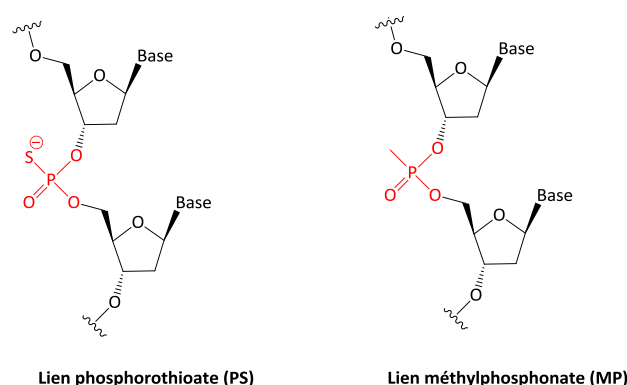


Figure 48 : Oligonucléotides modifiés de première génération.

IV.3.a.i. Les oligonucléotides à liaison phosphorothioate (PS)

Dans les oligonucléotides à liaison phosphorothioate, un atome d'oxygène lié au phosphore est remplacé par un soufre.¹⁵⁶ Le pK_a du groupement phosphorothioate étant inférieur à celui du phosphate, les oligonucléotides PS sont chargés négativement dans le milieu physiologique. Malgré des caractéristiques (longueur de liaison, rayon de Van Der Waals...) proches de ceux des oligonucléotides non modifiés, il a été montré que la demi-vie d'un oligonucléotide PS dans du sérum humain est environ dix fois plus longue que celle d'un oligonucléotide naturel.¹⁵⁷ En plus de cette faible sensibilité aux nucléases, les oligonucléotides PS présentent d'autres propriétés intéressantes : appariement avec un brin d'acide nucléique complémentaire selon Watson-Crick, bonnes propriétés pharmacocinétiques, etc.⁵⁴ Ils sont éliminés par les reins mais peu rapidement en raison de leurs interactions avec des protéines du sérum. Par ailleurs, les oligonucléotides à liaison phosphorothioate activent la dégradation de l'ARN cible par les RNases H.

On notera que cette liaison phosphorothioate apporte de nouveaux centres chiraux. Il a été montré qu'un des diastéréoisomères (S_p) est moins sujet à la dégradation mais a moins d'affinité avec sa cible tandis que l'autre diastéréoisomère (R_p), plus sensible aux nucléases, se lie davantage avec sa cible.¹⁵⁸ Il est courant de préparer les oligonucléotides PS sous forme de mélanges de diastéréoisomères car chaque oligonucléotide contient plusieurs liaisons résistantes si bien que la stabilité générale est augmentée.¹⁴⁶

¹⁵⁶ F. Eckstein, *Antisens Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10*, 117-121.

¹⁵⁷ J. M. Campbell, T. A. Bacon, E. J. Wickstrom, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1990**, *20*, 259-267.

¹⁵⁸ F. Eckstein, *Biochimie* **2001**, *84*, 841-848.

Les oligonucléotides PS présentent certains inconvénients :

- en raison de leur interaction avec certaines protéines (en particulier celles qui interagissent avec des polyanions), leur activité peut être diminuée. Cette interaction avec des protéines peut même résulter en une toxicité cellulaire.¹⁵⁹ Cependant, les essais cliniques sur l'Homme ont montré, qu'aux doses utilisées, ces effets secondaires sont souvent faibles. Cette capacité d'interaction avec les protéines peut même devenir intéressante pour les propriétés pharmacocinétiques.
- en comparaison avec les oligonucléotides non modifiés, les oligonucléotides PS présentent une affinité légèrement inférieure avec leur cible.¹⁶⁰ Cela est compensé par une spécificité d'hybridation plus grande.

Cependant, leur facilité de préparation aidant, les oligonucléotides PS ont été très étudiés contre des maladies multiples.¹⁶¹ Dès 1987, ils ont été exploités pour inhiber l'expression du VIH.¹⁶² Le VitraveneTM et le KynamroTM approuvés par la FDA contiennent d'ailleurs le lien phosphorothioate.

IV.3.a.ii. Les oligonucléotides à liaison méthylphosphonate (MP)

L'étude de la liaison méthylphosphonate (Figure 48) a commencé à la fin des années 1970.^{163,164} Il s'agit d'une liaison neutre très stable vis-à-vis des nucléases, apportant un nouveau centre chiral.¹⁶⁵ Malheureusement, bien qu'il s'agisse d'une liaison neutre, les oligonucléotides à MP ne pénètrent pas facilement les cellules et restent dans les endosomes. Cette pénétration cellulaire se fait par endocytose en phase fluide ou par adsorption c'est-à-dire par des mécanismes différents de ceux adoptés par les oligonucléotides à liaison phosphodiester.¹⁶⁶

Cette modification apporte plusieurs inconvénients dont une mauvaise capacité d'hybridation à la cible. Ce défaut est amoindri en utilisant des molécules optiquement pures¹⁶⁷ mais cette solution est trop chère pour être envisageable à grande échelle. Un autre défaut est la faible solubilité en milieu physiologique des oligonucléotides MP.¹⁶⁸

IV.3.b. Les oligonucléotides antisens de seconde génération

IV.3.b.i. Influence du substituent en position 2' du ribose

De nombreuses modifications de la partie ribose des oligonucléotides ont été envisagées pour augmenter leur stabilité vis-à-vis des nucléases et leur capacité d'hybridation. Les modifications les plus prometteuses de la partie sucre impliquent la position 2' qui est déterminante dans la conformation du ribose (Figure 49). Un substituant électronégatif en position 2' déplace l'équilibre

¹⁵⁹ X. H. Liang, H. Sun, W. Shen, S. T. Crooke, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 2927-2945.

¹⁶⁰ S. M. A. Rahman, T. Baba, T. Kodama, M. A. Islam, S. Obika, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4098-4102.

¹⁶¹ T. Iannitti, J. C. Morales-Medina, B. Palmieri, *Curr. Drug Targets* **2014**, *15*, 1-11.

¹⁶² M. Matsukura, K. Shinozuka, G. Zon, H. Mitsuya, M. Reitz, J. S. Cohen, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7706-7710.

¹⁶³ P. S. Miller, J. Yano, E. Yano, C. Carroll, K. Jayaraman, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry* **1979**, *8*, 5134-5143.

¹⁶⁴ P. S. Miller, K. B. McParland, K. Jayaraman, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1874-1880.

¹⁶⁵ P. S. Miller, R. A. Cassidy, T. Hamma, N. S. Kondo, *Pharmacol. Ther.* **2000**, *85*, 159-163.

¹⁶⁶ Y. Shoji, S. Akhtar, A. Periasamy, B. Herman, R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5543-5550.

¹⁶⁷ M. A. Reynolds, R. I. Hogrefe, J. A. Jaeger, D. A. Schwartz, T. A. Riley, W. B. Marvin, W. J. Daily, M. M. Vaghefi, T. A. Beck, S. K. Knowles, R. E. Klem, L. J. Arnold, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4584-4591.

¹⁶⁸ Z. J. Lesnikowski, *Bioorg. Chem.* **1994**, *22*, 128-139.

conformationnel vers la conformation C₃'-endo, plus susceptible de se lier à l'ARN. Par conséquent, plus le substituant est électronégatif et plus l'affinité avec un ARN complémentaire est grande.¹⁶⁹

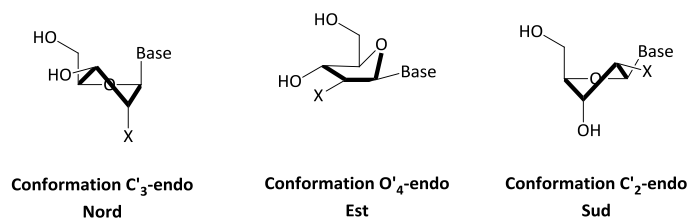


Figure 49 : Quelques conformations remarquables du ribose.

De nombreuses modifications^{146,170} en position 2' ont été décrites dans la littérature. Un premier exemple concerne les 2'-désoxy-2'-fluoro oligonucléotides qui forment des duplexes stables mais qui ne sont pas assez résistants aux nucléases pour des applications *in vivo*. Un autre exemple est constitué par les 2'-désoxy-2'-amino oligonucléotides qui, en raison de la plus faible électro-négativité de l'azote, adoptent majoritairement la conformation sud et qui se lient donc moins avec l'acide nucléique complémentaire.¹⁶⁹ Les 2'-O-alkyl oligonucléotides permettent aussi la formation de duplexes stables. En raison de la gêne stérique et de la perturbation de la structure au niveau du petit sillon, la stabilité des duplexes est plus importante avec de petits substituants. En revanche, des substituants plus gros augmentent la résistance aux nucléases.

Les 2'-O-alkyl oligonucléotides constituent la seconde génération d'oligonucléotides antisens qui montrent une plus grande affinité pour leur cibles¹⁷¹ et qui sont moins toxiques que leurs prédécesseurs. Les 2'-O-méthyl et les 2'-O-méthoxyéthyl ribonucléotides ont été très étudiés (Figure 50). On peut de suite noter qu'aucun des oligonucléotides modifiés en position 2' ne permet la dégradation de l'ARN cible des RNases H.

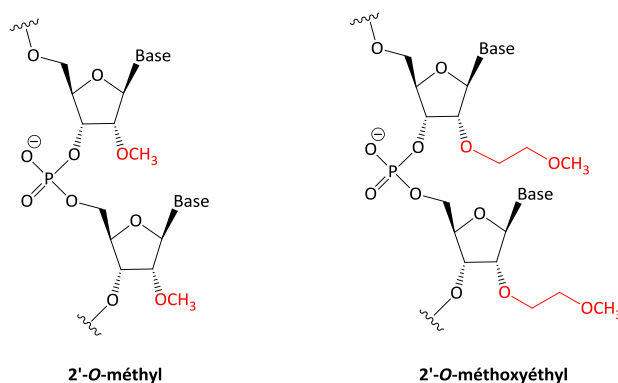


Figure 50 : Oligonucléotides modifiés de deuxième génération.

Ces modifications en position 2' peuvent être associées avec la modification de la liaison phosphodiester, comme c'est le cas pour la KynamroTM.

¹⁶⁹ M. Gallo, J. M. Montserrat, A. M. Iribarren, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, *36*, 143-151.

¹⁷⁰ S. Verma, F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 99-134.

¹⁷¹ V. Tereshko, S. Portmann, E. C. Tay, P. Martin, F. Natt, K. H. Altmann, M. Egli, *Biochemistry* **1998**, *37*, 10626-10634.

IV.3.b.ii. Les 2'-O-méthyl oligonucléotides

Les 2'-O-méthyl oligonucléotides sont parmi les modifications les plus répandues. Cette modification augmente l'affinité pour l'ARN complémentaire¹⁷² et la résistance aux nucléases.¹⁷³ Elle permet de diminuer les effets secondaires en réduisant la stimulation du système immunitaire.¹⁷⁴ La conformation nord (ressemblant à la conformation de l'ARN) est préférée si bien que les 2'-O-méthyl oligonucléotides forment des duplexes de type A.¹⁷⁵ Par conséquent, cette modification est particulièrement intéressante pour des analogues de siRNA. D'autres applications thérapeutiques sont envisageables. Par exemple, un 2'-O-méthyl aptamère de 23 nucléotides de long, en se liant au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) avec une constante d'affinité de 2 nM inhibe l'activité de ce dernier. Cet aptamère, particulièrement stable (aucune dégradation constatée après 96 heures dans du plasma à 37°C ou après un passage dans un autoclave à 125°C) est un potentiel agent anti-angiogénèse.¹⁷⁶ Une autre application concerne un 2'-O-méthyl oligonucléotide permettant la correction d'un épissage aberrant d'un pré-ARN_m muté de la β-globine.¹⁷⁷

IV.3.b.iii. Les 2'-O-méthoxyéthyl oligonucléotides (MOE)

Cette modification des oligonucléotides augmente leur stabilité en présence de nucléases dans le plasma et les tissus. Leur affinité pour leur cible est également améliorée. En effet, les riboses de ces oligonucléotides adoptent une conformation nord et sont donc susceptibles de se lier avec une forte affinité à un ARN complémentaire. Cette modification facilite aussi la pénétration cellulaire et l'absorption intestinale tout en diminuant la toxicité et la réponse du système immunitaire.¹⁷⁸ Les oligonucléotides modifiés en position 2' par des groupes méthoxyéthyl se lient facilement à des protéines et ont donc un long temps de circulation dans l'organisme. Cependant, à hautes doses, la capacité de fixation à des protéines est dépassée et une excrétion rénale rapide intervient. Comme pour les autres oligonucléotides, la pénétration des tissus se fait principalement au niveau des reins et du foie.¹⁷⁹

Les utilisations de ces oligonucléotides modifiés en tant qu'agents thérapeutiques sont multiples. Par exemple, en ciblant l'ARN_m d'ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), un de ces oligonucléotides peut inhiber la traduction et ce, sans faire intervenir la dégradation par les RNases H.¹⁸⁰

Cette modification est souvent associée au remplacement de la liaison phosphodiester par un lien phosphorothioate et conduit à des composés ayant de très bonnes propriétés.^{181,182}

¹⁷² M. Majlessi, N. C. Nelson, M. M. Becker, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2224-2229.

¹⁷³ B. S. Sproat, A. I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, U. Ryder, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3373-3386.

¹⁷⁴ K. A. Whitehead, J. E. Dahlman, R. S. Langer, D. G. Anderson, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 77-96.

¹⁷⁵ T. Nishizaki, S. Iwai, E. Ohtsuka, H. Nakamura, *Biochemistry* **1997**, *36*, 2577-2585

¹⁷⁶ P. E. Burmeister, S. D. Lewis, R. F. Silva, J. R. Preiss, L. R. Horwitz, P. S. Pendergrast, T. G. McCauley, J. C. Kurz, D. M. Epstein, C. Wilson, A. D. Keefe, *Chem. Biol.* **2012**, *12*, 25-33.

¹⁷⁷ H. Sierakowska, M. J. Sambade, S. Agrawal, R. Kole, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 12840-12844.

¹⁷⁸ M. Teplova, G. Minasov, V. Tereshko, G. B. Inamati, P. D. Cook, M. Manoharan, M. Egli, *Nature Struct. Biol.* **1999**, *6*, 535-539.

¹⁷⁹ R. Z. Yu, T. W. Kim, A. Hong, T. A. Watanabe, H. J. Gaus, R. S. Geary, *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 460-468.

¹⁸⁰ B. F. Baker, S. S. Lot, T. P. Condon, S. Cheng-Flournoy, E. A. Lesnik, H. M. Sasmor, C. F. Bennett, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11994-12000.

¹⁸¹ R. S. Geary, T. A. Watanabe, L. Truong, S. Freier, E. A. Lesnik, N. B. Sioufi, H. Sasmor, M. Manoharan, A. A. Levin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 890-897.

IV.3.c. Les oligonucléotides antisens de troisième génération

Les résultats décrits précédemment restant insuffisants, des oligonucléotides antisens de troisième génération ont été développés. Nous allons nous intéresser aux trois plus grandes familles (Figure 51).

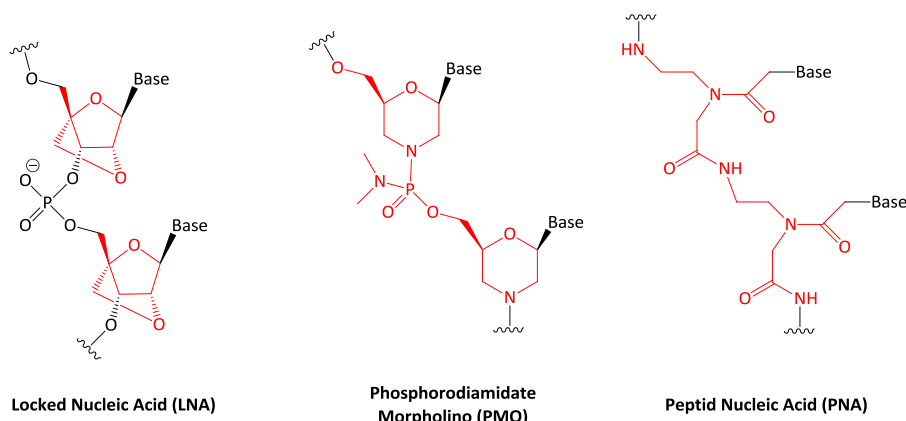


Figure 51 : Oligonucléotides modifiés de troisième génération.

IV.3.c.i. Les Locked Nucleic Acid (LNA)

Les Locked Nucleic Acid (LNA) contiennent un cycle ribose qui est bloqué dans une conformation C'_3 -endo par un pont méthylène entre l'oxygène en position 2' et le carbone C_4' (Figure 51). Les propriétés des LNA sont particulièrement intéressantes en vue d'applications thérapeutiques. Cette conformation bloquée favorise la fixation des LNA avec des acides nucléiques complémentaires. Ils sont très stables seuls ou hybridés à un ARN ou à un ADN *in vivo* et *in vitro*.¹⁸³ Peu toxiques à faibles dosages, ils pénètrent principalement les reins et sont éliminés dans l'urine. Leur profil pharmacocinétique est similaire à celui des oligonucléotides standards.¹⁸⁴ Des études ont montré que par rapport aux oligonucléotides modifiés en position 2' par des groupements méthoxyéthyle, les LNA ont un meilleur potentiel thérapeutique mais une forte hépatotoxicité.¹⁸⁵

Comme les oligonucléotides modifiés en position 2', les LNA ne permettent pas la dégradation de l'ARN cible par les RNases H. Leur forte affinité pour des ARN leur permet des applications en tant qu'agent antisens,¹⁸⁶ par exemple dans l'inhibition de la croissance de tumeurs.¹⁸⁴ Cette forte affinité pour des ARN associée à la reconnaissance des LNA double brin par le complexe RISC leur permet également d'être de bons agents siRNA.¹⁸⁷ Des thérapies les utilisant comme aptamères,¹⁸⁸ comme agents antigènes¹⁸⁷ ou dans la manipulation d'épissage¹⁸⁷ ont aussi été mises au point.

¹⁸² S. Henry, K. Stecker, D. Brooks, D. Monteih, B. Conklin, C. F. Bennett, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, 292, 468-479.

¹⁸³ S. K. Singh, J. Wengel, *Chem. Commun.* **1998**, 1247-1248.

¹⁸⁴ K. Fluiter, A. L. M. A. ten Asbroek, M. B. de Wissel, M. E. Jakobs, M. Wissenbach, H. Olsson, O. Olsen, H. Oerum, F. Baas, *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 953-962.

¹⁸⁵ E. E. Swayze, A. M. Siwkowski, E. V. Wancewicz, M. T. Migawa, T. K. Wyrzykiewicz, G. Hung, B. P. Monia, C. F. Bennett, *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 687-700.

¹⁸⁶ D. A. Braasch, Y. Liu, D. R. Corey, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 5160-5167.

¹⁸⁷ K. E. Lundin, T. Højland, B. R. Hansen, R. Persson, J. B. Bramsen, J. Kjems, T. Koch, J. Wengel, C. I. E. Smith, *Adv. Genet.* **2013**, 82, 47-107.

¹⁸⁸ J. Barciszewski, M. Medgaard, T. Koch, J. Kurreck, V. A. Erdmann, *Methods Mol Biol.* **2009**, 535, 165-186.

Des modifications chimiques des LNA conservant souvent leur grande affinité pour les acides nucléiques complémentaires sont rapportées dans la littérature.^{189,190,191} Par ailleurs, les LNA font partie d'une famille plus large d'oligonucléotides modifiés bicycliques (BNA pour *bicyclic nucleic acids*) qui sont susceptibles d'avoir un potentiel thérapeutique intéressant.⁵⁶

IV.3.c.ii. Les Morpholino Phosphoramidate (PMO)

Les oligonucléotides Morpholino (PMO pour *Phosphoramidate Morpholino*) ont été découverts à la fin des années 1990. Le ribose est remplacé par un cycle morpholine et les liaisons phosphodiester sont substituées par des liaisons phosphoramidate (Figure 51). Les PMO, solubles en milieu physiologique, sont particulièrement stables vis-à-vis des nucléases¹⁹² et ont la même cible que l'oligonucléotide non modifié ayant la même séquence de bases nucléiques. Leur affinité pour leur cible est plutôt forte. En revanche, la neutralité de cette molécule fait qu'elle interagit peu avec les protéines de l'organisme et qu'elle pénètre mal dans les cellules.⁴²

De nouveau, cette modification ne permet pas la dégradation de l'ARN cible par les RNases H¹⁹³ dans des thérapies antisens et les PMO pourront seulement bloquer stériquement l'expression des gènes. Bien que peu développés, ils constituent de très bons agents antisens ou anti-miR qui ont montré leur efficacité chez le poisson zèbre (organisme modèle).¹⁴⁶ Ils permettent également de moduler l'épissage de pré-ARN_m.¹⁹⁴

IV.3.c.iii. Les Acides Nucléiques Peptidiques (PNA)

Parmi les centaines d'acides nucléiques modifiés existant dans la littérature, les acides nucléiques peptidiques (PNA pour *peptide nucleic acids*) sont parmi ceux qui offrent les meilleures propriétés en chimie, en biologie moléculaire, en diagnostic, en thérapie, en tant que biosenseurs ou en nanotechnologies.¹⁹⁵ On compte près de 6000 références sur les PNA sur Web of ScienceTM en mai 2015. Pour les PNA, la liaison phosphodiester est remplacée par un pseudopeptide flexible de la *N*-(2-aminoéthyl)glycine et la base nucléique est attachée au squelette par un lien méthylèncarbone (Figure 51).¹⁹⁶ Malgré ces modifications importantes relativement aux oligonucléotides, les PNA (stables chimiquement) s'hybrident avec l'acide nucléique complémentaire avec une très grande affinité et une très grande spécificité. Ceci est permis par un espacement adéquat entre les bases nucléiques. Cet appariement se fait en suivant les règles d'appariement de Watson-Crick (Figure 53). On notera cependant que l'appariement d'un brin de PNA avec un brin d'ADN peut se faire de manière parallèle ou antiparallèle.¹⁹⁷ De plus, le PNA étant une molécule neutre, il n'y a pas de répulsion électrostatique lors de cet appariement.

¹⁸⁹ M. W. Johannsen, L. Crispino, M. C. Wamberg, N. Kalra, J. Wangel, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 243-252.

¹⁹⁰ C. Zhou, J. Chattopadhyaya, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3808-3832.

¹⁹¹ N. K. Andersen, B. A. Anderson, J. Wengel, P. J. Hrdlicka, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12690-12702.

¹⁹² J. Summerton, D. Weller, *Antisens Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 187-195.

¹⁹³ J. Summerton, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 141-158.

¹⁹⁴ L. Du, R. A. Gatti, *J. Immunol. Methods* **2011**, *365*, 1-7.

¹⁹⁵ A. Ray, B. Nordén, *FASEB J.* **2000**, *14*, 1041-1060.

¹⁹⁶ P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.

¹⁹⁷ A. Kiviniemi, M. Murtola, P. Ingman, P. Virta, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5153-5159.

De nombreuses études sur les PNA ont conduit à des résultats intéressants dans des thérapies contre le VIH²⁰⁷ ou contre le virus de l'hépatite B.²⁰⁸

Un certain nombre de modifications chimiques des PNA²⁰⁹ ont été entreprises et certaines modifient de manière intéressante leurs propriétés (comme leurs capacités de pénétration cellulaire, d'hybridation à un brin complémentaire d'acide nucléique²¹⁰). Par exemple, l'incorporation de chaînes latérales chargées composées d'acide aspartique ou de lysine modifient leur affinité pour l'ADN ou l'ARN, ce qui est intéressant pour des applications en thérapie antigène ou antisens.²¹¹

IV.3.d. Les gapmères

Beaucoup de ces modifications permettent d'augmenter l'affinité avec l'ARN_m mais ne permettent pas la dégradation de l'ARN cible par les RNases H. Par conséquent, des oligonucléotides avec chaque résidu modifié ne peuvent pas constituer de bons agents antisens (mais ils peuvent être très efficaces pour arrêter la traduction ou pour des modifications d'exons).

Les gapmères sont des oligonucléotides chimériques antisens qui contiennent un bloc central (ADN ou oligonucléotides PS) suffisamment long pour induire un clivage de l'ARN cible par les RNases H. Ce bloc est entouré de deux régions modifiées chimiquement permettant au gapmère de former un duplex stable avec sa cible. Ainsi, l'insertion de quelques résidus avec des liaisons phosphorothioate fournit des oligonucléotides qui permettent la dégradation de l'ARN cible par les RNases H tout en conservant les propriétés initiales (Figure 53).²¹² Des gapmères avec des LNA ont également été développés.²¹³

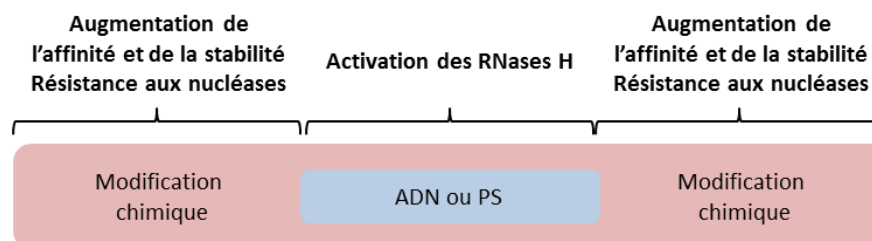


Figure 53 : Conception d'un *gapmère* c'est-à-dire un oligonucléotide antisens chimérique. Ce dernier contenant généralement un squelette phosphodiester, est formé de deux régions avec des riboses modifiés entourant une région centrale (ADN) qui permet la dégradation de l'ARN cible par les RNases H via une hybridation à l'ARN complémentaire.²¹⁴

IV.3.e. Résumé

Les propriétés de résistances aux nucléases et d'activation de la dégradation de l'ARN cible par les RNases H des principaux oligonucléotides modifiés sont résumés dans le Tableau 3.²¹⁵

²⁰⁷ V. N. Pandey, A. Upadhyay, B. Chaubey, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2009**, *9*, 975-989.

²⁰⁸ M. Robaczewska, R. Narayan, B. Seigner, O. Schorr, A. Thermet, A. J. Podhajska, C. Trepo, F. Zoulim, P. E. Nielsen, L. Cova, *J. Hepatol.* **2005**, *42*, 180-187.

²⁰⁹ E. Rozners, *J. Nucleic Acids* **2012**, ID 518162.

²¹⁰ A. Naberjee, V. A. Kumar, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4092-4101.

²¹¹ N. Tilani, S. De Costa, J. M. Heemstra, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2360-2363.

²¹² H. Kang, M. H. Fisher, D. Xu, Y. J. Miyamoto, A. Marchand, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 4411-4419.

²¹³ K. Fluiter, M. Frieden, J. Vreijling, C. Rosenbohm, M. B. De Wissel, S. M. Christensen, T. Koch, H. Ørum, F. Baas, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1104-1109.

²¹⁴ R. S. Geary, D. Norris, R. Yu, F. Bennett, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *In press*.

Oligonucléotide modifié	Résistance aux nucléases	Activation de la dégradation de l'ARN cible par les Rnases H
Phosphodiester	non	oui
Méthylphosphonate	oui	non
Phosphorothioate	oui	oui
ARN modifié en position 2'	oui	non
Phosphoramidite	oui	non
Morpholino	oui	non
Gapmères	oui	oui

Tableau 3 : Résumé des propriétés des principaux oligonucléotides modifiés.²¹⁵

IV.4. Comment administrer ces oligonucléotides ?

Les modifications chimiques vues précédemment permettent d'augmenter la durée de vie des oligonucléotides en milieu biologique et de diminuer la clairance. Cependant, les difficultés pour atteindre la cible ne sont pas encore résolues. La pleine exploitation du potentiel thérapeutiques des oligonucléotides nécessite la mise au point de méthodes de délivrance aux tissus et cellules cibles adéquates depuis le lieu d'administration. Le vecteur idéal doit être sans danger, efficace, utilisable à répétition et transférer l'oligonucléotide à sa cible tout en le protégeant de l'environnement intra ou extra cellulaire.

IV.4.a. Vectorisation par des méthodes physiques

Classiquement, les oligonucléotides pénètrent dans les cellules par endocytose. Cette endocytose peut être contournée en faisant pénétrer les oligonucléotides à l'intérieur des cellules via l'altération de la membrane plasmique cellulaire. Cette altération peut être faite :

- par électroporation.^{216,217,218} L'application d'un champ électrique extérieur affecte la perméabilité de la membrane plasmique, permettant aux oligonucléotides de pénétrer dans la cellule. Cette technique demande de grandes quantités d'acide nucléique et augmente le risque de mort de la cellule.
- par microinjection.²¹⁹ Cette technique consiste à injecter des oligonucléotides en solution directement dans le cytoplasme (voire dans le noyau) des cellules. Elle apporte de la précision dans le dosage et la durée, une grande efficacité de transduction et une faible cytotoxicité. Cependant, cette technique est laborieuse et très couteuse en temps, limitant son utilisation.

IV.4.b. Vectorisation biologique

La vectorisation biologique implique des virus, des virus reconstitués ou des pseudovirions. Ces derniers contiennent du matériel génétique (ADN ou ARN) organisé de façon compacte. La vectorisation par des virus consiste à insérer l'oligonucléotide dans le génome viral. La vectorisation par des virus est plus efficace que sans virus et les vecteurs viraux sont impliqués dans la majorité

²¹⁵ Integrated DNA Technologies, *Designing Antisense Oligonucléotides* **2005** and **2011**.

²¹⁶ V. Regnier, N. De Morre, A. Jadoul, V. Prétat, *Int. J. Pharm.* **1999**, *184*, 147-156.

²¹⁷ S. Chabot, J. Teissié, M. Golzio, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *81*, 161-168.

²¹⁸ M. Joergensen, B. Agerholm-Larsen, P. E. Nielsen, J. Gehl, *Oligonucleotides* **2011**, *21*, 29-37.

²¹⁹ Y. Zhang, L. C. Yu, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 506-510.

des essais cliniques en thérapie génétique.²²⁰ Les raisons de ce succès sont liées à une efficacité de transfection nettement supérieure et une adaptabilité à la majorité des cellules cibles.

Cependant, on rencontre certaines difficultés de sécurité : les vecteurs viraux peuvent engendrer des problèmes immunologiques et inflammatoires sérieux. Le recours aux vecteurs viraux est particulièrement critiqué en raison de la capacité de ceux-ci à s'intégrer aux chromosomes humains. Ces craintes sont beaucoup plus importantes depuis qu'il a été constaté que des patients atteints de déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X et soignés par ces thérapies ont un système immunitaire affaibli. Le vecteur rétroviral utilisé dans le transfert de gènes a même été associé au développement de leucémie chez deux patients.²²¹ De plus, le type de matériel génétique pouvant être cloné dans le vecteur viral limite leur utilisation. On rencontre également des problèmes de sélectivité.

Malgré leurs inconvénients, les vecteurs viraux ont été beaucoup étudiés et conduisent à de bons résultats, par exemple en interférence ARN.²²²

IV.4.c. Présentation des outils de vectorisation chimique

IV.4.c.i. Présentation de la vectorisation chimique

Des systèmes de vectorisation chimiques peuvent permettre de régler certaines difficultés liés aux vecteurs viraux. Ces vecteurs doivent pénétrer les cellules et circuler ensuite dans le milieu intra cellulaire (Figure 54). A ce titre, ils possèdent soit des parties ciblant la paroi cellulaire soit un excès de charges positives. Cela peut être des lipides fusogènes, des peptides, des polymères déstabilisant les membranes, etc.²²³ Les vecteurs non viraux présentent certains avantages : absence de virus (plus sûr), pas d'immunogénicité, bons marché, faciles à formuler et à assembler, versatiles, utilisables avec des acides nucléiques de tailles diverses.

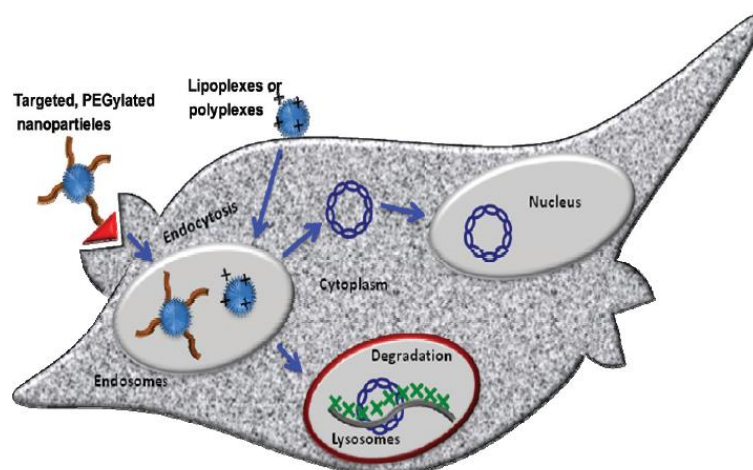


Figure 54 : Trafic intracellulaire des acides nucléiques encapsulés dans des vecteurs non viraux.²²³

²²⁰ K. J. Scanlon, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2004**, *5*, 1-6.

²²¹ D. B. Kohn, M. Sadelain, J. C. Glorioso, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 477-487.

²²² L. B. Couto, K. A. High, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 534-542.

²²³ M. Elsabahy, A. Nazarali, M. Foldvary, *Adv. Drug Delivery* **2011**, *8*, 235-244.

Il reste à savoir comment fixer ce vecteur à l'oligonucléotide. Cette liaison doit être suffisamment résistante pour transporter l'oligonucléotide à sa cible mais elle doit se dissocier dans le compartiment subcellulaire ou dans l'organelle cible. Cette liaison peut être covalente (c'est la conjugaison) ou non covalente (interactions électrostatiques, complexation, etc.). Des nanoparticules plus ou moins complexes peuvent aussi jouer le rôle de vecteurs.

IV.4.c.ii. Intérêts de la conjugaison

La conjugaison consiste à fixer via une liaison covalente divers ligands dans le but de modifier la biodistribution et la pénétration cellulaire ou de cibler des tissus bien spécifiques. Il s'agit d'une option intéressante et une étude bibliographique montre l'importance de cette technique avec les oligonucléotides depuis un certain nombre d'années (Figure 55).^{224,225}

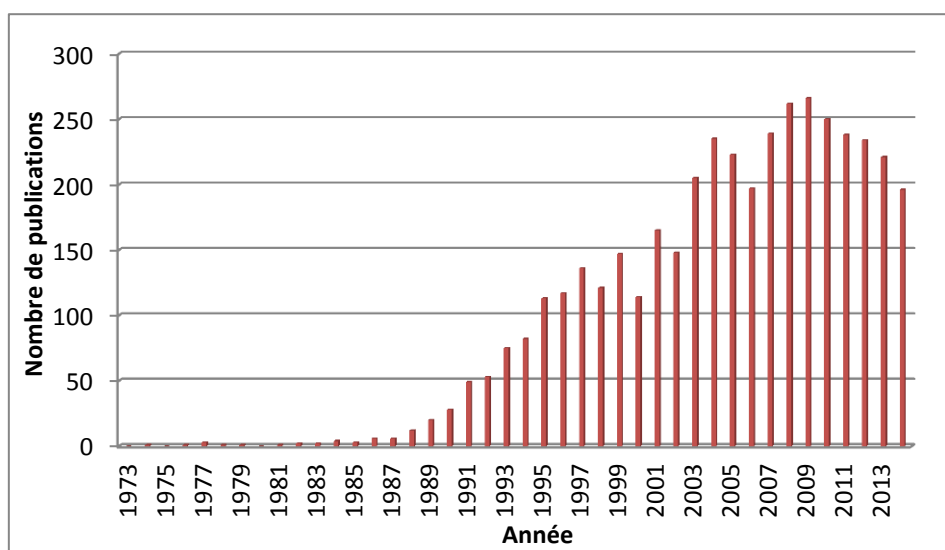


Figure 55 : Nombre depuis 1973 de publications portant sur les oligonucléotides conjugués (recherche Web of Science portant sur les mots clefs « conjugate* oligonucleotid* » en « topic »).

Un oligonucléotide peut être lié à son conjugué par des liaisons très variées : liaison hydrazide,²²⁶ pont disulfure²²⁷, thiol maléimide, oxime, triazole, etc.²²⁵ Le choix de la liaison et éventuellement de l'espaceur est crucial. En effet, l'oligonucléotide doit rester lié à son conjugué lors du transport mais être libéré une fois la cible atteinte. Cette conjugaison résulte en la formation d'un nouveau composé parfaitement défini.

IV.4.c.iii. Intérêts des nanoparticules dans cette vectorisation

Le développement des nanotechnologies permet de nos jours la synthèse de nanoparticules bien définies. Ces dernières, de taille comprise entre 1 nm et 1000 nm, peuvent être utilisées pour délivrer spécifiquement des médicaments et ce, en augmentant leur biodisponibilité, leur biodistribution et leur efficacité et en diminuant leur immunogénicité et leur toxicité. La délivrance de médicaments par des nanoparticules a fait ses preuves en phase clinique.²²⁸ Applicable aux

²²⁴ R. L. Juliano, X. Ming, O. Nakagawa, *Acc. Chem. Res.* **2012**, 45, 1067-1076.

²²⁵ J. Winkler, *Ther. Deliv.* **2013**, 4, 791-809.

²²⁶ S. Raddatz, J. Mueller-Ibeler, J. Kluge, L. Wäß, G. Burdinski, J. R. Havens, T. J. Onofrey, D. Wang, M. Schweitzer, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 4793-4802.

²²⁷ A. Filipovska, M. R. Eccles, R. A. J. Smith, M. P. Murphy, *FEBS Lett.* **2004**, 556, 180-186.

²²⁸ R. A. Petros, J. M. DeSimone, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2010**, 9, 615-627.

oligonucléotides thérapeutiques, elle présente de multiples avantages : protection contre la dégradation des oligonucléotides, bonne pénétration cellulaire, faible réponse immunitaire, production industrielle facile, etc.

Les nanoparticules utilisées couramment en vectorisation d'oligonucléotides sont le plus souvent inorganiques ou basées sur des lipides et des liposomes, sur des peptides, sur des aptamères, sur des anticorps, etc. (Figure 56).^{136, 229}

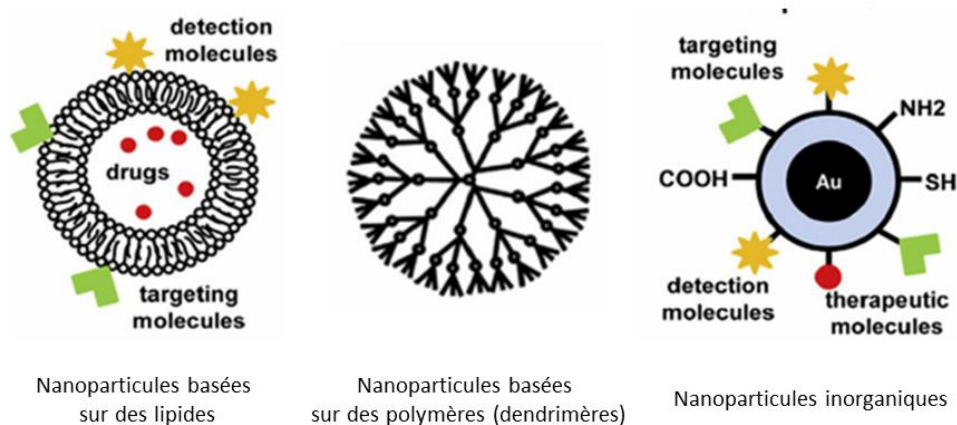


Figure 56 : Exemples de nanosystèmes permettant la délivrance d'oligonucléotides.²²⁹

IV.4.d. Exemples de vectorisation chimique

IV.4.d.i. Nanoparticules inorganiques

Des matériaux biocompatibles comme l'or, la silice, l'oxyde de fer, les nanotubes de carbone, etc. peuvent former des nanoparticules. La capacité de ces nanoparticules à pénétrer une grande variété de cellules leur permet d'être de bons vecteurs d'oligonucléotides. Afin d'améliorer leurs propriétés, des agents emboliques comme des émulsions lipidiques ou des microsphères biodégradables peuvent être ajoutés.¹³⁶

Grâce à leur biocompatibilité, leur biodégradation, l'absence de réponses immunitaires, les nanoparticules de silice poreuses sont des nano-transporteurs de médicaments prometteurs. Des nanoparticules de silice hydrocarbonées recouvertes de chitosane (polysaccharide naturel chargé positivement) promettent d'être de bons agents de vectorisation intracellulaire des oligonucléotides.²³⁰ Des nanoparticules d'or stables et fonctionnalisées par des oligonucléotides peuvent réguler l'expression des gènes dans des cellules mononucléaires du sang périphérique humain.²³¹

IV.4.d.ii. Vecteurs basés sur des composés lipophiles, des lipides et des liposomes

Une approche intéressante consiste à effectuer la conjugaison avec des ligands facilitant la pénétration à l'intérieur des cellules cibles. Par exemple, les PNA (molécules neutres donc diffusant

²²⁹ Y. Shu, F. Pi, A. Sharma, M. Rajabi, F. Haque, D. Shu, M. Leggas, B. M. Evers, P. Guo, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 74-89.

²³⁰ M. Hasanzadeh Kafshgari, B. Delalat, W. Y. Tong, F. J. Harding, M. Kaasalainen, J. Salonen, N. H. Voelcker, *Nano Res.* **2015**, *In press*.

²³¹ E. Y. Kim, R. Schulz, P. Swantek, K. Kunstman, M. H. Malim, S. M. Wolinsky, *Gene Ther.* **2011**, *18*, 1-7.

très doucement à travers la membrane cellulaire) sont souvent conjugués avec des molécules lipophiles. Une équipe²²⁷ a montré que la conjugaison à un cation 4-thiobutyltriphenylphosphonium lipophile via un pont disulfure permet au PNA de traverser la membrane cellulaire. De plus, lorsque le PNA pénètre le cytoplasme, le pont disulfure est réduit, libérant ainsi le PNA antisens qui peut alors inhiber l'expression du gène cible. Cette méthode permet de faciliter les applications *in vitro* et pharmaceutiques des PNA (Figure 57).

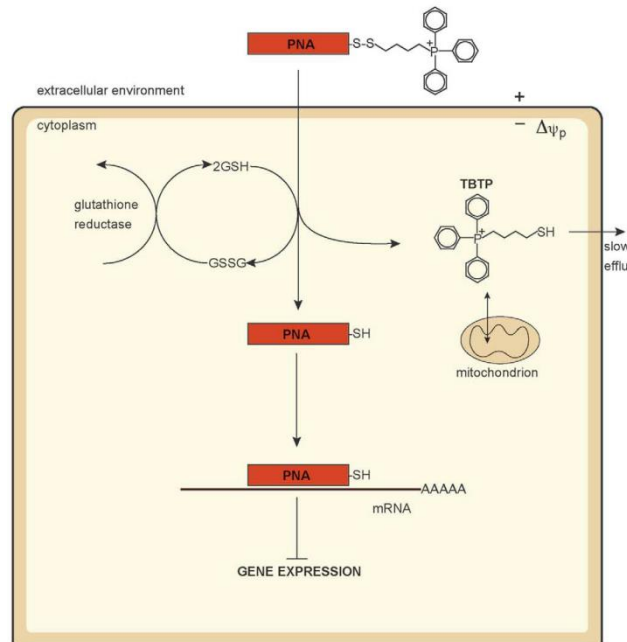


Figure 57 : Pénétration cellulaire d'un PNA conjugué *via* un pont disulfure à un cation lipophile.²²⁷ Le cation 4-thiobutyltriphenylphosphonium permet un transport rapide du PNA conjugué au travers de la membrane plasmique. A l'intérieur du cytoplasme, le pont disulfure est réduit par le glutathion endogène, libérant le PNA. Le cation 4-thiobutyltriphenylphosphonium va d'abord se répartir dans les mitochondries puis sortir progressivement de la cellule.

La complexation des oligonucléotides à des lipides cationiques est une technique très utilisée. Ces lipides cationiques interagissent de façon coulombienne avec les oligonucléotides chargés négativement et forment ce que l'on appelle des lipoplexes (Figure 58). Cependant, ces derniers présentent certains inconvénients comme une faible efficacité de transfection, une certaine toxicité, une activation de la réponse immunitaire ou des problèmes de stabilité dans le sérum.²³⁴

Des PNA conjugués à des oligophosphonates et véhiculés par des lipides cationiques dans des cellules HeLa montrent une bonne activité antisens à des concentrations faibles (subnanomolaire). Cette conjugaison augmente la pénétration cellulaire et abaisse la concentration efficace médiane (EC_{50}) à 1 nM.²³² En permettant une diminution de la tumeur pour les carcinomes à cellules squameuses de la région de la tête et du cou, le miR-107, est un agent anticancéreux prometteur. Il a pu être vectorisé avec succès grâce à des nanoparticules de lipides cationiques.²³³

Les liposomes forment une bicouche lipidique entourant un compartiment aqueux dans lequel des composés polaires comme des oligonucléotides peuvent être stockés. Les oligonucléotides peuvent aussi être complexés aux lamelles phospholipidiques. Ces liposomes permettent la pénétration cellulaire des substances emprisonnées grâce à des vésicules comme les endosomes

²³² T. Shiraishi, R. Hamzavi, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4424-4432.

²³³ L. Piao, M. Zhang, J. Datta, X. Xie, T. Su, H. Li, T. N. Teknos, Q. Pan, *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 1261-1269.

(Figure 58).²³⁴ Cette encapsulation a l'avantage de protéger les oligonucléotides des nucléases du sérum et n'est pas immunogène. Comme il est possible de modifier sa composition en phospholipides, le liposome peut être conçu en respectant des contraintes de taille, de charges en surface, de composition et de morphologie.²⁵⁹ Les liposomes peuvent être cationiques ou anioniques.

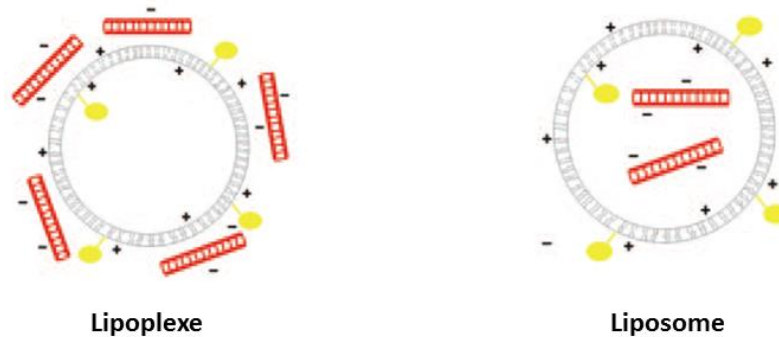


Figure 58 : Vectorisation par des lipoplexes et des liposomes. A gauche : les lipoplexes sont des lipides cationiques(en gris) formant un complexe avec l'oligonucléotide chargé négativement (en rouge). Du PEG (en jaune) est souvent attaché à cet ensemble afin d'améliorer les caractéristiques pharmacocinétiques. A droite : Liposome dans lequel le lipide cationique entoure l'oligonucléotide.²³⁴

L'encapsulation dans des liposomes fournit de bons résultats. Par exemple, sur des cellules leucémiques MOLT-3, des oligonucléotides non modifiés encapsulés dans des liposomes sont stables dans le sérum physiologique pendant des jours, pénètrent 20 fois plus dans les cellules et atteignent l'ensemble du noyau et du cytoplasme.²³⁵ Des complexes liposome cationique/ADN ont été utilisés pour permettre l'expression de ribozymes en « tête de marteau » basés sur des plasmides. Ces ribozymes ciblent une variété de gènes responsables de la progression de tumeurs chez les animaux porteurs de tumeurs.²³⁶

Les liposomes et les lipoplexes sont souvent entourés de molécules de polyéthylène glycol qui permettent une plus longue circulation dans le sang et une diminution de la toxicité (Figure 58). Les SNALP (*Stable Nucleic Acid Lipid Particle*) sont des liposomes conjugués à du polyéthylène glycol comprenant des siRNA encapsulés à l'intérieur d'une bicouche lipidique. La formulation sous forme de SNALP permet une plus longue durée de vie de l'oligonucléotide dans le plasma et le foie et plusieurs oligonucléotides vectorisés sous forme de SNALP sont en phase d'essais cliniques.¹³⁶

Afin d'améliorer la libération de l'oligonucléotide depuis les endosomes, des lipides fusogènes peuvent être ajoutés.²³⁴ Une équipe a montré que des siRNA administrés sous forme de lipoplexes avec des lipides cationiques et fusogènes atteignent l'ensemble des organes. Cependant, ces siRNA restent malheureusement principalement dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et pénètrent peu les tissus.²³⁷

²³⁴ J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378-1398.

²³⁵ A. R. Thierry, A. Dritschilo, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5691-5698.

²³⁶ M. Kashani-Sabet, Y. Liu, S. Fong, P. Y. Desprez, S. Liu, G. Tu, M. Nosrati, C. Handumrongkul, D. Liggitt, A. D. Thor, R. J. Debs, *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* **2002**, *99*, 3878-3883.

²³⁷ A. Santel, M. Aleku, O. Keil, J. Endruschat, V. Esche, G. Fisch, S. Dames, K. Löffler, M. Fechtner, W. Arnold, K. Giese, A. Klippel, J. Kaufmann, *Gene Ther.* **2006**, *13*, 1222-1234.

IV.4.d.iii. Vecteurs basés sur des peptides pénétrant les cellules

Les peptides pénétrant les cellules (CPP pour *cell-penetrating peptides*) constituent une bonne méthode de vectorisation des oligonucléotides. Il s'agit de peptides cationiques et/ou amphiphiles contenant usuellement moins de 30 acides aminés.²³⁸ Nés de l'observation de la capacité de certaines protéines à pénétrer dans les cellules, ils sont capables de traverser de manière efficace la membrane cellulaire en transportant une molécule appelée cargo. Le mécanisme d'internalisation dépend de la nature du peptide et peut être très varié.²³⁹ Une conception de CPP efficaces dans leurs rôles de vecteurs passe par une étude approfondie de la pénétration cellulaire et de la circulation à l'intérieur de la cellule de l'oligonucléotide associé au CPP.²⁴⁰ Le premier CPP a été dérivé de l'homéodomaine de la protéine antennapedia de la drosophile. Il s'agit d'une séquence de 16 résidus correspondant à une portion très conservée de l'homéodomaine (portion appelée penetratin) et capable de transporter un cargo dans la cellule. A la suite de ce travail, une série de peptides de transduction a été développée ; les autres CPP prototypiques sont des dérivés des peptides Tat (Tableau 4).²⁴¹

Peptide	Séquence	Origine
PEPTIDES DERIVES DE FACTEUR DE TRANSCRIPTION		
Tat	GRKKRRRQRRRPPQ	Tat du VIH
Séquences peptidiques correspondant à la troisième hélice des homéodomains		
Anp	RQIKIWFQNRRMKWKK	Protéine antennapedia
Eng	SQIKIWFQNKRAIKK	Engrailed 2 humaine
PEPTIDES AMPHIPATIQUES		
transportan	GWTLNSSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Galanin et mastoparan
Peptides signal		
MPG	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKRKY	Protéine NLS de fusion gp41
PEPTIDES BASES SUR DES POLYARGININE		
Arg9	RRRRRRRRR	

Tableau 4 : Exemples de CPP utilisés fréquemment.²⁴¹

Les CPP sont capables de franchir les différentes barrières biologiques, de protéger l'oligonucléotide de la dégradation et de l'amener à sa cible. Aucune autre famille de biomolécules ne possède de telles caractéristiques et les méthodes de vectorisation basées sur les peptides sont prometteuses.²⁴² Il reste cependant des difficultés de sortie des endosomes, de sélectivité et de toxicité.²⁴⁰

Une étude de la littérature montre que les CPP permettent de vectoriser des oligonucléotides antisens, des oligonucléotides modulant l'épissage, des siRNA, des oligonucléotides leurres, etc., *in vitro* et *in vivo*.²⁴³ Différentes techniques pour lier l'oligonucléotide au CPP existent : co-incubation, conjugaison, complexe non covalent, modification de la surface de complexes

²³⁸ T. Lehto, K. Ezzat, Ü. Langel, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2011**, *104*, 397-426.

²³⁹ S. Grijalvo, A. Aviño, R. Aritja, *Expt. Opin. Ther. Patents* **2014**, *24*, 801-819.

²⁴⁰ S. H. Lee, B. Castagner, J. C. Leroux, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 5-11.

²⁴¹ F. Marlin, P. Simon, T. Saison-Behmoaras, C. Giovannegeli, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1493-1500.

²⁴² M. E. Martin, K. G. Rice, *AAPS J.* **2007**, *9*, Article 3.

²⁴³ F. Heitz, M. C. Morris, G. Divita, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 195-206.

liposomiques ou polymériques.²⁴⁰ Cela permet aux CPP de vectoriser des oligonucléotides neutres, comme des PNA et des PMO.²⁴⁴

Des peptides riches en arginine relâchent l'oligonucléotide au niveau des compartiments intracellulaires vésiculaires.²⁴⁵ La conjugaison à des peptides pénétrant les cellules permet d'améliorer nettement les propriétés *in vivo* de PMO utilisés en saut d'exon dans le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne.²⁴⁶ Seuls, ces PMO souffrent d'une faible pénétration cellulaire, d'une clairance rénale rapide et de la nécessité d'administrer régulièrement des grandes quantités et d'une distribution inégale. La conjugaison permet d'abaisser la dose nécessaire et d'améliorer la distribution.

Pour moduler leurs propriétés, il est possible de modifier chimiquement le peptide avec par exemple l'acide α -aminoisobutyrique.²⁴⁷

IV.4.d.iv. Vecteurs basés sur d'autres ligands spécifiques

Une approche astucieuse consiste à effectuer la conjugaison avec des ligands choisis pour se fixer à des récepteurs bien précis. Cela permet aux oligonucléotides d'interagir spécifiquement avec les cellules à atteindre et également de pénétrer à l'intérieur de ces cellules.²⁴⁸

Des carbohydrates comme du glucose ou du *N*-acétylgalactosamine²⁴⁹ augmentent la sélectivité dans la délivrance. Par exemple, la conjugaison de glucose à un oligonucléotide anti-VIH-1 contenant des motifs non méthylés CpG (Figure 59) permet, grâce au ciblage des récepteurs d'endocytose par le carbohydrate, une meilleure sélectivité cellulaire.²⁵⁰

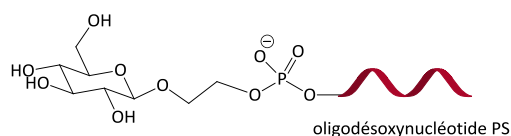


Figure 59 : Conjugaison de l'oligonucléotide à une molécule de glucose.²⁵⁰

Une autre possibilité est de conjuguer les oligonucléotides à des composés lipidiques comme des molécules de cholestérol²⁵¹ ou de tocophérol (Figure 60).²⁵² Cela facilite la fixation des oligonucléotides à des lipoprotéines du sérum ou à l'albumine et augmente ainsi le temps de

²⁴⁴ H. M. Moulton, J. D. Moulton, *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 870-875.

²⁴⁵ C. Cordier, F. Boutimah, M. Bourdeloux, F. Dupuy, E. Met, P. Alberti, F. Loll, G. Chassaing, F. Burlina, T. E. Saison-Bahmoaras, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104999.

²⁴⁶ H. M. Moulton, J. D. Moulton, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 2296-2303.

²⁴⁷ S. I. Wada, T. Urase, Y. Hasegawa, K. Ban, A. Sudani, Y. Kawai, J. Hayashi, H. Urata, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6776-6780.

²⁴⁸ O. Nakagawa, X. Ming, L. Huang, R. L. Juliano, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8848-8849.

²⁴⁹ T. P. Prakash, M. J. Graham, J. Yu, R. Carty, A. Low, A. Chappell, K. Schmidt, C. Zhao, M. Aghajan, H. F. Murray, S. Riney, S. L. Booten, S. F. Murray, H. Gaus, J. Crosby, W. F. Lima, S. Guo, B. P. Monia, E. E. Swayze, P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 8796-8807.

²⁵⁰ J. A. Reyes-Darias, F. J. Sánchez-Luque, J. C. Morales, S. Pérez-Rentero, R. Eritja, A. Berzal-Herranz, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 584-591.

²⁵¹ M. K. Bijsterbosch, E. T. Rump, R. L. A. De Vruh, R. Dorland, R. van Veghel, K. L. Tivel, E. A. L. Biessen, T. J. C. van Berkel, M. Manoharan, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2717-2725.

²⁵² T. Nishinia, J. Numata, K. Nishina, K. Yoshida-Tanaka, K. Nitta, W. Piao, R. Iwata, S. Ito, H. Kuwahara, T. Wada, H. Mizusawa, T. Yokota, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2015**, *4*, e220.

circulation tout en diminuant la pénétration dans le foie (présentant moins de récepteur à lipoprotéines). Les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques sont améliorées.²⁵³

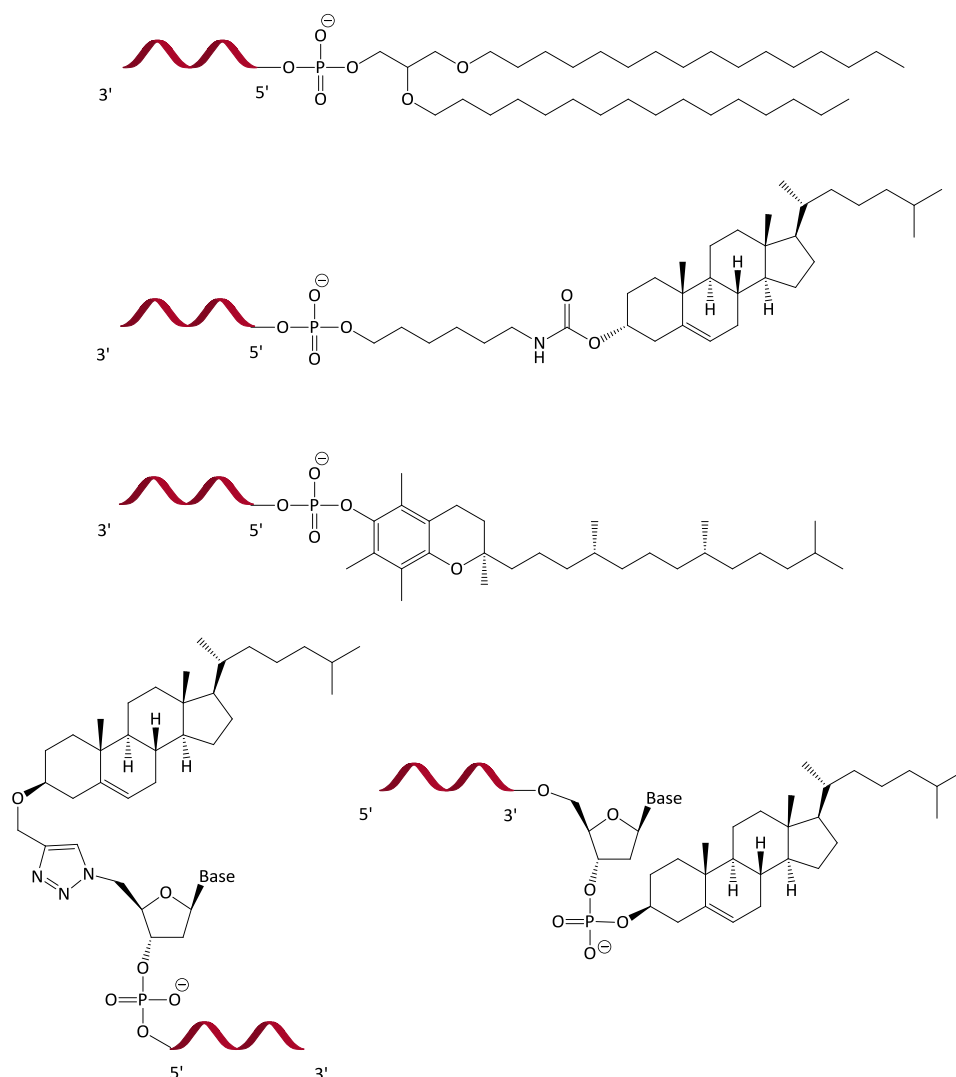


Figure 60 : Exemples d'oligonucléotides conjugués à des lipides.²⁵³

Par ailleurs, il a été proposé d'effectuer la conjugaison d'oligonucléotides thérapeutiques avec des aptamères.^{254,255} Cela permet de combiner la sélectivité cellulaire des aptamères avec la spécificité des oligonucléotides thérapeutiques. Les anticorps peuvent aussi permettre de diriger l'oligonucléotide vers sa cible. Ainsi, la conjugaison d'un oligodésoxynucléotide à un anticorps dirigé vers le récepteur de la transferrine du rat améliore la difficile pénétration dans les cellules du cerveau.²⁵⁶

Tout récemment, une équipe a montré que la conjugaison de photosensibilisateurs à des oligonucléotides permet une co-localisation spatiale et temporelle des deux modules dans la cellule cible, menant à une très bonne délivrance de l'oligonucléotide. De plus, la libération par irradiation

²⁵³ M. Raouane, D. Desmaële, G. Urbinati, L. Massaas-Massade, P. Couvreur, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1091-1104.

²⁵⁴ D. M. S. Hossain, P. Duttgupta, M. Kortylewski, *Ther. Deliv.* **2015**, *6*, 1-4.

²⁵⁵ H. Sun, X. Zhu, P. Y. Lu, R. Rosato, W. Tan, Y. Zu, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2014**, *3*, e182.

²⁵⁶ N. Normand-Sdiqi, S. Akhtar, *Int. J. Pharm.* **1998**, *163*, 63-71.

de l'oligonucléotide anti-cancéreux tue la cellule malade grâce à la modulation de l'oncogène et à la thérapie photodynamique.²⁵⁷

Il existe une multitude d'autres ligands possibles. La conjugaison d'oligonucléotides antisens ou antigène avec des oligospermines facilite la pénétration cellulaire à des concentrations nanomolaire (Figure 61).²⁵⁸

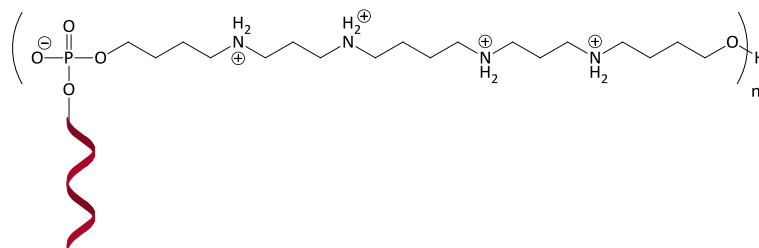


Figure 61 : Structure d'un conjugué 5'-oligospermine.²⁵⁸

IV.4.d.v. Vecteurs basés sur des polymères

Etant donné que les oligonucléotides (sauf certains oligonucléotides modifiés) sont des structures polyanioniques, ils diffusent mal à travers les parois cellulaires lipophiles. Par conséquent, de nombreux cations polymériques ont été développés pour contrebalancer la charge négative. Ces complexes cationiques polymère/acides nucléiques appelés polyplexes interagissent avec la surface de la cellule chargée négativement et facilitent ainsi la pénétration cellulaire.²⁵⁹

Les polymères peuvent ne pas être immunogènes si bien qu'à l'inverse des vecteurs viraux, ils peuvent être utilisés de manière répétitive. Un autre avantage de ces polymères réside dans la facilité de leur manipulation et la versatilité de leurs propriétés physico-chimiques. La matrice polymérique est choisie afin d'obtenir une distribution appropriée des différentes masses molaires et des degrés de réticulation. Les polymères utilisés classiquement et menant à des polyplexes cationiques sont le polyéthylèneimine,²⁶⁰ le poly(L-lysine),²⁶¹ le chitosane,²⁶² des dendrimères,²⁶³ etc. Ces systèmes ont certains inconvénients²⁶⁴ liés à leurs faibles capacités de transfert, à des difficultés dans le contrôle des masses molaires, dans la dispersion des polyplexes ainsi qu'à d'éventuelles propriétés pharmacologiques du polymère (hypercholestérol induit par le chitosane). Il est possible d'incorporer des ligands permettant un meilleur ciblage. Ce peut être des folates, des transferrines, des anticorps, des sucres, etc.²⁶⁴

Des nanoparticules vectorisant des oligonucléotides antisens peuvent être formulées dans un copolymère poly(lactide-co-glycolide) (50/50) via une méthode émulsion double/évaporation. Ces nanoparticules biodégradables augmentent la pénétration cellulaire de l'oligonucléotide antisens du VEGF et inhibe la sécrétion du VEGF et l'expression de l'ARN_m dans une lignée cellulaire humaine

²⁵⁷ A. Yuan, B. Laing, Y. Hu, X. Ming, *Chem. Commun.* **2015**, 51, 6678-6680.

²⁵⁸ K. T. Gagnon, J. K. Watts, H. M. Pendergraft, C. Montanier, D. Thai, P. Potier, D. R. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 8404-8407.

²⁵⁹ S. D. Patil, D. G. Rhodes, D. J. Burgess, *AAPS J.* **2005**, 7, Article 9.

²⁶⁰ G. F. Lemkine, B. A. Demeneix, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2001**, 3, 178-182.

²⁶¹ C. P. Lollo, M. G. Banaszczuk, P. M. Mullen, C. C. Coffin, D. Wu, A. T. Carlo, D. L. Bassett, E. K. Gouveia, D. J. Carlo, *Methods Mol. Med.* **2002**, 69, 1-13.

²⁶² G. Borchard, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 52, 145-150.

²⁶³ R. J. Marano, I. Toth, N. Wimmer, M. Brankov, P. E. Rakoczy, *Gene Ther.* **2005**, 12, 1544-1550.

²⁶⁴ T. Merdan, J. Kopeček, T. Kissel, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 715-758.

épithiale du pigment rétinien.²⁶⁵ Dans la maladie de Tchernobyl, deux gènes fusionnent et sont responsables de la production de la protéine pathogène. Pour la traiter, on peut cibler la jonction des gènes par un siRNA adéquat. Ce siRNA peut être vectorisé dans des nanoparticules de polymères biodégradables comportant des chaînes de chitosane. Les résultats montrent que les siRNA seuls n'inhibent pas la croissance de la tumeur alors que ces tumeurs disparaissent lorsque ces mêmes siRNA vectorisés par les nanoparticules de chitosane sont administrés (Figure 62).²⁶⁶

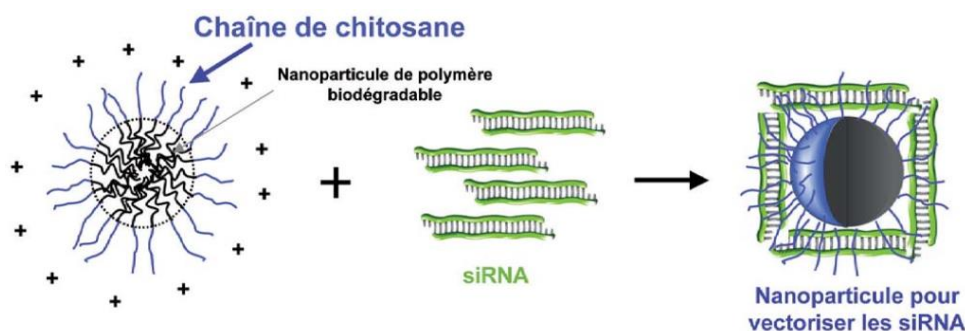


Figure 62 : Des chaînes de chitosane (bleu), portant des charges positives ont été greffées à une nanoparticule de polymère biodégradable. Le siRNA (en vert) est fixé en quantité importante et est véhiculé vers l'ARN cible.²⁶⁶

Des nanoparticules peuvent être utilisées dans la délivrance de vaccins associés à des oligonucléotides CpG. Dans ce but, une équipe²⁶⁷ a développé des nanoparticules de polymère endosomolytiques sensibles au pH permettant d'améliorer les réponses immunitaires humorales et cellulaires. Le copolymère dibloc avec deux modules fonctionnels est préparé par polymérisation RAFT (*reversible addition-fragmentation chain transfer*). Le premier bloc hydrophile et cationique est composé de DMAEMA (méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyle) pour la complexation électrostatique de l'oligonucléotide CpG et d'un peu de PDSEMA (méthacrylate de (pyridyldisulfide)éthyle) pour lier via un pont disulfure l'antigène ovalbumine. Le deuxième bloc hydrophobe et endosomolytique conduit à l'assemblage des micelles et permet la délivrance cytosolique de l'antigène.

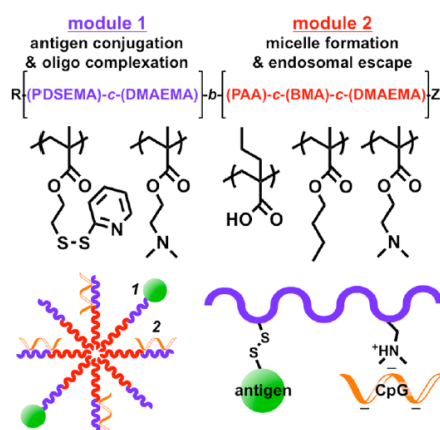


Figure 63 : Vectorisation de vaccins par des nanoparticules basées sur un polymère répondant au pH. Cette technique permet une double délivrance de l'antigène et de l'oligonucléotide.²⁶⁷

²⁶⁵ J. V. Aukunuru, S. P. Ayalasomayajula, U. B. Kompella, *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*, 1199-1206.

²⁶⁶ P. Couvreur, « Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères » dans M. T. Dinh-Audouin, R. A. Jacquesy, D. Olivier, P. Rigny, *La chimie et la santé*, EDP Sciences **2010**, 105-125.

²⁶⁷ J. T. Wilson, S. Keller, M. J. Manganiello, C. Cheng, C. C. Lee, C. Opara, A. Convertine, P. S. Stayton, *ACS Nano* **2013**, *7*, 3912-3925.

Une autre difficulté est rencontrée avec les oligonucléotides : il s'agit de leur clairance élevée. Ce problème peut être surmonté en augmentant la masse moléculaire des oligonucléotides par PEGylation c'est-à-dire en conjuguant l'oligonucléotide avec des chaînes de PEG (Figure 64).^{268,269}

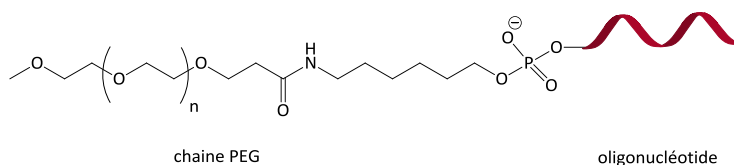


Figure 64 : PEGylation d'oligonucléotides.²⁶⁹

Il s'agit d'une méthode simple pour augmenter la solubilité des oligonucléotides et pour empêcher une élimination rapide, améliorant ainsi la distribution dans les tissus. Cependant, des longues chaînes de PEG peuvent influencer négativement sur les propriétés pharmacodynamiques en diminuant les capacités d'hybridation.²⁶⁹

IV.5. Vectorisation des oligonucléotides : conclusion

Le Tableau 5 ci-dessous présente au travers des exemples un aperçu de ces méthodes de vectorisation.

Parties de ciblage	Tissus ou cellules cibles	Stratégies de vectorisation
Lipoprotéines à haute densité Lipoprotéines à basse densité	Foie	siRNA lié à du cholestérol siRNA lié à du tocophérol
Folate	Cellules A549 et KB Cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical	Oligodésoxynucléotide antisens ou siRNA conjugué à un folate Oligodésoxynucléotide dans un liposome revêtu de folate
Transferrine	Cellules tumorales du sarcome d'Ewing	Nanoparticules de cyclodextrines
Anticorps	Leucocytes activés/K562 Neuroblastome ou mélanome	Complexe anticorps/protamine/siRNA Immunoliposomes ciblant GD2
Peptide	Cellules endothéliales humaines matures isolées à partir de la veine de cordon ombilical et cellules N2A Cellules HeLa	siRNA conjugués à un peptide Tat Nanoparticules contenant des acides aminés (arginine, glycine, acide aspartique), du PEG et du polyéthylèneimine
Aptamère	Cellule cancéreuses humaines (prostate)	siRNA conjugué à un aptamère spécifique et à un antigène de membrane spécifique de la prostate
Carbohydate	Lignée cellulaire humaine du carcinome hépatocellulaire	siRNA-PEG-lactose

Tableau 5 : Résumé de différentes approches de vectorisation des oligonucléotides.¹³⁸

²⁶⁸ Y. Ikeda, Y. Nagasaki, *Inc. J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131*, 40293-40295

²⁶⁹ N. Shokrzadeh, A. M. Winkler, M. Dirin, J. Winkler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5758-5761.

V. CONCLUSION

Grâce à leur capacité à contrôler spécifiquement l'expression des gènes, les oligonucléotides thérapeutiques sont des outils très prometteurs. Les thérapies envisageables sont extrêmement variées (thérapie antigène, antisens, interférence ARN, etc.) et sont applicables à de très nombreuses maladies (infections virales, cancers, maladies cardiovasculaires, etc.), y compris à des maladies incurables. A ce jour, 3 oligonucléotides (Vitravene™, Macugen™, Kynamro™) sont approuvés par la FDA et de très nombreux oligonucléotides sont actuellement en phase d'essais cliniques. Par rapport aux médicaments usuels, la conception des oligonucléotides est plus rationnelle (règles d'appariement de Watson-Crick) et bien étayée, elle permet une modulation *in vitro* très sélective de l'expression du gène cible. L'application thérapeutique de tels composés semblent en théorie sans limite.

Cependant, force est de constater qu'en 2015, le développement des oligonucléotides en tant qu'agents thérapeutiques n'est pas à la hauteur des espérances. Ceci est en grande partie dû aux problèmes de stabilité en milieu physiologique des oligonucléotides et aux nombreuses barrières biologiques à franchir par l'oligonucléotide avant qu'il puisse atteindre sa cible.

Les difficultés liées à la stabilité des oligonucléotides naturels en milieu biologique peuvent être résolues au moins partiellement par des modifications chimiques. Ainsi, la littérature fournit une multitude d'exemples de modifications d'oligonucléotides dont certaines (2'-O-méthoxyéthyl oligonucléotides, PNA, LNA, etc.) permettent d'améliorer très nettement les propriétés pharmacocinétiques des oligonucléotides. La fixation, covalente ou non, de ligands permet de modifier la biodistribution et la pénétration cellulaire, d'augmenter la sélectivité, etc. Ces ligands peuvent être des peptides, des protéines, des sucres ou des petites molécules (cholestérol, tocophérol, acide folique, etc.). La vectorisation via des nanoparticules basées sur des lipides cationiques, des liposomes, des peptides pénétrant les cellules, des polymères, etc., fournit également de très bons résultats.

Les limites de la vectorisation des oligonucléotides sont en grande partie responsables du faible développement de thérapies utilisant des oligonucléotides. D'immenses progrès ont été faits dans ce domaine ces dernières années. Durant la prochaine décennie, les tests précliniques et cliniques de ces oligonucléotides vectorisés nous permettront d'avoir une vision précise de leur potentiel thérapeutique *in vivo*.

CHAPITRE 2
LA LIAISON N-O DANS LES NUCLEOSIDES, DINUCLEOSIDES ET
OLIGONUCLEOTIDES

I. INTRODUCTION

De grands efforts pour découvrir de nouveaux agents thérapeutiques ont été fournis durant les dernières décennies.²⁷⁰ Il est par exemple urgent de trouver de nouveaux composés qui exercent une forte activité biologique tout en étant peu toxiques avec les cellules hôtes. A ce titre, un grand intérêt s'est porté sur la synthèse et l'activité biologique d'analogues de nucléosides (nucléosides modifiés au niveau du ribose ou de la base nucléique). En effet, certains de ces composés peuvent être anticancéreux, antiviraux, antibactériens, etc. La zidovudine (ou azidothymidine AZT) utilisée dans le traitement du VIH est un exemple emblématique.

Les analogues de nucléosides, qui miment les nucléosides naturels, exercent leur activité antivirale par une inhibition compétitive réversible de la transcription inverse. Pour cela, l'hydroxyle en position 5' est reconnu et phosphorylé par une phosphorylase, transformant le nucléoside en nucléotide. Ce nucléotide est incorporé dans un brin d'acide nucléique en formation, ce qui interrompt le processus de transcription inverse. Les analogues de nucléosides peuvent également se comporter comme des antimétabolites. Ils entrent en compétition avec des nucléosides physiologiques et interagissent par conséquent avec un grand nombre de cibles intracellulaires, ce qui induit une cytotoxicité.

L'activité des analogues de nucléosides antiviraux est étroitement liée à leur conversion par des enzymes en leur forme triphosphate. Un des inconvénients des analogues de nucléosides est leur instabilité après leur triphosphorylation dans la cellule hôte. De nombreuses stratégies ont été mises au point pour augmenter leur résistance aux phosphohydrolases ou pour assurer une phosphorylation efficace dans les cellules cibles.

Depuis la découverte de l'AZT, de nombreux analogues de nucléosides pouvant mimer les nucléosides endogènes ont été préparés et étudiés. Etant donné qu'il sert à la phosphorylation, l'hydroxyle en position 5' est souvent conservé lors de la conception de nouveaux analogues et ce sont plutôt les positions 2' et 3' du ribose ainsi que les bases nucléiques qui sont modifiées. Nous allons ici nous intéresser à des nucléosides modifiés qui comportent une liaison oxygène-azote.

Un très grand nombre de composés comporte une liaison oxygène-azote : hydroxylamine, acide hydroxamique, oxime, nitroxyde, composés nitrés, composés nitroso, etc. (Figure 65). Cette liaison N-O se retrouve également dans des hétérocycles aromatiques ou non aromatiques.

²⁷⁰ R. Romeo, C. Carnovale, S. V. Giofrè, G. Monciino, M. A. Chiacchio, C. Sanfilippo, B. Macchi, *Molecules* **2014**, *19*, 14406-14416.

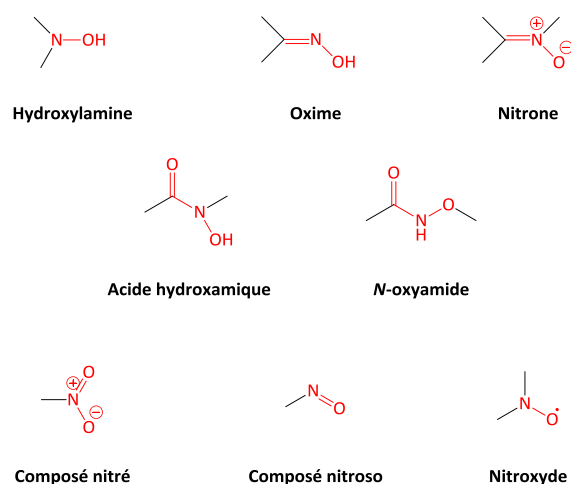


Figure 65 : Exemples de composés comportant une liaison oxygène-azote.

Dans la nomenclature IUPAC, le terme hydroxylamine désigne le composé NH_2OH et ses dérivés substitués sur l'azote ou sur l'oxygène. Pour davantage de clarté, nous désignerons par *N*-oxyamines les composés présentant une fonction aminooxyle $-\text{ONH}_2$ substituée ou non sur l'azote. Par ailleurs, nous désignerons par hydroxylamines les composés présentant une fonction hydroxylamino $-\text{N}(\text{OH})\text{R}$ et par alkoxyamines les composés présentant une fonction alkoxyamino $-\text{N}(\text{OR}')\text{R}$ avec $\text{R}' \neq \text{H}$.

Ce chapitre va porter sur les nucléosides, dinucléosides et oligonucléotides à liaison N-O. Au travers de ces composés, nous présenterons les propriétés des composés à liaison N-O. Etant donné leur réactivité bien particulière, nous choisissons ici de ne pas aborder les nucléosides présentant une fonction nitro $-\text{NO}_2$ ^{271,272,273,274,275} ou nitroso $-\text{NO}$.

II. LES NUCLEOSIDES A LIAISON N-O

II.1. Les nucléosides isoxazolidines

L'oxazolidine (nom IUPAC 1,3-oxazolidine) est un hétérocycle à 5 atomes contenant 3 atomes de carbone, un d'azote et un d'oxygène, ces deux derniers étant en position 1,3. Lorsque l'azote et l'oxygène sont directement liés, on obtient un isoxazolidine (nom IUPAC 1,2-oxazolidine). Leurs structures sont données sur la Figure 66. Ces composés peuvent avoir des propriétés médicinales intéressantes.²⁷⁶ Les isoxazoles correspondent à ces cycles isoxazolidines aromatiques (Figure 66).

²⁷¹ I. I. Fedorov, E. M. Kazmina, G. V. Gurskaya, M. V. Jasko, V. E. Zavodnic, J. Balzarini, E. De Clercq, A. Faraj, J. P. Sommadossi, J. L. Imbach, G. Gosselin, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 486-494.

²⁷² K. M. Borland, S. F. AbdulSalam, M. J. Solivio, M. P. Burke, P. R. Wolfkiel, S. M. Lawson, C. A. Stockman, J. M. Andersen, S. Smith, J. N. Tolstolutskaia, P. N. Gurjar, A. P. Bercz, E. J. Merino, V. A. Litosh, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 1869-1881.

²⁷³ B. Gadakh, G. Vondenhoff, E. Lescrinier, J. Rozenski, M. Froeyen, A. Van Aerschot, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 2875-2886.

²⁷⁴ A. Danhel, V. Raindlova, L. Havrana, H. Pivonkova, M. Hocek, M. Fojta, *Electrochim. Acta* **2014**, *126*, 122-131.

²⁷⁵ A. Samanta, M. Thunemann, R. Feil, T. Stafforst, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7120-7123.

²⁷⁶ K. A. Kumar, P. Jayaroopa, *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* **2013**, *3*, 294-304.

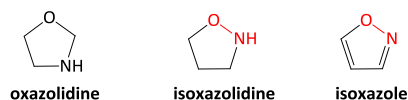


Figure 66 : Structure de l'oxazolidine, de l'isoxazolidine et de l'isoxazole.

Pour plus de clarté dans ce paragraphe consacré aux nucléosides isoxazolidines, on gardera une numérotation analogue à celle des nucléosides non modifiés c'est-à-dire qu'on note 1' le carbone du cycle isoxazolidine qui porte la base nucléique.

Certains nucléosides isoxazolidines constituent une famille intéressante d'analogues de nucléosides doués d'une activité pharmaceutique potentielle. Les résultats sont globalement très contrastés et difficilement prévisibles.

II.1.a. Une grande variété de nucléosides isoxazolidines

En 1992, l'équipe de Tronchet²⁷⁷ a décrit les premiers nucléosides pour lesquels le furanose est remplacé par un cycle isoxazolidine (Figure 67 à gauche). Ce cycle pour lequel l'oxygène est en position 2' et l'azote en position 3' correspond aux nucléosides isoxazolidines les plus courants. On notera que ces composés présentent une possibilité d'inversion autour de l'azote, offrant ainsi de nouveaux degrés de liberté conformationnelle. Cette équipe²⁷⁷ s'est penchée sur l'activité biologique de ses composés mais ne trouva rien d'intéressant.

En 1995, l'équipe de Zhao²⁷⁸ a séparé les stéréoisomères α et β de ces composés (Figure 67 au milieu). La littérature fournit de très nombreux exemples de dérivés de 2'-oxa-3'-azanucléosides carbocycliques comme cet isoxazolidine analogue de la thymine polyoxine C (Figure 67 à droite).²⁷⁹

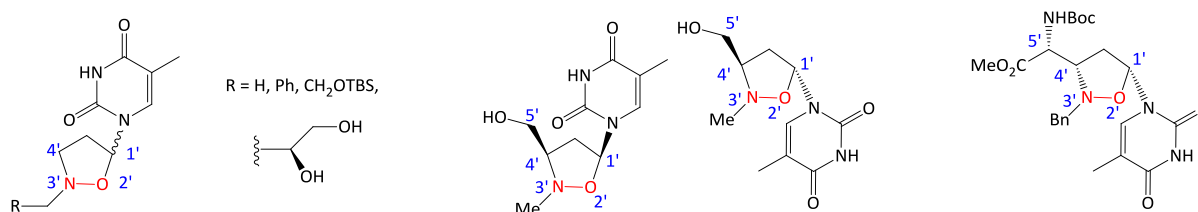


Figure 67 : A gauche : Structures décrites en 1992 par l'équipe de Tronchet.²⁷⁷ Au milieu : Nucléosides isoxazolidines énantiomériquement purs décrits par Zhao.²⁷⁸ A droite : Analogue isoxazolidine de la thymine polyoxine C.²⁷⁹ La numérotation utilisée dans ce paragraphe est indiquée en bleu.

L'équipe de Sindona a préparé des nucléosides isoxazolidines racémiques non substitués (Figure 68).^{280,281,282,283} Des synthèses diastéréosélectives et énantiosélectives de ces composés seront mises au point quelques années plus tard.^{284,285} Lors de tests sur des lignées, l'ADT (Figure 68) montre une bonne activité contre le VIH et une faible cytotoxicité *in vitro*. Il peut être utilisé sous forme d'un

²⁷⁷ J. M. J. Tronchet, M. Iznaden, F. Barbalat-Rey, H. Dhimane, A. Ricca, J. Balzarini, E. De Clercq, *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27*, 555-560.

²⁷⁸ Y. Xiang, J. Chen, R. F. Schinazi, K. Zhao, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7193-7196.

²⁷⁹ P. Merino, S. Franco, F. L. Merchan, T. Tejero, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6411-6414.

²⁸⁰ A. Leggio, A. Liguori, A. Procopio, C. Siciliano, G. Sindona, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1277-1280.

²⁸¹ A. Leggio, A. Liguori, A. Procopio, C. Siciliano, G. Sindona, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1515-1518.

²⁸² E. Colacino, A. Converso, A. Liguori, A. Napoli, C. Siciliano, G. Sindona, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 8551-8557.

²⁸³ R. Dalpozzo, A. De Nino, L. Maiuolo, A. Procopio, G. De Munno, G. Sindona, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4035-4038.

²⁸⁴ U. Chiacchio, A. Rescifina, A. Corsaro, V. Pistrà, G. Romeo, R. Romeo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2045-2048.

²⁸⁵ U. Chiacchio, A. Corsaro, D. Iannazzo, A. Piperno, V. Pistrà, A. Rescifina, R. Romeo, V. Valveri, A. Mastino, G. Romeo, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 3696-3702.

mélange des stéréoisomères α et β .²⁸² Le composé (-)-ADFU (Figure 68), faiblement cytotoxique est un bon inducteur d'apoptose de lymphoïdes et de cellules monocytoides.²⁸⁵

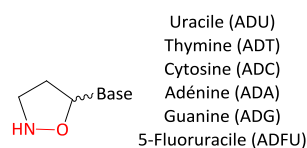


Figure 68 : Nucléosides isoxazolidines non substitués.²⁸⁵

On peut envisager des substitutions très diverses (diéthylphosphonate, groupement aromatique, etc.) sur différentes positions du cycle isoxazolidine (C_1 , C_5 , N, etc.).^{286,287,288,289} Le choix du substituant est primordial. Par exemple, la présence d'un groupe phosphonate en position 5' permet de contourner la première étape inefficace et lente de monophosphorylation dans la conversion du nucléoside en nucléotide 5'-triphosphate. Le cycle peut même être tronqué au niveau du C_4 .^{290,291} De larges familles de N,O -nucléosides peuvent ainsi être obtenues (Figure 69).²⁹²

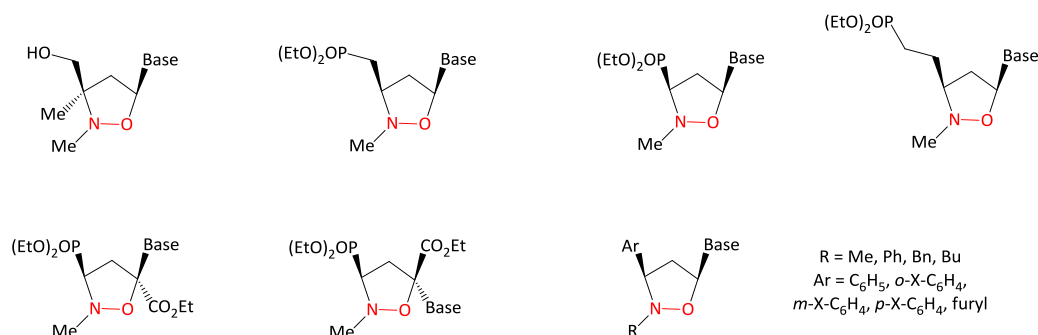


Figure 69 : Exemples de substitution des nucléosides isoxazolidines.^{286,287,288,289,290,291,292}

Une modification pouvant améliorer les propriétés biologiques de ces composés consiste à ajouter un substituant au carbone C_1 (un ester²⁹³ par exemple). Lorsque ce substituant est un groupe hydroxyméthyle, il s'agit des nucléosides psicofuranosyles.^{294,295,296,297} Il est possible de jouer sur la

²⁸⁶ U. Chiacchio, F. Genovese, D. Iannazzo, A. Piperno, P. Quadrelli, C. Antonino, R. Romeo, V. Valveri, A. Mastino, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3903-3909.

²⁸⁷ U. Chiacchio, E. Balestrieri, B. Macchi, D. Iannazzo, A. Piperno, A. Rescifina, R. Romeo, M. Saglimbeni, M. T. Sciortino, V. Valveri, A. Mastino, G. Romeo, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1389-1394.

²⁸⁸ U. Chiacchio, D. Iannazzo, A. Piperno, R. Romeo, G. Romeo, A. Rescifina, M. Saglimbeni, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 955-959.

²⁸⁹ U. Chiacchio, A. Rescifina, D. Iannazzo, A. Piperno, R. Romeo, L. Borrello, M. T. Sciortino, E. Balestrieri, B. Macchi, A. Mastino, G. Romeo, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3747-3750.

²⁹⁰ A. Piperno, S. V. Giofrè, D. Iannazzo, R. Romeo, G. Romeo, U. Chiacchio, A. Rescifina, D. G. Piotrowska, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2798-2805.

²⁹¹ R. Romeo, C. Carnovale, S. V. Giofrè, G. Romeo, B. Macchi, C. Frezza, F. Marino-Merlo, V. Pistarà, U. Chiacchio, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3652-3657.

²⁹² O. Bortolini, A. De Nino, T. Eliseo, R. Gavioli, L. Maiuolo, B. Russo, F. Sforza, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 6970-6976.

²⁹³ M. G. Saita, U. Chiacchio, D. Iannazzo, P. Merino, A. Piperno, T. Previtara, A. Rescifina, G. Romeo, R. Romeo, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, *22*, 739-742.

²⁹⁴ U. Chiacchio, A. Corsaro, D. Iannazzo, A. Piperno, A. Rescifina, R. Romeo, G. Romeo, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1777-1780.

²⁹⁵ D. Iannazzo, A. Piperno, V. Pistarà, A. Rescifina, R. Romeo, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 581-587.

²⁹⁶ U. Chiacchio, L. Borrello, D. Iannazzo, P. Merino, A. Piperno, A. Rescifina, B. Richichi, G. Romeo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2419-2425.

²⁹⁷ P. Camps, T. Gómez, D. Muñoz-Torrero, J. Rull, L. Sánchez, F. Boschi, M. Comes-Franchini, A. Ricci, T. Calvet, M. Font-Bardia, E. De Clercq, L. Naesens, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6657-6665.

configuration des carbones ou sur la nature des substituants pour obtenir différents *N,O*-psiconucléosides (Figure 70).

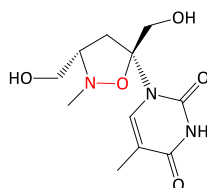


Figure 70 : Exemple de *N,O*-psiconucléosides.²⁹⁴

Ces cycles isoxazolidines peuvent aussi être substitués par une double liaison exocyclique. L'équipe de Romeo²⁹⁸ a ainsi préparé les trois composés de la Figure 71. Ces composés sont analogues à l'entécavir (Figure 71) qui montre une bonne activité sélective contre le virus de l'hépatite B et au DMDC (Figure 71) qui inhibe la croissance de différentes cellules tumorales humaines *in vitro* et *in vivo*.

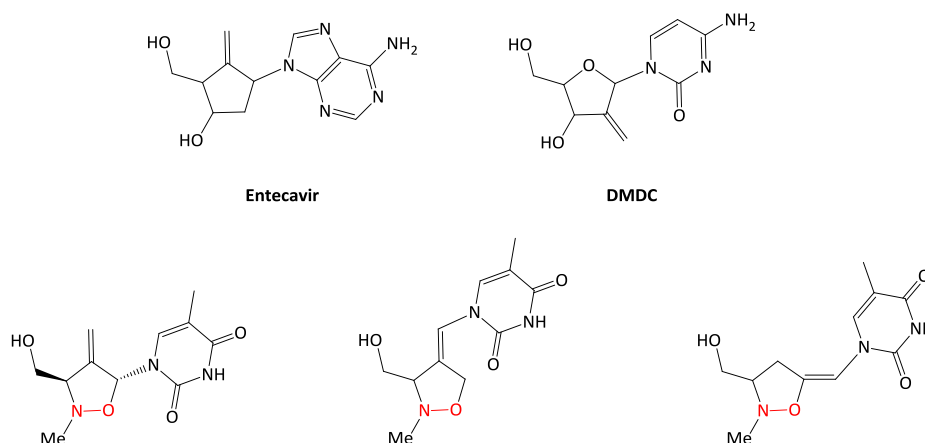


Figure 71 : Structure de l'entécavir, du DMDC et des 3 nucléosides isoxazolidines alkydènes préparés par l'équipe de Romeo.²⁹⁸

Des modifications au niveau de la base nucléique sont envisageables. Le tiazofurine est un C-nucléoside comportant un cycle thiazole qui exerce une bonne activité antitumorale. L'équipe de Romeo s'est donc intéressée à la préparation d'un analogue isoxazolidine du tiazofurine (Figure 72).²⁹⁹ Cette même équipe a préparé des *N,O*-nucléosides furoypyrimidines (Figure 72).³⁰⁰ Les analogues furoypyrimidines des *N,O*-nucléosides (Figure 72) ne montrent pas d'activité antivirale à des concentrations sub-toxiques. Cependant, certains sont capables d'inhiber la prolifération de cellules infectées par des virus très divers de 50% à des concentrations de 0,7 à 62,5 mmol/L.³⁰⁰

²⁹⁸ A. Piperno, A. Rescifina, A. Corsaro, M. A. Chiacchio, A. Procopio, R. Romeo, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 1517-1521.

²⁹⁹ P. Merino, T. Tejero, F. J. Unzurrunzaga, S. Franco, U. Chiacchio, M. G. Saita, D. Iannazzo, A. Piperno, G. Romeo, *Tetrahedron: Asymetry* **2005**, *16*, 3865-3876.

³⁰⁰ R. Romeo, S. V. Giofrè, A. Garozzo, B. Bisignano, A. Corsaro, M. A. Chiacchio, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5688-5693.

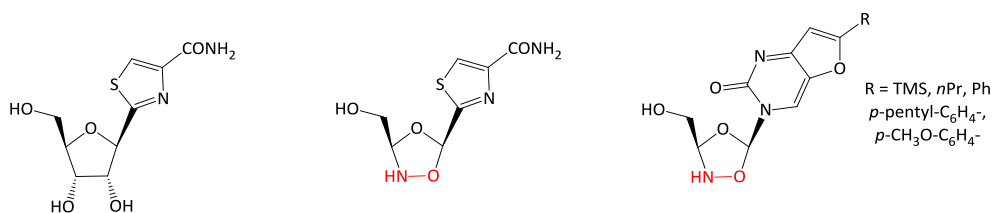


Figure 72 : A gauche : Structure du tiazofurine. Au milieu : Structure de l'analogue isoxazolidine du tiazofurine.²⁹⁹ A droite : Structure d'un furopyrimidine isoxazolidine (à droite).³⁰⁰

Par ailleurs, un grand intérêt a été porté aux nucléosides alcynyles. La présence d'une entité alcynyle peut être responsable d'une importante activité antitumorale. Ainsi, de tels composés sont actifs contre le VIH.³⁰¹ La position 5 des bases pyrimidines est idéale pour ces modifications.³⁰² En effet, les substituants en position 5 sont bien accueillis dans le grand sillon du duplex d'ADN B. L'introduction de substituants de taille moyenne (halogène, groupe alcynyle, etc.) peut même stabiliser le duplex en renforçant les appariements des bases.³⁰³ L'équipe de Scala a ainsi choisi d'introduire un substituant alcynyle en position 5 de *N,O*-nucléosides (Figure 73).³⁰⁴ Les propriétés antivirales et antitumorales des nucléosides isoxazolidines 5-alcynyles préparés par l'équipe de Scala³⁰⁴ ont été testées. Contrairement aux attentes, aucun de ces composés ne montre d'activité antivirale significative.

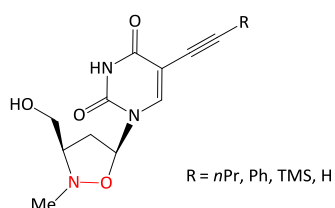


Figure 73 : Nucléoside 5-alcynyle isoxazolidine.³⁰⁴

Un espaceur couramment utilisé est le cycle 1,2,3-triazole. En effet, le cycle 1,2,3-triazole est facile à préparer et de nombreux composés contenant ce cycle ont montré des activités biologiques intéressantes. L'équipe de Glowacka s'est donc intéressée à la synthèse de nucléosides isoxazolidines contenant un cycle 1,2,3-triazole (Figure 74).³⁰⁵ L'ajout d'un tel espaceur peut se cumuler avec le remplacement de la base nucléique par un cycle aromatique.^{306,307} Un triazole peut également être greffé sur la base nucléique³⁰⁸ ou en position 5'.³⁰⁹

³⁰¹ H. Ohru, S. Kohgo, K. Kitano, S. Sakata, E. Kodama, K. Yoshimura, M. Matsuoka, S. Shigeta, H. Mitsuya, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4516-4525.

³⁰² F. Seela, V. R. Sirivolu, P. Chittepu, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 211-224.

³⁰³ Y. S. Lee, S. M. Park, H. M. Kim, S. K. Park, K. Lee, C. W. Lee, B. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4688-4691.

³⁰⁴ R. Romeo, S. V. Giofrè, D. Iaria, M. T. Sciortino, S. Ronsisvalle, M. A. Chiacchio, A. Scala, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 5690-5695.

³⁰⁵ D. G. Piotrowska, J. Balzarini, I. E. Glowacka, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 501-509.

³⁰⁶ R. Romeo, S. V. Giofrè, C. Carnovale, A. Campisi, R. Parenti, L. Bandini, M. A. Chiacchio, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7929-7937.

³⁰⁷ S. V. Giofrè, R. Romeo, C. Carnovale, R. Mancuso, S. Cirmi, M. Navarra, A. Garozzo, M. A. Chiacchio, *Molecules* **2015**, *20*, 5260-5275.

³⁰⁸ R. Romeo, S. V. Giofrè, C. Carnovale, M. A. Chiacchio, A. Campisi, R. Mancuso, S. Cirmi, M. Navarra, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 5442-5447.

³⁰⁹ R. Romeo, C. Carnovale, S. V. Giofrè, M. A. Chiacchio, A. Garozzo, E. Amata, G. Romeo, U. Chiacchio, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 328-334.

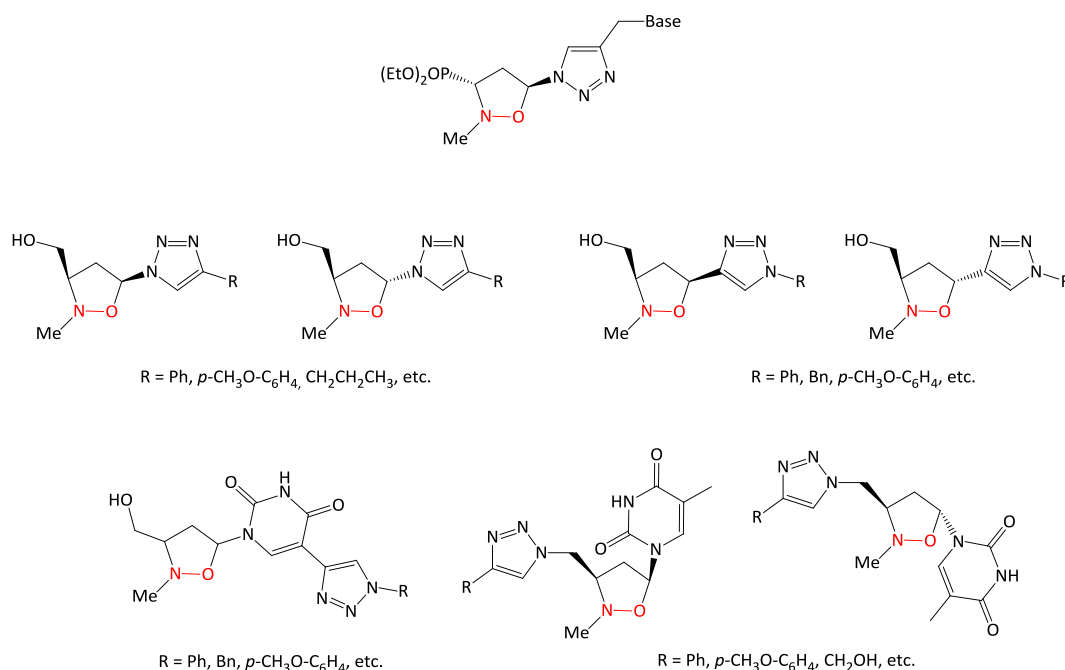


Figure 74 : En haut: Nucléosides isoxazolidines diéthylphosphonates contenant un cycle 1,2,3-triazole.³⁰⁵ Au milieu: Nucléosides Isoxazolidines contenant un cycle 1,2,3-triazole³⁰⁶ ou 2,3,4-triazole.³⁰⁷ En bas: Nucléosides isoxazolidines avec un cycle triazole sur la base³⁰⁸ ou en position 5'.³⁰⁹

Les nucléosides isoxazolidines contenant un cycle 1,2,3-triazole préparés par l'équipe de Glowacka³⁰⁵ (Figure 74) ne montrent pas d'activité antivirale à des concentrations sub-toxiques. Certains de ces composés sont cytostatiques à une certaine concentration. Certains *N,O*-nucléosides, dont la base liée au ribose par un triazole est remplacée par un groupe aromatique, inhibent la prolifération de lignées cellulaires humaines d'un cancer anaplasique ou folliculaire de la thyroïde. Ils induisent une activation de la protéine caspase 3 et une fragmentation de l'ADN préférentiellement dans les lignées cellulaires atteintes par le cancer folliculaire de la thyroïde.³⁰⁶ D'autres composés similaires³⁰⁷ font preuve d'un effet antiprolifératif : l'effet d'inhibition de croissance atteint 50% des cellules HepG2 et HT-29 et est même de 56% dans des lignées cellulaires de SH-SY5Y après 72 heures d'incubation à la concentration de 100 μ M. Par contre, ils n'inhibent l'activité d'aucun virus. D'autres nucléosides isoxazolidines avec un cycle triazole greffé sur la base nucléique se sont avérés être des agents anticancéreux prometteurs.³⁰⁸ Les *N,O*-nucléosides avec un cycle triazole en position 5' ont une activité antitumorale mais pas d'activité antivirale.³⁰⁹

Par ailleurs, des nouveaux analogues de nucléosides isoxazolidines avec un espaceur amide et un substituant aromatique à la place de la base nucléique ont été préparés (Figure 75).³¹⁰ Ces nucléosides ne montrent pas d'activité antivirale mais inhibent la prolifération de cellules L1210, CEM ou HeLa. L'espaceur peut également être simplement un CH₂ : ce sont des analogues isoxazolidines d'homonucléosides.^{311,312} Ces analogues ne montrent pas d'activité antivirale à des concentrations sub-toxiques mais certains inhibent la prolifération des cellules L1210.

³¹⁰ K. Kokosza, J. Balzarinni, D. G. Piotrowska, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1097-1108.

³¹¹ M. Lysakowska, J. Balzarini, D. G. Piotrowska, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2014**, *347*, 341-353.

³¹² U. Chiacchio, F. Genovese, D. Iannazzo, V. Librando, P. Merino, A. Rescifina, R. Romeo, A. Propopio, G. Romeo, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 441-448.

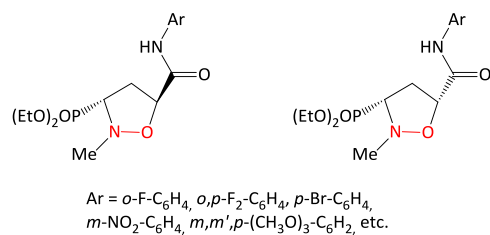


Figure 75 : En haut : Nucléosides isoxazolidines contenant un espaceur amide et un groupe aromatique remplaçant la base nucléique.³¹⁰ En bas : Analogues isoxazolidines d'homonucléosides.³¹¹

Des isoxazolidines comportant une insaturation ainsi que des isoxazoles ont été décrits (Figure 76).^{313,314}

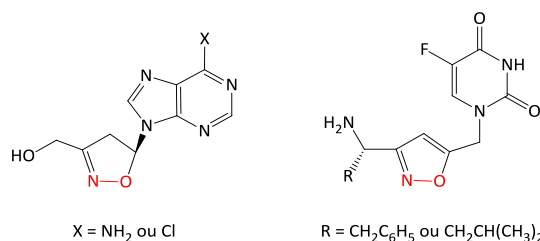


Figure 76 : Analogues insaturés des 2'-oxa-3'-azanucleosides carbocycliques.^{313,314}

L'équipe de Romeo a préparé un monomère de PNA isoxazolidine appelé isoxPNA (Figure 77).³¹⁵ Les isoxPNA sont des PNA dont la conformation est restreinte. Ils sont susceptibles d'être hydrophiles. Cependant, à notre connaissance, aucun oligomère n'a été décrit dans la littérature et leurs travaux se sont arrêtés au monomère.

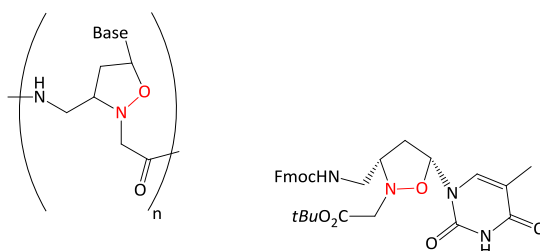


Figure 77 : A gauche : Structure des isoxPNA. A droite : Monomère correspondant préparé par l'équipe de Romeo.³¹⁵

Il est possible de modifier la position de l'azote et de l'oxygène sur le cycle isoxazolidine (Figure 78).³¹⁶ Ces nucléosides isoxazolidines inversés (Figure 78) ont été testés en tant qu'inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH-1 ou du virus de la myéloblastose aviaire (AMV).³¹⁶ Leur cytotoxicité sur des cellules MOLT-3 a également été évaluée. Leurs résultats sont intéressants et permettent de les envisager comme potentiels inhibiteurs de transcriptases inverses. Il est

³¹³ Y. S. Lee, B. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1395-1397.

³¹⁴ Y. Xiang, J. Chen, R. F. Schinazi, K. Zhao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1051-1054.

³¹⁵ P. Merino, T. Tejero, J. Mate's, U. Chiacchio, A. Corsaro, G. Romeo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1517-1520.

³¹⁶ R. Romeo, S. V. Giofrè, B. Macchi, E. Balestrieri, A. Mastino, P. Merino, C. Carnovale, G. Romeo, U. Chiacchio, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 565-569.

également possible d'ajouter un espaceur entre la base nucléique et le ribose. Cet espaceur peut être un groupe CH_2 : on obtient un 2'-aza-3'-oxohomonucléoside carbocyclique (Figure 78).³¹⁷

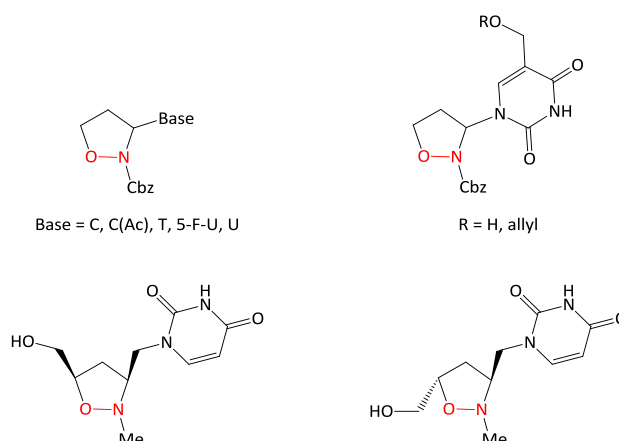


Figure 78 : En haut : Structure des 2'-aza-3'-oxonucléosides.³¹⁶ En bas : Structure des 2'-aza-3'-oxohomonucléosides carbocycliques.³¹⁷

Lorsqu'on remplace la liaison C-N glycosidique par une liaison C-C, on obtient des analogues isoxazolidines inversés de la pseudouridine (Figure 79).³¹⁸

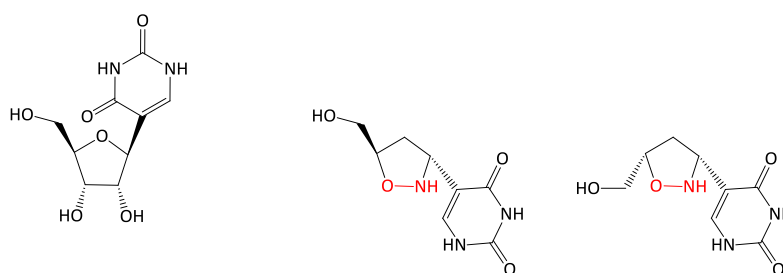


Figure 79 : A gauche : Structure de la pseudouridine. Au milieu et à droite : Structures d'analogues isoxazolidines de la pseudouridine.³¹⁸

II.1.b. Méthodes de préparation des nucléosides isoxazolidines

Deux grandes méthodologies permettent la construction du cycle isoxazolidine : une addition conjuguée ou une cycloaddition 1,3-dipolaire (Schéma 1).

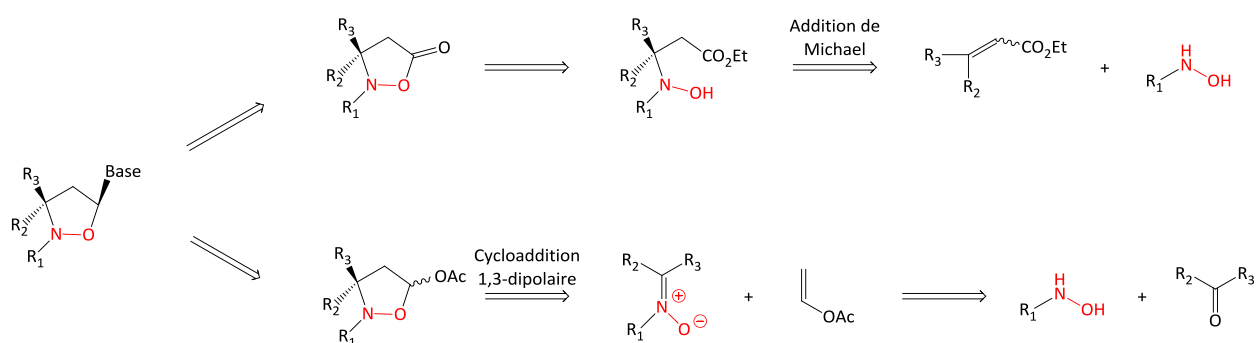


Schéma 1 : Approche rétrosynthétique pour un 2'-oxa-3'-azanucléoside carbocyclique.

³¹⁷ J. Gotkowska, J. Balzarini, D. G. Piotrowska, *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 7097-7100.

³¹⁸ U. Chiacchio, A. Corsaro, J. Mates, P. Merino, A. Piperno, A. Rescifina, G. Romeo, R. Romeo, T. Tejero, *Tetrahedron* **2003**, 59, 4733-4738.

Dès 1992, l'équipe de Tronchet²⁷⁷ a préparé le cycle isoxazolidine via une cycloaddition 1,3-dipolaire avec une nitroène. L'équipe de Zhao a exploité quant à elle une addition conjuguée.²⁷⁸ La première synthèse diastéréosélective et énantiosélective date de 1996 et fait appel à une addition conjuguée suivie d'une *N*-glycosylation stéréosélective.³¹⁹

II.1.b.i. Etude de l'addition conjuguée

En 1997, l'équipe de Zhao³²⁰ a mis au point une synthèse des nucléosides β-D-isoxazolidines basée sur l'addition conjuguée stéréosélective d'une hydroxylamine sur un ester α,β-insaturé (Schéma 2).

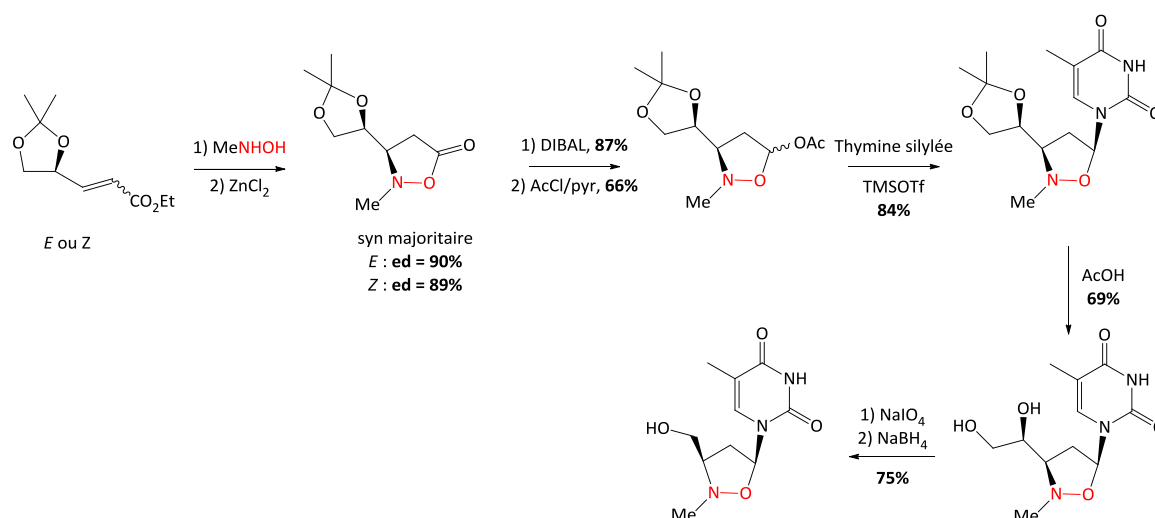


Schéma 2 : Préparation de la *N*-méthylthymidine isoxazolidine.³²⁰

Dans cette voie de synthèse, la préparation de l'isoxazolidinone est une étape clef. L'ester de configuration *E* est traité avec la *N*-méthylhydroxylamine dans le THF pendant 12 heures puis du chlorure de zinc (II) est ajouté. L'isoxazolidinone est obtenue sous forme d'un mélange de diastéréoisomères avec un excès diastéréoisomérique de 90% en faveur du composé *syn*. L'ester de configuration *Z* fournit également le diastéréoisomère *syn* avec un excès diastéréoisomérique de 89%. Cette addition conjuguée sur un système acyclique chiral est hautement stéréosélective. Le résultat étant indépendant de la stéréochimie de l'alcène, cette stéréosélectivité s'explique par le substituant diméthyl-dioxolane, exerçant soit une gêne stérique soit un effet directeur grâce à des liaisons hydrogène. Ensuite, la conversion de l'isoxazolidinone en D-nucléoside passe par une réaction de *N*-glycosylation. Cette étape est également stéréosélective et fournit majoritairement le stéréoisomère *cis* qui s'avère expérimentalement être le produit cinétique et le produit thermodynamique. Cette voie de synthèse hautement stéréosélective a été appliquée à d'autres nucléosides purines ou pyrimidines.³²⁰

II.1.b.ii. Etude de la cycloaddition 1,3-dipolaire

L'équipe de Romeo a étudié la cycloaddition 1,3-dipolaire servant à construire le cycle isoxazolidine. Dès 1996,³²¹ cette équipe a montré que cette réaction péricyclique est régiosélective.

³¹⁹ Y. Xiang, Y. Gong, K. Zhao, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4877-4880.

³²⁰ Y. Xiang, H. J. Gi, D. Niu, R. F. Schinazi, K. Zhao, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7430-7434.

Quelques années plus tard, cette même équipe,³²² en ajoutant une copule chirale sur la nitronne, l'a rendu stéréosélective (Schéma 3). Afin d'éviter de devoir travailler également sur la stéréosélectivité de la *N*-glycosylation, la cycloaddition a été effectuée directement sur la vinylnucléobase. Cela a permis de créer tous les centres chiraux lors de la même étape.

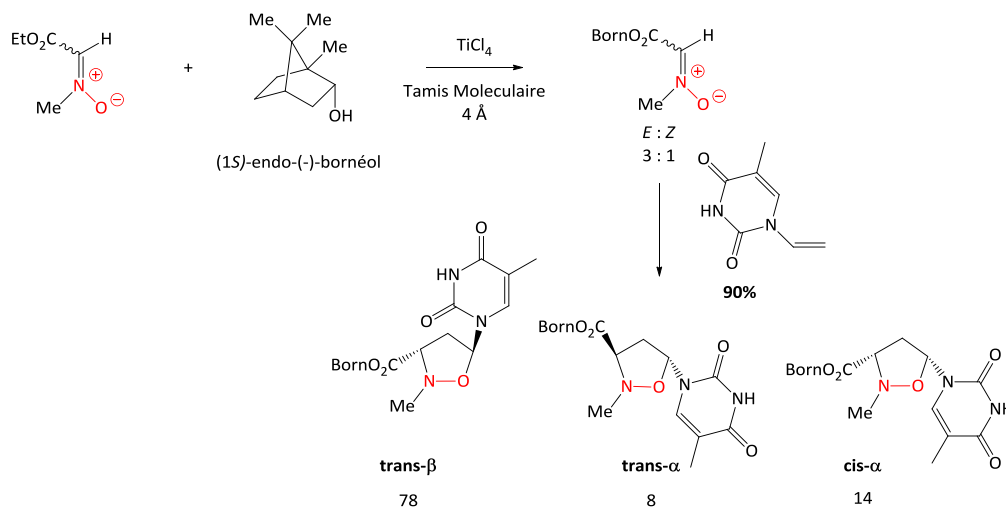


Schéma 3 : Préparation stéréosélective de nucléosides isoxazolidines.³²²

Cette réaction péricyclique a été étudiée pour différentes vinylnucléobases. Le Schéma 3 indique les proportions des produits obtenus dans le cas de la base nucléique thymine. Ces proportions sont mesurées grâce à l'intégration des signaux du spectre RMN ¹H. La détermination de la structure des produits est faite par mesures NOE. La dénomination *trans* ou *cis* concernent les substituants base nucléique et -CO₂Born. La dénomination α ou β concerne la stéréochimie du carbone C_{1'}. On constate que cette réaction est hautement régiosélective et l'approche *exo* (menant au produit *trans*) est favorisée.

Cette réaction montre une bonne diastéréosélectivité *cis/trans* et bonne induction asymétrique. La nitronne portant la copule chirale existe sous forme d'un mélange de deux isomères *E* et *Z*, le diastéréoisomère *E* obtenu majoritairement étant le plus réactif. La cycloaddition montre une très bonne sélectivité envers l'une des faces diastérotopes de la vinylnucléobase.

La généralité de cette réaction a été vérifiée avec d'autres vinylnucléobases.³²² Dans cette voie de synthèse, il reste ensuite à réduire l'ester pour obtenir le nucléoside isoxazolidine. La même stratégie utilisée en fixant la copule chirale sur l'azote de la nitronne permet d'obtenir les composés analogues non substitués sur l'azote.³²³

La cycloaddition 1,3-dipolaire s'est imposée comme la voie de synthèse des nucléosides isoxazolidines et a été utilisée dans des synthèses diastéréosélectives et énantiosélectives de *N,O*-psiconucléosides.^{294,295,296}

³²¹ U. Chiacchio, G. Gumina, A. Rescifina, R. Romeo, N. Uccella, F. Casuscelli, A. Piperno, G. Romeo, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8889-8898.

³²² U. Chiacchio, A. Corsaro, D. Iannazzo, A. Piperno, A. Procopio, A. Rescifina, G. Romeo, R. Romeo, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1893-1898.

³²³ U. Chiacchio, A. Corsaro, D. Iannazzo, A. Piperno, V. Pistrà, A. Rescifina, R. Romeo, G. Sindona, G. Romeo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2717-2723.

Cette réaction péricyclique permet également la préparation des nucléosides isoxazolidines alkylidènes.²⁹⁸ Dans ce but, une cycloaddition entre la nitronne et un allène est effectuée et conduit à trois produits principaux (Schéma 4).

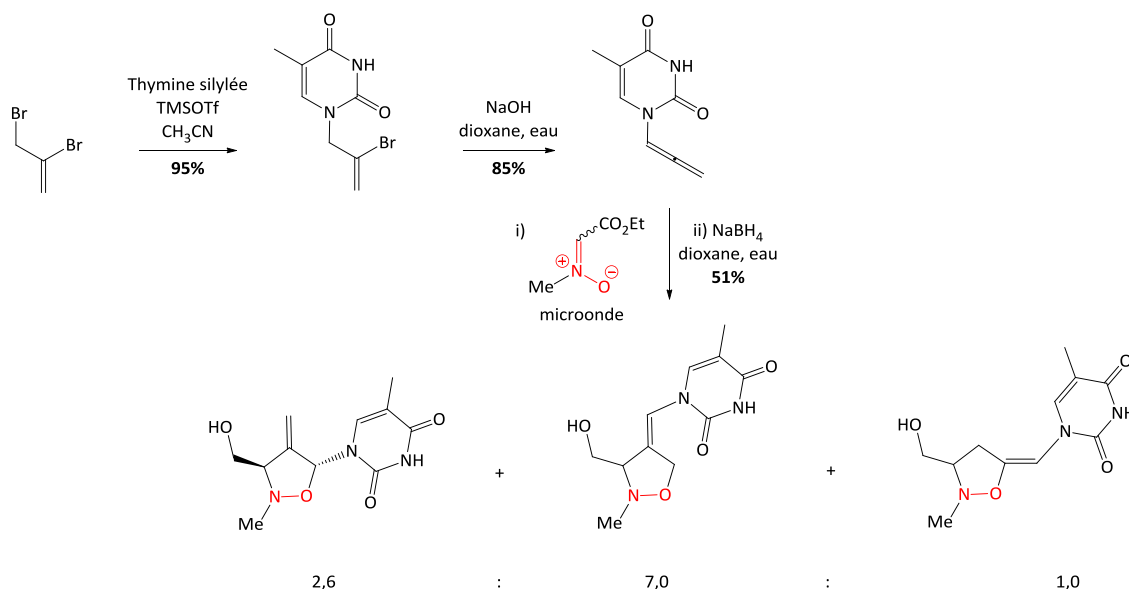


Schéma 4 : Préparation des nucléosides isoxazolidines alkylidènes.²⁹⁸

Des cycles isoxazolidines insaturés sont également formés par cette cycloaddition 1,3-dipolaire. Ainsi, dans la préparation des composés avec une insaturation dans le cycle, l'équipe de Zhao³¹⁴ a utilisé une cycloaddition entre la vinylchloropurine et le THPOCH₂CH₂NO₂ en présence de phénylisocyanate (Schéma 5).

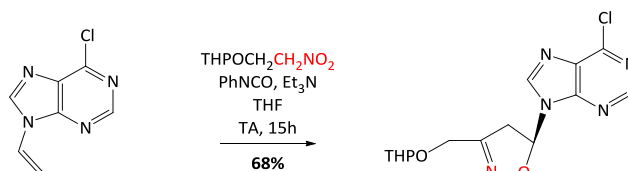


Schéma 5 : Préparation du cycle isoxazolidine insaturé.³¹⁴

Le cycle isoxazole est lui obtenu à partir d'une cycloaddition 1,3-dipolaire sur un alcyne. Le Schéma 6 fournit un exemple d'une telle réaction.³¹³

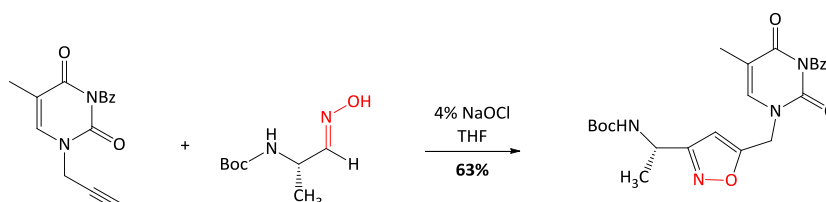


Schéma 6 : Formation par cycloaddition du cycle isoxazole.³¹³

Une autre possibilité beaucoup moins répandue³²⁴ faisant appel à une cycloaddition est une préparation de ces *N,O*-nucléosides en 2 étapes : une cycloaddition de la nitronne avec l'acétate de vinyle conduisant au cycle isoxazolidine suivie d'une *N*-glycosylation de Vorbrüggen. Il y a alors deux étapes dont il faut contrôler la stéréosélectivité.

³²⁴ E. Hýrošová, L. Fišera, M. Medvecký, H. U. Reissig, A. Al-Harrasi, M. Kóš, *ARKIVOC* **2009**, 9, 122-142.

II.1.b.iii. Autre possibilité : la réaction ène

Les composés nitrosocarbonyles sont facilement obtenus par différentes méthodes : oxydation de chlorooximes ou d'oxydes de nitrile (Schéma 7) ou cycloréversions thermiques ou photochimiques de 1,2,4-oxadiazole-4-oxides. Ils réagissent facilement dans des réactions d'hétéro Diels Alder.³²⁵

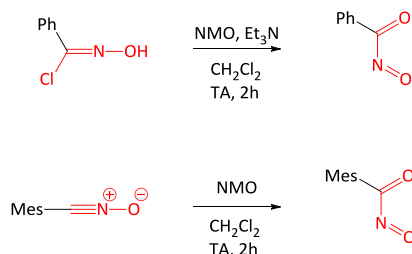


Schéma 7 : Méthodes de préparation d'intermédiaires nitrosocarbonyles.³²⁵

Ces composés sont très énohiles et peuvent facilement réagir avec une oléfine et en particulier avec des alcools allyliques comme le 3-méthylbut-2-èn-1-ol ou ses dérivés éthers méthyliques ou acétyles. Un aménagement fonctionnel et une *N*-glycosylation ultérieure conduisent aux nucléosides désirés (Schéma 8).^{325,326}

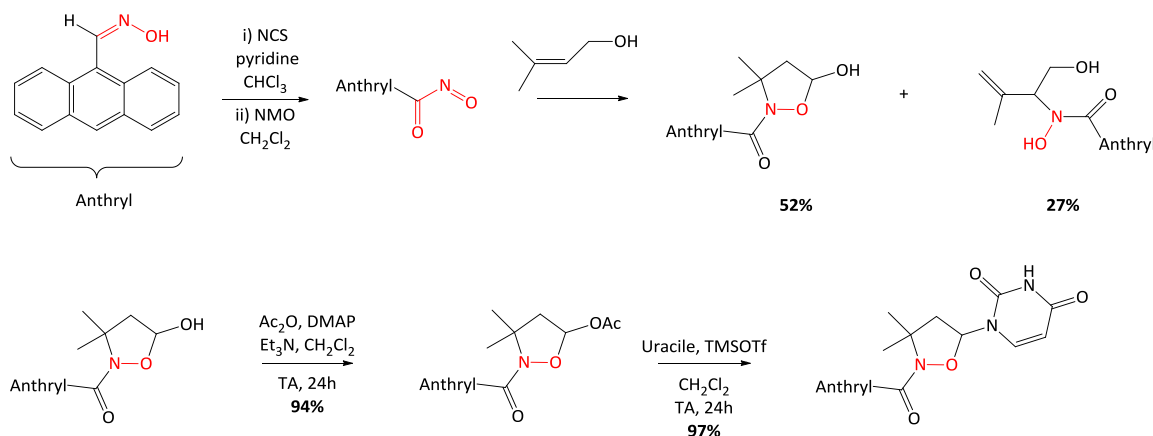


Schéma 8 : Préparation de *N,O*-nucléosides à partir d'une réaction ène.³²⁵

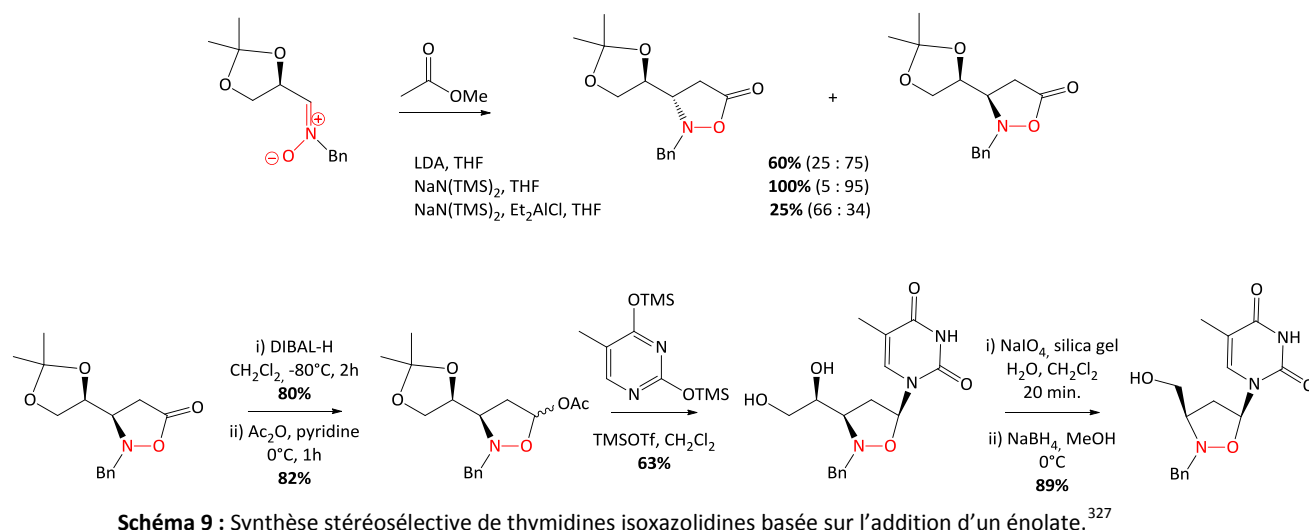
II.1.b.iv. Autre possibilité : addition d'un énolate sur l'acétate de méthyle

L'équipe de Merino a mis au point une autre méthode d'obtention de ces nucléosides à partir de nitrones.³²⁷ Elle est basée sur l'addition stéréosélective de l'énolate de l'acétate de méthyle sur une nitronne. Un aménagement fonctionnel et une *N*-glycosylation ultérieure fournissent le nucléoside énantiomériquement pur avec un bon rendement (Schéma 9).

³²⁵ P. Quadrelli, M. Mella, S. Carosso, B. Bovio, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 516-526.

³²⁶ P. Quadrelli, M. Mella, S. Carosso, B. Bovio, *Synthesis* **2013**, *45*, 1414-1420.

³²⁷ P. Merino, S. Franco, N. Garces, F. L. Merchan, T. Tejero, *Chem. Commun.* **1998**, 493-494.



II.2. Autres nucléosides à liaison N-O

III.2.a. Les nucléosides oximes

III.2.i. Exemples de nucléosides oximes

Il est envisageable de greffer une liaison oxime à différentes positions sur des nucléosides. Des composés dérivés de la thymidine et présentant une fonction oxime en position 3' ont été préparés (Figure 80) et étudiés.²⁷¹ Leur conformation est dépendante de la stéréochimie de la double liaison et du substituant R. Certains de ces composés ont une activité antivirale intéressante, en particulier contre le VIH.

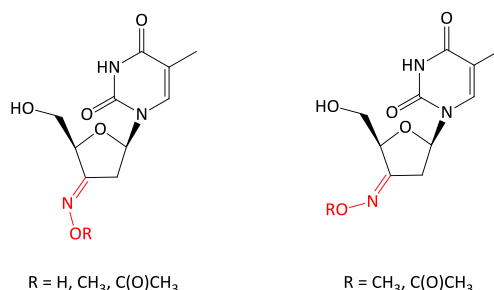


Figure 80 : Structure de (*E*)-[2,3-didésoxy-3-(*N*-hydroxyimino)-β-D-glycéro-pentofuranosyl]thymine, des dérivés *O*-méthylloximes et des dérivés *O*-acétyloximes (*E*) et (*Z*).²⁷¹

L'introduction d'un atome de fluor électroattracteur sur le ribose de nucléosides a conduit à l'identification de composés ayant une activité biologique significative.³²⁸ Les propriétés intéressantes de nucléosides fluorés proviennent de la relative stabilité de la liaison carbone-fluor vis-à-vis des clivages chimiques et enzymatiques et de la forte électronégativité du fluor qui affecte les propriétés stéréoélectroniques de toute la molécule. Le fluor peut être un bon mime d'atome d'hydrogène (petite taille) et de groupe hydroxyle (même polarité), ce qui peut influencer sur la stabilité de la liaison glycosidique de nucléosides sensibles en milieu acide et sur la conformation du sucre. L'équipe de C. Périgaud³²⁹ a ainsi choisi de combiner la présence d'un atome de fluor et d'une fonction oxime sur un nucléoside et a préparé différents nucléosides de ce type (Figure 81). L'activité

³²⁸ P. Liu, A. Sharon, C. K. Chu, *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 743-766.

³²⁹ A. Khalil, C. Mathé, C. Périgaud, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3172-3179.

antivirale et cytotoxique de ces composés a ensuite été testée mais aucun ne montre d'activité intéressante.

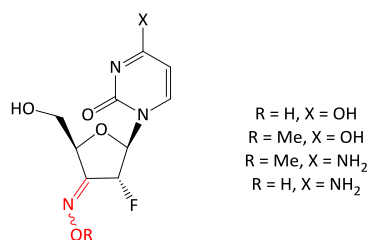


Figure 81 : Structure des nucléosides 2',3'-didésoxy-2'-fluoro-3'-(hydroxyimino) et -3'-(méthoxyimino)pyrimidines.³²⁹

La glycosylation des protéines est une des modifications post-transcriptionnelles les plus omniprésentes et complexes. L'étude biologique de la *O*-glycosylation est compliquée étant donné que les moyens chimiques pour contrôler cette modification font défaut. L'inhibition de l'UDP-GlcNAc 4-épimérase humaine qui synthétise l'UDP-GalNAc (carbohydrate donneur initiant la *O*-glycosylation) pourrait être un outil puissant pour inhiber réversiblement la *O*-glycosylation. Une librairie de nucléosides uridines présentant une fonction oxime a été étudiée comme inhibiteur de l'UDP-GlcNAc 4-épimérase humaine (Figure 82).³³⁰

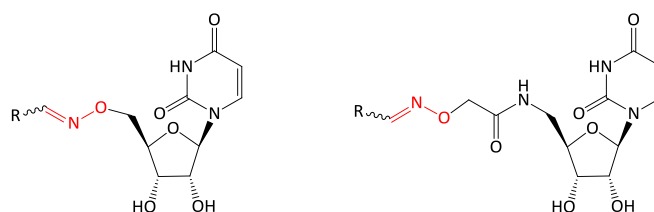


Figure 82 : Librairie de nucléosides testés.³³⁰

Un bon inhibiteur pour l'enzyme 4-épimérase a été identifié (Schéma 10). Les tests *in vitro* de ce composé face à un ensemble d'enzymes confirment sa spécificité pour la 4-épimérase.

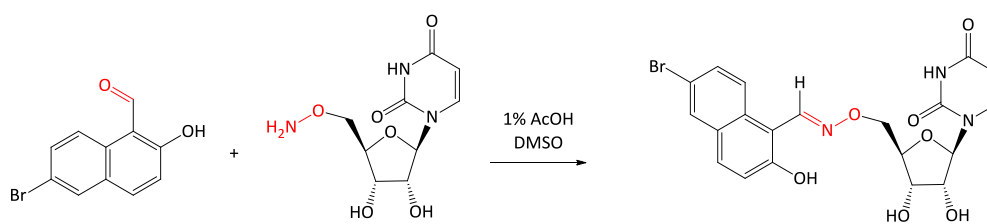


Schéma 10 : Structure et préparation de l'inhibiteur de l'UDP-GlcNAc 4-épimérase.³³⁰

Par ailleurs, des nucléosides présentant une fonction oxime peuvent servir de donneur de monoxyde d'azote et faire preuve d'une activité antivirale.³³¹

III.2.ii. Préparation des nucléosides oximes

Les oximes sont classiquement obtenues par condensation de l'hydroxylamine (substituée ou non) sur la cétone correspondante (Schéma 11). Une catalyse acide est nécessaire pour activer l'électrophilie du dérivé carbonyle. Cependant, le milieu ne doit être trop acide pour conserver la

³³⁰ K. A. Winans, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 113-129.

³³¹ J. B. Shi, S. Xu, Y. P. Wang, J. J. Li, Q. Z. Yao, *Chinese Chem. Lett.* **2011**, *22*, 899-902.

nucléophilie de l'hydroxylamine. Ainsi, on utilise l'hydroxylamine sous forme de chlorhydrate ou l'hydroxylamine en présence d'HCl et de pyridine.

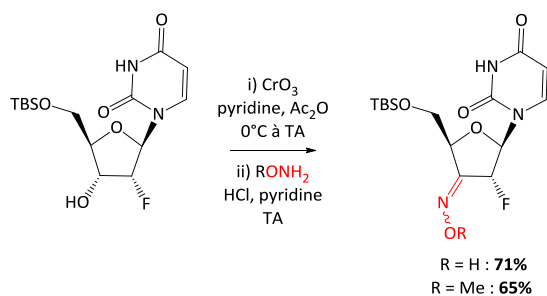


Schéma 11 : Préparation d'un nucléoside oxime par condensation de l'hydroxylamine sur un dérivé carbonyle.³²⁹

Il existe cependant d'autres méthodes. Ainsi, Kim et Ryu³³² ont démontré que la réaction de certains oxydes de nitrile stables avec un nucléoside uracile conduit à une substitution du H₅ par une oxime de configuration Z (Schéma 12). L'oxyde de nitrile est généré *in situ* à partir de la chlorooxime correspondante. Aucun produit de cycloaddition n'est obtenu et seul le produit d'addition 1,3 est isolé. Les études ont montré que l'oxyde de nitrile réagit avec la base uracile pour conduire à un produit de cycloaddition. Par la suite, ce produit s'ouvre pour donner le produit d'addition 1,3. On notera que de telles oximes peuvent subir un réarrangement de Beckman et conduire aux amides correspondants.³³³

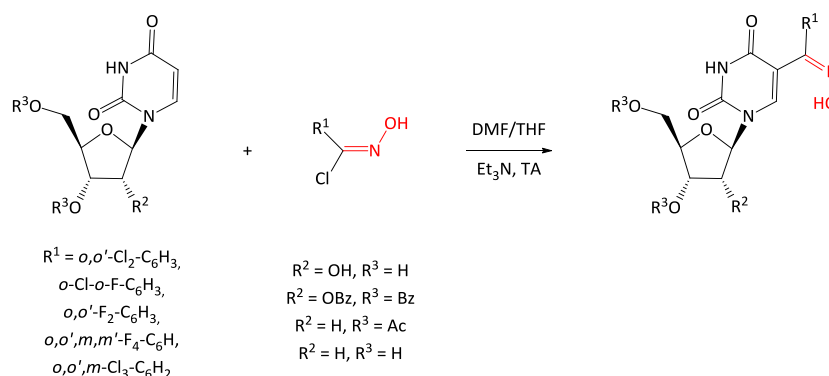


Schéma 12 : Réaction d'un oxyde de nitrile avec un nucléoside uracile.³³²

III.2.b. Les nucléosides hydroxylamines et alkoxyamines

Les dérivés d'hydroxylamine peuvent être facilement réduits en amines ou oxydés en nitroène ou conduire à des radicaux. Pour ces raisons, l'introduction d'une fonction hydroxylamine sur un nucléoside peut lui conférer des propriétés biologiques intéressantes.

III.2.b.i. Exemples de nucléosides hydroxylamines

L'équipe de Tronchet a préparé des nucléosides portant un groupe hydroxylamino en position 3' ou 5' (Figure 83).^{334,335,336,337}

³³² J. N. Kim, E. K. Ryu, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1088-1092.

³³³ D. Bärwolff, P. Langen, *Nucleic Acids Res.* **1978**, *1*, s227-s230.

³³⁴ J. M. J. Tronchet, R. Benhamza, N. Dolatshahi, M. Geoffroy, H. Türlér, *Nucleosides Nucleotides* **1988**, *7*, 249-269.

³³⁵ J. M. J. Tronchet, K. Mekhael, J. Graf-Poncet, R. Benhamza, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 1893-1896.

³³⁶ J. M. J. Tronchet, M. Zsély, K. Capek, F. de Villedon de Naide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1723-1728.

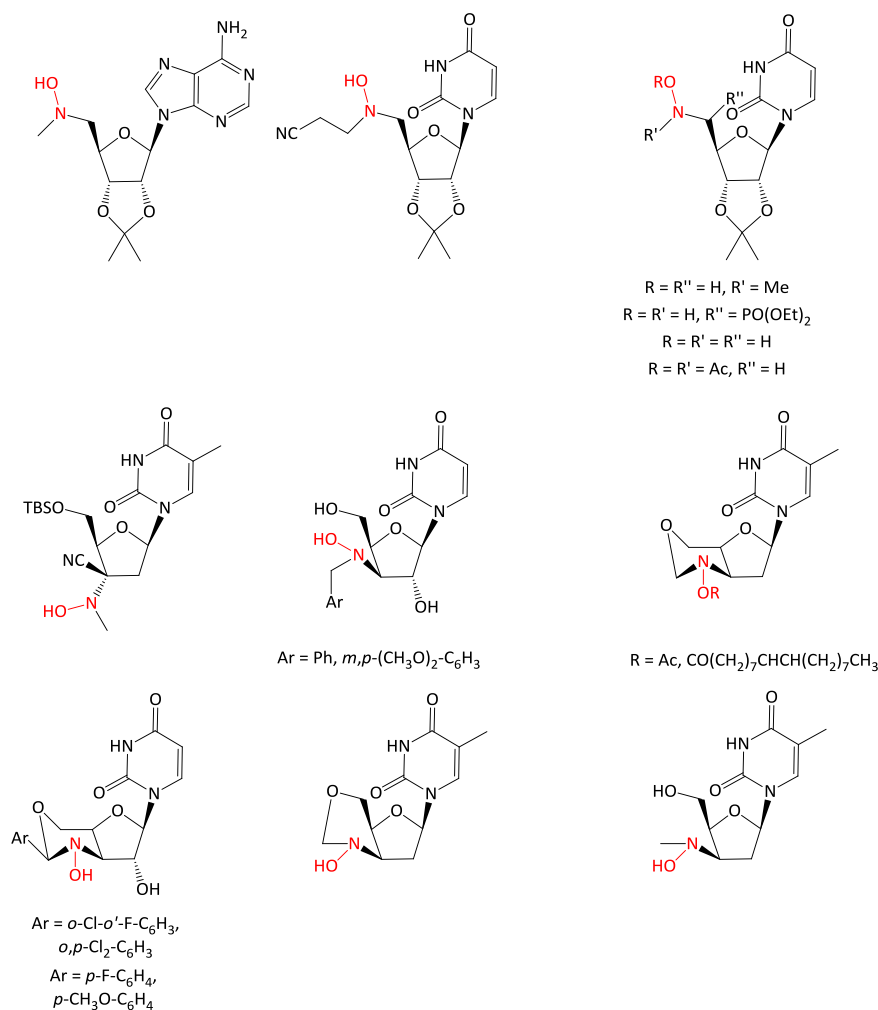


Figure 83 : Structure de quelques nucléosides hydroxylamines préparés par l'équipe de Tronchet.^{334,335,336,337}

La même équipe a proposé des composés similaires avec l'hydroxylamine en position 2'.³³⁸ Ces derniers, majoritairement de configuration arabino, sont obtenus par réaction du composé 2'-désoxyiminouridine correspondant. Cependant, les composés de configuration arabino subissent une addition conjuguée sur le cycle uracile et mènent à un nouveau type de nucléosides (Schéma 13).

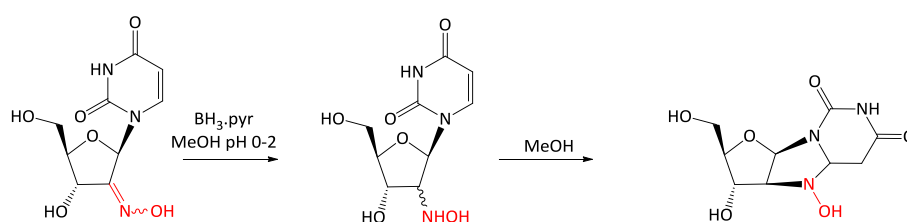


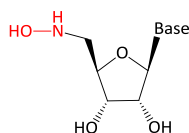
Schéma 13 : Préparation d'un nouveau type de nucléoside.³³⁸

Miller et Li³³⁹ ont préparé des nucléosides 5'-désoxy-5'-*N*-hydroxylaminopyrimidines et purines. De tels composés peuvent permettre de préparer des oligonucléotides avec un lien hydroxamate (Figure 84).

³³⁷ J. M. J. Tronchet, M. Zsely, K. Capek, I. Komaromi, M. Geoffroy, E. De Clerq, *Nucleosides Nucleotides* **1994**, *13*, 1871-1889.

³³⁸ J. M. J. Tronchet, R. Benhamza, G. Bernardinelli, M. Geoffroy, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 531-534.

³³⁹ H. Li, M. J. Miller, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9289-9293.



Base = A, C, G, U

Figure 84 : Structure des nucléosides 5'-désoxy-5'-N-hydroxylaminopyrimidines et purines.³³⁹

Un intérêt de ces composés souligné par J. M. J. Tronchet réside dans leur oxydation spontanée en radicaux libres nitroxyde, ce qui est intéressant pour le marquage de spins permettant d'étudier le mode d'action de nucléosides thérapeutiques. Certains de ces composés ont d'ailleurs montré une bonne activité antivirale tout en étant peu cytotoxiques.

Quelques années plus tard, l'équipe de Matsuda^{340,341} a préparé le 2'-désoxy-2'-hydroxylaminouridine (2'-DHAU), cytidine (2'-DHAC), adénine (2'-DHAA), leurs 2'-désoxy analogues ainsi que leurs régioisomères en position 3' (Figure 85).

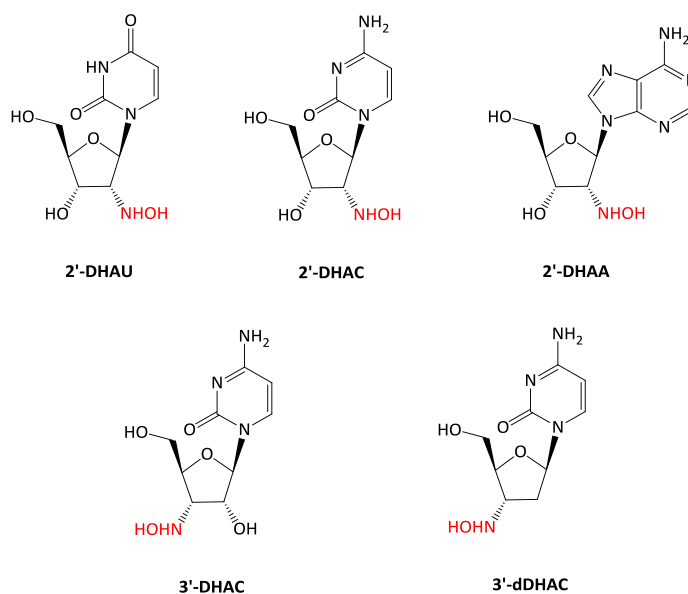


Figure 85 : Structure du 2'-DHAU, du 2'-DHAC, du 2'-DHAA, du 3'-DHAC et du 3'-dDHAC.^{340,341}

Les pKa du groupe hydroxylamino (-NHOH/-NHO⁻) du 2'-DHAU et du 3'-DHAU sont respectivement de 2,9 et de 3,4. Ces nucléosides se décomposent dans des solutions neutres mais pas en solution acide. Cette décomposition est probablement liée à la génération de radicaux sur le ribose. La capacité du 2'-DHAC à conduire à des radicaux a été étudiée par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE). Le spectre RPE obtenu permet de déterminer la structure du radical formé (Figure 86). Ce radical est généré par homolyse dès que le 2'-DHAC est dissous dans la solution tampon phosphate et sa demi-vie est de 35 minutes.

³⁴⁰ A. Ogawa, S. Shuto, O. Inanami, M. Kuwabara, M. Tanaka, T. Sasaki, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1913-1918.

³⁴¹ A. Ogawa, M. Tanaka, T. Sasaki, A. Matsuda, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5094-5107.

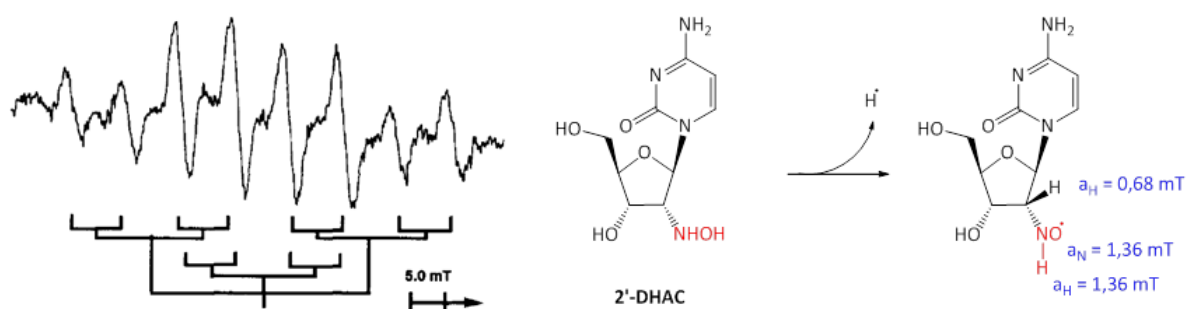


Figure 86 : A gauche : Spectre RPE du 2'-DHAC (20 mmol/L) dans une solution tampon phosphate (pH 7,0 à 200 mmol/L), 10 minutes après dissolution. A droite : Mécanisme de formation du radical dans une solution neutre. Les constantes de couplage hyperfin sont indiquées en bleu.³⁴⁰

Le 2'-DHAC inhibe la croissance de cellules L1210 (cellules leucémiques de souris) et KB (cellules humaines épidermoïdes), avec des valeurs respectives d' IC_{50} de 1,58 et 1,99 μM . Il est plus efficace que le 2'-DHAU et 2'-DHAA dont les valeurs respectives d' IC_{50} sont de 34 et 27,3 μM . Le 2'-DHAC est efficace dans le cas de 9 lignées cellulaires tumorales humaines, avec des valeurs d' IC_{50} de l'ordre du micromolaire. Il a également montré une activité antitumorale sur des cellules leucémiques implantées chez la souris. La phosphorylation du 2'-DHAC par la kinase uridine/cytidine est essentielle pour sa cytotoxicité car l'inhibition de la synthèse d'ADN est le principale mode d'action du 2'-DHAC. On notera que la cytotoxicité du 2'-DHAC et du 3'-DHAC contre des cellules L1210 est renversée par l'addition de cytidine, tandis que celle du 3'-dDHAC est renversée par l'addition de 2'-désoxycytosine. Cela signifie que l'activité antitumorale des 2'-DHAC et 3'-DHAC nécessite la phosphorylation par l'uridine/cytidine kinase (UCK) tandis que le 3'-dDHAC est phosphorylé par la désoxycytidine kinase (dCK).

Les carbonucléosides sont devenus une classe importante de composés en raison de leur stabilité métabolique. Mulvihill et Miller³⁴² se sont intéressés à des carbonucléosides présentant une fonction hydroxylamine en position 4'. De tels composés sont intéressants pour plusieurs raisons. La fonction hydroxylamine peut servir d'isostère au groupe hydroxyméthyle. La liaison N-O étant plus faible que la liaison C-O, des modifications chimiques sont envisageables après la phosphorylation. De plus, les carbonucléosides hydroxylamines sont neutres à pH physiologique ($pK_a(N\text{-hydroxyméthylammonium}) = 6$), ce qui ne limite pas la pénétration cellulaire. Par ailleurs, un hydroxyle est présent en position 5', ce qui permet la reconnaissance par les kinases virales. Des dérivés carbonucléosides de 4'-hydroxylaminoadénine énantiomériquement purs et dérivant de nucléosides biologiquement actifs ont été préparés (Figure 87).³⁴²

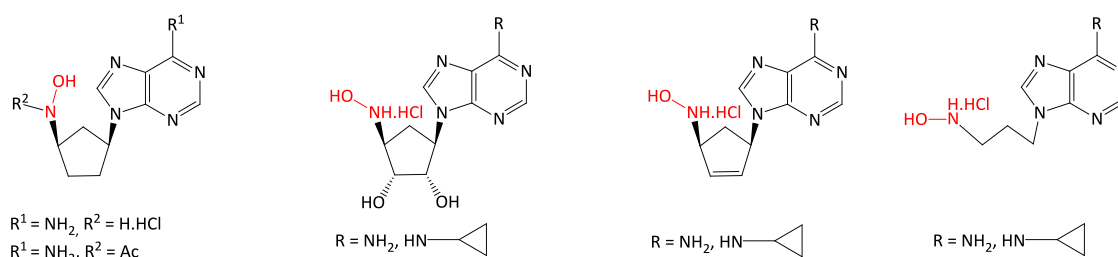


Figure 87 : Analogues carbocycliques de nucléosides hydroxylamines.³⁴²

³⁴² M. J. Mulvihill, M. J. Miller, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6605-6626.

Des nucléosides présentant une fonction alkoxyamine en position 2' ont été incorporés dans des séquences oligonucléotidiques par synthèse en phase solide (Figure 88).³⁴³ L'incorporation de ces nucléosides modifiés en 2' a un effet défavorable sur l'affinité avec l'ARN ou l'ADN complémentaire. Cependant, la reconnaissance de leur cible est bonne : l'isomère arabino se fixe préférentiellement à l'ARN tandis que l'isomère ribo se fixe préférentiellement à l'ADN. Ces modifications augmentent également la résistance aux nucléases.

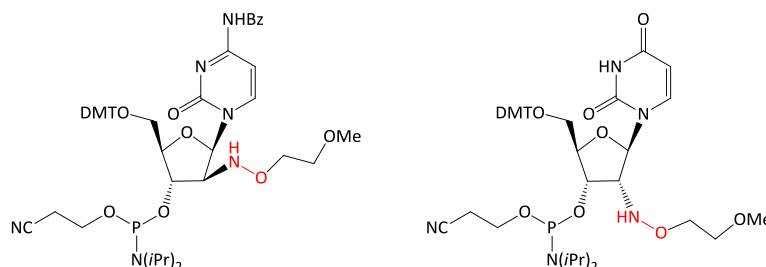


Figure 88 : Nucléosides hydroxylamines prêts à être incorporés dans des séquences oligonucléotidiques.³⁴³

L'azote de la fonction alkoxyamine peut remplacer l'oxygène du ribose (Figure 89).³⁴⁴

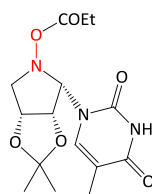


Figure 89 : Nucléoside alkoxyamine dans lequel l'oxygène du ribose est remplacé par N(OCOEt).³⁴⁴

III.2.b.ii. Préparation des nucléosides hydroxylamines et alkoxyamines

Une fonction hydroxylamine ou alkoxyamine peut être introduite :

- Par réduction de la nitroène correspondante. La condensation d'hydroxylamines avec des aldéhydes conduit à des oximes dont la réduction conduit à des composés hydroxylamines (Schéma 14).³³⁴

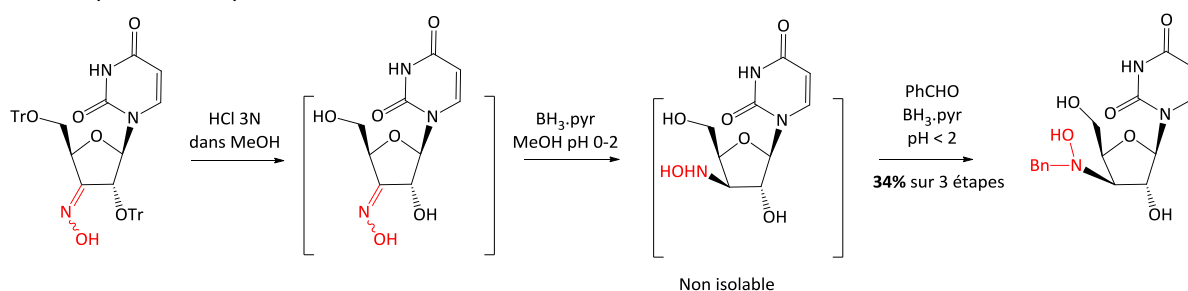


Schéma 14 : Préparation d'un nucléoside hydroxylamine par réduction de l'oxime correspondante.³³⁴

³⁴³ T. S. Zatsepin, Y. M. Ivanova, T. S. Oretskaya, *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 1537-1545.

³⁴⁴ J. M. J. Tronchet, G. Zosimo-Landolfo, M. Balkadjan, A. Ricca, M. Zsély, F. Barbalat-Rey, D. Cabrini, P. Lichtle, M. Geoffroy, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4129-4132.

- Par réaction de Mitsunobu (Schéma 15).³⁴²

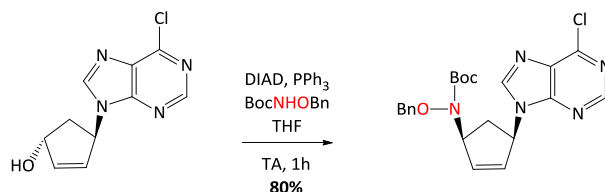


Schéma 15 : Préparation d'un nucléoside alkoxyamine par réaction de Mitsunobu.³⁴⁴

- Par substitution nucléophile de l'hydroxylamine sur un dérivé électrophile présentant un bon groupe partant. Des travaux récents³⁴⁵ ont montré que le 5'-désoxy-5'-N-hydroxylaminoguanosine peut être obtenu par substitution nucléophile en solvant aqueux et ce, sans groupements protecteurs et chromatographie (Schéma 16).

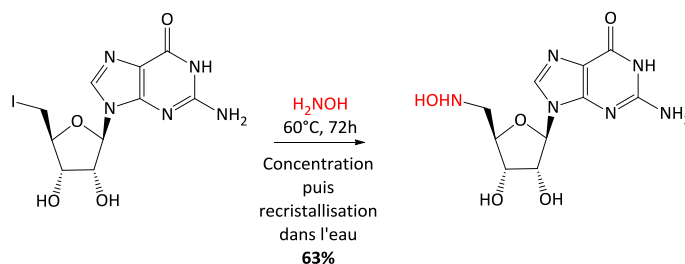


Schéma 16 : Préparation d'un nucléoside hydroxylamine par substitution nucléophile.³⁴⁵

Cette substitution peut aussi se faire sur l'anhydrouridine et conduit à son ouverture (Schéma 17).³⁴⁶

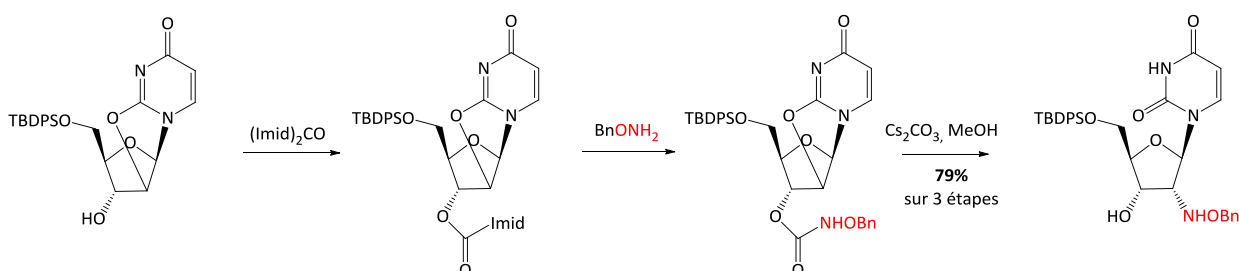


Schéma 17 : Préparation d'un nucléoside hydroxylamine par ouverture nucléophile d'un anhydronucléoside.³⁴⁶

- Par addition conjuguée. Une hydroxylamine peut effectuer une addition conjuguée sur une lactone α,β -insaturée. Une telle réaction peut être utilisée lors de la synthèse du 2',3'-didésoxy-2'- β -fluoro-3'-(N-hydroxy-N-méthylamino)-D-arabinofuranosylnucléoside (Schéma 18).^{347,348}

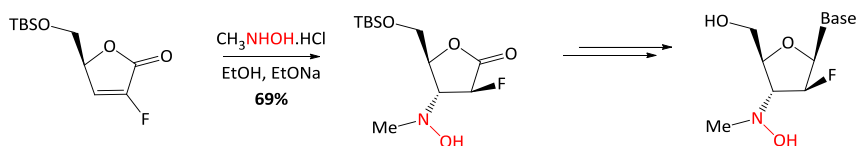


Schéma 18 : Addition conjuguée d'une hydroxylamine.³⁴⁷

³⁴⁵ P. Brear, G. R. Freeman, M. C. Shankey, M. Trmčić, D. R. W. Hodgson, *Chem. Commun.* **2009**, 4980-4981.

³⁴⁶ D. P. Sebersta, S. S. O'Rourke, R. L. Martinez, W. A. Pieken, D. P. C. McGee, *Tetrahedron* **1996**, 52, 14385-14402.

³⁴⁷ S. Pan, J. Wang, K. Zhao, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 4-5.

³⁴⁸ S. Wang, J. Chang, S. Pan, K. Zhao, *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 327-339.

III.2.c. Les nucléosides *N*-oxyamines

En raison de l'effet α , la fonction *N*-oxyamine est très nucléophile et réagit facilement avec des électrophiles (dérivés carbonylés, dérivés d'acides carboxyliques, etc.). Une *N*-oxyamine est moins basique que l'amine correspondante (pK_a (R-OH₃⁺/R-OH₂) \approx 4,6 et pK_a (R-NH₃⁺/R-NH₂) \approx 10). Cette fonction est facilement engagée dans les liaisons hydrogène.

III.2.c.i. Exemples de nucléosides oxyamines

Les nucléosides oxyamines ont été étudiés pour de potentielles propriétés thérapeutiques, par exemple en radiolyse.³⁴⁹

Les aminooxynucléosides peuvent être incorporés dans des séquences oligonucléotidiques. Des aminooxynucléosides ont ainsi été incorporés via une synthèse en phase solide dans la séquence de ribozymes en tête de marteau.³⁵⁷ Cette incorporation a des effets importants sur l'activité du ribozyme. L'équipe de Manoharan³⁵⁰ a incorporé des 2'-*O*-[2-[(*N,N*-diméthylamino)oxyéthyl]] nucléosides appelés 2'-*O*-DMAOE nucléosides (Figure 90) dans des oligonucléotides contenant des bases puriques et pyrimidiques avec des liens phosphodiester et/ou phosphorothioates. Cette modification en position 2' augmente l'affinité pour l'ARN complémentaire (mais pas pour l'ADN complémentaire). Les oligonucléotides modifiés avec des liens phosphodiester possèdent une excellente résistance aux nucléases (avec des temps de demi-vie supérieur à 24 heures). Ils ont également préparé des gampères avec des 2'-*O*-DMAOE nucléosides sur les ailes et des oligonucléotides ne comportant que des 2'-*O*-DMAOE nucléosides et ont évalué leurs capacités à inhiber l'expression des gènes cibles.^{351,352} Sous forme de gampères, les oligonucléotides avec les ailes en 2'-*O*-DMAOE sont capables de faire intervenir les RNases H et d'inhiber l'expression des gènes. Les oligonucléotides totalement modifiés par des 2'-*O*-DMAOE nucléosides sont quant à eux capables d'inhiber la traduction par un mode d'action ne faisant pas intervenir les RNases H. Des composés similaires avec l'oxyamine non protégée ou substituée par des groupes éthyles ont également été étudiés.³⁵³

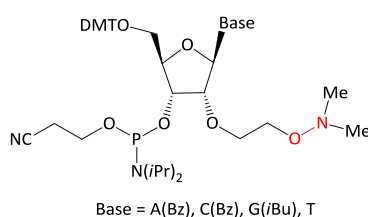


Figure 90 : Nucléosides incorporés dans des séquences oligonucléotidiques par l'équipe de Manoharan.³⁵⁰

Des nucléosides triphosphates ayant un groupe aminooxyle en position 3' et possédant ou non un groupe fluorescent sur leurs nucléobases ont été préparés (Figure 91).³⁵⁴ Des ADN

³⁴⁹ T. Kuroda, K. Hisamura, I. Matsukuma, H. Nishikawa, M. Morimoto, T. Ashizawa, N. Nakamizo, *J. Heterocyclic Chem.* **1992**, *29*, 1133-1142.

³⁵⁰ T. P. Prakash, A. M. Kawasaki, A. S. Fraser, G. Vasquez, M. Manoharan, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 357-369.

³⁵¹ T. P. Prakash, A. M. Kawasaki, J. F. Johnston, M. J. Graham, T. P. Condon, M. Manoharan, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 829-832.

³⁵² T. P. Prakash, J. F. Johnston, M. J. Graham, T. P. Condon, M. Manoharan, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 828-833.

³⁵³ T. P. Prakash, M. Manoharan, A. M. Kawasaki, E. A. Lesnik, S. R. Owens, G. Vasquez, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3995-3998.

³⁵⁴ D. Hutter, M. J. Kim, N. Karalkar, N. A. Leal, F. Chen, E. Guggenheim, V. Visalakshi, J. Olejnik, S. Gordon, S. A. Benner, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2010**, *29*, 879-895.

polymérase pouvant les intégrer dans une séquence ont été identifiées. Elles permettent l'ajout d'un seul nucléotide à l'extrémité 3' d'une amorce. L'acide nitreux HONO permet de cliver le 3'-ONH₂ dans des conditions douces et ainsi de permettre la poursuite de l'extension d'amorce. Ce processus exploite la grande réactivité de la fonction oxyamine. Ces cycles extension/clivage/extension en solution sont réalisés avec des nucléosides fluorescents, non fluorescents ou en mélange. Ces groupes 3'-ONH₂ bloquant l'extension d'amorce sont intéressants pour des séquençages de nouvelle génération.

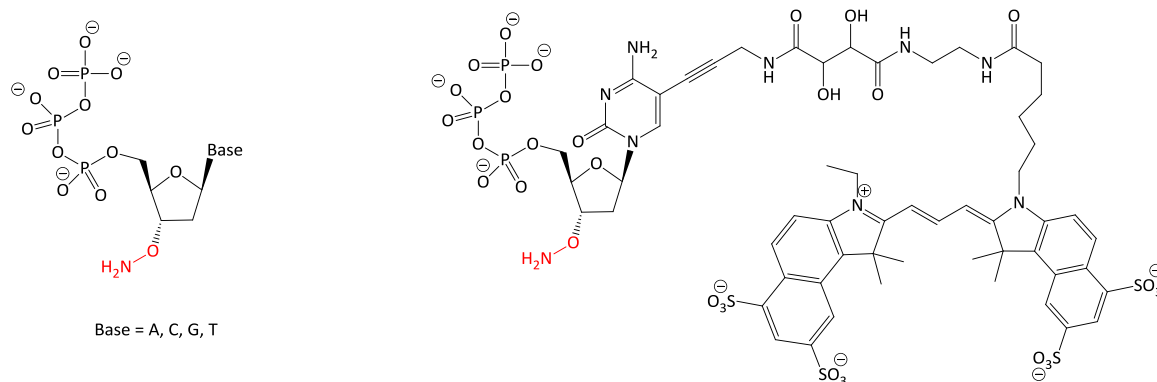


Figure 91 : Exemples de nucléosides triphosphates induisant un arrêt réversible dans l'extension d'amorce.³⁵⁴

Un espaceur 3-aminoxypropionate greffé sur un nucléoside médicament peut permettre la libération de ce dernier.³⁵⁵ Le déclenchement de cette libération est une protéolyse qui est suivie d'une cyclisation intramolécule. En comparaison d'un groupe amino, le groupe aminoxy permet une libération plus rapide du médicament et ce, à un pH plus bas. Les deux groupes méthyles en α du carboxylate de l'espaceur augmentent également la vitesse de cyclisation. Cet espaceur a été utilisé dans un promédicament modèle pour l'activation de protéases utilisant l' α -chymotrypsine comme enzyme activante. Il permet une libération 136 fois plus rapide que le promédicament modèle utilisant un espaceur amine (Schéma 19).

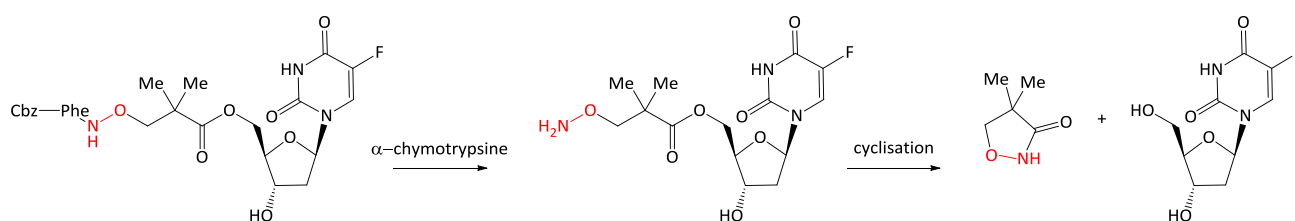


Schéma 19 : Activation par clivage protéolytique et cyclisation du promédicament.³⁵⁵

III.2.c.ii. Préparation des nucléosides N-oxyamines

Les hydroxylamines présentent deux sites nucléophiles (N et O). Cependant, l'azote étant plus nucléophile que l'oxygène, la préparation d'aminooxynucléosides demande de partir d'une hydroxylamine protégée sur l'azote (PhthNOH, CbzNHOH, etc.).

³⁵⁵ Y. Ge, X. Wu, D. Zhang, L. Hu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 941-944.

La méthode de choix pour introduire la fonction aminoxyde en position 5' de ces nucléosides est une réaction de Mitsunobu avec le *N*-hydroxyphthalimide suivie d'une hydrazinolysé (Schéma 20).³⁵⁶

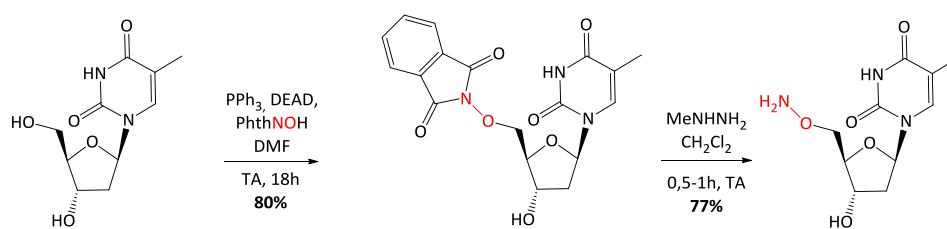


Schéma 20 : Réaction de Mitsunobu suivie d'une hydrazinolysé permettant l'introduction de la fonction *N*-oxyamine.³⁵⁶

Une fonction oxyamine peut également être introduite par substitution nucléophile. Ainsi, le *N*-hydroxyphthalimide peut jouer le rôle de nucléophile pour donner le composé phthalimidoxyde correspondant (Schéma 21).³⁵⁷ Il restera alors à effectuer une hydrazinolysé pour libérer l'oxyamine.

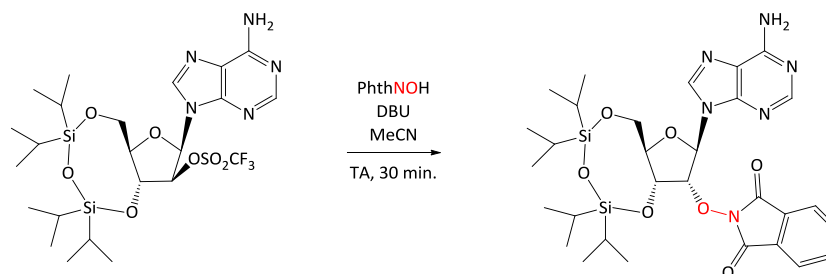


Schéma 21 : Réaction de substitution nucléophile avec le *N*-hydroxyphthalimide.³⁵⁷

La substitution nucléophile peut aussi se faire par réaction entre le nucléoside 5'-*O*-tosylate et le sel potassique de *N*-éthoxycarbonylhydroxylamine suivie d'une hydrolyse basique de l'uréthane (Schéma 22).³⁵⁸ Une autre solution est de mettre à réagir le nucléoside 5'-*O*-tosylate avec le sel de l'acétohydroxamate d'éthyle (Figure 92) avant un traitement avec de l'acide acétique aqueux.^{359,360}

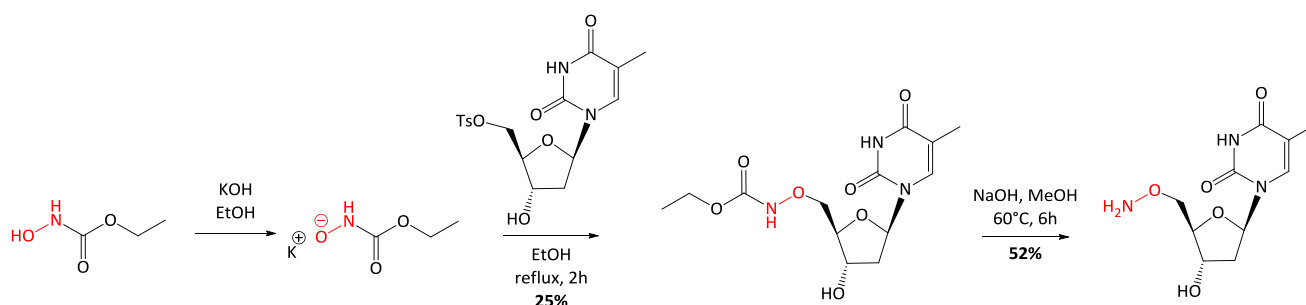


Schéma 22 : Préparation du sel potassique de *N*-éthoxycarbonylhydroxylamine et réaction de substitution nucléophile.³⁵⁸

³⁵⁶ M. Perbost, T. Hoshiko, F. Morvan, E. Swayze, R. H. Griffey, Y. S. Sanghvi, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5150-5156.

³⁵⁷ A. Karpeisky, C. Gonzalez, A. B. Burgin, L. Beigelman, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1131-1134.

³⁵⁸ L. C. Davies, *Nucleosides Nucleotides* **1985**, *4*, 395-400.

³⁵⁹ K. Kondo, T. Ogiku, I. Inoue, *Nucleic Acids Res. (Symposium Series No.16)* **1985**, 93-96.

³⁶⁰ M. A. Khomutov, S. Mandal, J. Weisell, N. Saxena, A. R. Simonian, J. Vepsalainen, R. Madhubala, S. N. Kochetkov, *Amino Acids* **2010**, *38*, 509-517.

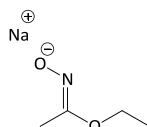


Figure 92: Structure du sel de sodium de l'acétohydroxamate d'éthyle.³⁶⁰

Les oxyamines sont souvent substituées sur l'azote, en particulier avec un groupe méthyle. Ces substituants peuvent être incorporés via une amination réductrice. L'azote peut être mono³⁶¹ ou disubstitué (Schéma 23).³⁶²

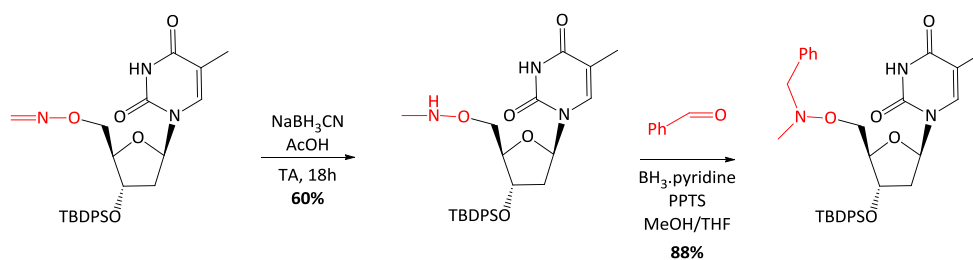


Schéma 23 : Préparation de nucléosides hydroxylamines *N,N',O*-trisubstitués par amination réductrice.³⁶²

III.2.d. Les *N,O*-nucléosides bicycliques

Des nucléosides bicycliques contenant un cycle isoxazolidine ou isoxazole ont également été préparés et étudiés.

III.2.d.i. Les *N,O*-nucléosides bicycliques isoxazolidines

Une modification possible des nucléosides est l'ajout d'un pont sur le ribose. En raison des contraintes conformationnelles imposées par ce pont, de tels composés sont susceptibles d'avoir des propriétés biologiques intéressantes. Ce pont peut comporter une liaison N-O. Ainsi, de nombreux nucléosides bicycliques isoxazolidines ont été préparés et étudiés (Figure 93).^{363,364}

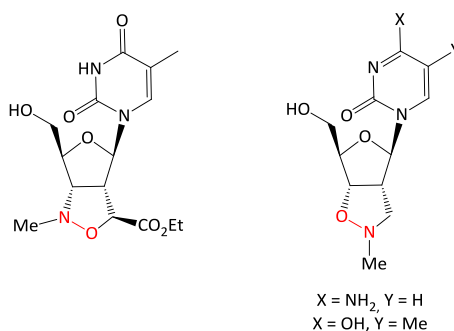


Figure 93 : Exemple de nucléosides bicycliques isoxazolidines.^{363,364}

Une autre méthode pour contrôler la conformation du ribose est l'introduction d'un spiro-isoxazolidine en position 2' du ribose (Figure 94).³⁶⁵ Les mesures de relaxation des protons en RMN et l'analyse des constantes de couplage indiquent que le ribose est bloqué dans une conformation nord et montre une rigidité substantielle.

³⁶¹ S. Dimock, B. Bhat, D. Peoc'ch, Y. S. Sanghvi, E. E. Swayze, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1629-1632.

³⁶² E. E. Swayze, Y. S. Sanghvi, *Synlett* **1997**, 859-861.

³⁶³ Y. Xiang, R. F. Schinazi, K. Zhao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1475-1478.

³⁶⁴ A. Papchikhin, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 5279-5286.

³⁶⁵ K. Versteeg, D. Willing, H. Wang, K. M. Church, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8145-8150.

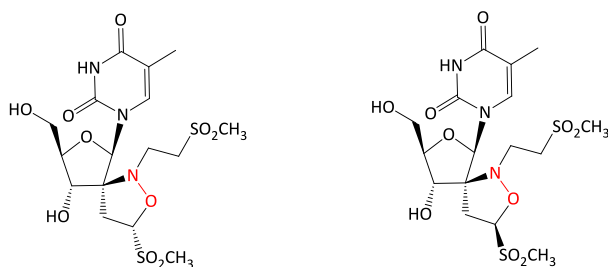


Figure 94 : Thymidines 2'-spiroisoxazolidines.³⁶⁵

Les caprazamycines sont des nucléosides naturels dotés d'une activité antibactérienne prometteuse. Des analogues isoxazolidines de ces caprazamycines ont été préparés (Figure 95).³⁶⁶ Ces composés sont synthétisés via une cycloaddition 1,3-dipolaire intramoléculaire d'une nitroène alcényle. Plusieurs de ces analogues présentent une bonne activité contre *H. influenza* ATCC 10211 (concentration minimale inhibitrice de 0,25-0,5 µg/mL) et une activité modérée contre *E. faecalis* SR7914 résistant à la vancomycine (concentration minimale inhibitrice de 4-8 µg/mL).

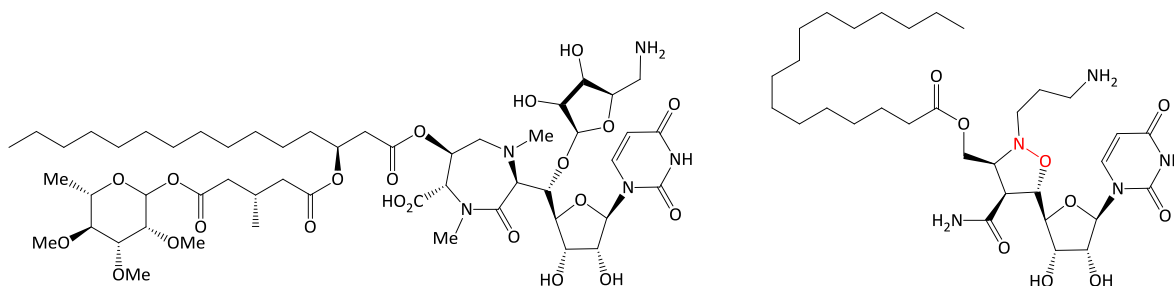


Figure 95 : A gauche : Structure de la caprazamycine B. A droite : Structure d'un des analogues isoxazolidines.³⁶⁶

III.2.d.ii. Les *N,O*-nucléosides bicycliques isoxazolidines insaturés

L'équipe de P. Quadrelli s'est intéressée à une famille de nucléosides carbocycliques isoxazolidines présentant une insaturation au niveau du cycle isoxazolidine (Figure 96).^{367,368,369}

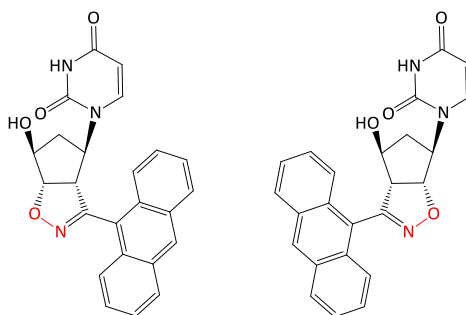


Figure 96 : Exemples de nucléosides carbocycliques isoxazolidines présentant une insaturation au niveau du cycle isoxazolidine.³⁶⁹

La synthèse de ces composés comporte une étape de cycloaddition 1,3-dipolaire d'un oxyde de nitrile sur le 2,3-oxazanorborn-5-ène préparé via une réaction d'hétéro-Diels Alder. Des aménagements fonctionnels ultérieurs permettent d'obtenir le nucléoside bicyclique désiré.³⁶⁷ Leur activité antivirale a été testée.^{368,369} Les résultats sont très variables selon la structure du composé.

³⁶⁶ M. Yamaguchi, A. Matsuda, S. Ichikawa, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1187-1197.

³⁶⁷ Y. Moggio, L. Legnani, B. Bovio, M. G. Memeo, P. Quadrelli, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 1384-1392.

³⁶⁸ P. Quadrelli, M. Mella, L. Legnani, D. Al-Saad, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4655-4665.

³⁶⁹ M. G. Memeo, F. Lapolla, G. Maga, P. Quadrelli, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1986-1990.

III.2.d.iii. Les *N,O*-nucléosides bicycliques isoxazoles

Des nucléosides pyrimidines modifiés en position 5 ont montré une certaine efficacité contre les virus de l'Herpès. Un exemple est le Brivudine, actif contre le virus de la varicelle et du zona, le HSV1 (herpès simplex de type 1), ainsi que d'autres membres de la famille des *Herpes viridae*. Le Brivudine inhibe l'action de l'ADN polymérase après s'être incorporé dans l'ADN viral, ce qui empêche la réplication du virus. Des nucléosides comportant un cycle isoxazole sur la base nucléique ont été préparés et étudiés (Figure 97).^{370,371} Ces composés sont obtenus par cycloaddition d'un oxyde de nitrile sur un alcyne. Ils ont une activité contre les virus de l'herpès de type 1 et 2, le virus Encephalomyocarditis, le virus Coxsackie B3 et le virus de la stomatite vésiculaire. Ils sont par contre inactifs contre le corona virus, le virus influenza et le VIH.

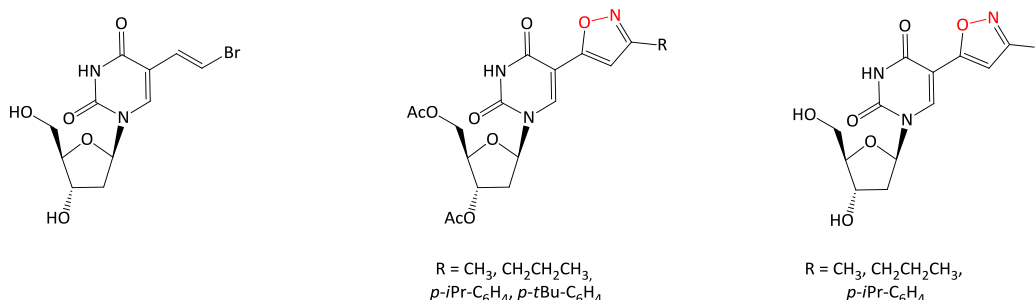


Figure 97 : A gauche : Structure du Brivudine. Au milieu et à droite : Structures de nucléosides comportant un cycle isoxazole.³⁷⁰

III.2.e. Les nucléosides acides hydroxamiques

Des composés hydroxamates sont susceptibles d'avoir des activités anticancéreuses, antibactériennes, etc.^{372,373} Étant donné leur capacité à chélater des ions métalliques,³⁷⁴ ce sont de bons inhibiteurs de métallo enzymes.³⁷⁵ Ils peuvent également être des donneurs d'acides nitriques.³⁷⁶ L'exemple le plus connu est celui de l'hydroxyurée qui agit sur la ribonucléotide réductase.³⁷⁷ D'autres acides hydroxamiques sont capables d'inhiber la synthèse d'ADN en inactivant la ribonucléotide réductase. Ainsi, des nucléosides acides hydroxamiques sont susceptibles d'avoir des propriétés biologiques intéressantes.

III.2.e.i. Exemples de nucléosides acides hydroxamiques

En 1989, des nucléosides acides hydroxamiques acycliques ont été préparés comme potentiels agents antitumoraux (Figure 98).³⁷⁸ Le mécanisme d'action implique l'inhibition de la ribonucléotide réductase par donation d'un atome d'hydrogène de l'acide hydroxamique au radical tyrosyle de la ribonucléotide réductase. *In vitro*, ces nucléosides acides hydroxamiques acycliques

³⁷⁰ Y. S. Lee, S. M. Park, B. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1126-1128.

³⁷¹ I. Creuven, C. Evrard, A. Olivier, G. Evrard, A. Van Aerschot, P. Wigerinck, P. Herdewijn, F. Durant, *Antiviral Res.* **1996**, *30*, 63-74.

³⁷² G. G. Rajulu, H. S. B. Naik, A. Viswanadhan, J. Thiruvengadam, K. Rajesh, S. Ganesh, H. Jagadheshan, P. K. Kesavan, *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 168-175.

³⁷³ J. F. Zhang, M. Li, J. Y. Miao, B. X. Zhao, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *83*, 516-525.

³⁷⁴ B. Kurzak, H. Kozłowski, E. Farkas, *Coord. Chem. Rev.* **1992**, *114*, 169-200.

³⁷⁵ R. Codd, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 1387-1408.

³⁷⁶ C. J. Marmion, D. Griffith, K. B. Nolan, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 3003-3016.

³⁷⁷ H. L. Elford, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *33*, 129-135.

³⁷⁸ R. A. Farr, P. Bey, P. S. Sunkara, B. J. Lippert, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1879-1885.

sont 3 à 10 fois moins actifs que l'hydroxyurée contre la cytidine diphosphate réductase du thymus de veau. Le dérivé 6-fluorouracile est quasiment aussi actif que l'hydroxyurée dans l'inhibition de la croissance des cellules HeLa tandis que les deux autres sont peu ou pas actifs. D'autres nucléosides acides hydroxamiques acycliques ont été préparés par une autre équipe.³⁷⁹

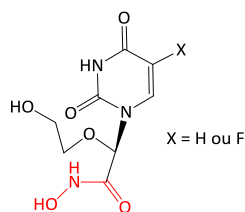


Figure 98 : Exemples de nucléoside acide hydroxamique acyclique.³⁷⁸

La fonction acide hydroxamique peut également être sur la base nucléique.³⁸⁰ Ces composés sont aussi de potentiels inhibiteurs de la ribonucléoside diphosphate.

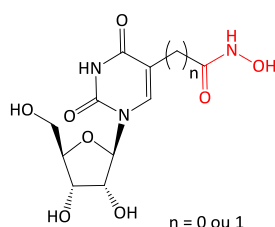


Figure 99 : Structure de nucléosides uraciles acides hydroxamiques.³⁸⁰

III.2.e.ii. Préparation de nucléosides acides hydroxamiques

Ces nucléosides acides hydroxamiques peuvent être obtenus par réaction entre un ester activé et l'hydroxylamine (Schéma 24).³⁸⁰

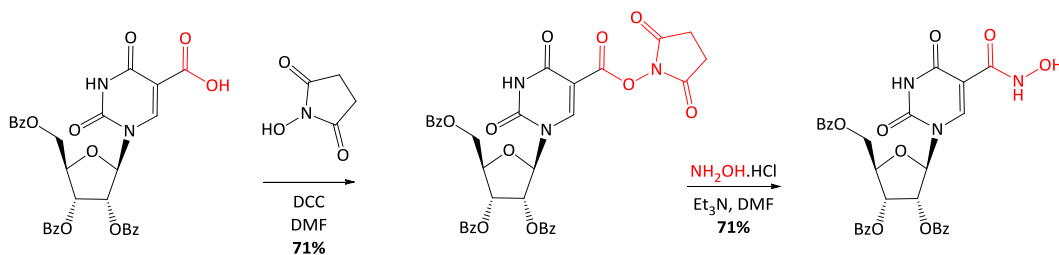


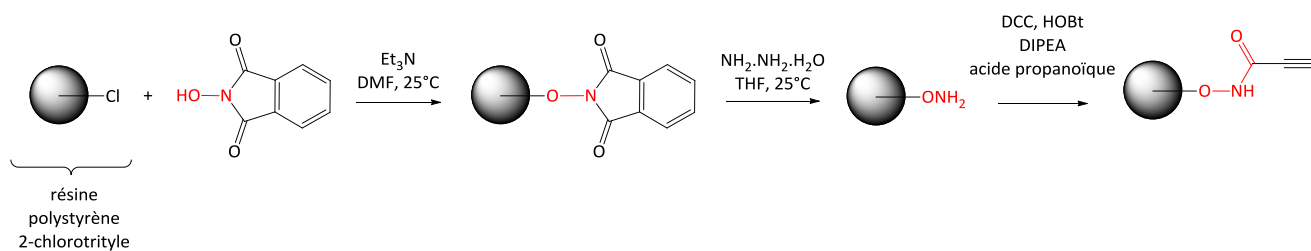
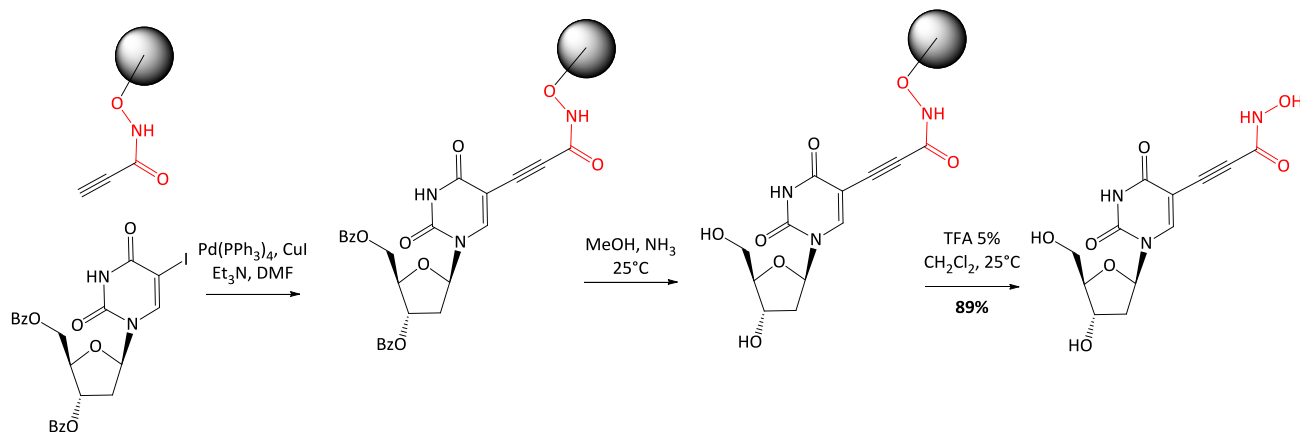
Schéma 24 : Préparation d'un nucléoside acide hydroxamique.³⁸⁰

Ils peuvent également être obtenus via une procédure en phase solide.³⁸¹ Pour cela, un acide hydroxamique lié à un support polystyrène/2-chlorotrytile est préparé (Schéma 25). Un couplage pallado-catalysé est ensuite réalisé entre la 5-iodouridine et l'alcyne de l'acide hydroxamique lié au support (Schéma 26).

³⁷⁹ V. Vrček, V. Caplar, S. Uršic, *Croat. Chem. Acta* **1998**, *71*, 119-124.

³⁸⁰ P. Currid, R. H. Wightman, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 115-128.

³⁸¹ S. I. Khan, M. W. Grinstaff, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8031-8034.

Schéma 25 : Préparation du support.³⁸¹Schéma 26 : Préparation de nucléosides acides hydroxamiques sur support solide.³⁸¹

Une méthode moins conventionnelle est la réaction entre un aldéhyde et un nitrosobenzène en présence d'ions ferriques.³⁸²

III.2.f. Les nucléosides nitroxydes

Les nitroxydes sont des composés clefs dans le marquage de spin qui est une technique efficace pour étudier des biomolécules.

III.2.f.i. Exemples de nucléosides nitroxydes

En 2006, des 2'-désoxyuridines comportent un radical nitroxyde ont été décrits (Figure 100 en haut).³⁸³ Le radical est lié au nucléoside via un espaceur *p*-phénylène totalement conjugué qui apporte de la stabilité à température ambiante et qui permet une délocalisation de la densité de spin sur la partie uracile. La cristallisation du composé avec R = H mène à une chaîne monodimensionnelle le long d'un axe *a*, avec des liaisons hydrogène intra-chaînes ($O_{5'}-H \cdots O_{3'}$) et inter-chaînes ($N_3-H \cdots O_{5'}$, $O_{3'}-H \cdots O^{NO}$). On note des couplages ferromagnétiques intra-chaînes forts et des couplages antiferromagnétiques inter-chaînes faibles.

³⁸² S. Uršić, B. Nigović, V. Vrček, V. Pilepić, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 9547-9550.

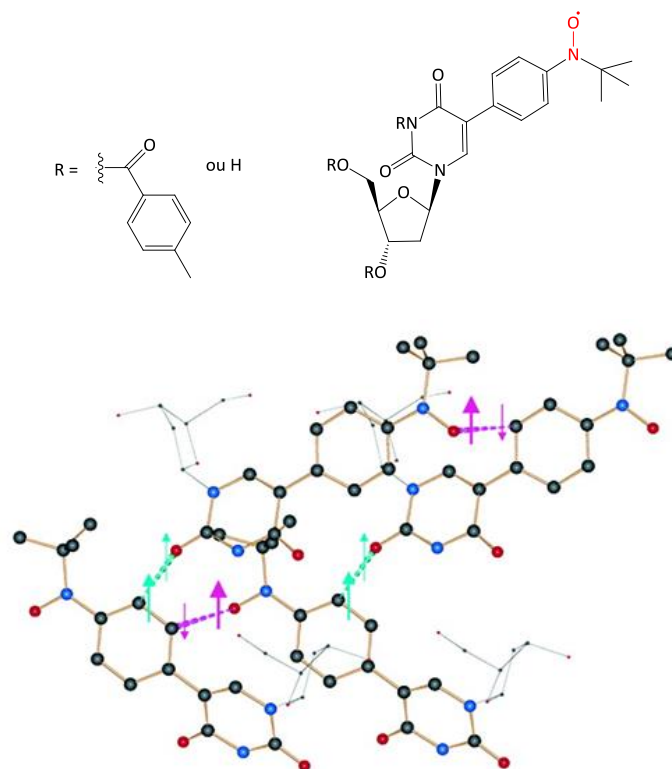


Figure 100 : En haut : Structure de nucléosides comportant un marqueur de spin nitroxyde conjugué. En bas : Empilement de nucléosides nitroxydes le long d'une chaîne monodimensionnelle. Les lignes en pointillés en bleu turquoise et en magenta correspondent à des distances intermoléculaires courtes ³⁸³

Le marquage de spin d'acides nucléiques sera étudié plus en détail dans la partie sur les oligonucléotides nitroxydes.

III.2.f.ii. Préparation de nucléosides nitroxydes

Un nucléoside nitroxyde peut être obtenu par oxydation d'un nucléoside hydroxylamine (Schéma 27). ³⁸³

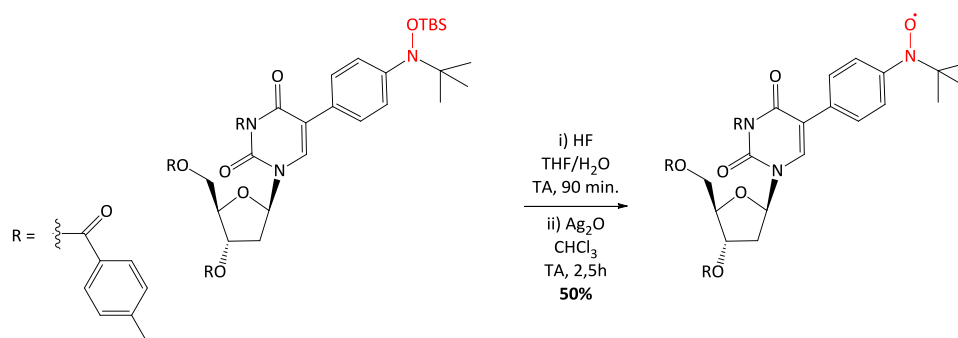


Schéma 27 : Préparation d'un nucléoside nitroxyde par oxydation d'un nucléoside hydroxylamine. ³⁸³

³⁸³ K. Das, M. Pink, S. Rajca, A. Rajca, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5334-5335.

III. LES DINUCLEOSIDES ET LES OLIGONUCLEOTIDES A LIAISON N-O

III.1. Les dinucléosides à liaison N-O

Nous avons vu qu'une des modifications envisageables pour les oligonucléotides est la modification de la liaison phosphodiester. Nous allons donc nous intéresser aux dinucléosides liés par liaison N-O.

III.1.a. Les dinucléosides liés par liaison hydroxylamine

Les premiers travaux sur la liaison méthylhydroxylamine datent de 1992.^{384,385} Une synthèse stéréosélective d'un dimère portant un lien méthylhydroxylamine a été réalisée via une réaction radicalaire intermoléculaire stéréosélective (Schéma 28). Cette synthèse peut également se faire via une amination réductrice. Cette liaison neutre est achirale,³⁸⁶ ce qui nous affranchit du problème de chiralité rencontré avec d'autres modifications de la liaison phosphodiester (phosphonate, phosphorothioate, etc.). Elle peut permettre la conjugaison ultérieure de ces composés. Les dimères liés par liaison hydroxylamine sont facilement incorporés dans des séquences oligonucléotidiques. Le lien hydroxylamine ne pouvant être un substrat pour les nucléases naturelles, ces liens apportent une grande résistance aux nucléases. De plus, la présence de la liaison C-C en position 3' diminue l'interaction gauche entre le O_{4'} et le C_{3'} en comparaison du lien phosphodiester correspondant.

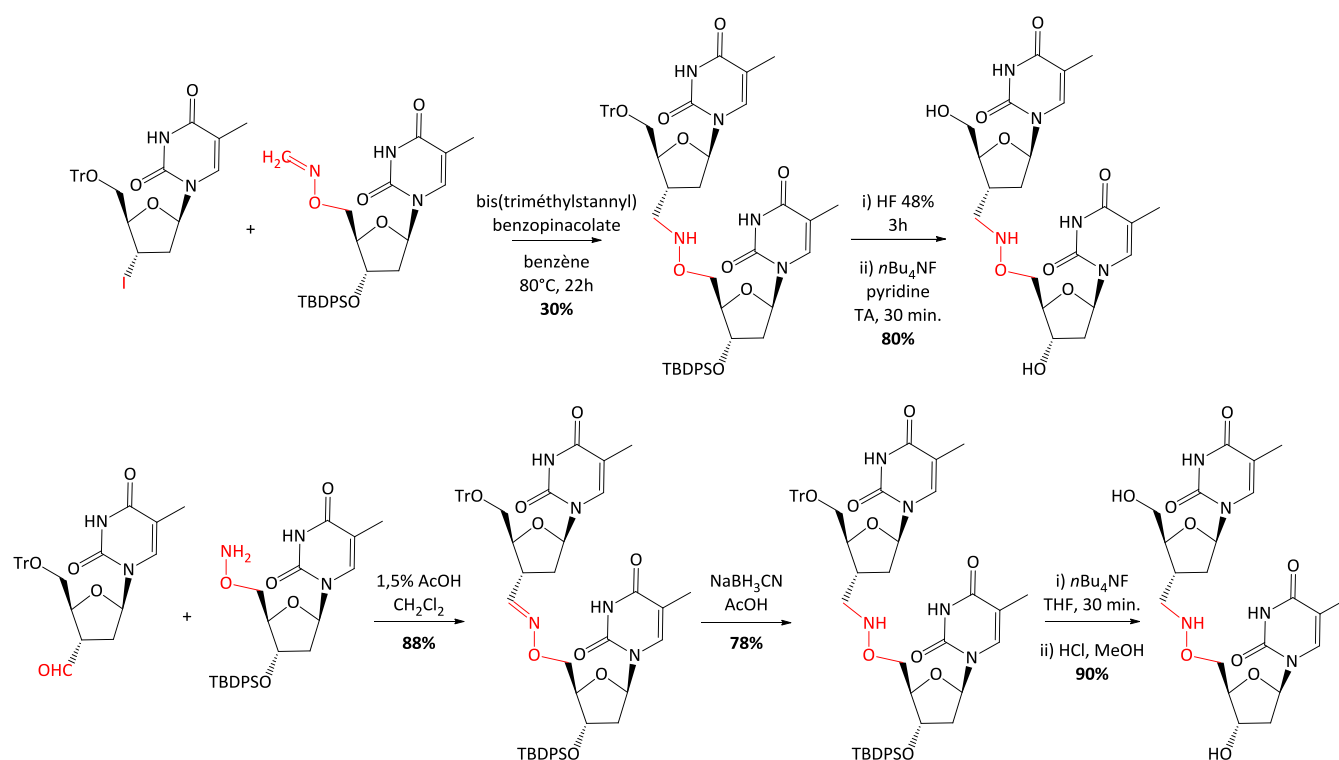


Schéma 28 : Préparation par couplage radicalaire³⁸⁴ (en haut) ou par amination réductrice³⁸⁵ (en bas) du dimère lié par liaison méthylhydroxylamine.

³⁸⁴ F. Debart, J. J. Vasseur, Y. S. Sanghvi, P. D. Cook, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2645-2648.

³⁸⁵ J. J. Vasseur, F. Debart, Y. S. Sanghvi, P. D. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4006-4007.

³⁸⁶ R. S. Varma, *Synlett* **1993**, 621-637.

La même équipe a préparé l'analogue méthylène(méthylimino) appelé MMI dans lequel l'azote est substitué par un groupe méthyle.³⁸⁴ Ce groupe méthyle peut être incorporé par amination réductrice (Schéma 29).

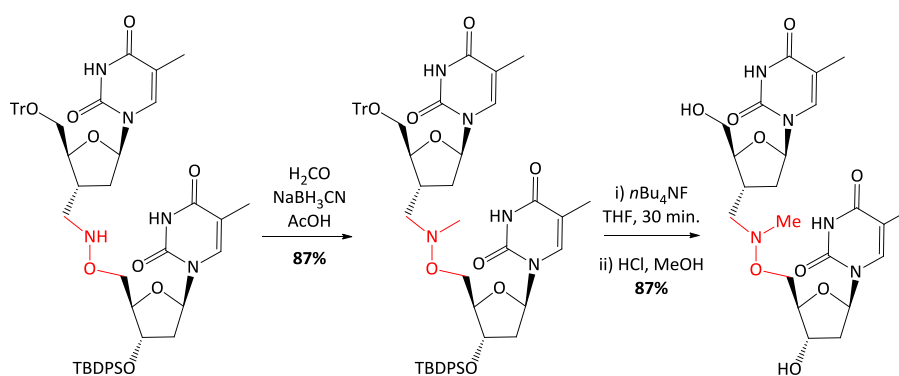


Schéma 29 : Préparation d'un dimère lié par liaison MMI.³⁸²

Une autre équipe s'est penchée sur l'étude structurale et dynamique de dinucléosides liés par liaison MMI.³⁸⁷ Des simulations de dynamique moléculaire et des études RMN à basse température montrent que la liaison internucléosidique d'un dimère TT lié par MMI peut adopter deux types de conformations de basse énergie différents par une inversion/rotation autour de l'azote de l'alkoxylamine (Figure 101) : l'une avec le méthyle vers l'extérieur, l'autre avec le méthyle vers l'intérieur. Les études RMN en température montrent que ces deux conformères sont en échange rapide à 20°C mais en échange lent à des températures plus basses. Dans ces deux conformères, le lien MMI est moins encombrant que la liaison phosphodiester. Les données NOE à basse température concernant les protons du ribose et des bases nucléiques confirment le fait que les bases nucléiques sont empilées.

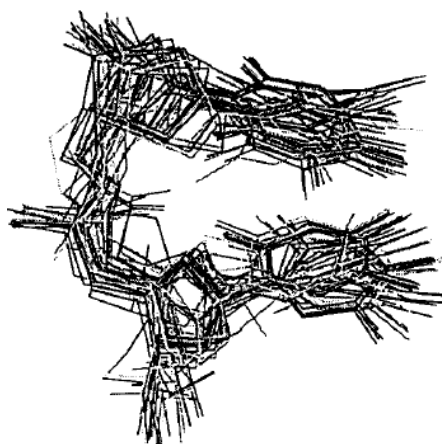


Figure 101 : Structures des conformères du dimère TT lié par MMI.³⁸⁷ Ces structures ont été obtenues lors de recherches conformationnelles par dynamique moléculaire. On peut les classer en deux catégories : celles avec le groupe *N*-Me pointant vers l'extérieur et celles avec le groupe *N*-Me pointant vers l'intérieur.

Des études de dynamique moléculaire en présence d'un solvant explicite ont été effectuées en prenant un conformère de chaque type comme structure de départ. Elles permettent d'en savoir davantage sur le comportement dynamique du lien MMI et sur son influence sur les modes de plissement de la partie ribose. Les transitions corrélées observées pour les angles dièdres α et γ du

³⁸⁷ V. Mohan, R. H. Griffey, D. R. Davis, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6855-6868.

lien internucléosidique (Figure 102) suggèrent que les nucléosides liés par MMI ont une certaine flexibilité autour de ces angles. Cette mobilité est diminuée par les lents mouvements autour des angles dièdres β et δ . Les angles dièdres de la liaison MMI du conformère majoritaire ne correspondent pas à ceux de la liaison phosphodiester. Cette différence et la flexibilité modifiée peuvent jouer un rôle clef dans la stabilité vis-à-vis des nucléases. La modification des angles dièdres n'affecte pas l'affinité pour le brin complémentaire étant donné que l'empilement des bases et la géométrie sont maintenus. Le désoxyribose de l'extrémité 5' est majoritairement dans une conformation C'_3 -endo (Nord), plus susceptible de se lier à l'ARN alors que le désoxyribose de l'extrémité 3' subit de fréquentes transitions entre les formes C'_3 -endo (Nord) et C'_2 -endo (Sud) (cf. Chapitre 1). Ainsi, le groupe 3'-CH₂ du lien MMI favorise l'interaction avec l'ARN. Ces résultats de dynamique moléculaire sont cohérents avec les données obtenues par étude des constantes de couplage en RMN.

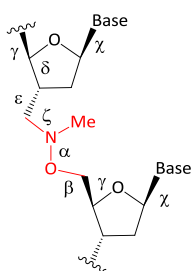


Figure 102 : Définition des angles de torsion dans le dimère MMI.³⁸⁷

Des dimères TT liés par liaison MMI ont été incorporés dans des séquences oligonucléotidiques grâce à la méthode aux phosphoramidites.³⁸⁴ Les études d'hybridation montrent que l'incorporation de 1 à 5 dimères modifiés dans la séquence standard a très peu d'effet sur la stabilité des duplexes formés avec le brin d'ARN complémentaire. Une répartition uniforme des dimères modifiés dans la séquence oligonucléotidique fournit un duplex légèrement plus stable. La sélectivité des appariements de Watson-Crick est maintenue. L'étude de la résistance aux nucléases dans des extraits cellulaires HeLa montre leur grande résistance à la dégradation (temps de demi-vie dans du sérum de bœuf fœtal d'oligonucléotides modifiés autour de 15 heures contre 30 minutes pour l'oligonucléotide non modifié).

Des dimères liés par liaison MMI avec d'autres bases nucléiques que la thymine ont ensuite été synthétisés à grande échelle.³⁸⁸ Des oligomères incorporant ces dimères variés ont été préparés. Tous ces oligonucléotides liés par MMI adoptent une structure préorganisée avec une conformation de type ARN. Ils sont résistants aux nucléases, ont une bonne affinité et une bonne spécificité pour leur ARN cible. Ils font preuve d'une activité biologique intéressante et n'interfèrent pas avec l'activité des RNases H. Les oligonucléotides à lien MMI sont donc susceptibles d'avoir des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques améliorées. Par ailleurs, des oligonucléotides chimériques (gapmères MMI/PS/MMI) antisens avec de meilleures propriétés pharmacocinétiques que l'oligonucléotide initial ont été préparés.

³⁸⁸ Y. S. Sanghvi, L. Bellon, F. Morvan, T. Hoshiko, E. Swayze, L. Cummins, S. Freier, N. Dean, B. Monia, R. H. Griffey, P. D. Cook, *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 1087-1090.

Le lien MMI confère une stabilité vis-à-vis des nucléases au lien phosphodiester adjacent.³⁸⁹ Des oligonucléotides avec une alternance liaison phosphodiester/MMI sont de bons agents antisens faisant preuve d'une bonne affinité et d'une bonne spécificité pour l'ARN complémentaire tout en réduisant la charge absolue de l'oligonucléotide de 50%. Les études préliminaires *in vitro* de ces composés montrent qu'ils ont une activité biologique identique ou supérieure aux oligomères PS correspondants.

Le remplacement d'une liaison phosphodiester par un lien MMI remplace un petit groupe chargé et polaire par un grand groupe neutre et lipophile. Afin de mieux comprendre l'influence d'une telle modification sur la structure en solution et sur les propriétés des duplexes modifiés, la structure d'un duplex ADN-ARN d(CGCGTT-MMI-TTGCGC)-r(GCGCAAACGCG) a été étudiée en détail.³⁹⁰ Afin de permettre l'adoption d'une conformation plus stable pour l'angle de torsion autour de la liaison N-O, le groupe *N*-méthyle lipophile se trouve en périphérie de l'hélice. Cela a des conséquences sur le potentiel électrostatique du duplex. Le lien MMI promeut une conformation 3'-endo des riboses aux positions 3' et 5' adjacentes et un entortillement du lien le long de la direction 3'. Ces variations structurales sont très compatibles avec la fixation à un brin d'ARN (Figure 103).

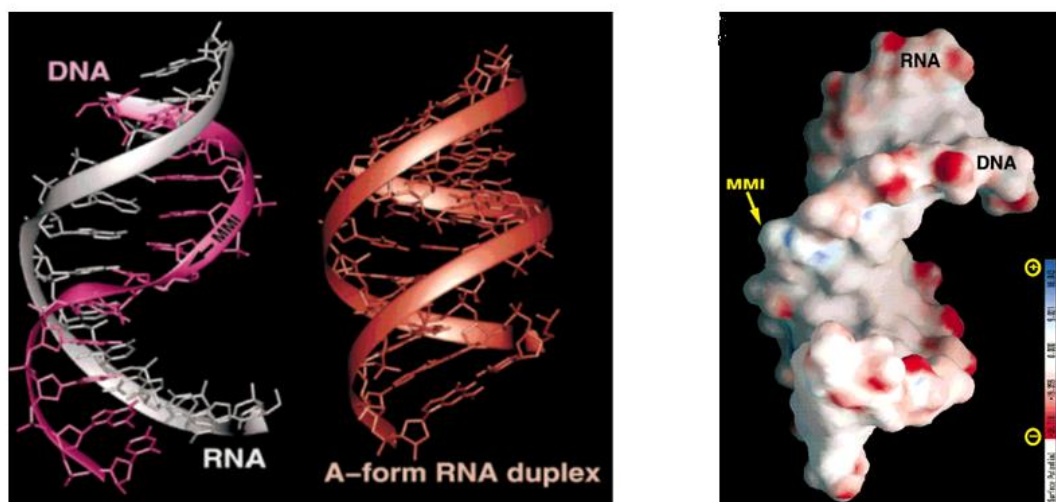


Figure 103 : A gauche : Comparaison de la structure du duplex ADN-ARN d(CGCGTT-MMI-TTGCGC)-r(GCGCAAACGCG) et du duplex d'ARN de forme A. Les rubans dessinés montrent la perturbation dans la transition hélicoïdale du brin d'ADN du duplex étudié. Cette perturbation est du côté 3' du lien MMI. A droite : Surface de potentiel électrostatique du duplex ADN-ARN d(CGCGTT-MMI-TTGCGC)-r(GCGCAAACGCG). Les couleurs rouges et bleues marquent respectivement les charges négatives et positives. La neutralité électrique introduite par la modification avec MMI est indiquée par une flèche.³⁹⁰

Etant donné les propriétés intéressantes des oligonucléotides modifiés en position 2' du ribose, des dimères MMI avec un substituant en position 2' du ribose ont été préparés.³⁹¹ Ce substituant peut être un hydroxyle,³⁹² un méthoxyle,³⁸⁹ un méthoxyéthoxyle,³⁹¹ un fluoro.³⁹¹ Les capacités d'hybridation d'oligonucléotides incorporant de tels dimères ont été étudiées.³⁹¹ Ces composés ont une bonne affinité avec l'ARN cible mais ce sont les 2'-OMe qui ont la meilleure capacité d'hybridation avec leur cible. Cela est certainement dû à des facteurs entropiques (déformation au niveau local et global de l'hydratation du sillon mineur qui résulte en une

³⁸⁹ B. Bhat, E. E. Swayze, P. Wheeler, S. Dimock, M. Perbost, Y. S. Sanghvi, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8186-8199.

³⁹⁰ X. Yang, X. Han, C. Cross, S. Bare, Y. Sanghvi, X. Gao, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12586-12596.

³⁹¹ D. Peoc'h, E. E. Swayze, B. Bhat, Y. S. Sanghvi, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 411-438.

³⁹² M. Prhavic, G. Just, B. Bhat, P. D. Cook, M. Manoharan, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9967-9971.

augmentation des degrés de liberté pour la formation des duplexes). De plus, les 2'-OMe riboses sont préorganisées en conformation $C_{3'}$ -endo, favorisée pour la fixation à l'ARN.

Ces oligonucléotides ont fait l'objet de travaux ultérieurs par exemple pour améliorer les méthodes de synthèses de tels composés. Cela passe par une synthèse aisée de dimères MMI. Ainsi, des dimères avec un groupe 2'-OMe ont été préparés par couplage radicalaire intermoléculaire stéréosélectif.³⁸⁸ La procédure d'alkylation réductrice dans des conditions douces développée pour la synthèse d'hydroxylamines N,N',O -trisubstituées est applicable à la synthèse de dimères liés par lien MMI.³⁶² Mais il faut également faciliter la préparation des oligonucléotides. Le lien MMI étant compatible avec la méthode aux phosphoramidites, ces composés sont adaptés à une synthèse sur support solide.³⁹³ Des méthodologies flexibles en phase liquide ou en phase solide permettent par ailleurs au lien MMI d'être positionné à n'importe quel endroit d'un oligonucléotide lié par des liens phosphodiester et/ou phosphorothioates.³⁹⁴ Cela facilite aussi la synthèse d'oligonucléotides chimériques.

Les places de l'azote et de l'oxygène peuvent être inversées : on obtient alors des dinucléosides liés par liaison méthylèneoxy(méthylimino) appelés MOMI (Figure 104).³⁹⁵ Ces dimères ont été incorporés dans des séquences oligonucléotidiques. Les résultats montrent que les oligonucléotides à liaison MOMI ont une affinité plus faible que les oligonucléotides MMI pour le brin d'ARN complémentaire. La résistance aux nucléases est également inférieure même si elle reste supérieure à celle d'oligonucléotides non modifiés (temps de demi-vie de 2 heures dans du sérum de bœuf fœtal). Ainsi, un petit changement dans le lien MMI modifie dramatiquement les propriétés biochimiques et biophysiques. Les auteurs font l'hypothèse que la proximité plus étroite entre le groupe encombrant 5'-N(CH₃) du lien MOMI et le C₆-H de la base thymine décale la base thymine dans une conformation non adaptée à un appariement avec une base complémentaire. Cette proximité n'existe pas dans le lien MMI car un oxygène peu encombrant est à cette position.

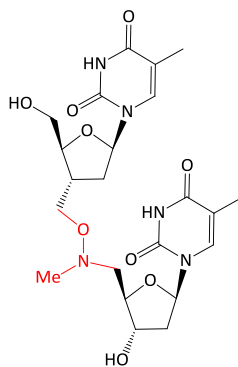


Figure 104 : Dimère lié par liaison MOMI.³⁹⁵

Notre équipe a préparé par amination réductrice un dimère de thymine (Figure 105 à droite).³⁹⁶

³⁹³ E. E. Swayze, B. Bhat, D. Peoc'h, Y. S. Sanghvi, *Nucleotides Nucleosides* **1997**, *16*, 971-972.

³⁹⁴ F. Morvan, Y. S. Sanghvi, M. Perbost, J. J. Vasseur, L. Bellon, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 255-256.

³⁹⁵ F. Debart, J. J. Vasseur, Y. S. Sanghvi, P. D. Cook, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1479-1482.

³⁹⁶ S. Peyrat, J. Xie, *Synthesis* **2012**, *44*, 1718-1724.

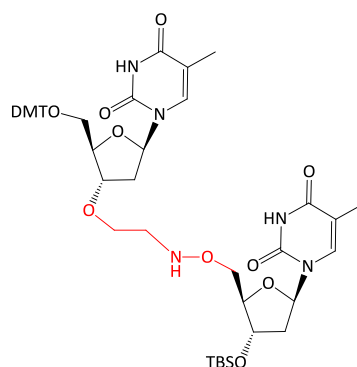


Figure 105 : Dimères liés par liaison oxime préparés dans notre équipe.³⁹⁶

III.1.b. Les dinucléosides liés par liaison N-oxyamide

Dans la liaison *N*-oxyamide, on retrouve des propriétés chimiques analogues à la fonction *N*-oxyamine. En raison de l'effet alpha, le pKa du couple R-CONHO-/R-CON⁻O⁻ est fortement abaissé (10/15) par rapport à celui de l'amide correspondante (pKa (R-CONH-/RCON⁻) ≈ 20/25). Par ailleurs, les groupes NH et CO de la liaison *N*-oxyamide sont facilement engagés dans des liaisons hydrogène. Grâce à des liaisons hydrogène, les α-*N*-oxyamides forment des cycles à 8 appelés α N-O turn.³⁹⁷ Cette liaison neutre est stable vis-à-vis des hydrolases et elle résiste à l'hydrolyse en milieu aqueux acide ou basique.

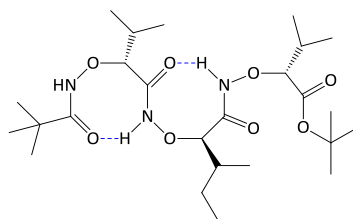


Figure 106 : Formation de cycles à 8 chaînons appelés α N-O turn. Les liaisons hydrogène sont indiquées en bleus.

Le remplacement de la liaison phosphodiester chargée négativement par une liaison neutre comme la liaison *N*-oxyamide peut apporter des propriétés intéressantes (sensibilité inférieure aux nucléases, facilité de passage à travers les membranes cellulaires, pas de répulsion électrostatique dans les duplexes, etc.). En 1994, deux monomères thymines ont été couplés pour former un dinucléoside lié par liaison *N*-oxyamide (Figure 107).³⁹⁸ Ce dimère a ensuite été incorporé dans des séquences oligonucléotidiques. Le lien *N*-oxyamide présente un atome de moins que le lien phosphodiester. On pourrait donc s'attendre à une affinité moins forte pour le brin complémentaire. Cependant, les oligodésoxynucléotides modifiés montrent une affinité seulement légèrement inférieure à celle montrée par le brin non modifié pour la séquence complémentaire. Pour expliquer cela, on peut faire l'hypothèse que la planéité de la liaison *N*-oxyamide compense l'atome en moins.

³⁹⁷ D. Yang, J. Qu, B. Li, F. F. Ng, X. C. Wang, K. K. Cheung, D. P. Wang, Y. D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 589-590.

³⁹⁸ K. Burgess, R. A. Gibbs, M. L. Metzker, R. Raghavachari, *Chem. Commun.* **1994**, 915-916.

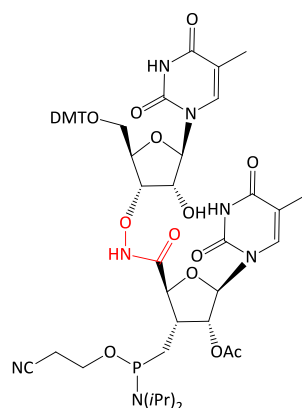


Figure 107 : Dimère préparé par Burgess et al.³⁹⁸

Notre équipe a également préparé un dimère d'uridine lié par liaison *N*-oxyamide.³⁹⁹ Cette liaison est formée par couplage peptidique entre un monomère portant une fonction oxyamine et un monomère portant une fonction acide carboxylique (Schéma 30). Aucune étude de ces composés n'a été réalisée.

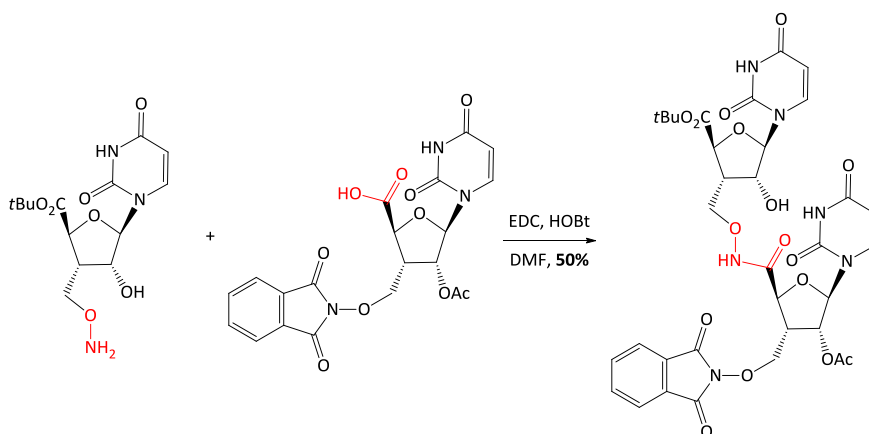


Schéma 30 : Préparation d'un dimère lié par liaison *N*-oxyamide.³⁹⁹

III.1.c. Les dinucléosides liés par liaison hydroxamate ou *N*-hydroxycarbamate

En 2000, une équipe s'est intéressée à des oligonucléotides contenant un lien hydroxamate. Le choix de cette liaison hydroxamate s'explique par le fait que cette liaison est stable dans les conditions physiologiques et se chélate à des ions ferriques, ce qui peut générer des radicaux hydroxyles.⁴⁰⁰ Ainsi, en plus du processus faisant intervenir les RNases H, les oligonucléotides à liaison hydroxamate peuvent cliver leur cible par des réactions radicalaires.⁴⁰¹ De plus, la solubilité d'oligonucléotides à liaison hydroxamate peut être augmentée par coordination avec des ions métalliques. La charge absolue est diminuée, facilitant la pénétration à l'intérieur des membranes cellulaires chargées négativement. Des dimères liés par liaison hydroxamate ont été préparés (Figure 108) et incorporés dans des séquences oligonucléotidiques.^{402,403} Une autre équipe s'est intéressée à des dimères liés par liaison *N*-hydroxycarbamate (Figure 108).⁴⁰⁴

³⁹⁹ Y. Gong, S. Peyrat, H. Sun, J. Xie, *Tetrahedron* **2011**, 67, 7114-7120.

⁴⁰⁰ M. Gosh, L. J. Lambert, P. W. Huber, M. J. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 2337-2340.

⁴⁰¹ S. Hashimoto, Y. Nakamura, *Chem. Commun.* **1995**, 1413-1414.

⁴⁰² K. S. Ramasamy, L. He, V. Stoisavljevic, B. Harpham, W. Seifert, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4317-4321.

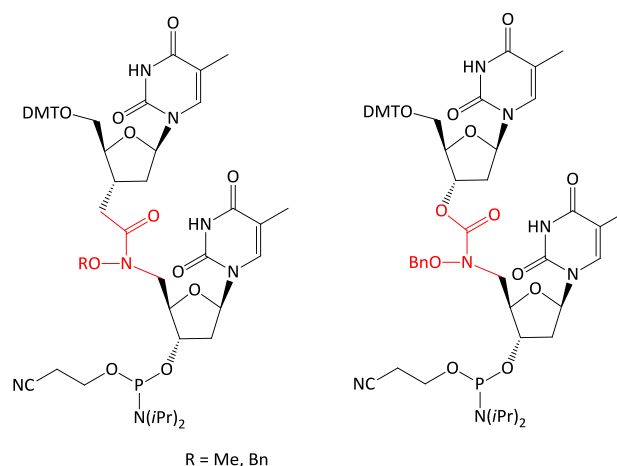


Figure 108 : Dimères liés par liaison hydroxamate (à gauche) et *N*-hydroxycarbamate (à droite) et prêts à être incorporés dans des oligonucléotides.⁴⁰⁴

Ces dimères sont obtenus par couplage entre le nucléoside hydroxylamine ou alkoxyamine et l'acide carboxylique correspondants (Schéma 31).³⁸³

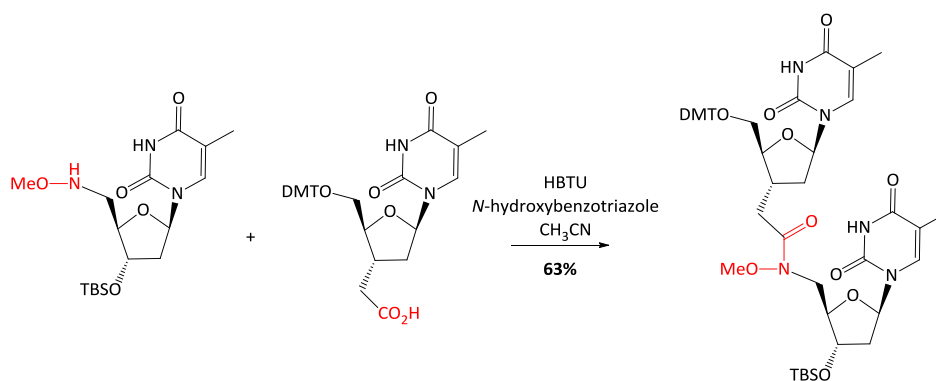


Schéma 31 : Formation de la liaison hydroxamate.³⁸³

Le dimère *N*-hydroxycarbamate⁴⁰⁴ (à droite sur la Figure 108) a été incorporé une, deux ou trois fois par synthèse sur support solide dans des oligonucléotides à 16 unités ne comportant que des bases thymines. Les liens hydroxamates sont ensuite déprotégés par hydrogénolyse et l'oligonucléotide est décroché du support solide par traitement avec une solution concentrée d'ammoniac à TA pendant 1 heure. Le duplex formé entre le brin déprotégé et le brin complémentaire polyd(A) est légèrement déstabilisé par rapport au duplex formé avec le brin non modifié. Par contre, le duplex formé est déstabilisé lorsque les liens hydroxamates sont protégés par les groupes Bn encombrants. La déstabilisation est peu dépendante du nombre de substitution des liens phosphodiester par des liens hydroxamates. Les oligonucléotides modifiés montrent par contre une plus grande résistance aux nucléases. Ces oligomères forment facilement des complexes avec le fer(III). Un oligomère à 16 unités thymidine avec trois liens hydroxamates incorporés au centre de la séquence peut se lier à la fois au fer(III) et au brin complémentaire.⁴⁰⁵ 3 liaisons hydroxamates non adjacentes sont nécessaires à cette chélation. Dans les conditions de Fenton, ce nouvel analogue oligothymidylate clive l'ADN complémentaire (Figure 109).

⁴⁰³ K. S. Ramasamy, V. Stoisavljevis, J. Y. N. Lau, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 1173-1176.

⁴⁰⁴ H. Li, M. J. Miller, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4323-4327.

⁴⁰⁵ M. J. Miller, H. Li, C. A. Foss, *Biometals* **2009**, *22*, 491-510.

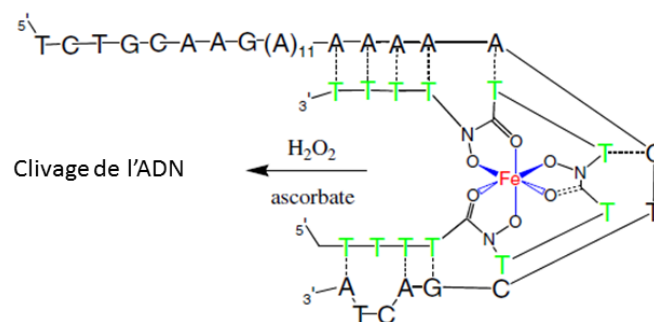


Figure 109 : Modèle de liaison entre l'oligonucléotide modifié et sa cible. Deux paires de Wobble T-G sont formées en plus des sept appariements de Watson-Crick A-T.⁴⁰⁵

Les dimères 3'-désoxy^{402,403} (à gauche sur la Figure 108) ont également été incorporés dans des séquences oligonucléotidiques. Lorsque le groupe sur l'hydroxamate est peu encombrant (R = Me), la stabilité du duplex formé avec le brin complémentaire ARN ou ADN est quasiment inchangée. Par contre, le duplex est beaucoup moins stable avec un substituant encombrant (R = Bn). Cela s'explique par la conformation plus favorable adoptée lorsque le brin est peu encombré. Les brins modifiés sont aussi plus résistants aux nucléases. Tous ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus avec les dimères *N*-hydroxycarbamates.

Quelques années plus tard, des homo-oligonucléosides contenant le lien *N*-hydroxycarbamate ont été synthétisés (Figure 110).⁴⁰⁵ Les résultats en termes de capacité d'hybridation, de résistance aux nucléases ou de chélation au fer(III) sont similaires.

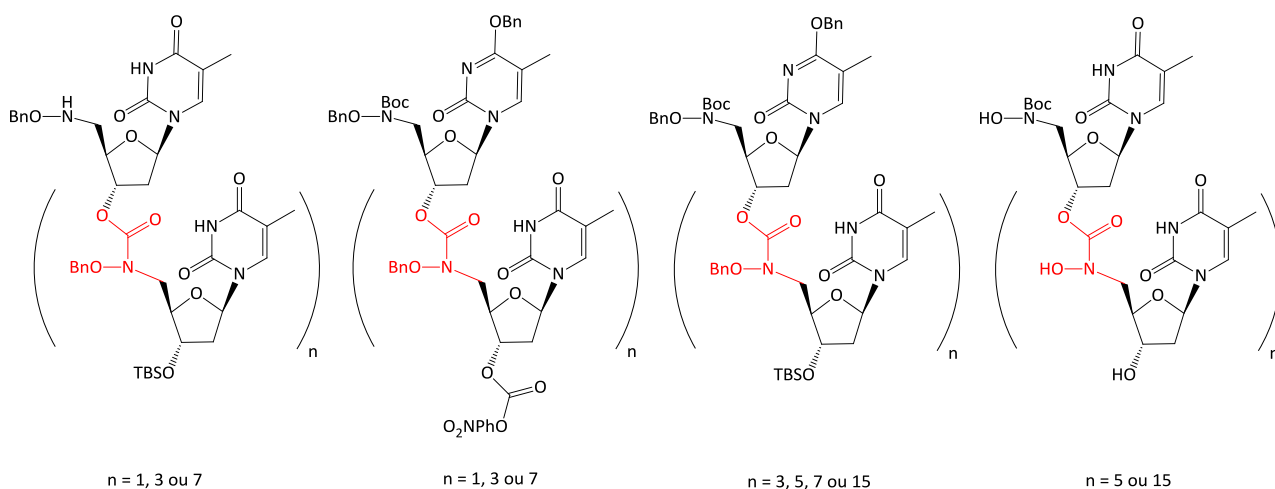


Figure 110 : Homo-oligomères de thymidine liés par des liens *N*-hydroxycarbamates.⁴⁰⁵

III.1.d. Autres exemples de dinucléosides liés par liaison N-O

Gallos et Dellios ont préparé des dimères liés par liaison nitroxy, hydroxylamine et amidoxime (Figure 111).⁴⁰⁶ Un -CH₂ est lié au carbone C_{3'} afin de favoriser la conformation C_{3'}-endo qui favorise l'affinité avec des ARN. En raison de leur neutralité à pH physiologique, ces liens contribuent à la réduction de la charge totale, ce qui favorise la pénétration cellulaire à travers les membranes. De plus, leur hydrophilicité augmente la solubilité de ces composés dans les fluides

⁴⁰⁶ J. K. Gallos, C. C. Dellios, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5679-5681.

biologiques. Les liaisons nitrones et hydroxamates ont une préorganisation structurale similaire à celle de liaisons amides.

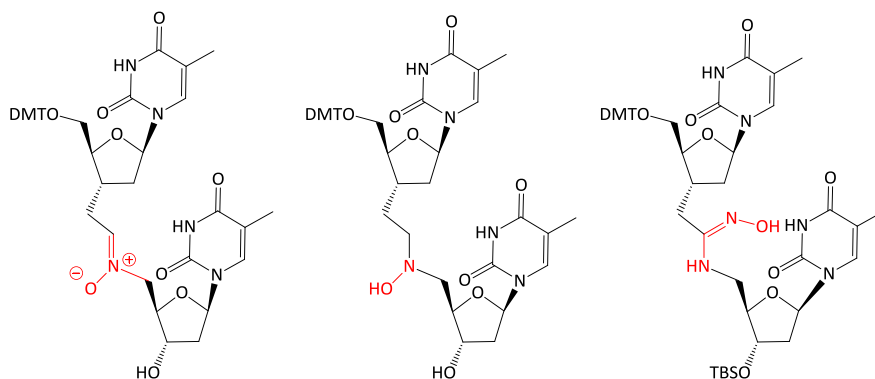


Figure 111 : A gauche : Dimère lié par liaison nitron. Au milieu : Dimère lié par liaison hydroxylamine. A droite : Dimère lié par liaison amidoxime.⁴⁰⁶

La liaison nitron est obtenue par couplage entre la thymidine hydroxylamine et la thymidine aldéhyde (Schéma 32) tandis que la liaison amidoxime est obtenue par addition-élimination du chlorooxime (Schéma 32).

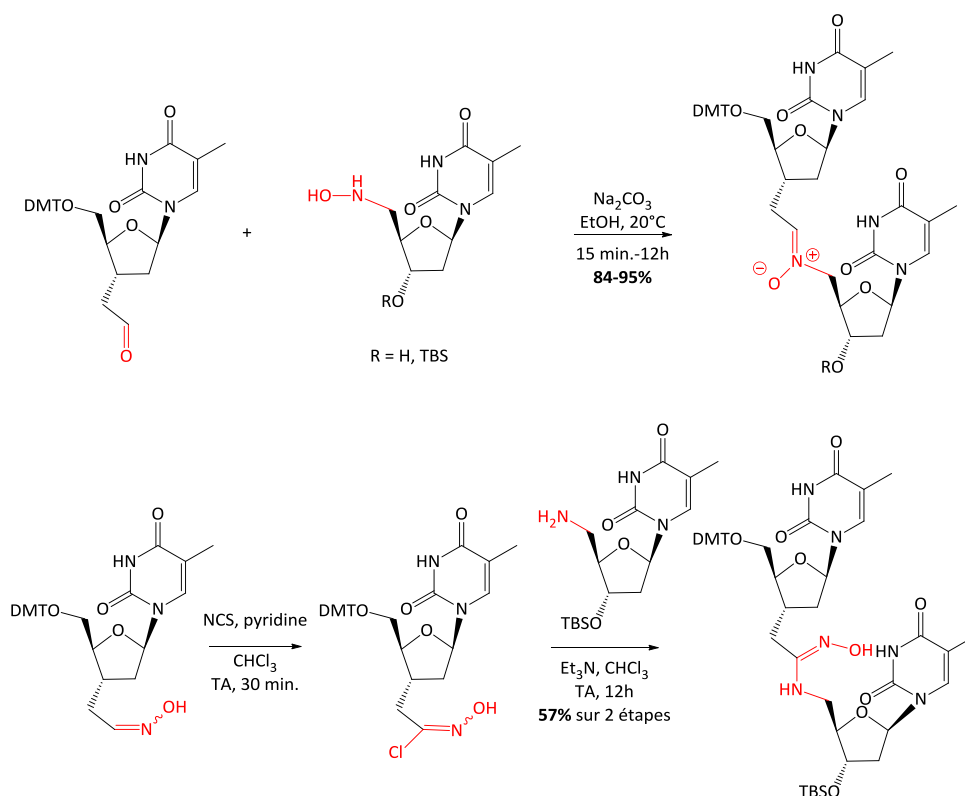


Schéma 32 : En haut : Formation de la liaison nitron. En bas : Formation de la liaison amidoxime.⁴⁰⁶

Notre équipe³⁹⁶ a préparé des dimères liés par liaison oxime (Figure 112).

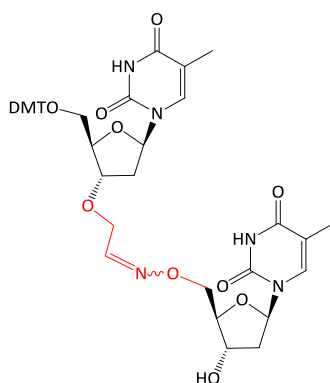


Figure 112 : Dimères liés par liaison oxime.³⁹⁶

III.2. Les oligonucléotides à liaison N-O

Ce paragraphe donne un aperçu des principaux oligonucléotides présentant une liaison N-O. Cet aperçu n'est pas exhaustif.

III.2.a. Les BNA à liaison N-O

III.2.a.i. Les 2',4'-BNA^{NC}

Dans leurs recherches d'oligonucléotides formant des triples hélices stables, l'équipe d'Imanishi a proposé en 1997 de nouveaux BNA (*Bicyclic Nucleic Acid*) appelés 2',4'-BNA^{NC} (Figure 113).⁴⁰⁷ Dans ces composés ressemblant aux ENA (*Ethylene bridge Nucleic Acid*), le pont reliant le carbone C_{2'} et le carbone C_{4'} comportent une liaison N-O.

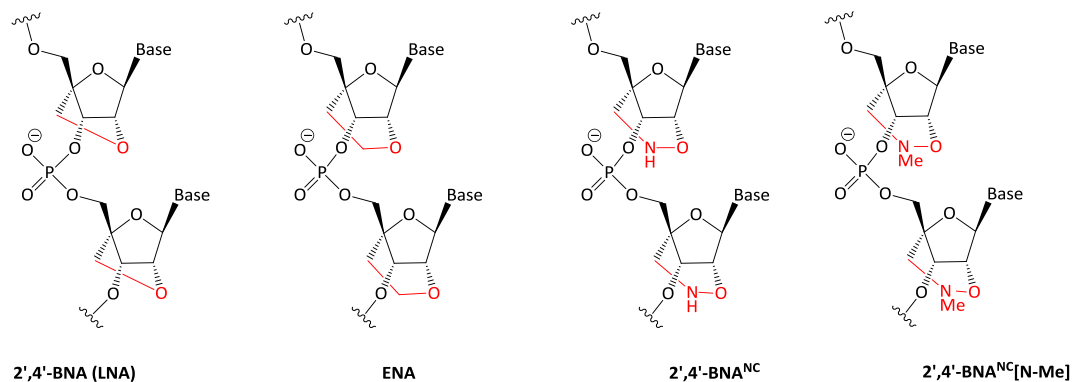


Figure 113 : Structure des 2',4'-BNA (ou LNA pour *Locked Nucleic Acid*), des ENA (*Ethylene bridged Nucleic Acid*), des 2',4'-BNA^{NC} et des 2',4'-BNA^{NC}[N-Me].⁴⁰⁷

Les 2',4'-BNA^{NC} peuvent être préparés grâce à une réaction de substitution nucléophile entre une fonction *N*-oxyamine -ONH₂ précédemment introduite par une réaction de Mitsunobu et un groupement tosyle.⁴⁰⁷ (Schéma 33). Les monomères peuvent ensuite être incorporés dans des séquences d'oligonucléotides via la méthode aux phosphoramidites.

⁴⁰⁷ S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, S. Haitani, K. Miyashita, T. Imanishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4306-4309.

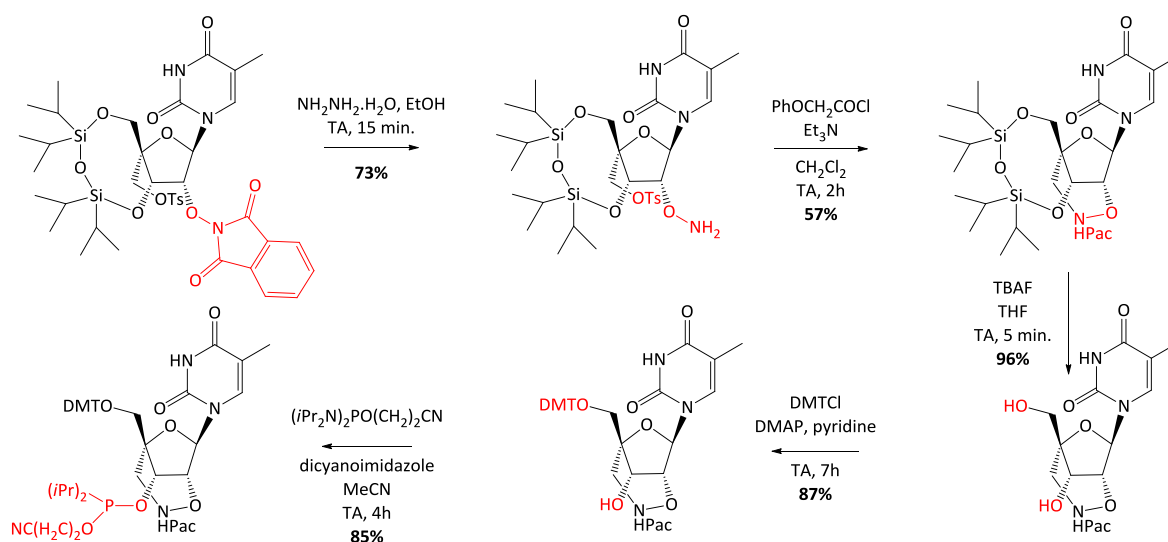


Schéma 33 : Etapes clés de la préparation des monomères de 2',4'-BNA^{NC}.⁴⁰⁷

Les TFO composés de 2',4'-BNA^{NC} forment des triplexes particulièrement stables à pH physiologique. Leur capacité à former des triples hélices est meilleure que celle de TFO composés de BNA/LNA ou d'ENA et l'efficacité optimale n'est plus forcément obtenue avec des oligonucléotides contenant également des monomères non modifiés. Ces propriétés résultent probablement de la conformation bloquée autour de l'azote et de la protonation de l'azote, qui crée des interactions électrostatiques entre le TFO chargé positivement et les liaisons phosphodiester chargées négativement du duplex cible. De plus, la présence d'un cycle à 6 chaînons apporte une flexibilité à la conformation globale de l'oligonucléotide. Ces 2',4'-BNA^{NC} sont potentiellement utilisables dans la stratégie antigène.

Les 2',4'-BNA offre la possibilité de fonctionnaliser l'azote du cycle ponté. La même équipe s'est donc intéressée aux 2',4'-BNA^{NC}[N-Me], obtenus par substitution de l'azote du cycle par un groupe méthyle (Figure 113).⁴⁰⁸ Ces 2',4'-BNA^{NC}[N-Me] ont, en comparaison des LNA, une affinité similaire pour les ARN mais une meilleure sélectivité et une meilleure résistance à la dégradation par les nucléases. De plus, le groupement méthyle hydrophobe est avantageux pour la pénétration cellulaire des oligonucléotides. L'azote peut également être substitué par un groupe benzyle pour donner des 2',4'-BNA^{NC}[N-Bn].⁴⁰⁹ Des études ont montré que ces composés sont de bons agents antisens.^{56,410}

Un autre groupe a préparé des *N*-MeO-amino BNA et *N*-Me-aminoxy BNA (Figure 114) dont les structures sont intermédiaires entre celles des 2'-*O*-DMAOE et celles des LNA.⁴¹¹

⁴⁰⁸ K. Miyashita, S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, T. Imanishi, *Chem. Commun.* **2007**, 3765-3767.

⁴⁰⁹ S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, H. Yoshikawa, K. Miyashita, T. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4886-4896.

⁴¹⁰ T. Yamamoto, H. Yasuhara, F. Wada, M. Harada-Shiba, T. Imanishi, S. Obika, *J. Nucleic Acids* **2012**, Article ID 707323.

⁴¹¹ T. P. Prakash, A. Siwkowski, C. R. Allerson, M. T. Migawa, S. Lee, H. J. Gaus, C. Black, P. P. Seth, E. E. Swayze, B. Bhat, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1636-1650.

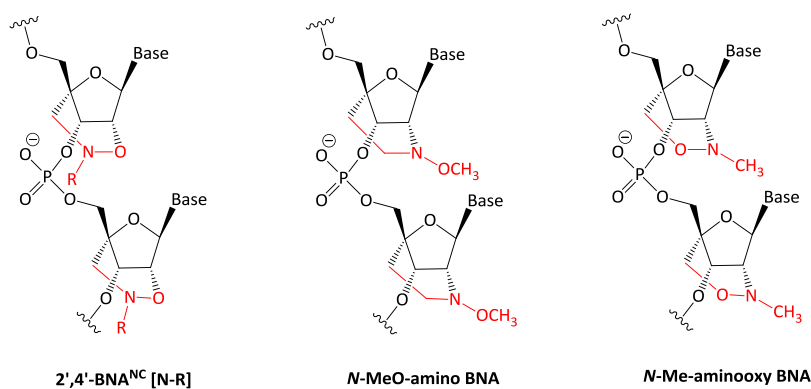


Figure 114 : Structure des 2',4'-BNA substitués, des *N*-MeO-amino BNA et *N*-Me-aminooxy BNA.⁴¹¹

Les *N*-MeO-amino BNA ont été préparés par substitution nucléophile et cyclisation intramoléculaire monotope tandis que les *N*-Me-aminooxy BNA ont été obtenus par une fermeture intramoléculaire de cycle monotope impliquant une réduction d'oxime et une substitution nucléophile (Schéma 34).⁴¹¹

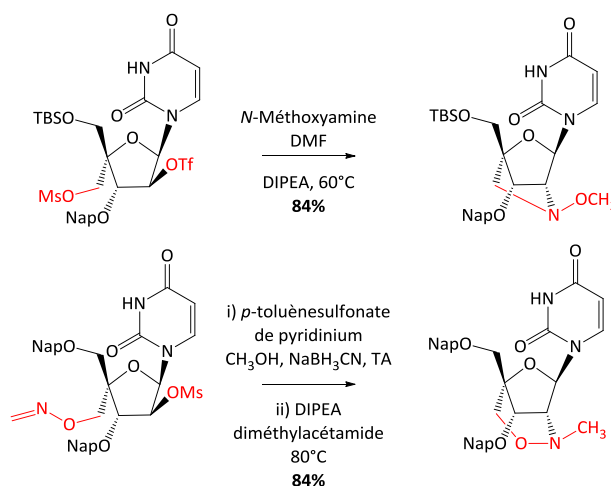


Schéma 34 : Etapes clefs de formation du cycle des *N*-MeO-amino BNA et des *N*-Me-aminooxy BNA.⁴¹¹

Les études biologiques (toxicité, affinité pour l'ARN cible, etc.) ont montré que ces modifications des nucléosides contenant la liaison N-O (*N*-MeO-amino BNA, *N*-Me-aminooxy BNA, 2',4'-BNA^{NC}[N-Me]) sont intéressantes pour obtenir des oligonucléotides antisens faisant intervenir les RNases H même si elles ont un potentiel inférieur aux LNA. Elles permettent également de réduire l'augmentation de la transaminase observée avec les oligonucléotides LNA ayant la même séquence.⁴¹¹

III.2.a.ii. Les HxNA

Des BNA contenant un cycle à 6 chaînons de perhydro-1,2-oxazin-3-one ont été préparés (Figure 115).⁴¹² L'azote peut être substitué ou non.

⁴¹² A. R. Shrestha, Y. Hari, A. Yahara, T. Osawa, S. Obika, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 9891-9899.

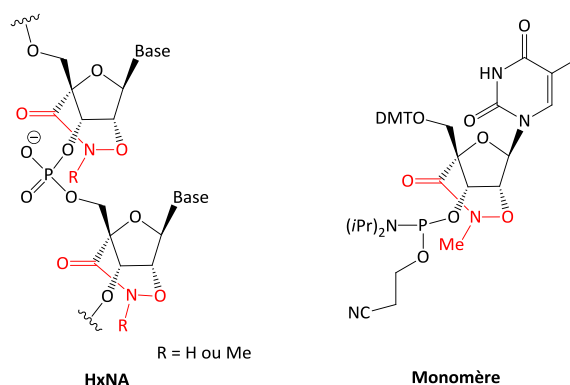


Figure 115 : A gauche : Structure des HxNA (*Hydroxamate bridged Nucleic Acid*). A droite : Structure du monomère incorporé dans des oligonucléotides.⁴¹²

Le pont a été formé par des conditions de couplage classiques entre une fonction *N*-oxyamine et un acide carboxylique (Schéma 35).

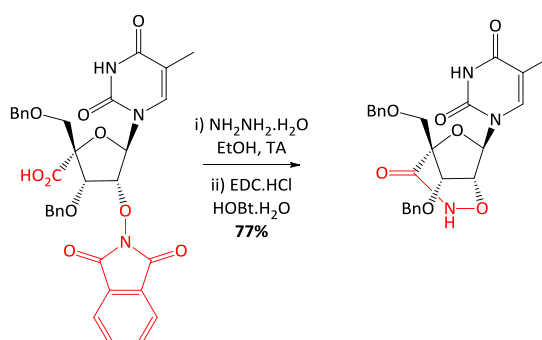


Schéma 35 : Etape clef de la formation du cycle dans le cas du monomère non substitué sur l'azote.⁴¹²

Le monomère thymine HxNA[N-Me]-T (Figure 115) a été incorporé dans des séquences oligonucléotidiques. On notera que le monomère HxNA[N-H] n'est pas étudié en raison de son instabilité en milieu basique et de la difficulté à préparer le monomère phosphoramidite. Les oligonucléotides modifiés contenant le monomère HxNA[N-Me] ont fait preuve d'une excellente capacité d'hybridation avec l'ARN simple brin complémentaire. La résistance aux nucléases de ces oligomères est plus importante que celles des oligomères composés de 2',4'-BNA et de LNA. Des oligomères contenant un monomère analogue au HxNA[N-Me]-T mais non ponté (Figure 116) sont extrêmement résistants à la digestion enzymatique. L'exposition des oligonucléotides modifiés par des HxNA aux 3'-exonucléases conduit à une ouverture du cycle, ce qui arrête la dégradation enzymatique. Cette modification des oligonucléotides est donc particulièrement prometteuse car elle fournit des oligonucléotides antisens hautement résistants aux nucléases et très sélectifs vis-à-vis de l'ARN complémentaire.

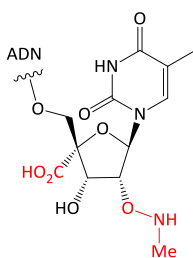


Figure 116 : Oligomères contenant un monomère analogue au HxNA[N-Me]-T non ponté.⁴¹²

III.2.a.iii. Les 2',5'-BNA^{ON}

Des BNA dans lesquels le pont à liaison N-O relie les carbone C_{2'} et C_{5'} ont également été développés (Figure 117).⁴¹³ Il a été montré que pour le monomère uracile (appelé 2',5'-BNA^{ON}-U), le ribose est, en raison du pont, dans une conformation de type sud. Un dimère formé de 2',5'-BNA^{ON}-U liée à un monomère thymine par un lien carbamate a été préparé puis incorporé dans une séquence oligonucléotidique en utilisant la méthode aux phosphoramidites (Figure 116). La capacité d'hybridation de cet oligonucléotide avec le simple brin ADN ou ARN complémentaire s'est avérée inférieure à celle d'un oligonucléotide non modifié.

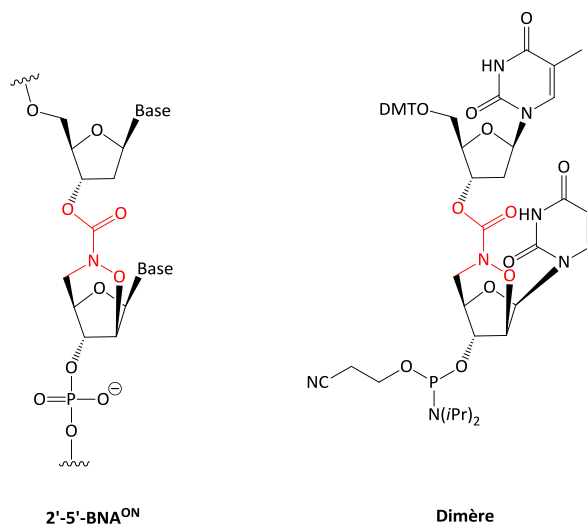


Figure 117 : A gauche : Structure des 2',5'-BNA^{ON}. A droite : Structure du dinucléotide incorporé dans des séquences oligonucléotidiques.

III.2.a.iv. Les trans 3',4'-BNA

Un monomère de trans 3',4'-BNA a également été préparé (Figure 118).⁴¹⁴ Le ribose de ce monomère est bloqué dans une conformation de type sud (comme la forme B de l'ADN).

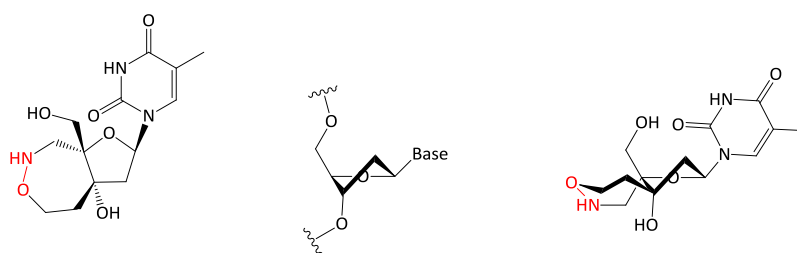


Figure 118 : A gauche : Structure du trans-3',4'-BNA. Au milieu : Forme B de l'ADN. A droite : Structure calculée en DFT 6-31G* du monomère trans 3',4'-BNA.

III.2.b. Les oligonucléotides circulaires à liaison N-O

Les oligonucléotides circulaires sont des simples brins d'ADN ou d'ARN fermés de manière covalente.⁴¹⁵ Ils possèdent des propriétés biologiques et chimiques bien différentes des

⁴¹³ T. Kodama, C. Matsuo, H. Ori, T. Miyoshi, S. Obika, K. Miyashita, T. Imanishi, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2116-2123.

⁴¹⁴ T. Kodama, K. Sugaya, T. Baba, T. Imanishi, S. Obika, *Heterocycles* **2009**, *79*, 873-882.

⁴¹⁵ E. T. Kool, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 1-28.

oligonucléotides linéaires, stimulant ainsi leur étude.^{416,417,418,419,420} Etant donné qu'ils n'ont aucune extrémité disponible pour débiter la digestion, ils sont plus résistants à l'activité des exonucléases que les oligonucléotides linéaires correspondants. Ils ont une très bonne affinité avec l'ADN ou l'ARN complémentaire et se lient avec ces derniers avec une excellente sélectivité.⁴²¹ Ils ont également une bonne activité de déplacement de brins qui, en théorie, les aide à s'hybrider dans les régions des ARN repliés. Des activités biologiques prometteuses ont ainsi été rapportées pour les petits et les grands oligonucléotides cycliques.⁴²² Des ARN cycliques double brin ont même été décrits.⁴²³

Un exemple d'oligonucléotide circulaire fermé par une liaison oxime a été décrit.⁴²⁴ Il est formé par condensation entre la fonction *N*-oxyamine située à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide et la fonction aldéhyde située à l'extrémité 3' de ce même oligonucléotide (Schéma 36).⁴²⁴

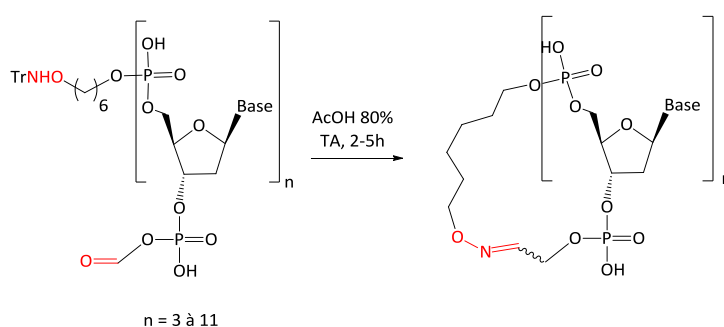


Schéma 36 : Dernière étape de la synthèse d'un oligonucléotide cyclique fermé par une liaison oxime.⁴²⁴

III.2.c. Les oligonucléotides nitroxydes

Les marqueurs de spin sont des radicaux stables chimiquement fixés à des sites bien spécifiques d'une biomolécule qui permettent des études sur la structure et la dynamique de biomolécules. Des nucléosides portant des radicaux nitroxydes ont été développés pour analyser la structure d'ARN riboswitch,⁴²⁵ d'ADN et l'interaction de l'ADN avec des protéines.⁴²⁶ Tout récemment, une équipe a utilisé des marqueurs de spin dérivés du TEMPO permettant de sonder des perturbations dans la structure locale de l'ADN (Figure 119).⁴²⁷ Ces marqueurs sont des nitroxydes connectés à l'amine exocyclique des nucléobases adénine et cytosine. Les monomères correspondants peuvent être incorporés dans des oligonucléotides et servir de sondes de structure. Ces ARN avec des marqueurs de spin à des sites spécifiques ont été préparés en utilisant comme catalyseur un désoxyribozyme sélectionné *in vitro*.

⁴¹⁶ R. Micura, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2077-2082.

⁴¹⁷ T. Li, D. Liu, J. Chen, A. H. F. Lee, J. Qi, A. S. C. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12901-12902.

⁴¹⁸ D. Liu, J. Chen, A. H. F. Lee, L. M. C. Chow, A. S. C. Chan, T. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 797-799.

⁴¹⁹ A. Sanchez, E. Pedrosa, A. Grandas, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 309-311.

⁴²⁰ J. Lietard, A. Meyer, J. J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 191-200.

⁴²¹ E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 502-510.

⁴²² D. A. Di Giusto, S. M. Knox, Y. Lai, G. D. Tyrelle, M. T. Aung, G. C. King, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 535-544.

⁴²³ N. Abe, H. Abe, T. Ohshiro, Y. Nakashima, M. Maeda, Y. Ito, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2125-2127.

⁴²⁴ O. P. Edupuganti, E. Defrancq, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8708-8710.

⁴²⁵ L. Büttner, J. Seikowski, K. Wawrzyniak, A. Ochmann, C. Höbartner, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6171-6180.

⁴²⁶ A. Hakam, I. E. Thomas, A. M. Bobst, *Int. J. Biol. Macromol.* **1980**, *2*, 49-51.

⁴²⁷ D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 219-227.

L'étude de ces acides nucléiques marqués par des nitroxydes se fait par spectroscopie de RPE (Résonance Paramagnétique Electronique) mais cette étude peut aussi se faire par spectroscopie de fluorescence lorsque le nitroxyde est fluorescent.⁴²⁸

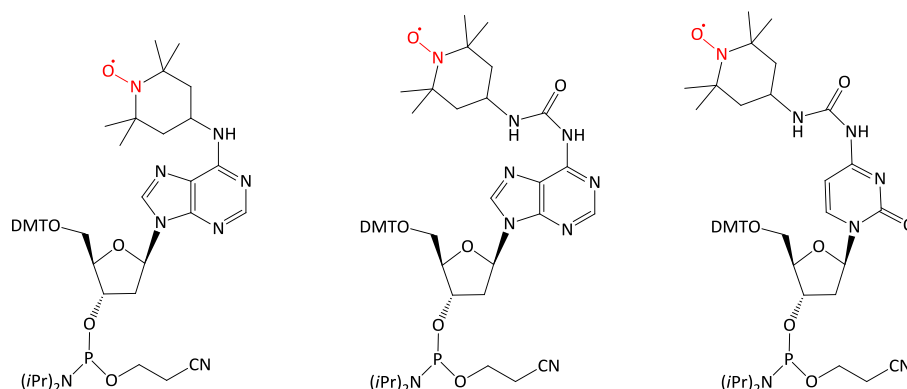


Figure 119 : Nucléotides nitroxydes phosphoramidites permettant le marquage de spin.⁴²⁷

De nombreuses sondes marqueuses de spin nitroxyde existent. Les marqueurs de spin rigides qui n'ont pas de mouvement indépendamment de leurs cibles sont particulièrement intéressants. Il est aussi intéressant que le marqueur de spin perturbe le moins possible la structure de l'acide nucléique à sonder. Cela demande qu'il soit bien accommodé dans la structure tridimensionnelle de l'acide nucléique et ne perturbe pas la stabilité de duplexes d'ARN.⁴²⁹ L'équipe de Qin a développé un marqueur de spin quasi-rigide qui se fixe au niveau des liens internucléosidiques et ce, indépendamment de la nature de la base (Figure 120 à gauche).⁴³⁰ Il permet l'étude des mouvements segmentaires dans les acides nucléiques, en particulier dans de longs ARN repliés. Cette rigidité peut également être contrôlée grâce à des nucléosides avec des benzimidazoles dérivés d'isoindolines qui sont engagés dans des liaisons hydrogène intramoléculaires (entre le NH de l'imidazole et le O₄ de la base uracile) (Figure 120 à droite).⁴³¹ Des nucléosides comportant des marqueurs de spin isoindolines dont la conformation est bloquée (avec le nitroxyde sur le même axe que les 3 liaisons simples utilisées pour ancrer le marqueur de spin fixé sur un isoindoline rigide à la nucléobase) ont été incorporés dans des duplexes d'ADN. Ils permettent ainsi la mesure de distance dans des acides nucléiques par spectroscopie PELDOR (*Pulsed Electron-Electron Double Resonance Spectroscopy*).⁴³²

⁴²⁸ N. Barhate, P. Cekan, A. P. Massey, S. T. Sigurdsson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2655-2658.

⁴²⁹ C. Höbartner, G. Sicoli, F. Wachowius, D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7749-7754.

⁴³⁰ P. H. Nguyen, A. M. Popova, K. Hideg, P. Z. Qin, *BMC Biophysics* **2015**, *8*, 1-6.

⁴³¹ D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 999-1001.

⁴³² D. B. Gophane, B. Endeward, T. F. Prisner, S. T. Sigurdsson, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 15913-15919.

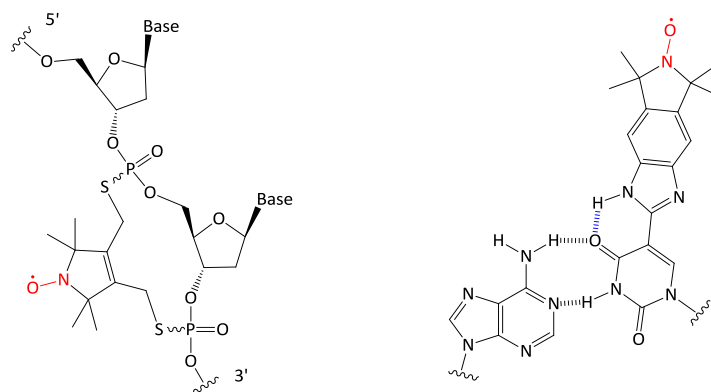


Figure 120 : A gauche : Marqueur de spin nitroxyde cyclique reliant deux liaisons phosphorothioates.⁴³⁰ A droite : Appariement entre le nucléoside U nitroxyde jouant le rôle de marqueur de spin et une adénine. La liaison hydrogène intramoléculaire (en bleu) entre le NH de l'imidazole et le O₄ de la nucléobase uracile restreint la rotation autour de la liaison connectant le nitroxyde à la base.⁴³¹

IV. CONJUGAISON D'OLIGONUCLEOTIDES VIA LA LIAISON OXIME

La conjugaison d'oligonucléotides à d'autres biomolécules ou à des petites molécules est une approche intéressante pour moduler les propriétés biologiques des oligonucléotides (cf. Chapitre 1).⁴³³ Cependant, le cahier des charges pour choisir la conjugaison est exigeant. On se limitera ici à la conjugaison d'oligonucléotides via une liaison oxime en excluant par exemple des conjugués aminoxyacides/nucléosides.⁴³⁴

IV.1. Choisir la liaison oxime en bioconjugaison ?

IV.1.a. Conjugaison par liaison oxime : formation et intérêts

IV.1.a.i. Intérêts de la conjugaison par liaison oxime

La conjugaison d'oligonucléotides se fait à partir de réactions de condensation sur un dérivé carbonyle (conduisant à des imines, des hydrazones, etc.),^{435,436} de cycloadditions alcyne/azido, de réactions de Staudinger ou de réactions de Diels Alder. En effet, des réactions hautement chimiosélectives et régiosélectives dans des conditions douces sont préférées dans la conjugaison d'oligonucléotides. Ainsi, des réactions basées sur des fonctions thiols ou amines manquent de sélectivité. Il peut également y avoir des problèmes d'hydrolyses compétitives de réactifs.

La liaison oxime est une liaison très utilisée dans la conjugaison de peptides et d'oligonucléotides⁴³⁷ car elle remplit les critères de « click chimie ».⁴³⁸ Elle se forme en mettant en présence l'aldéhyde et l'oxyamine correspondants via une réaction efficace qui ne nécessite pas de conditions dures (milieu aqueux). Aucun agent de couplage, aucune étape de préactivation et aucune manipulation technique avancée ne sont nécessaires : il suffit de mélanger les deux réactifs. L'eau est le seul sous-produit. Les fonctions aldéhyde et oxyamine sont facilement introduites et peuvent être

⁴³³ Y. Singh, N. Spinelli, E. Defrancq, *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 263-290.

⁴³⁴ B. Draghici, F. K. Hansen, A. M. Buciumas, B. El-Dien, M. El-Gendy, E. Todadze, A. R. Katritzky, *RSC Adv.* **2011**, *1*, 602-606.

⁴³⁵ T. S. Zatsepin, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 471-489.

⁴³⁶ N. Ollivier, C. Olivier, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 997-999.

⁴³⁷ Y. Singh, O. P. Edupuganti, M. Villien, E. Defrancq, P. Dumy, *C. R. Chimie* **2005**, *8*, 789-796.

⁴³⁸ S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 34-41.

protégées par de nombreux groupes protecteurs.⁴³⁹ Etant donné la nucléophilie exacerbée des fonctions oxyamines (en raison de l'effet α), les autres fonctions n'ont pas besoin d'être protégées et cette jonction est particulièrement sélective. Cette réaction, efficace et chimiosélective, est compatible avec la majorité des fonctionnalités des biomolécules. La transoximation est très lente (en particulier en milieu neutre) et nécessite une catalyse, un chauffage, un milieu acide, etc. Les oximes sont bien plus stables que les imines correspondantes. Cette stabilité provient de l'effet α apporté par la présence d'un hétéroatome adjacent à l'azote sp^2 . La délocalisation électronique des doublets libres est responsable de la faible électrophilie du carbone sp^2 qui est alors moins susceptible d'être attaqué par des molécules d'eau. De plus, les effets inductifs attracteurs diminuent la basicité de l'azote sp^2 , diminuant encore davantage la vitesse de cette hydrolyse catalysée par H^+ . Une hydrolyse complète ou partielle d'oxime demande des conditions acides fortes. Par ailleurs, aucune étape de réduction de l'oxime n'est nécessaire pour stabiliser le conjugué.

IV.1.a.ii. Formation de la liaison oxime

La constante d'équilibre de la formation d'oxime (correspondant au rapport entre la constante de vitesse k_1 de formation de l'oxime et la constante de vitesse k_{-1} d'hydrolyse de l'oxime) est usuellement supérieure à $10^8 M^{-1}$. Il a été montré, lors de l'étude de la synthèse de très grosses molécules dérivées de protéines, qu'un milieu légèrement acide est adapté pour la formation de liaisons oximes. Ce milieu légèrement acide permet d'ailleurs de protoner les fonctions amines, ce qui dans certains cas (peptides par exemple) aide à la solubilité en solvant aqueux ou dans des cosolvants. Par ailleurs, cette liaison oxime est stable pendant plus de 65 heures à pH 8 et plus de 2 heures à pH 9.^{440,441} La cinétique de formation de la liaison oxime est relativement lente et peut être accélérée par l'utilisation d'aniline (Figure 121).⁴⁴² Ce catalyseur permet une formation rapide du lien oxime à des concentrations faibles et ce, sans recourir à l'excès de constituants.⁴⁴³

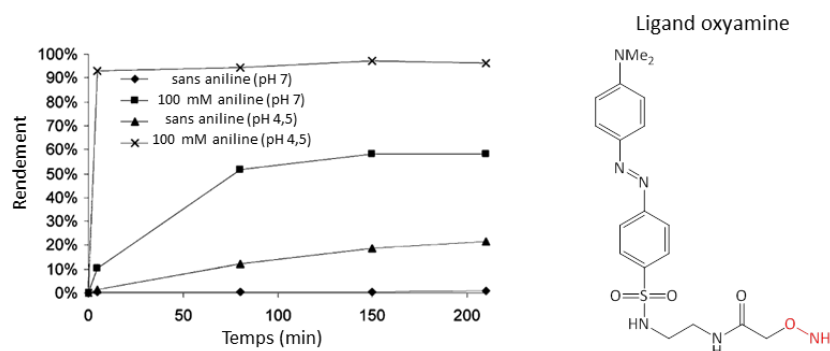


Figure 121 : Cinétique de formation d'une oxime entre un ADN modifié présentant une fonction aldéhyde et un composé oxyamine (structure donnée à droite de la figure) en présence et en l'absence d'aniline à différents pH.⁴⁴³

L'équipe de S. Beaucage a montré que la formation de la liaison oxime peut être réversible.⁴⁴⁴ Des 2'-O-aminooxyméthylribonucléosides réagissent avec le 1-pyrèncarboxaldéhyde pour former un

⁴³⁹ N. Venkatesan, B. Hyeon Kim, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3712-3761.

⁴⁴⁰ K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.

⁴⁴¹ K. Rose, W. Zeng, P. O. Regamey, I. V. Chernushevich, K. G. Standing, H. F. Gaertner, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 552-556.

⁴⁴² A. Dirksen, P. E. Dawson, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2543-2548.

⁴⁴³ P. Crisalli, A. R. Hernandez, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1969-1980.

⁴⁴⁴ J. Cieslak, A. Grajkowski, C. Ausin, A. Gapeev, S. L. Beaucage, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 2312-2329.

ribonucléoside conjugué en position 2' (Schéma 37). La présence de fluorure de tétra-*n*-butylammonium (TBAF) rompt par β -élimination la liaison oxime et forme le ribonucléoside de départ et le pyrène nitrile (Schéma 38). D'autres composés obtenus par exemple par réaction entre le 5-cholestèn-3-one avec le 2'-*O*-aminooxyméthyluridine ne sont pas affectés par la présence de TBAF (Figure 122). Cette conjugaison permanente ou réversible de 2'-*O*-aminooxyméthylnucléosides mais également de 5'-*O*-aminooxyméthylnucléosides est une approche efficace et pratique pour la modification de séquences d'ADN et d'ARN.

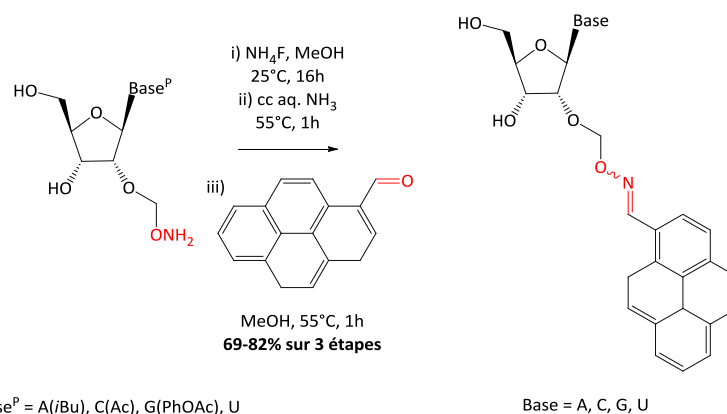


Schéma 37 : Formation du ribonucléoside conjugué en position 2' avec le pyrène aldéhyde.⁴⁴⁴

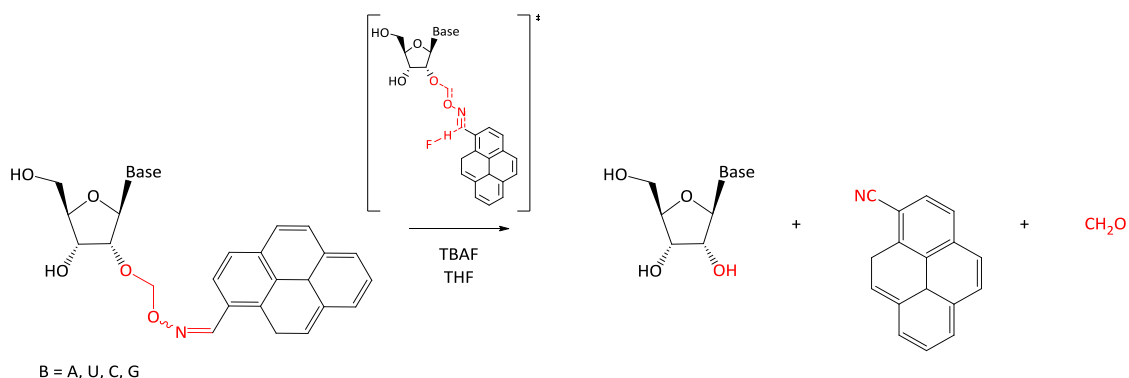


Schéma 38 : Conversion par le TBAF du 2'-*O*-pyrénylribonucléoside en ribonucléoside natif.⁴⁴⁴

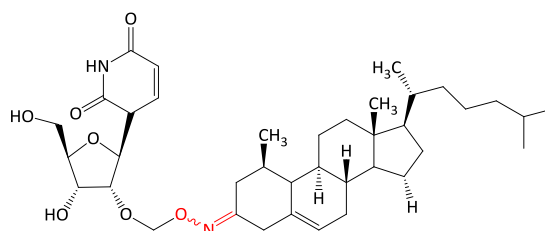


Figure 122 : Exemple de conjugué insensible aux ions fluorure.⁴⁴⁴

Lors de la formation d'une liaison oxime, il faut porter attention au fait qu'un groupe aminoxyyle primaire peut réagir avec deux aldéhydes. Ainsi, lors de la conjugaison d'oligonucléotides à des complexes de ruthénium,⁴⁴⁵ un sous-produit est obtenu. Il correspond à la réaction de deux aldéhydes avec une oxyamine (Schéma 39). Cependant, en contrôlant les conditions opératoires

⁴⁴⁵ M. Villien, S. Deroo, E. Gicquel, E. Defrancq, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, P. Dumy, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11299-11306.

(utilisation d'au moins deux équivalents d'oxyamine), la formation de ce sous-produit devient négligeable.

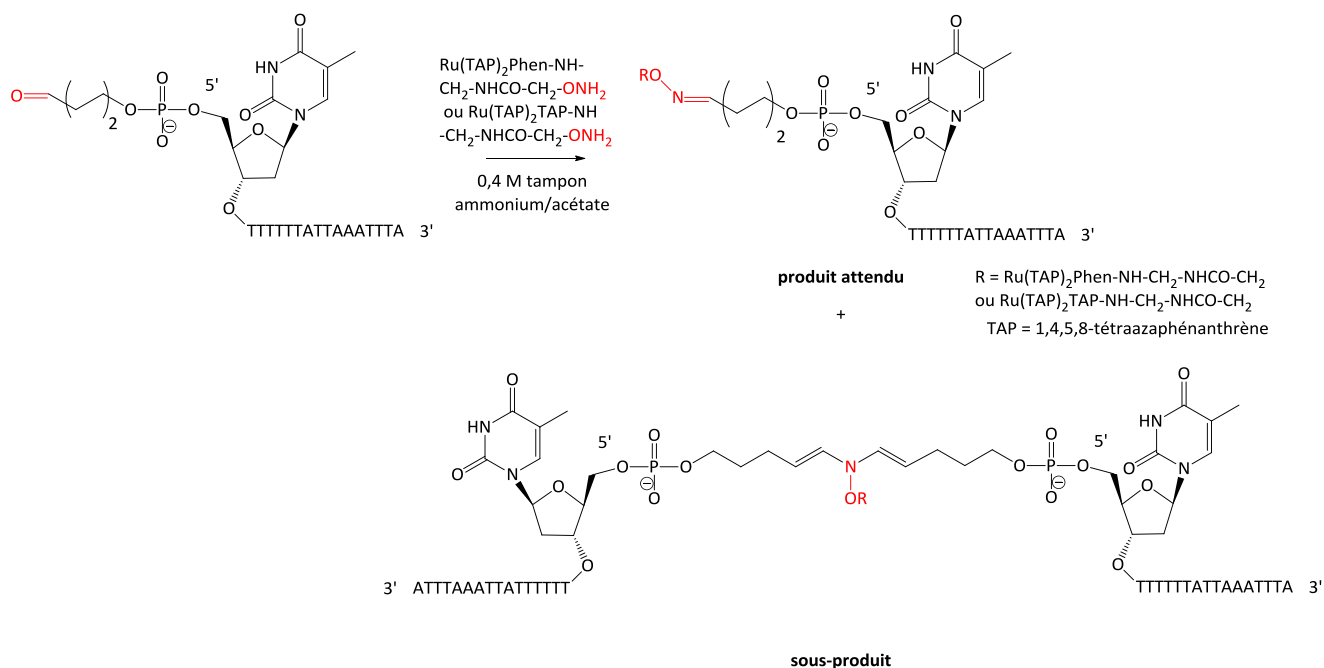


Schéma 39 : Sous-produit obtenu lors de la conjugaison d'un oligonucléotide via un lien oxime.⁴⁴⁵

Pour permettre cette conjugaison, l'oligonucléotide doit porter une fonction aldéhyde (cas majoritaire que nous avons vu précédemment),⁴⁴⁶ une fonction cétone (Schéma 40) ou la fonction *N*-oxyamine.⁴⁴⁷

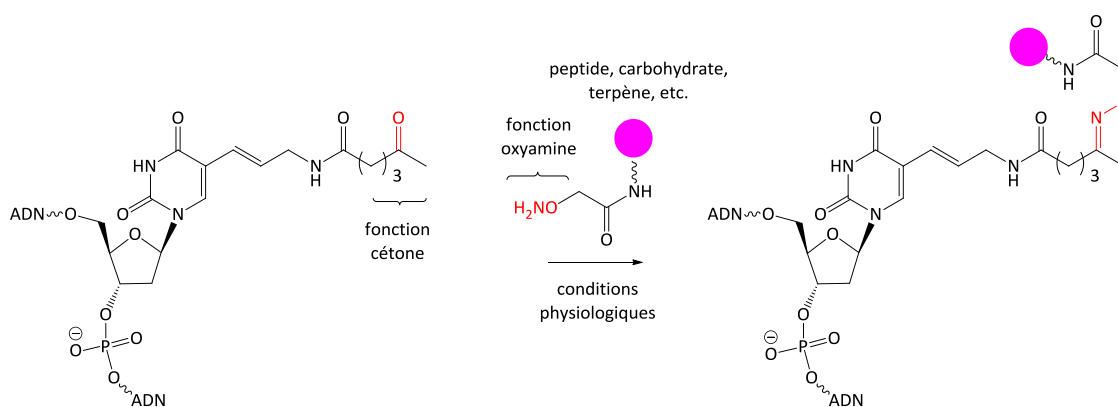


Schéma 40 : Conjugaison d'un oligonucléotide portant une fonction cétone.⁴⁴⁷

IV.1.b. Multiples positions de conjugaison

Le choix judicieux d'une conjugaison pour un oligonucléotide doit passer par une réflexion sur le site sur lequel est fixé le conjugué. Elle peut se faire à une des extrémités 3' ou 5' de l'oligonucléotide terminal ou au niveau de la base nucléique ou de la position 2' d'un nucléotide (quelle que soit la position de ce nucléotide dans la séquence oligonucléotidique). Ce peut également

⁴⁴⁶ N. Spinelli, Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, 26, 883-887.

⁴⁴⁷ S. Dey, T. L. Sheppard, *Org. Lett.* **2001**, 3, 3983-3986.

être une petite molécule comme le 4-éthoxy-2-(éthyluréido)quinoléine, fixé sur l'oligonucléotide lors de sa synthèse, qui porte la fonction aldéhyde ou oxyamine.⁴⁴⁸

IV.1.b.i. Conjugaison aux extrémités 3' ou 5'

Afin d'éviter de perturber les capacités d'hybridation de l'oligonucléotide avec l'acide nucléique cible, la conjugaison est généralement entreprise aux extrémités 3',^{449,450} ou 5'.^{451,452}

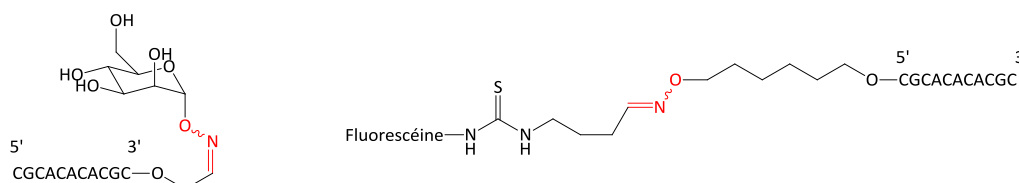


Figure 123 : A gauche : Conjugaison d'oligonucléotides à l'extrémité 3'.⁴⁴⁹ A droite : Conjugaison d'oligonucléotides à l'extrémité 5'.⁴⁵¹

IV.1.b.ii. Conjugaison en position 2'

Cette conjugaison peut également être entreprise sur la position 2' de l'oligonucléotide (Figure 124).^{453,454} L'incorporation de ces oligonucléotides permettant la conjugaison en position 2' diminue très légèrement la capacité d'hybridation avec un brin d'ADN complémentaire. Par contre, la capacité d'hybridation avec l'ARN complémentaire est fortement diminuée. La stabilisation sélective des duplexes avec l'ADN cible comparé à l'ARN cible peut s'expliquer par la conformation sud adoptée par le ribose favorisant la formation d'hélice de type B.

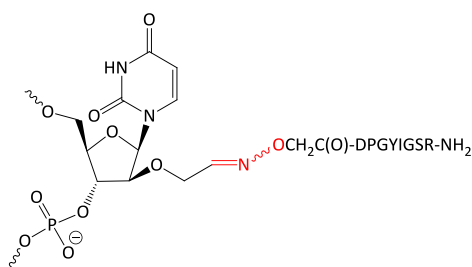


Figure 124 : Conjugaison d'oligonucléotides en position 2'. Dans cette étude, des oligonucléotides de 12 unités contiennent un ou deux nucléotides conjugués en position 2'.⁴⁵⁴

IV.1.b.iii. Conjugaison sur la base nucléique

La conjugaison peut se faire au niveau de la base nucléique (Figure 125).⁴⁵⁵ Dans ce cas, le ou les nucléotide(s) permettant la conjugaison de l'oligonucléotide peuvent se trouver à n'importe quelle position dans la séquence oligonucléotidique.

⁴⁴⁸ T. Hamma, P. S. Miller, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 320-330.

⁴⁴⁹ D. Forget, O. Renaudet, D. Boturyn, E. Defrancq, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 9171-9174.

⁴⁵⁰ M. Villien, E. Defrancq, P. Dumy, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 1657-1666.

⁴⁵¹ E. Defrancq, J. Lhomme, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 931-933.

⁴⁵² Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8544-8546.

⁴⁵³ E. M. Zubin, D. A. Stetsenko, T. S. Zatsepin, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4912-4920.

⁴⁵⁴ T. S. Zatsepin, Y. M. Ivanova, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7327-7330.

⁴⁵⁵ E. Trévisiol, A. Renard, E. Defrancq, J. Lhomme, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8687-8690.

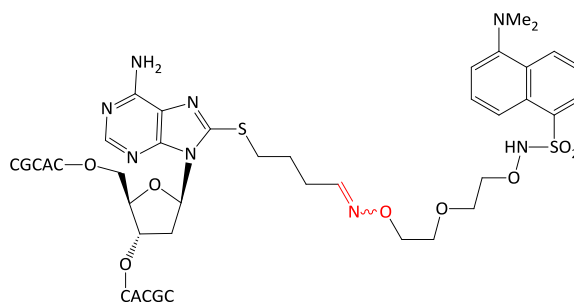


Figure 125 : Exemples d'oligonucléotides conjugués au niveau de la base nucléique.⁴⁵⁵

Il a été montré⁴³⁷ que la conjugaison sur la nucléobase diminue énormément la stabilité des duplexes formés entre l'oligonucléotide conjugué et le brin d'acide nucléique complémentaire.

IV.1.c. Conjugaison sur support solide ou post-synthèse

La conjugaison des oligonucléotides peut se faire lors de la synthèse sur support solide ou après la synthèse de l'oligonucléotide.⁴⁵⁶ On pourra noter qu'étant donné que la déprotection en milieu acide d'un aldéhyde protégé en acétal risque de conduire à une dépurination, on préfère souvent introduire l'aldéhyde par clivage oxydant de diols vicinaux.

IV.1.c.i. Conjugaison de l'oligonucléotide sur support solide

La conjugaison d'oligonucléotides peut se faire directement sur support solide. Cela permet d'éviter des étapes de purification intermédiaires.⁴⁵⁷ La préparation de l'oligonucléotide et sa conjugaison se font sur un unique support. Des groupements protecteurs et des protocoles minimisant les sous-produits sont employés. Cela demande au lien fixant l'oligonucléotide sur le support de résister aux étapes de conjugaison. Par exemple, un oligodésoxyribonucléotide fixé sur un support solide et contenant le monomère 2'-O-(2,3-dihydroxypropyl)cytidine est préparé. La déprotection de ce diol suivie d'un clivage oxydant conduit à la formation d'un aldéhyde en position 2'. On notera que l'aldéhyde reste sur le support solide et que ces conditions oxydantes ne conduisent à aucune dégradation. Une conjugaison avec des composés variés est effectuée. Il reste ensuite à décrocher l'oligonucléotide conjugué de son support (Schéma 41). Différents supports solides ont été développés.⁴⁵⁸

⁴⁵⁶ K. Lu, Q. P. Duan, L. Ma, D. X. Zhao, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 187-202.

⁴⁵⁷ T. S. Zatsepin, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3191-3195.

⁴⁵⁸ N. Spinelli, O. P. Edupuganti, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 219-222.

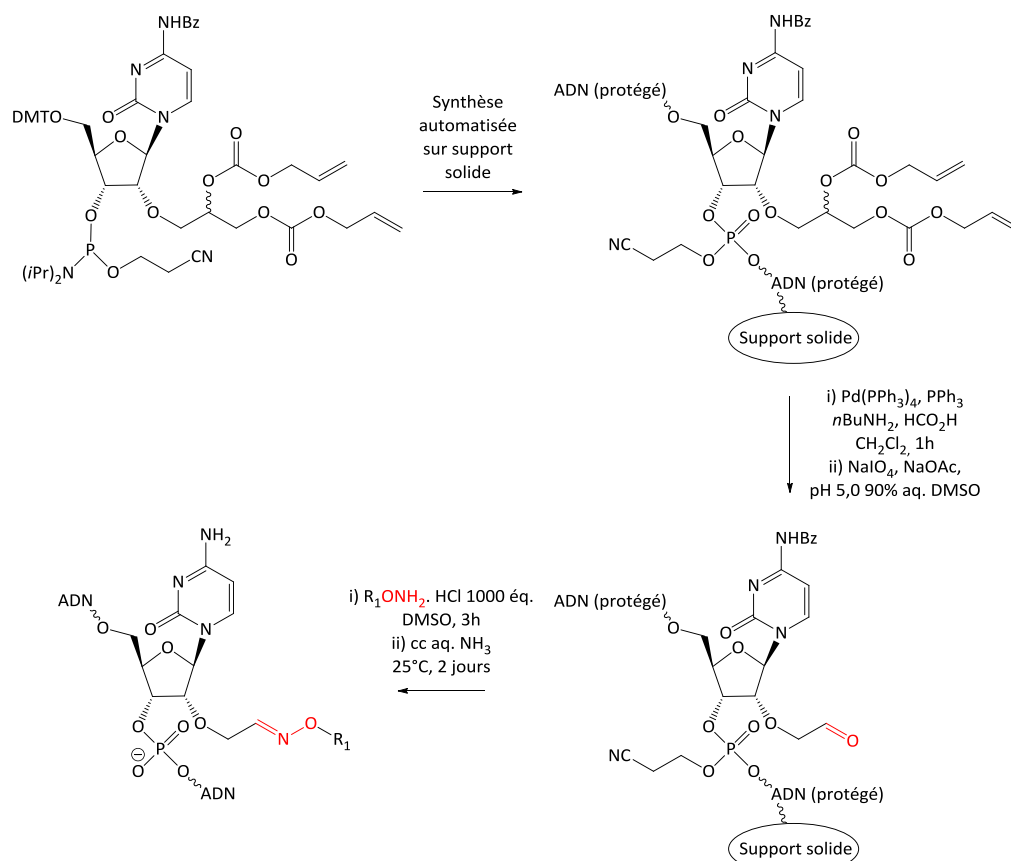


Schéma 41 : Préparation puis conjugaison d'un oligonucléotide sur support solide.⁴⁵⁷

Il est également possible de préparer des monomères phosphoramidites comportant un groupe aminooxyle protégé sous forme de phthalimidoxyle (Figure 126).⁴⁵⁹ Ces monomères sont incorporés sur support solide dans des séquences oligonucléotidiques puis les fonctions oxyamines sont déprotégées avec l'acétate d'hydrazinium. Les liens succinyles sont stables dans ces conditions et l'oligonucléotide lié au support peut être conjugué à un pyrène carbaldéhyde ou au cis-rétinal. La déprotection usuelle par aminolyse libère le conjugué déprotégé en solution.

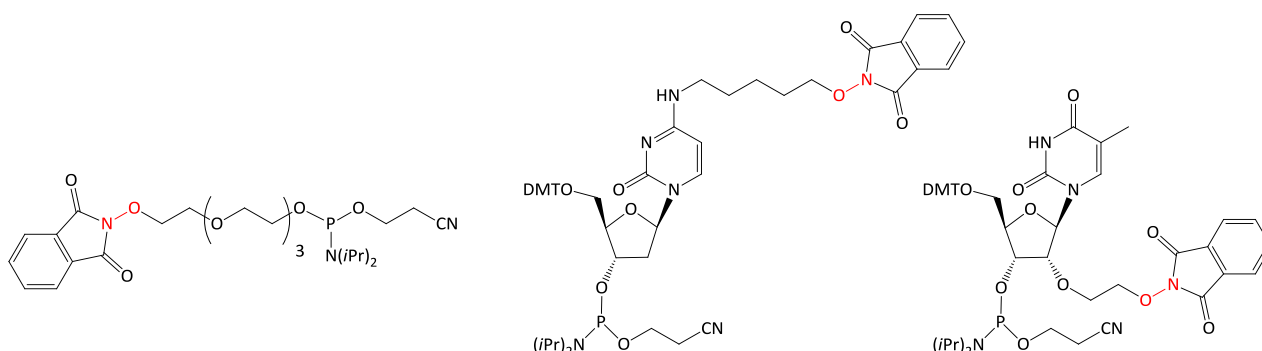


Figure 126 : Monomères phosphoramidites fonctionnalisés par une fonction *N*-oxyamine protégée. Ces composés permettent l'attache d'un groupe aminooxyle à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide (monomère de gauche) ou à n'importe quelle position de la séquence oligonucléotidique (monomère du milieu et de droite).⁴⁵⁹

Une des difficultés de cette technique est la faible compatibilité entre l'oligonucléotide et le composé à conjuguer.⁴³⁷

⁴⁵⁹ H. Salo, P. Virta, H. Hakala, T. P. Prakash, A. M. Kawasaki, M. Manoharan, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 815-823.

IV.1.c.ii. Conjugaison de l'oligonucléotide après sa synthèse

Dans cette approche de conjugaison post-synthétique de l'oligonucléotide, l'oligonucléotide et le composé conjugué sont construits séparément avec des méthodes classiques (synthèse peptidique, etc.). Ils sont fonctionnalisés à la fin de leur synthèse par une fonction aminoxyyle ou aldéhyde et sont ensuite conjugués ensemble en solution (Schéma 42). Cette technique peut se révéler très efficace avec des purifications faciles et de bons rendements de couplage. Elle permet de conjuguer des familles beaucoup plus vastes de composés (peptides, carbohydrates, fluorophores) à des oligonucléotides. De nouveau, l'oligonucléotide peut porter la fonction aldéhyde ou la fonction aminoxyyle.⁴⁵⁶

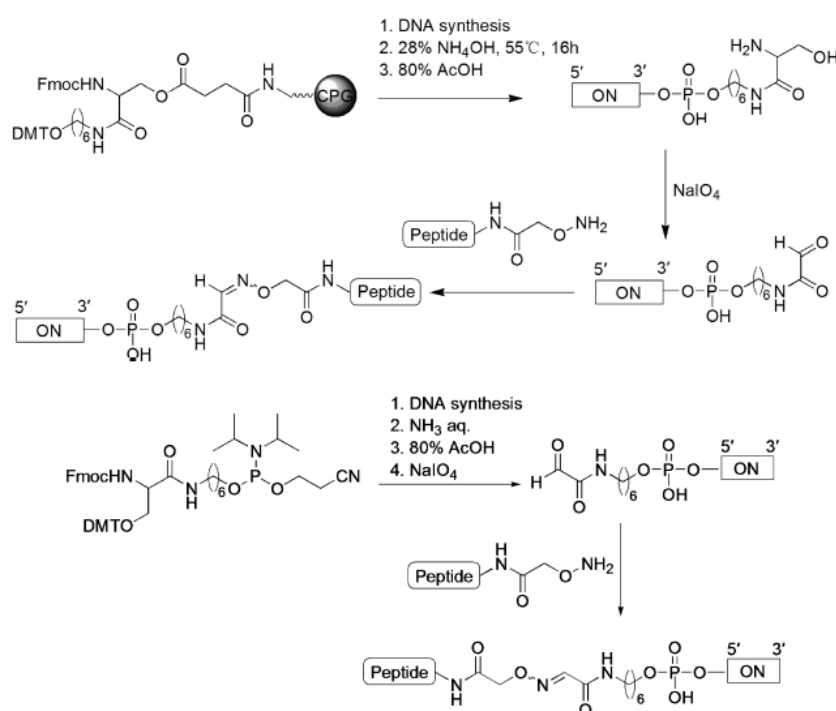


Schéma 42 : Conjugaison post-synthétique d'un oligonucléotide en position 3' (en haut) ou 5' (en bas).⁴⁵⁶

La conjugaison post-synthèse peut régler certaines difficultés de compatibilité rencontrées lors de la conjugaison par liaison oxime. Le remplacement du lien phosphodiester naturel par une liaison phosphorothioate est une modification très répandue des oligonucléotides. L'incorporation de la fonction aldéhyde sur l'oligonucléotide se fait classiquement via le clivage oxydant d'un diol. Or, de telles conditions oxydantes sont incompatibles avec un lien phosphorothioate (oxydation en phosphodiester). La conjugaison post-synthèse apporte une solution à ce problème. En effet, l'équipe d'Eric Defrancq⁴⁶⁰ a montré que l'oximation d'oligonucléotides PS peut être effectuée efficacement avec un aldéhyde aromatique (Schéma 43). Lors de la préparation de l'oligonucléotide PS sur support solide, un phosphoramidite avec l'aldéhyde protégé sous forme d'un acétal est incorporé lors de la dernière étape. L'aldéhyde est généré par un traitement faisant suite à la synthèse en phase solide de l'oligonucléotide. Abendroth et Seitz ont également proposé une

⁴⁶⁰ P. Murat, N. Spinelli, P. Dumy, E. Defrancq, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6534-6537.

méthode impliquant une oximation et une cycloaddition [3+2] permettant la conjugaison d'oligonucléotide PS.⁴⁶¹

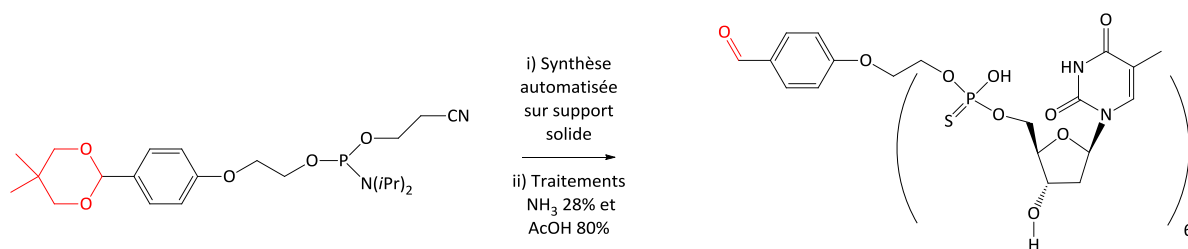
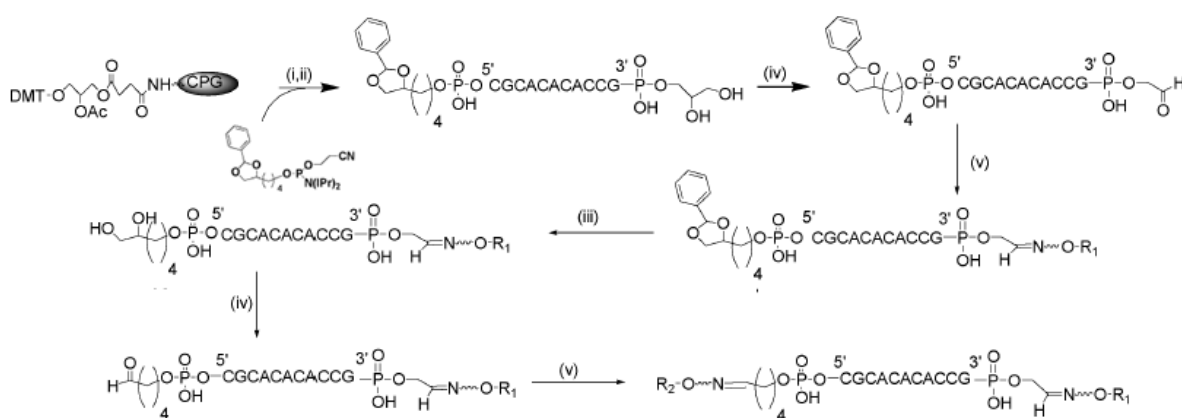


Schéma 43 : Préparation de l'oligonucléotide prêt à être conjugué.⁴⁶⁰

IV.1.d. Conjugaison multiple

Si on veut éviter une attaque par les nucléases, une double conjugaison à l'extrémité 3' et à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide est souhaitable. Pour cette double conjugaison, des oligonucléotides portant deux fonctions aldéhydes et/ou *N*-oxyamines sont utilisables (Schéma 44).^{451,462} Par exemple, de tels oligonucléotides bifonctionnalisés peuvent être conjugués via une liaison oxime à un cyclopentapeptide contenant un motif tripeptidique arginine/glycine/acide aspartique (RGD) qui est un excellent ligand sélectif de récepteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (ciblage de tumeurs) et à un peptide contenant une séquence de signal de localisation nucléaire (NLS) utilisé dans la transfection de cellules. Ils peuvent également être conjugués à deux carbohydrates (lactose, mannose).⁴⁶³ Tous les duplexes formés par ces conjugués sont par ailleurs légèrement stabilisés.



Reagents and conditions : (i) Solid-phase oligonucleotide assembly by phosphoramidite approach; (ii) 28% Ammonia, 55 °C, 16 h; (iii) 80% Aqueous AcOH, 1h; (iv) 10^{-3} M NaIO₄, H₂O; (v) Peptide-aminoxy (1 equiv), acetate buffer (100 mM, pH=4.2).

Schéma 44 : Conjugaison d'oligonucléotide en 3' et en 5'.⁴⁴⁶

Les deux conjugaisons peuvent faire intervenir deux types de liaison différents.⁴⁶⁴ Ainsi, des oligonucléotides fonctionnalisés par un alcyne à l'extrémité 5' et un aldéhyde à l'extrémité 3' peuvent être doublement conjugués à des carbohydrates azido, à des sondes fluorescentes azido, à

⁴⁶¹ F. Abendroth, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10504-10509.

⁴⁶² O. P. Edupuganti, Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 5988-5995.

⁴⁶³ O. P. Edupuganti, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 2839-2842.

⁴⁶⁴ A. Meyer, N. Spinelli, P. Dumy, J. J. Vasseur, F. Morvan, E. Defrancq, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 3927-3930.

des peptides oxyamines, à des carbohydrates oxyamines, etc. (Figure 127). Les deux conjugaisons peuvent être effectuées dans n'importe quel ordre.

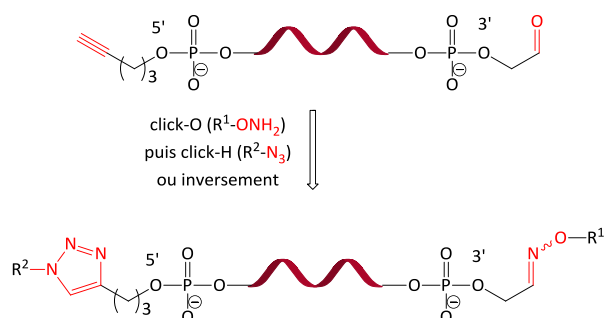


Figure 127 : Double conjugaison séquentielle d'un oligonucléotide via des procédures click-oxime et click-Huisgen.⁴⁶⁴

Des espaceurs bifonctionnels peuvent permettre cette double conjugaison. Ainsi, l'équipe de Defrancq a développé un espaceur hétérobifonctionnel contenant un groupe nitropyridyle disulfique réactif avec des thiols et une oxyamine réactive avec des aldéhydes (Schéma 45).⁴⁶⁵ Le lien disulfure peut être formé puis le lien oxime ou inversement. Cet espaceur permet de lier différentes biomolécules et un conjugué peptide/oligonucléotide peut ainsi être préparé.

⁴⁶⁵ Y. Singh, N. Spinelli, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1413-1419.

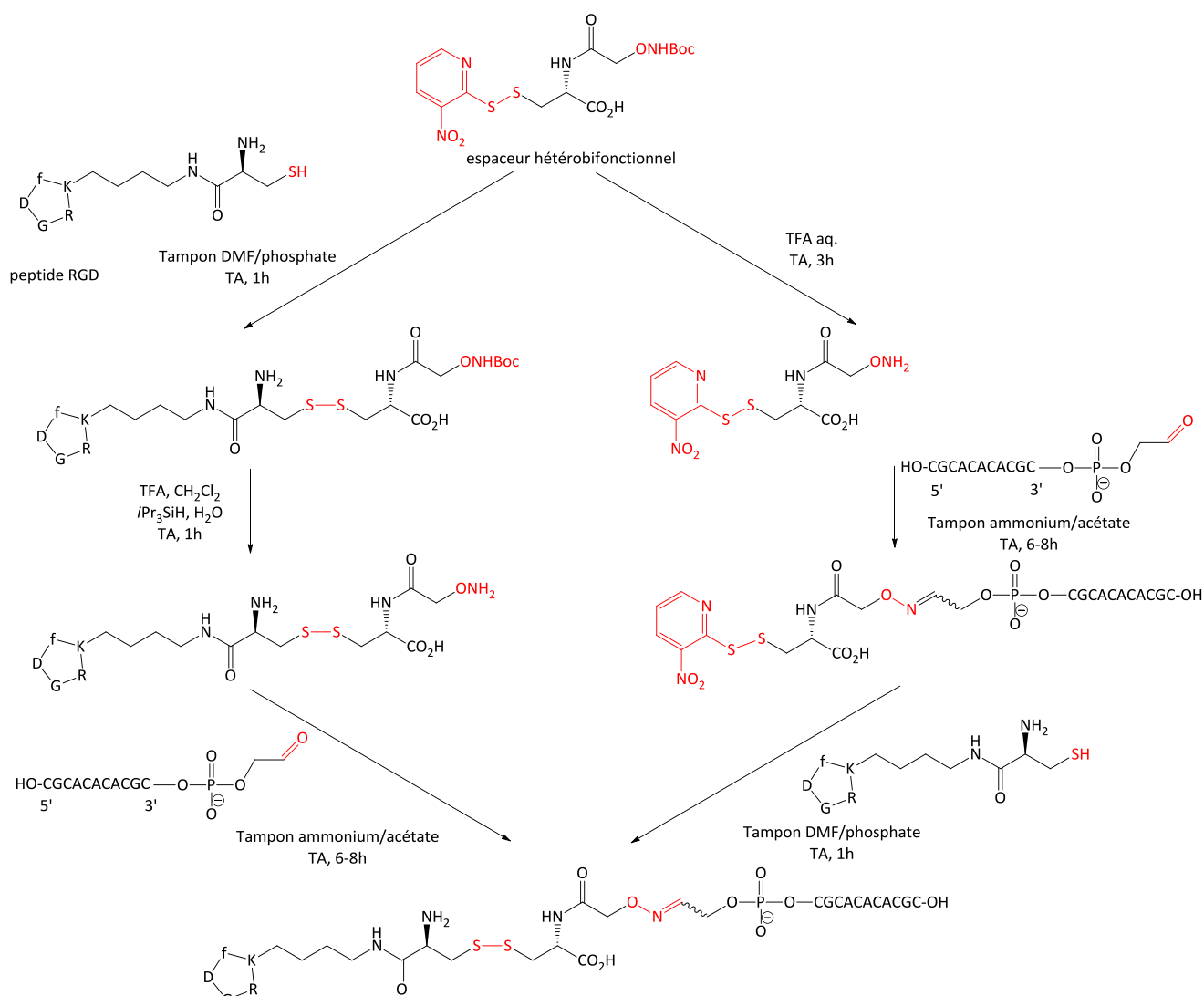


Schéma 45 : Préparation d'un conjugué double peptide/oligonucléotide à l'aide d'un espaceur hétérobifonctionnel.⁴⁶⁵

Il existe même des agents de réticulation hétérotrifonctionnels qui permettent une triple conjugaison (Figure 128).⁴⁶⁶

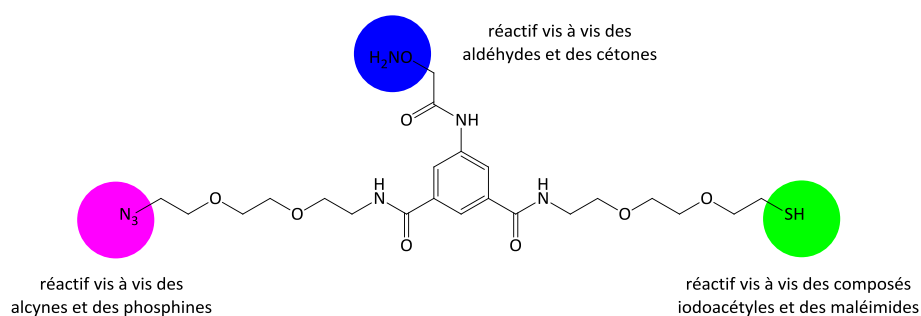


Figure 128 : Structure de l'agent de réticulation hétérotrifonctionnel.⁴⁶⁶

L'équipe de Pascal Dumy^{438,467} a développé des peptides cycliques présentant deux domaines indépendants qui permettent l'assemblage séquentiel et sélectif de différents composés via des

⁴⁶⁶ G. Viault, S. Dautrey, N. Maindron, J. Hardouin, P. Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2693-2705.

⁴⁶⁷ E. Garanger, D. Boturyn, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2402-2410.

liaisons oximes (Figure 129). Ils peuvent ainsi former des nouveaux conjugués qui comportent par exemple une fonction ciblant la cellule et un composé cytotoxique.

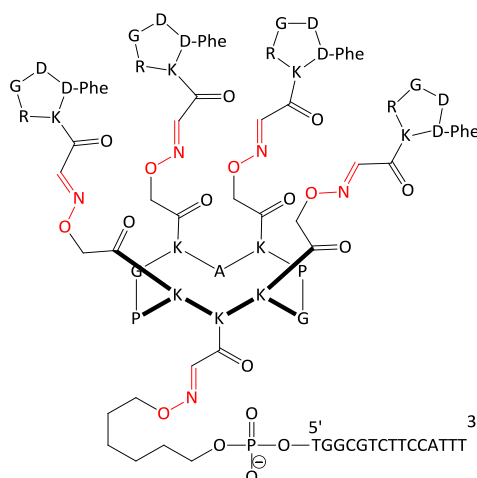


Figure 129 : Structure d'un cyclodécapeptide lié par des liaisons oxime à un oligonucléotide et à des peptides cycliques.⁴⁶⁷

IV.1.e. Difficultés de la conjugaison par liaison oxime

Malgré tous les atouts de la conjugaison par liaison oxime énoncés précédemment, celle-ci a été beaucoup moins développée que d'autres conjugaisons comme par exemple celle par cycloaddition de Huisgen.⁴³⁸ Cela est probablement dû à des difficultés lors de la synthèse, la manipulation ou le stockage de biomolécules modifiées contenant des fonctions aldéhydes ou oxyamines. En effet, les aldéhydes peuvent s'oxyder spontanément ou se coupler avec un nucléophile ou sur eux-mêmes. Les oxyamines peuvent réagir avec des électrophiles comme des esters activés ou avec des impuretés carbonylées de solvant. Par ailleurs, les oximes peuvent exceptionnellement faire preuve d'une instabilité en milieux aqueux.

IV.2. Principaux exemples d'oligonucléotides conjugués par une liaison oxime

Une grande variété de composés peut être conjuguée à des oligonucléotides.⁴⁶⁸ Nous nous limitons ici à la conjugaison d'oligonucléotide et nous n'abordons pas l'utilisation de la liaison oxime dans l'étiquetage d'ARN⁴⁶⁹ ou dans l'incorporation de motifs sur des surfaces en verre.^{470,471,472}

IV.2.a. Oligonucléotides conjugués à des petites molécules

La liaison oxime a permis la préparation d'oligonucléotides marqués en 3' ou en 5' avec des composés électrochimiquement actifs comme du ferrocène et du viologène.⁴⁷³ Ces composés ne perturbent pas les propriétés de reconnaissance de l'oligonucléotide (Figure 130).

⁴⁶⁸ Y. Singh, P. Murat, E. Defrancq, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 2054-2070.

⁴⁶⁹ E. Trévisiol, E. Defrancq, J. Lhomme, A. Laayoun, P. Cros, *Tetrahedron* **2000**, 56, 6501-6510.

⁴⁷⁰ N. Dendane, A. Hoang, L. Guillard, E. Defrancq, F. Vinet, P. Dumy, *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 671-676.

⁴⁷¹ N. Dendane, A. Hoang, O. Renaudet, F. Vinet, P. Dumy, E. Defrancq, *Lab Chip* **2008**, 8, 2161-2163.

⁴⁷² G. Clavé, H. Boutal, A. Hoang, F. Perraut, H. Volland, P. Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 3065-3078.

⁴⁷³ J. Moreau, N. Dendane, B. Schöllhorn, N. Spinelli, C. Fave, E. Defrancq, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 955-958.

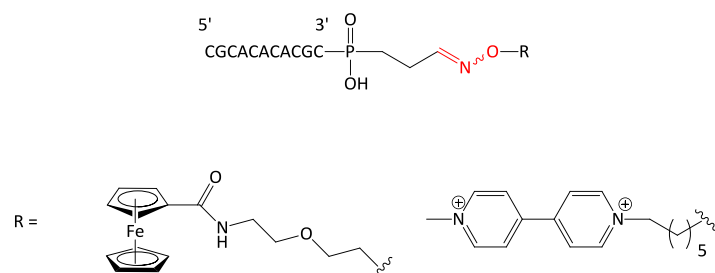


Figure 130 : Conjugaison d'un oligonucléotide avec un marqueur électrochimique.⁴⁷³

L'ancrage de dérivés de phénanthroline à des oligonucléotides est intéressant car le cycle aromatique du phénanthroline apporte des propriétés intercalantes. De plus, des nucléases artificielles ont été conçues pour exploiter les propriétés rédox de complexes de coordination avec un ou plusieurs ligands phénanthroline. Un dérivé de phénanthroline portant une fonction *N*-oxyamine peut réagir avec un oligonucléotide comportant une fonction aldéhyde en position 3' ou 5' pour donner un conjugué oligonucléotide/phénanthroline (Figure 131).⁴⁷⁴ Ici, il est possible de ne pas utiliser un excès de phénanthroline, facilitant ainsi les étapes de purification.

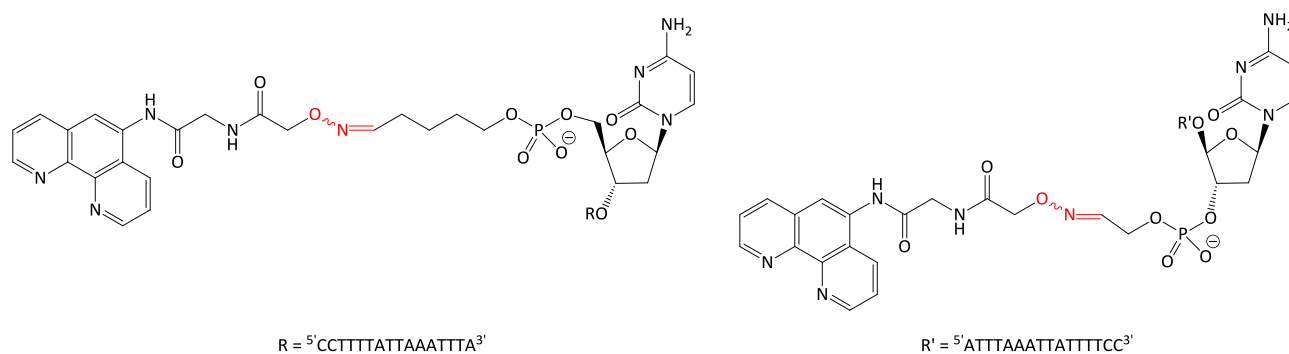


Figure 131 : Conjugués phénanthroline/oligonucléotides.⁴⁷⁴

La conjugaison peut également se faire à des composés fluorescents⁴⁷⁵ ou à un quencher de fluorescence.⁴⁴³

IV.2.b. Oligonucléotides conjugués à des peptides

Nous avons vu qu'en raison de leurs rôles dans de nombreux processus biologiques (hormones, anticorps, récepteurs, etc.), de leur grande perméabilité membranaire, de leur capacité à stabiliser le cargo, les peptides (peptides naturels dérivant de protéines virales, bactériales, de mammifères, etc. ou peptides synthétiques) sont largement utilisés dans la vectorisation d'oligonucléotides.⁴⁷⁶

La conjugaison d'oligonucléotides à des peptides peut être effectuée via une jonction oxime. Pour cela, un peptide fonctionnalisé par une oxyamine est traité avec un oligonucléotide contenant un aldéhyde et vice versa.⁴⁷⁷ Les conjugués sont ainsi obtenus avec de bons rendements et ce, sans

⁴⁷⁴ S. Deroo, E. Defrancq, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8379-8382.

⁴⁷⁵ E. Trévisiol, A. Renard, E. Defrancq, J. Lhomme, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 1427-1439.

⁴⁷⁶ E. Trévisiol, E. Defrancq, J. Lhomme, A. Laayoun, A. Hoang, F. Besème, P. Cros, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 979-980.

⁴⁷⁷ D. Forget, D. Boturyn, E. Defrancq, J. Lhomme, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3976-3984.

stratégie de protection et dans des conditions aqueuses douces (Figure 132). La liaison oxime peut même être utilisée pour conjuguer des oligonucléotides duplexes à des peptides. Pour cela, l'oligonucléotide est d'abord hybridé au brin complémentaire et le duplex est mis à réagir avec le peptide dans les mêmes conditions que le brin seul. La conjugaison ne perturbe pas la structure en duplex si bien que la stabilité du duplex est inchangée.⁴⁷⁷

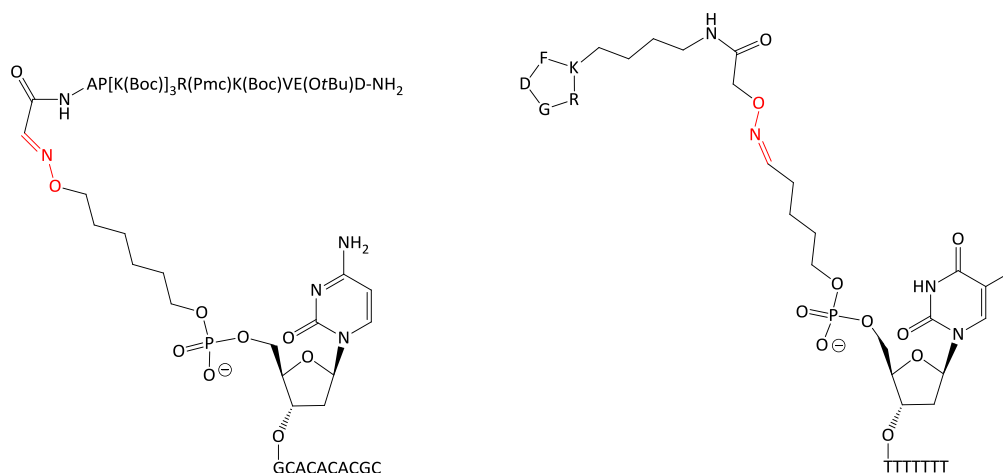
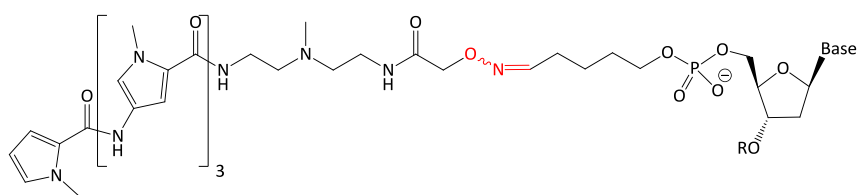


Figure 132 : Préparation de conjugués oligonucléotide/peptide.⁴⁷⁷

Le distamycine est un médicament anti-cancéreux bien connu. Il se lie spécifiquement à des séquences riches en A/T du petit sillon de l'ADN B. Des oligonucléotides ont ainsi été conjugués à des analogues du distamycine via une liaison oxime (Figure 133).⁴⁷⁸ Dans ces conjugués, le carbone terminal des analogues de distamycine est lié à l'extrémité 5' des oligonucléotides. L'hybridation de ce conjugué à la séquence cible convertit ce simple brin en un complexe double brin et génère une structure secondaire avec un grand et un petit sillon. Cette hybridation déclenche la fixation du distamycine ancrée à l'extrémité 5' de l'oligodésoxynucléotide dans la structure en petit sillon précédemment générée. Les conjugués avec le distamycine se fixent sélectivement à des oligonucléotides contenant une étendue continue de paires de bases A/T plutôt que ceux ayant des alternances de bases A/T. La combinaison d'une telle hybridation et fixation à la cible permet d'envisager une utilisation thérapeutique.



Base = G, R = 5'-CTTTTTTCG-3'
 ou Base = G, R = 5'-CATATATCG-3'
 ou Base = A, R = 5'-GCGCGCGCA-3'

Figure 133 : Oligonucléotides conjugués à un analogue de distamycine.⁴⁷⁸

L'équipe d'Oretskaya a généralement effectué la conjugaison d'oligonucléotides avec des peptides à partir d'oligonucléotides substitués en position 2' par des aldéhydes.⁴⁷⁹ Ils ont exploité un des grands avantages de la conjugaison en position 2' en conjuguant un ou plusieurs peptides à des

⁴⁷⁸ S. Ghosh, E. Defrancq, J. H. Lhomme, P. Dumy, S. Bhattacharya, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 520-529.

⁴⁷⁹ T. S. Zatsepin, D. A. Stetsenko, A. A. Arzumanov, E. A. Romanova, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 822-830.

endroits choisis de la chaîne oligonucléotidique. De plus, les extrémités 3' et 5' restent disponibles pour attacher d'autres molécules. Les conjugués oligonucléotides/peptides préparés ont généralement une affinité similaire ou supérieure pour l'ARN complémentaire cible que les oligonucléotides non modifiés et non conjugués correspondants. Par exemple, les 2'-O-méthyloligoribonucléotides conjugués une ou deux fois au peptide modèle laminine conservent leur capacité à se lier à leur cible ARN TAR et à inhiber la transcription *in vitro* du VIH-1 qui dépend du peptide Tat. Cette conjugaison est donc intéressante dans la conjugaison d'oligonucléotides antisens.

Les bisPNA sont des oligomères avec deux séquences d'acides nucléiques peptidiques identiques liées par un espaceur flexible en épingle à cheveux. Ces bisPNA sont capables de se lier spécifiquement à des séquences d'ADN sans altérer le surenroulement de l'ADN. Cela offre la possibilité d'attacher diverses entités fonctionnelles à un ADN de haut poids moléculaire. Il n'est cependant pas aisé de trouver des méthodes de synthèse pour fixer d'autres composés. Il a été montré que ces bisPNA peuvent être conjugués à des peptides via une liaison oxime.⁴⁸⁰

Les oligonucléotides peuvent également être conjugués à deux peptides avec un peptide pénétrant les cellules et un peptide ciblant les cellules.⁴⁶²

IV.2.c. Oligonucléotides conjugués à des carbohydrates

Les récepteurs à la surface de cellules (lectines) se lient spécifiquement et internalisent les glycoconjugués portant le résidu sucre adéquat. La conjugaison à des carbohydrates est donc une méthode de choix pour cibler spécifiquement des cellules ou tissus. La jonction oxime entre un carbohydrate et un oligonucléotide est une méthode efficace et rapide pour préparer un conjugué carbohydrate/oligonucléotide (Figure 134).⁴⁸¹ Ce type de composés peut servir à cibler des cellules hépatiques ou dendritiques via leurs récepteur asialoglycoprotéine ou mannose correspondant.

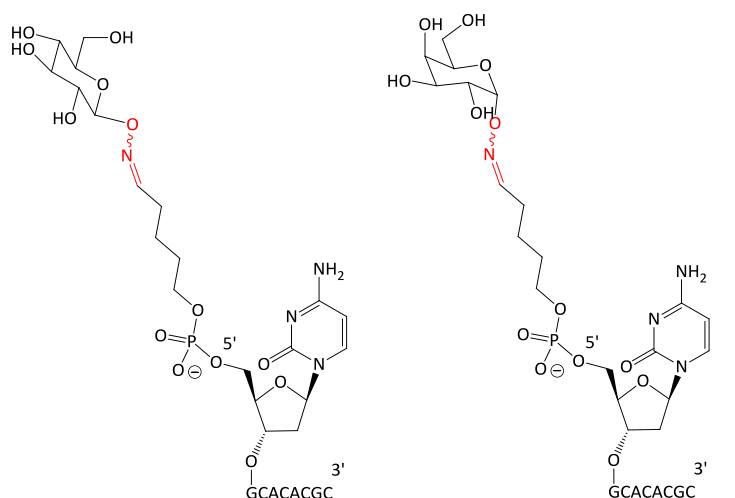


Figure 134 : Préparation d'oligonucléotides conjugués à des carbohydrates.⁴⁸¹

Les cyclodécapeptides de l'équipe de Pascal Dumy peuvent permettre la préparation de conjugués glycopeptides/oligonucléotides multitopiques (Figure 135).⁴⁸² La liaison oxime est alors exploitée pour construire des glycoconjugués tétramériques qui présente une augmentation

⁴⁸⁰ P. Neuner, P. Gallo, L. Orsatti, L. Fontana, P. Monaci, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 276-281.

⁴⁸¹ D. Forget, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7829-7832.

⁴⁸² Y. Singh, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362.

conjugués à des complexes métalliques. Des conjugués complexes de ruthénium/oligonucléotides liés par une liaison oxime peuvent être préparés (Figure 137).⁴⁴⁵ Cela nécessite le greffage d'une fonction *N*-oxyamine sur un ligand du complexe et d'une fonction aldéhyde sur l'oligonucléotide à conjuguer (ou inversement). Les conditions de formation du conjugué sont douces, ce qui est compatible avec la stabilité du complexe de ruthénium(II). Ce type de complexe a permis de développer une nouvelle génération de sondes photoréactives Ru/oligonucléotides contenant des guanines.⁴⁸⁴ Ces sondes ont un comportement photochimique unique et s'inhibent elles-mêmes en l'absence du brin d'acide nucléique complémentaire.

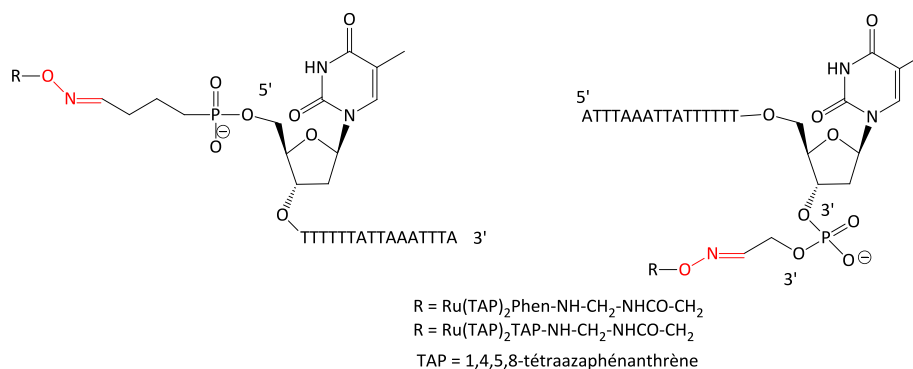


Figure 137 : Structures de conjugués oligonucléotides/complexes de Ru(II).⁴⁴⁵

V. CONCLUSION

Une grande famille de nucléosides comportant une liaison oxygène-azote est constituée par les nucléosides isoxazolidines. Dans la majorité des cas, ils sont préparés par cycloaddition 1,3-dipolaire entre une nitroène et la vinylnucléobase correspondante. Certains de ces composés ont montré des activités biologiques intéressantes. Des nucléosides comportant des fonctions oxime, *N*-oxyamine, hydroxylamine, acide hydroxamique, etc. ont également été développés et étudiés.

La liaison N-O peut également relier deux nucléosides pour former des dimères. Le lien le plus étudié est le lien méthylène(méthylimino) (MMI). Certains oligomères obtenus par incorporation de dimères MMI dans des séquences oligonucléotidiques montrent une bonne affinité pour leur cible et une bonne résistance aux nucléases. D'autres dimères liés par liaison N-O ont été étudiés. A ce titre, notre équipe a précédemment développé des dimères liés par liaison *N*-oxyamide.

Des oligonucléotides peuvent également contenir une liaison N-O. En particulier, l'introduction d'un nucléoside nitroxyde dans une séquence oligonucléotidique permet l'étude par un marquage de spin de cet acide nucléique. Les oligonucléotides peuvent aussi être fonctionnalisés par un groupe aminooxyle dans le but d'effectuer la conjugaison via une liaison oxime de l'oligonucléotide avec des peptides, des carbohydrates, des ligands fluorescents, etc.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de synthétiser et d'étudier les oligomères de nucléosides aminooxy acides (Figure 138) et les *N*-oxy PNAs (Figure 139). Ces deux familles de

⁴⁸⁴ S. Le Gac, S. Rickling, P. Gerbaux, E. Defrancq, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1122-1125.

composés comprennent la liaison *N*-oxyamide. En effet, ces liaisons présentent l'intérêt d'être stables vis-à-vis des hydrolyses enzymatiques et de pouvoir être fonctionnalisées.

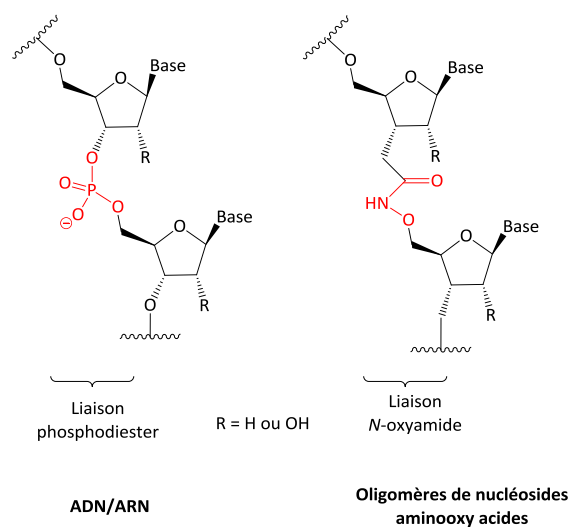


Figure 138 : Structures des oligomères de nucléosides aminoxy acides cibles ainsi que de l'ADN et l'ARN.

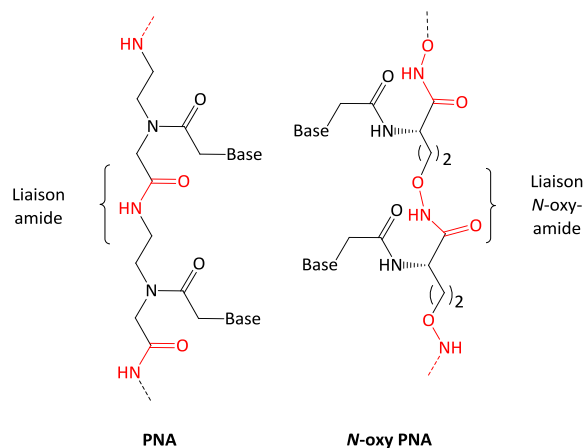


Figure 139 : Structures des *N*-oxy PNA cibles ainsi que du PNA d'origine.

Par ailleurs, un autre projet consiste à développer et à étudier des sondes chimiques qui, en ciblant le ribose de l'ARN, permettent la détermination de la structure secondaire de l'ARN.

CHAPITRE 3
VERS LA SYNTHÈSE D'OLIGOMÈRES DE NUCLEOSIDES AMINOXY
ACIDES VIA LA MODIFICATION DU NUCLEOSIDE

I. INTRODUCTION

En s'appariant spécifiquement et sélectivement à l'ADN ou à l'ARN, les oligonucléotides modifiés sont de potentiels agents thérapeutiques. Dans ces travaux de thèse, l'objectif est de créer une nouvelle génération d'oligonucléotides modifiés : les oligomères de nucléosides aminoxy acides (Figure 140). Dans ces composés, la liaison phosphodiester de l'ADN/ARN est remplacée par une liaison *N*-oxyamide -CONHO-. Cette modification peut permettre la formation de nouvelles liaisons hydrogène et laisse la possibilité de fonctionnaliser l'azote. Par ailleurs, la liaison *N*-oxyamide est stable vis-à-vis de l'hydrolyse chimique et enzymatique, ce qui est intéressant pour des applications thérapeutiques.

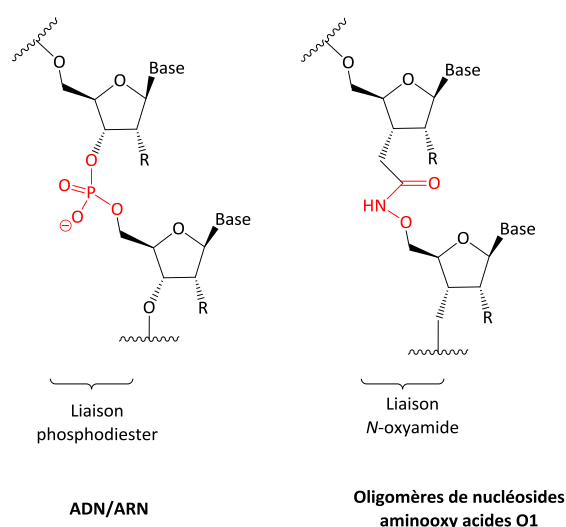


Figure 140 : Structures de l'ADN et de l'ARN (à gauche) ainsi que des oligomères de nucléosides aminoxy acides cibles (à droite). R = H ou OH.

Afin d'obtenir un bon appariement avec le brin d'acides nucléiques complémentaire, il est nécessaire de trouver un équilibre entre flexibilité et rigidité. Les oligonucléotides modifiés présentent 6 liaisons entre le carbone C_{3'} d'un nucléoside et le carbone C_{4'} du nucléoside suivant tandis que les oligonucléotides naturels présentent 5 liaisons entre le carbone C_{3'} d'un nucléoside et le carbone C_{4'} du nucléoside suivant. En raison de la conjugaison, la liaison *N*-oxyamide est plus rigide que la liaison phosphodiester. Cette rigidité compense la liaison supplémentaire si bien que l'on peut espérer de bonnes capacités d'appariement avec le brin d'acides nucléiques complémentaire.

Dans cette première partie de travaux de thèse, nous nous intéressons à la synthèse d'oligomères d'uridines aminoxy acides (série ARN), une ancienne doctorante du laboratoire ayant travaillé en série thymidine (série ADN).

II. APPROCHE RETROSYNTHETIQUE DES OLIGOMERES D'URIDINES AMINOXY ACIDES

Lors de la synthèse de peptides d'aminooxy acides, l'équipe de D. Yang forme la liaison *N*-oxyamide avec des conditions de couplage peptidique classiques : chlorhydrate de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide (EDC.HCl, Figure 141 à gauche) en présence de 1-

hydroxybenzotriazole (HOBT, Figure 141 au milieu)⁴⁸⁵ ou de 1-hydroxy-7-azabenzotriazole (HOAt, Figure 141 à droite).⁴⁸⁶

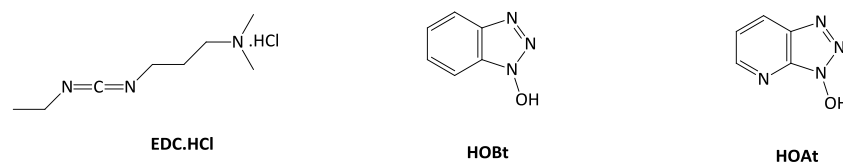


Figure 141 : Structure de EDC.HCl, de HOBT et de HOAt.

Par conséquent, afin de préparer des oligomères d'uridines aminoxy acides, il nous faut synthétiser le monomère uridine présentant une fonction aminoxy protégée et une fonction acide carboxylique protégée. Ce monomère peut être obtenu par modification du nucléoside commercial (Schéma 46). Tous les centres asymétriques du composé cible étant déjà présents dans le composé de départ, nous n'avons pas besoin de nous intéresser à la stéréosélectivité des réactions. Il faudra tout de même s'assurer qu'il n'y a pas d'épimérisation lors des étapes de synthèse.

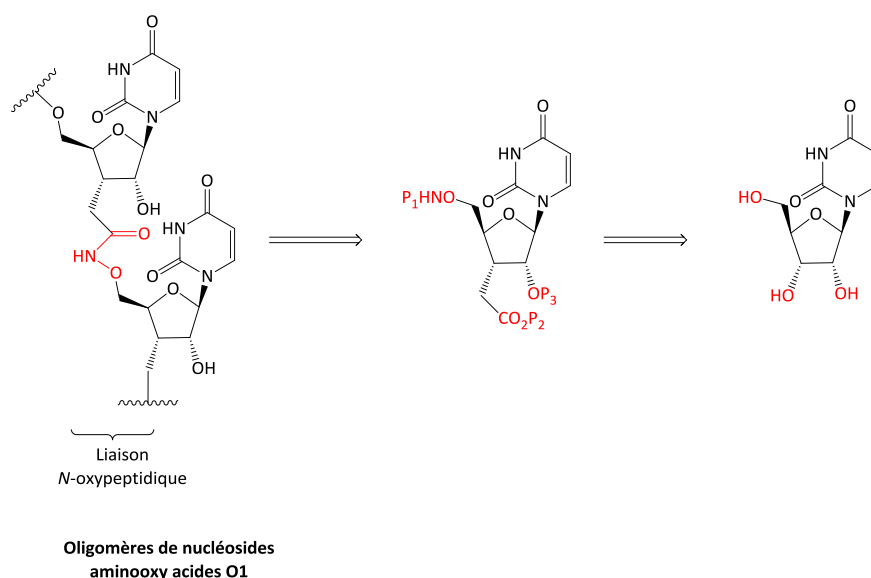


Schéma 46 : Préparation des oligomères de nucléosides aminoxy acides O1 à partir de l'uridine commerciale. P₁, P₂ et P₃ désignent des groupements protecteurs.

Il nous reste à choisir les groupements protecteurs P₁, P₂ et P₃ du monomère uridine aminoxy acide. Notre choix s'est porté sur un groupement *tert*-butoxycarbonyl (Boc) pour la fonction aminoxy, une fonction ester éthylique pour la fonction acide carboxylique et un groupement silylé pour l'hydroxyle en position 2' (Figure 142). Un « bon » choix de groupement silylé est le *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS ou TBS), bien plus résistant que le triméthylsilyle (TMS), mais bien moins onéreux et encombrant que le *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDPS) ou que le triisopropylsilyle (TIPS). La protection de l'acide carboxylique sous forme d'un ester éthylique permet d'introduire lors de la synthèse cet ester plutôt que l'acide carboxylique. La protection d'une amine primaire ou secondaire avec un groupement Boc est une méthode communément utilisée,⁴⁸⁷ entre autre en raison de sa facilité d'introduction et de déprotection. Par ailleurs, les conditions de déprotection

⁴⁸⁵ D. Yang, B. Li, F. F. Ng, Y. L. Yan, J. Qu, Y. D. Wu, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7303-7312.

⁴⁸⁶ D. Yang, X. W. Chang, D. W. Zhang, Z. F. Jiang, K. S. Song, Y. H. Zhang, N. Y. Zhu, L. H. Weng, M. Q. Chen, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4796-4805.

⁴⁸⁷ C. Agami, F. Couty, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2701-2724.

(milieu acide pour la fonction aminooxyle, milieu basique pour l'acide carboxylique, ions fluorures pour l'hydroxyle en position 2') de ces 3 groupements sont orthogonales (Figure 142).

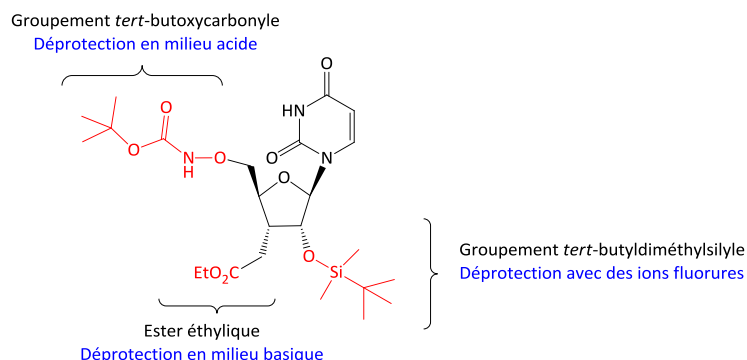


Figure 142 : Choix des groupements protecteurs. Les conditions de déprotection des fonctions clefs sont indiquées en bleu.

La préparation de certains composés *N*-oxyamines à partir de dérivés bromés ou de composés mésylés a été rapportée dans la littérature.^{488,489} La liaison N-O peut ainsi être introduite par substitution nucléophile entre le *N*-Boc-hydroxylamine et un composé avec un bon groupe partant en position 5'. Cela nous conduit donc à nous intéresser à la formation du composé bromé en position 5' **U7**. Ce composé peut être préparé par bromation de l'alcool **U6** correspondant. Ce dernier est obtenu par déprotection, hydrogénation et réaction de Wittig de la cétone **U4**. Cette cétone est préparée à partir de l'uridine commerciale grâce à une protection sélective et une oxydation (Schéma 47). On notera que l'uridine présente une fonction alcool primaire en position 5' ainsi que deux fonctions alcools secondaires en position 2' et 3'. Nous savons que la fonction primaire peut être différenciée des deux fonctions secondaires en contrôlant précisément les conditions (typiquement, nous pourrons jouer sur le nombre d'équivalents de réactifs, le temps de réaction ou encore la température). Par contre, les fonctions alcools en position 2' et 3' sont beaucoup plus délicates à faire réagir sélectivement et détermineront la stratégie à utiliser. Il faudra également porter attention à la réactivité de la base nucléique.

⁴⁸⁸ F. Liu, J. Thomas, J. Burke, *Synthesis* **2008**, 15, 2432-2438.

⁴⁸⁹ A. M. Bondia, N. Larcher, L. Garrelly, J. C. Rossi, R. Pascal, *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 3330-3333.

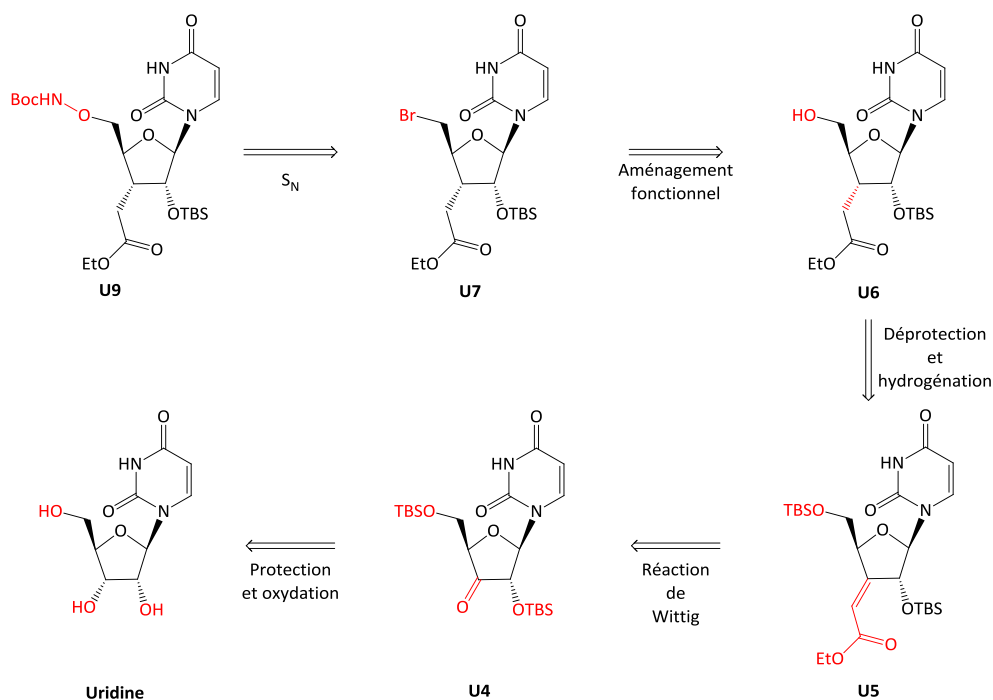


Schéma 47 : Schéma rétrosynthétique du monomère uridine aminoxy acide protégé via la modification du nucléoside.

La seule étape qui devra être stéréosélective est l'étape de réduction de la double liaison carbone/carbone. Par ailleurs, en particulier en milieu basique, il faudra faire attention au risque d'épimérisation.

III. VERS LA SYNTHÈSE DES OLIGOMÈRES D'URIDINES AMINOXY ACIDES

III.1. Synthèse et déprotection du Boc-aminoxy ester U9

III.1.a. Synthèse du Boc-aminoxy ester U9

III.1.a.i. Préparation du composé bromé U7

Il nous faut d'abord préparer le composé bromé **U7**. La voie envisagée (Schéma 47) s'appuie sur la préparation de l'uridine di-silylée en positions 2' et 5'. Dans ses travaux de thèse,⁴⁹⁰ M. Chemama a synthétisé avec un rendement de 53% le 2',5'-di-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)adénosine à partir de l'adénosine en utilisant 2 équivalents de chlorure de *tert*-butyldiméthylsilane (TBSCl) et de nitrate d'argent (AgNO₃) et en laissant agiter à température ambiante pendant 24 heures. En adaptant ce protocole à l'uridine, nous obtenons un mélange de produits tri-substitué, di-substitué en 2' et 5' et di-substitué en 3' et 5' (séparables par chromatographie sur colonne). Cela met en lumière la nécessité de contrôler la sélectivité de cette réaction. M. Chemama avait déjà expliqué ce faible rendement par l'obtention du composé di-silylé en position 2' et 5' (34%) et le produit tri-substitué (7%). Nous décidons alors d'utiliser 3 équivalents de TBSCl et d'AgNO₃ et de diminuer la durée de réaction (1 heure à température ambiante). Cette durée correspond au meilleur compromis

⁴⁹⁰ M. Chemama, *Synthèse d'analogues d'aminocyl-ARN_t pour l'étude et l'inhibition d'une transférase de type Fem*, Paris : Université Pierre et Marie Curie, **2009**, 320 p.

entre consommation de l'uridine et formation minimale de produit tri-substitué. Un tel protocole nous permet d'obtenir le produit désiré **U1** avec un rendement de 81%, le reste étant converti en produit di-substitué en 3' et 5' **U2** (5%) et en produit tri-substitué **U3** (9%) (Schéma 48). Ce résultat est meilleur que celui décrit dans des travaux de 2007 dans lesquels la réaction de l'uridine avec 2,05 équivalents de TBSCl, 2,05 équivalents d'AgNO₃ et 5 équivalents de pyridine dans le THF pendant une nuit à TA fournit le composé **U1** avec un rendement de 62%.⁴⁹¹

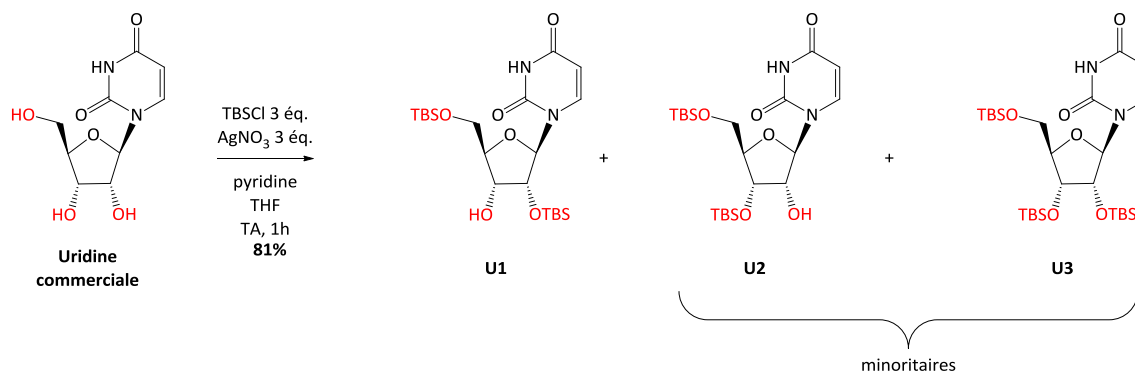


Schéma 48 : Préparation du 2',5'-di-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)uridine **U1**.

Le composé **U2** pourrait aussi être intéressant par la suite pour faire varier la synthèse qui va suivre. Une modification des conditions s'avèrerait toutefois nécessaire pour l'obtenir avec un meilleur rendement.

Pour l'oxydation, notre choix s'est porté sur l'utilisation du tétraméthylpipéridinenitrosyle (TEMPO, Figure 143 à gauche) qui est l'un des radicaux connus les plus stables.⁴⁹² Cette oxydation se fait en milieu biphasique et utilise du TEMPO en quantité catalytique, de l'hypochlorite de sodium en quantité stœchiométrique et du bromure de potassium en quantité catalytique. NaOCl oxyde le TEMPO pour former le véritable oxydant : l'ion nitrosonium (Figure 143 au milieu). KBr, en échangeant le contre ion Cl⁻ du nitrosonium par un Br⁻, permet de rendre l'ion nitrosonium plus soluble en phase organique. Dans la phase organique, l'alcool à oxyder (nucléophile) s'additionne sur la double liaison N⁺=O de l'ion nitrosonium. Le composé carbonylé est obtenu après une élimination β. Cette élimination libère également l'hydroxylamine dérivée du TEMPO (Figure 143 à droite) qui est réoxydée par NaOCl.

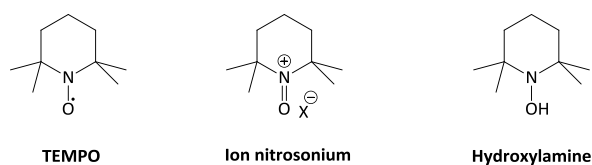


Figure 143 : Structure du TEMPO (à gauche), de l'ion nitrosonium (X = Cl⁻ ou Br⁻) (au milieu) et de l'hydroxylamine libérée en fin de réaction (à droite).

Cette réaction est totale et fournit en 2 heures le produit désiré **U4** avec un excellent rendement de 92% (Schéma 49). Nous avons ici utilisé le TEMPO en quantité stœchiométrique mais

⁴⁹¹ J. Razkin, H. Nilsson, L. Baltzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14752-14758.

⁴⁹² P. L. Anelli, C. Biffi, F. Montanari, S. Quici, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2559-2562.

une quantité catalytique aurait suffi. Cette réaction est beaucoup plus propre que les oxydations classiques utilisant CrO_3 /pyridine/anhydride acétique ou DMSO/anhydride acétique.⁴⁹³

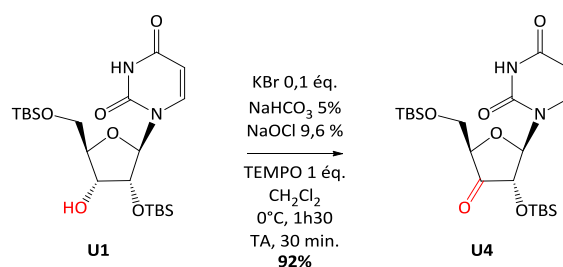


Schéma 49 : Préparation du 3'-oxo-2',5'-di-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)uridine **U4**.

L'étape suivante est une réaction de Wittig. La préparation du phosphorane **I1** nécessaire se fait à partir de la triphénylphosphine et du bromoacétate d'éthyle commerciaux avec un bon rendement (Schéma 50).⁴⁹⁴

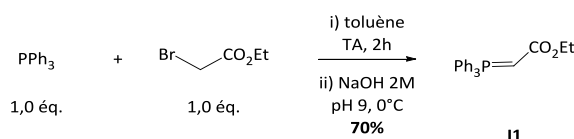


Schéma 50 : Préparation du phosphorane **I1**.

La cétone **U4** est ensuite engagée dans une réaction de Wittig avec le phosphorane **I1**. N'étant pas certain de sa pureté, le phosphorane **I1** préalablement synthétisé est utilisé en léger excès. La réaction est incomplète au bout d'une nuit et nécessite 24 heures supplémentaires pour atteindre une conversion de 100%. Une huile transparente est obtenue avec un bon rendement de 77% (Schéma 51). L'étape suivante étant l'hydrogénation de la double liaison $\text{C}=\text{C}$ formée, il est inutile de s'intéresser à la stéréochimie de la double liaison formée.

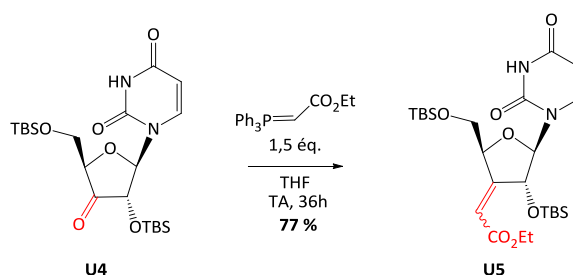


Schéma 51 : Préparation du 3'-désoxy-3'-(éthoxycarbonylméthylène)-2',5'-di-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)uridine **U5**.

La suite de la synthèse consiste à hydrogéner stéréosélectivement la double liaison $\text{C}=\text{C}$ du composé **U5**. Felpin et Fouquet⁴⁹⁵ ont rapporté la préparation *in situ* d'un catalyseur actif de Pd^0/C à partir de l'acétate de palladium et de palladium sur charbon dans le méthanol sous une atmosphère de dihydrogène. Ils mettent en avant les conditions de réaction douces, le peu de palladium nécessaire et le fait que cette méthode peut se substituer au Pd/C activé commercial utilisé habituellement. Nous avons donc dans un premier temps adapté ce protocole. Pour cela, à une solution de **U5** dans du MeOH est ajoutée une pointe de spatule d'acétate de palladium et de

⁴⁹³ F. Hansske, D. Madej, M. J. Robins, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 125-135.

⁴⁹⁴ R. W. Lang, H. J. Hansen, *Org. Synth.* **1990**, *7*, 232-236.

⁴⁹⁵ F. X. Felpin, E. Fouquet, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12440-12445.

palladium sur charbon. Le milieu est soumis à un léger flux de dihydrogène (ballon, 1 atmosphère) pendant 36 heures. La réaction demeure incomplète même en ajoutant du Pd⁰/C. Etant donné que cette réaction semble bloquée, nous appliquons un protocole utilisant 0,05 équivalent de Pd/C activé ainsi qu'une quantité faible d'acide acétique (1% en volume). La réaction est complète après 12 heures d'agitation à TA et forme un produit plus polaire que le produit formé sans acide acétique. L'analyse de ce produit montre que le groupement TBS en position 5' a été déprotégé par l'acide acétique. Cette déprotection permet de gagner une étape. Le produit **U6** est obtenu avec un très bon rendement de 79% (Schéma 52).

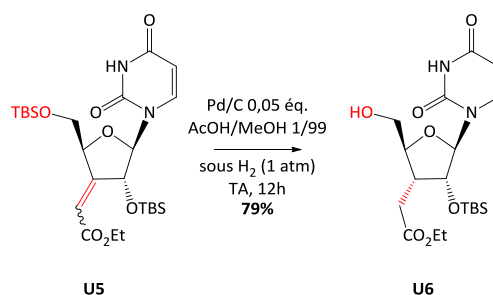


Schéma 52 : Préparation du 3'-désoxy-3'-(éthoxycarbonylméthyl)-2'-O-(*tert*-butyldiméthylsilyl)uridine **U6**.

Nous ne nous sommes pour l'instant pas assurés de la stéréochimie du composé obtenu. Nous savons que les hydrogénations se font préférentiellement sur la face de l'alcène la moins encombrée. Afin de déterminer la face préférentielle d'approche, nous calculons par DFT (théorie de la fonctionnelle densité) dans la base 6-31G(d,p) la conformation stable de l'alcène (Figure 144). Nous choisissons d'effectuer cette modélisation sur le composé **U5** déprotégé en position 5' car la déprotection en milieu acide d'un alcool silylé primaire est très rapide. La stéréochimie de la double liaison est choisie arbitrairement. Grâce au décalage de la base uracile et à cause de l'encombrement de face inférieure par le groupement *tert*-butyldiméthylsilyle en position 2', la face supérieure est la face moins encombrée. On peut donc s'attendre à ce que l'hydrogénation se fasse sur la face supérieure. Il nous reste à vérifier expérimentalement cette prédiction. La configuration du carbone asymétrique nouvellement formé pourrait être vérifiée par un spectre 2D NOESY. Cela sera rendue inutile par une réaction détaillée plus loin.

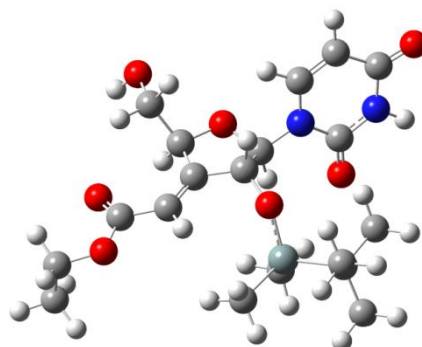


Figure 144 : Conformation obtenue pour l'ester α,β -insaturé par calcul DFT dans la base 6-31G(d,p) avec le logiciel Gaussian 09.

Il faut maintenant transformer l'hydroxyle en un bromure qui est un bon groupe partant. Verheyden et Moffatt⁴⁹⁶ ont rapporté le remplacement de la fonction hydroxyle en position 5' du

⁴⁹⁶ J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt, *J. Org. Chem.* **1972**, *87*, 2289-2299.

2',3'-*O*-isopropylidèneuridine par des groupements chloro, bromo ou iodo en utilisant du PPh₃ et du CCl₄ ou CBr₄ ou Cl₄ dans du DMF à température ambiante. L'adaptation de ce protocole nous a conduit à ajouter, à une solution de **U6** dans du DMF, 2 équivalents de PPh₃ et de CBr₄. Après agitation pendant une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est devenu orange. On observe l'apparition d'une tâche moins polaire mais il reste toujours du produit de départ. Une agitation de 24 heures supplémentaires ne permet pas de consommer davantage le produit de départ. En chauffant à 90°C pendant 6 h, le réactif de départ ainsi que le produit précédemment formé sont totalement convertis en un unique produit plus polaire. L'analyse du produit formé nous permet d'identifier la lactone **U8** (Schéma 53). Le produit attendu **U7** n'est pas obtenu.

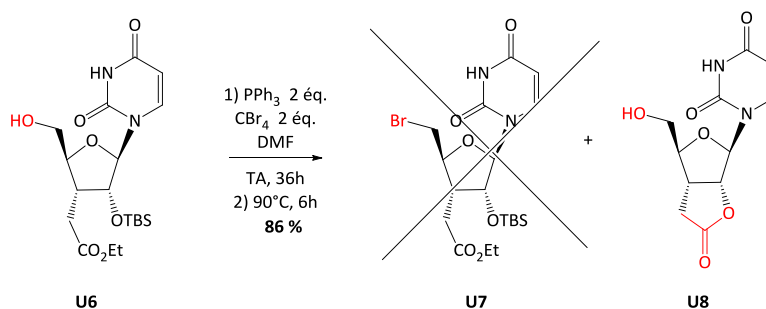


Schéma 53 : Obtention de la lactone **U8** à la place du dérivé bromé **U7**.

Cette lactone est connue dans la littérature⁴⁹⁷ où elle est obtenue par la déprotection suivante (Schéma 54). On peut noter qu'elle peut réagir avec des 5'-amino-5'-désoxynucléotides grâce à une catalyse avec la 2-hydroxypyridine pour donner des dinucléosides liés par liaison amide.⁴⁹⁸

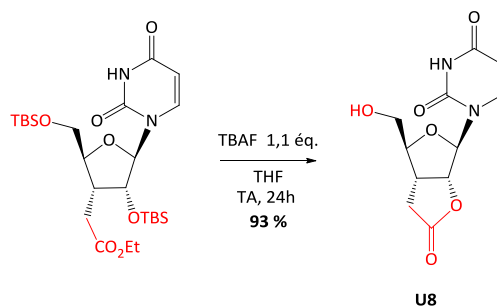


Schéma 54 : Préparation du 3'-(carboxyméthyl)-3'-désoxyuridine-2',3'-lactone **U8** selon Peterson *et al.*⁴⁹⁷

Il est intéressant de noter que cette réaction nous a, contre toute attente, permis de vérifier la configuration absolue du carbone C_{3'} du composé **U6**. Par ailleurs, la réaction de cette lactone avec 1,5 équivalent de PPh₃ et 1,5 équivalent de CBr₄ donne, de façon incomplète, le produit bromé en position 5'. Des ajouts supplémentaires de PPh₃ et de CBr₄ ainsi qu'un chauffage à 50°C ne permettent pas de faire avancer davantage cette réaction.

Confrontés à des réactions incomplètes, nous nous sommes tournés vers le protocole rapporté par Hanessian *et al.*⁴⁹⁹ Ce protocole permet une halogénéation efficace de l'alcool par traitement avec de la triphénylphosphine (3,5 équivalents) et du *N*-bromosuccinimide NBS (2,5

⁴⁹⁷ M. A. Peterson, B. L. Nilsson, S. Sarker, B. Doboszewski, W. Zhang, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8183-8192.

⁴⁹⁸ M. J. Robins, S. Sarker, M. Xie, W. Zhang, M. A. Peterson, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3921-3924.

⁴⁹⁹ S. Hanessian, M. M. Ponpipom, P. Lavalée, *Carbohydr. Res.* **1972**, *24*, 45-56.

équivalents). Ces conditions permettent, après un chauffage à 50°C pendant une nuit, d'obtenir le composé bromé avec un rendement de 40% (Schéma 55).

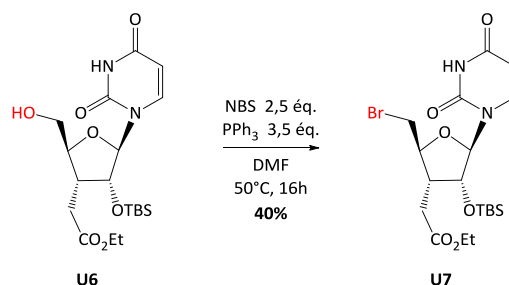


Schéma 55 : Préparation du 5'-bromo-3',5'-didésoxy-3'-(éthoxycarbonylméthyl)-2'-O-(*tert*-butyldiméthylsilyl)uridine **U7**.

Le faible rendement observé s'explique par la formation d'un sous-produit plus polaire que le produit désiré. Le spectre RMN ^1H de ce composé montre qu'il provient de la bromation de la base. En effet, la littérature⁵⁰⁰ fait état de la formation du composé bromé en position 5 de la base uracile lors de réactions avec le *N*-bromosuccinimide (Schéma 56).

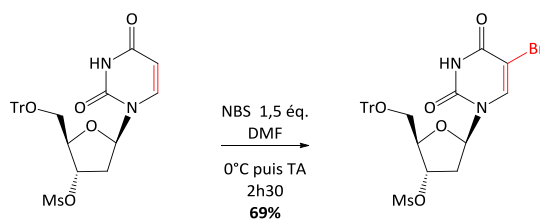


Schéma 56 : Bromation en position 5 de la base uracile.⁵⁰⁰

III.2.a.ii. Introduction de la liaison N-O par substitution nucléophile

Le composé bromé étant obtenu, nous nous intéressons maintenant à la substitution nucléophile par le *N*-Boc-hydroxylamine selon un protocole adapté des travaux de Burke et *al.*⁴⁸⁸ La réaction du dérivé bromé **U7** avec le *N*-Boc-hydroxylamine (2,5 équivalents) en présence de 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU, base non nucléophile, 5 équivalents) conduit, après une nuit d'agitation à TA, au composé **U9** attendu. Cependant, la réaction est très incomplète et le rendement n'excède pas 14% (Schéma 57).

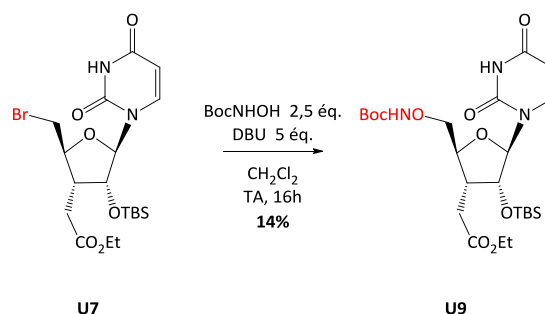


Schéma 57 : Obtention du composé **U9** par substitution nucléophile sur le composé bromé **U7**.

Afin d'augmenter le rendement, nous choisissons de travailler avec le composé iodé **U10**. En effet, l'ion iodure est un meilleur nucléofuge que l'ion bromure en raison de sa plus grande polarisabilité. Le composé iodé **U10** est obtenu avec un rendement de 73% selon le même protocole

⁵⁰⁰ N. C. Srivastav, N. Shakya, M. Mak, B. Agrawal, D. L. Tyrrell, R. Kumar, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7156-7166.

que pour **U7** (Schéma 58). Le *N*-iodosuccinimide est précédemment recristallisé dans le système dioxane/ CCl_4 . Il se forme également un peu de sous-produit dû à l'iodation en position 5 de la base uracile. Le rendement obtenu (73%) est similaire à celui obtenu par l'équipe de Peterson utilisant PPh_3 et I_2 dans la pyridine.⁴⁹⁷

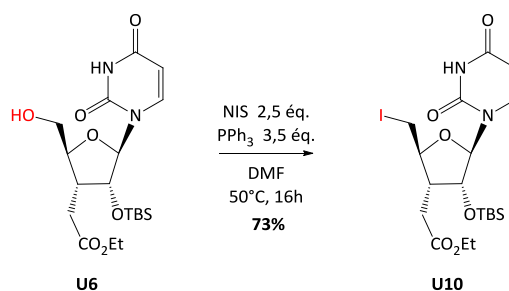


Schéma 58 : Préparation du 3',5'-didésoxy-3'-(éthoxycarbonylméthyl)-5'-iodo-2'-*O*-(*tert*-butylidiméthylsilyl)uridine **U10**.

Ce composé iodé est ensuite engagé dans la réaction de substitution nucléophile avec BocNHOH . Dans ce cas, la réaction est quasi complète après une nuit à TA et le produit est obtenu avec un rendement de 51% (Schéma 59). Cela est cohérent avec la meilleure nucléofugacité de l'ion iodure.

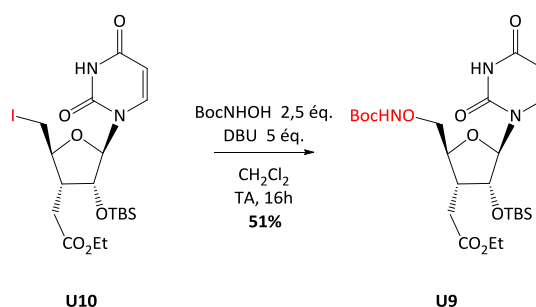
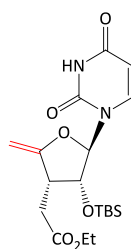


Schéma 59 : Obtention du composé **U9** par substitution nucléophile sur le composé iodé **U10**.

Ce rendement moyen s'explique par la formation du composé d'élimination **U11** avec un rendement de 17% (Figure 145). Nous avons alors cherché à modifier les conditions opératoires dans le but de minimiser l'élimination. Ainsi, la réaction du dérivé iodé **U10** avec 2,5 équivalents de BocNHOH et 1,5 équivalent de DBU pendant 5 heures à TA mène à un brut réactionnel contenant du réactif de départ, le produit désiré et le produit d'élimination. Les proportions de ces 3 composés, déterminées grâce aux intégrations du spectre RMN ^1H du brut réactionnel sont de 9% de réactif de départ, 56% du produit attendu et 35% du produit d'élimination. La diminution du nombre d'équivalent de base et de la température ne permet donc pas d'améliorer le rendement de la substitution nucléophile. Nous avons alors fait l'hypothèse que l'élimination se produit lors de la concentration du milieu réactionnel. Cela nous a amené à changer le mode opératoire : pas de concentration du milieu réactionnel avant le traitement, concentration sous vide sans chauffage après traitement. Malheureusement, aucune amélioration n'a été constatée. Par ailleurs, remplacer la DBU par la *N,N*-diisopropyléthylamine DIPEA (base encombrée) ou le dichlorométhane par le DMF ne permet pas d'améliorer le rendement de cette réaction de substitution nucléophile.



U11

Figure 145 : Sous-produit U11 obtenu par élimination.

III.1.b. Déprotection de la fonction *N*-oxyamine et de la fonction ester de U9

III.1.b.i. Déprotection de la fonction *N*-oxyamine de U9

Afin d'être utilisée ultérieurement dans des réactions de couplage, la fonction aminooxyle du composé U9 doit être déprotégée. La déprotection d'une amine ou d'une *N*-oxyamine protégée par un groupe Boc se fait en milieu acide de manière irréversible (libération de CO₂ et protonation de l'azote). Ces déprotections sont usuellement décrites avec de très bons rendements.⁵⁰¹

La déprotection de cette fonction en milieu acide nécessite de porter attention au groupement TBS en position 2' (censé être plus résistant). Nous choisissons donc d'effectuer la réaction à 0°C avec une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique TFA et de la suivre par CCM (Schéma 60). Les différents essais effectués sont regroupés dans le Tableau 6. Cette réaction est difficile à suivre par CCM (produit traînant sur la plaque et révélation à la ninhydrine non concluante). L'utilisation de TFA en solution aqueuse 1/1 en volume ne permet pas la déprotection sélective de la fonction *N*-oxyamine.

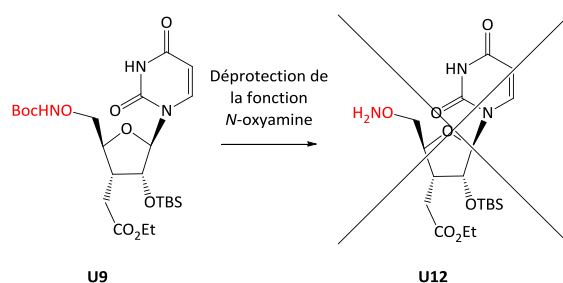


Schéma 60 : Déprotection de la fonction aminooxyle du composé U9.

	TFA	Conditions	Résultats
Entrée 1	29 éq.	Eau, 15 min. à 0°C	produit de départ majoritaire
Entrée 2	29 éq.	Eau, 1 heure à 0°C	produit de départ majoritaire
Entrée 3	58 éq.	Eau, 1h30 à 0°C puis 30 min. à TA	produit de départ majoritaire

Tableau 6 : Essais de déprotection de la fonction *N*-oxyamine du composé U9 avec des solutions aqueuses de TFA.

Nous essayons alors d'autres solutions acides en solvant organique. Une solution de TFA à 10% dans le dichlorométhane ne permet pas de déprotéger la fonction *N*-oxyamine. L'utilisation d'acide sulfurique à 10% dans le dioxane conduit en 15 minutes à TA à la perte de la base nucléique et l'utilisation de chlorure d'acétyle à 10% dans l'éthanol mène à une dégradation du composé.

⁵⁰¹ L. S. Lin, T. Lanza Jr, S. E. de Laszlo, Q. Truong, T. Kamenecka, W. K. Hagmann, *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 7013-7016.

L'acide de Lewis $ZnBr_2$ dans le dichlorométhane peut permettre de déprotéger une amine protégée avec un Boc.⁵⁰² Ainsi, nous avons mis à réagir le composé **U9** avec 2,7 équivalents de $ZnBr_2$ dans le dichlorométhane pendant 1h30 à TA mais cela aboutit de nouveau à une dégradation.

En conclusion, ces différents essais pour obtenir l'oxyamine **U12** ont échoué.

III.1.b.ii. Déprotection de la fonction ester de **U9**

Afin d'être utilisée ultérieurement dans des réactions de couplage, la fonction acide carboxylique doit être déprotégée. Cette déprotection se fait classiquement avec des conditions basiques. Une telle réaction a été décrite sur des structures très proches (Schéma 61).⁴⁹⁷ Ces saponifications peuvent aussi se faire avec de la lithine $LiOH$.⁵⁰³

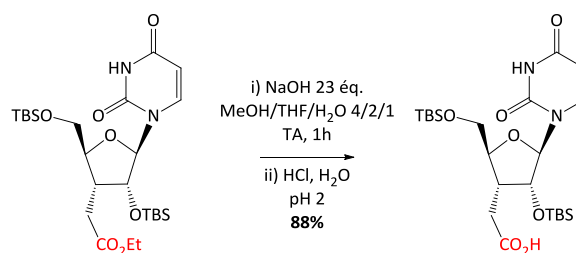


Schéma 61 : Saponification d'un ester éthylique.⁴⁹⁷

Nous avons donc testé ces conditions basiques sur le composé **U9**. La réaction est d'abord menée dans du méthanol avec 2 équivalents d'hydroxyde de lithium à TA. La réaction n'ayant pas avancé après 3 jours, des ajouts supplémentaires de $LiOH$ ont été effectués (2 équivalents puis 1 équivalent). Cela n'a pas permis d'obtenir l'acide carboxylique correspondant. Nous avons alors utilisé la lithine en excès dans des systèmes de solvant eau/dioxane ou encore eau/THF mais sans succès. Nous ne notons qu'une dégradation du produit de départ et l'acide carboxylique **U13** n'est pas obtenu (Schéma 62).

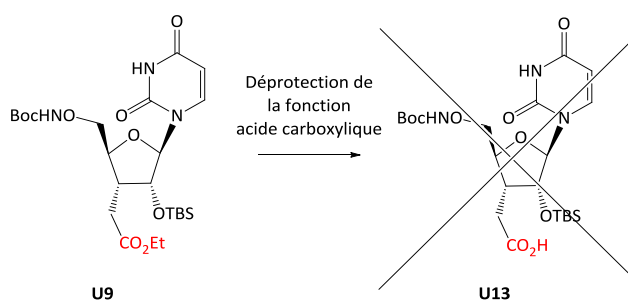


Schéma 62 : Déprotection de la fonction acide carboxylique du composé **U9**.

II.1.b.iii. Conclusions des essais de déprotection de **U9**

Le groupement Boc est susceptible de créer des réactions secondaires très diverses.⁴⁸⁷ En particulier, il réagit de manière intramoléculaire avec des nucléophiles et des électrophiles. Nous avons donc préféré arrêter nos essais de saponification et ne pas essayer d'autres conditions opératoires (comme l'utilisation d'iodure de méthyle en présence de carbonate de potassium,⁵⁰⁴

⁵⁰² R. M. Williams, J. Cao, H. Tsujishima, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 2540-2544.

⁵⁰³ S. Cantel, S. Desgranges, J. Martinez, J. A. Fehrentz, *J. Peptide Sci.* **2004**, 10, 326-328.

⁵⁰⁴ Y. Otani, T. Hori, M. Kawahata, K. Yamaguchi, T. Ohwada, *Tetrahedron* **2012**, 68, 4418-4428.

d'iodure de lithium en présence de pyridine,⁵⁰⁵ d'un milieu non aqueux⁵⁰⁶ ou encore de triméthylsilanolate de potassium^{507,508}). Nous avons également arrêté les essais de déprotection de la fonction *N*-oxyamine et avons préféré changer de groupement protecteur.

III.2. Choix d'un autre groupement protecteur

Suite aux échecs rencontrés lors des essais de déprotection de la fonction *N*-oxyamine et de la fonction acide carboxylique du composé **U9**, nous avons choisi de nous tourner vers un autre groupement protecteur pour la fonction aminoxyyle. En raison de sa facilité d'introduction via une réaction de Mitsunobu, notre choix s'est porté sur le groupe phthaloyle.

III.2.a. Synthèse et déprotection du phthalimidooxy ester **U14**

III.2.a.i. Synthèse du phthalimidooxy ester **U14**

Nous voulons préparer le phthalimidooxy ester **U14**. Pour cela, il est possible d'introduire la liaison N-O via une réaction de Mitsunobu avec le *N*-hydroxyphthalimide. La réaction de **U6** avec 1,3 équivalent de *N*-hydroxyphthalimide, 1,3 équivalent de triphénylphosphine et 1,5 équivalent d'azodicarboxylate de diisopropyle DIAD (Figure 146 à gauche) dans le THF ne mène à la formation d'aucun produit (Schéma 63). Des précédents travaux du laboratoire ont montré l'importance d'ajouter le DIAD lentement et à froid.³⁹⁶ Un ajout lent et dilué du DIAD à froid, un changement de solvant ou un long temps de réaction (Tableau 7) ne permettent pas non plus d'observer une réaction. Pourtant, on observe, lors de chaque essai, une couleur orange brune intense révélant la formation d'un intermédiaire (probablement PhthNO⁻).

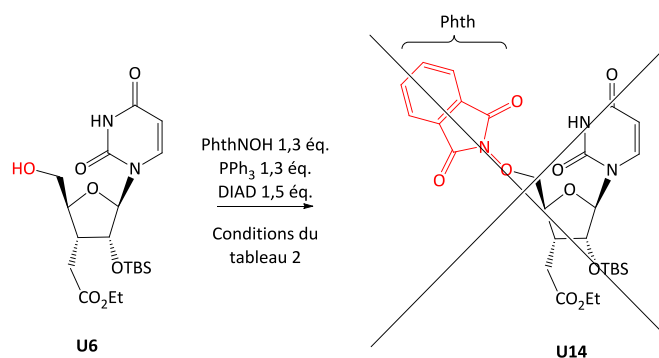


Schéma 63 : Réactions de Mitsunobu sur l'hydroxyle en position 5' de **U6**.

⁵⁰⁵ T. Kamiya, M. Hashimoto, O. Nakaguchi, T. Oku, *Tetrahedron* **1979**, *35*, 323-328.

⁵⁰⁶ V. Theodorou, K. Skobridis, A. G. Tzakos, V. Ragoussis, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8230-8233.

⁵⁰⁷ E. D. Laganis, B. L. Chenard, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5831-5834.

⁵⁰⁸ E. Minta, C. Boutonnet, N. Boutard, J. Martinez, V. Rolland, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1795-1797.

	Solvant	Conditions opératoires	Résultats	Observations
Entrée 1	THF	ajout dilué et lent du DIAD à 0°C après 3 jours : ajout supplémentaire de 1,5 éq. de DIAD et de DMF	produit de départ	couleur rouge brune observée au moment de l'ajout de DIAD à 0°C
Entrée 2	toluène	ajout lent et dilué d'une solution de DIAD à 40% dans le toluène à 0°C		
Entrée 3	THF	réaction en plus grande quantité pour permettre un ajout très lent et dilué du DIAD à 0°C		
Entrée 4	DMF	ajout lent et dilué du DIAD à 0°C		

Tableau 7 : Récapitulatif des différents essais de réaction de Mitsunobu sur le composé **U6**. Pour chaque entrée, la réaction est agitée au moins 3 jours à TA.

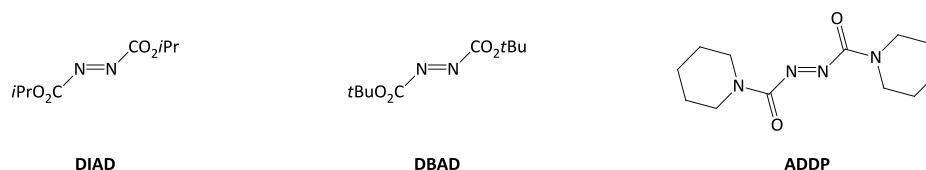


Figure 146 : Structure de l'azodicarboxylate de diisopropyle (DIAD, à gauche), de l'azodicarboxylate di-*tert*-butyle (DBAD, au milieu) et du 1,1'-(azodicarbonyl)dipipéridine (ADDP à droite).

Il était alors intéressant de se tourner vers le azodicarboxylate de di-*tert*-butyle (DBAD, Figure 146 au milieu)^{339,509}. Malheureusement, aucune réaction n'est observée avec le DBAD. Même avec des conditions plus dures (2 équivalents de PPh₃ et de PhthNOH, 3 équivalents de DBAD ajoutés à froid suivi d'un chauffage à 80°C durant une nuit ou utilisation de la tributylphosphine PBU₃), seul le produit de départ est obtenu.

Une dernière tentative a été l'utilisation de PBU₃ associé au 1,1'-(azodicarbonyl)dipipéridine (ADDP, Figure 146 à droite) comme cela été rapporté par D'Onofrio et *al.*⁵¹⁰ Encore une fois, seul le produit de départ a été obtenu.

Afin de comprendre l'absence de réaction du composé **U6**, des calculs de modélisation moléculaire ont été effectués (Figure 147). Les réactions de Mitsunobu étant fortement sensibles à l'encombrement stérique, il s'agit en particulier de s'assurer que l'hydroxyle en position 5' est disponible. Sur la conformation obtenue pour l'alcool **U6**, l'hydroxyle en position 5' est dégagé et on ne voit aucune gêne stérique majeure. Nous ne savons donc pas expliquer la non-réactivité de **U6**.

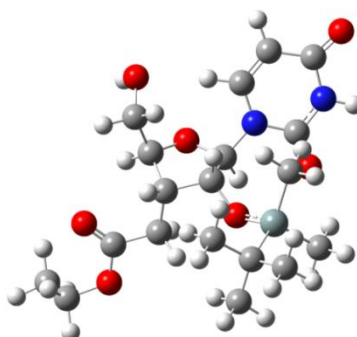


Figure 147 : Conformation stable en phase gaz obtenue par calcul DFT (B3LYP/6-31G(d,p)) pour l'alcool **U6**. La même conformation est obtenue lors d'une simulation dans le THF et le toluène (modèle IEFPCM).

⁵⁰⁹ M. Kiankarimi, R. Lowe, J. R. McCarthy, J. P. Whitten, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4497-4500.

⁵¹⁰ J. D'Onofrio, L. De Napoli, G. Di Fabio, D. Montesarchio, *Synlett* **2006**, 845-848.

Le groupement phthaloyle peut aussi être incorporé par une réaction de substitution nucléophile (Schéma 64).^{511,512}

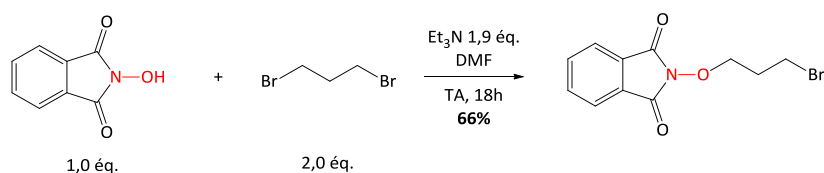


Schéma 64 : Réaction de substitution nucléophile avec le *N*-hydroxyphthalimide.⁵¹¹

Nous mettons donc à réagir le composé iodé **U10** avec 2,1 équivalents de *N*-hydroxyphthalimide et 2 équivalents de triéthylamine dans le DMF (solvant polaire aprotique, favorisant les S_N2). On constate l'apparition d'une couleur rouge brune révélant la présence de l'anion PhthNO^- . Après une nuit à TA, un nouveau produit se forme mais la conversion est incomplète. Des ajouts supplémentaires de PhthNOH ou de base ne permettent pas d'augmenter la conversion. Ce n'est qu'après 5 jours qu'une conversion satisfaisante est atteinte. Le produit attendu **U14** est obtenu avec un rendement de 63% (Schéma 65). Aucune élimination n'est observée dans ces conditions. Bien que cette réaction soit très lente, nous choisissons de ne pas chauffer afin de ne pas risquer d'obtenir le produit d'élimination. Le rendement moyen observé s'explique par une perte de produit lors de l'essorage en raison de la solubilité partielle du composé **U14** dans le filtrat.

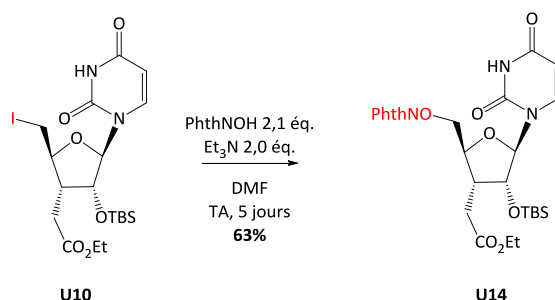


Schéma 65 : Obtention du composé **U14** par réaction de substitution nucléophile.

III.2.a.ii. Déprotection du phthalimidooxy ester **U14**

Il nous faut maintenant déprotéger la fonction *N*-oxyamine. La déprotection d'une fonction *N*-oxyamine protégée sous forme de phthaloyle se fait par hydrazinolyse avec de bons rendements.³⁵⁶ Cependant, il nous faudra faire attention au fait que l'hydrazine peut réagir sur l'uridine.⁵¹³ Une base nucléique pyrimidine présente en effet plusieurs sites électrophiles (Figure 148). Ainsi, l'uracile, la thymine et leurs nucléosides et nucléotides sont dégradés quantitativement par traitement avec l'hydrazine hydratée à 90°C.⁵¹⁴ L'hydrazine peut également réagir sur l'ester.

⁵¹¹ F. Ito, S. Ando, M. Iuchi, T. Ukari, M. Takasaki, K. Yamaguchi, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8009-8013.

⁵¹² D. Dhanak, C. B. Reese, S. Romana, G. Zappia, *Chem. Commun.* **1986**, 903-904.

⁵¹³ P. A. Levene, L. W. Bass, *J. Biol. Chem.* **1926**, *71*, 167-172.

⁵¹⁴ D. H. Hayes, F. Hayes-Baron, *J. Chem. Soc.* **1967**, 1528-1532.

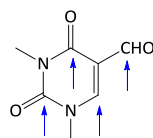


Figure 148 : Sites électrophiles du 5-formyluracile.⁵¹⁵

Nous effectuons donc l'hydrazinolyse du composé **U14** avec des conditions très variées (Tableau 8) : utilisation de l'hydrazine ou de la méthylhydrazine (moins réactive), nombre d'équivalent, changement du solvant, dilution, temps de réaction plus ou moins long, température, traitement, etc.

MeNHNH ₂ (3 éq.), CH ₂ Cl ₂ , TA, une nuit
MeNHNH ₂ (1,4 éq.), CH ₂ Cl ₂ /MeOH 1/1, TA, 2 heures
MeNHNH ₂ (2,4 éq.), CH ₂ Cl ₂ /MeOH 1/1, TA, 4 heures
NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O (1,1 éq.), MeOH, 0°C, 20 minutes

Tableau 8 : Exemples de conditions testées pour la réaction d'hydrazinolyse.

Nous rencontrons de grands problèmes de reproductibilité des résultats que nous ne savons expliquer. Les CCM comportent plusieurs tâches et les spectres RMN obtenus sont parfois très propres, parfois très sales. Aucune des conditions envisagées n'apporte systématiquement une amélioration. Lors de certains essais, nous avons tout de même réussi à isoler le composé attendu et à la caractériser (Schéma 66).

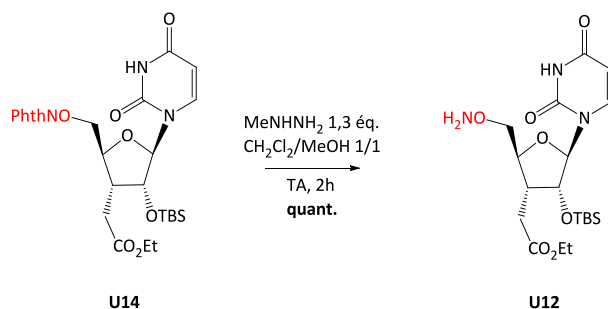


Schéma 66 : Déprotection de la fonction *N*-oxyamine du composé **U14**.

Il nous faut également déprotéger la fonction acide carboxylique. Cette déprotection se fait classiquement en milieu basique. Par conséquent, on traite le composé **U14** avec 2 équivalents de lithine pendant 5 heures à TA. La RMN du brut montre que l'acide carboxylique attendu **U15** n'est pas obtenu et que, comme on pouvait le craindre, le cycle phthaloyle s'est ouvert (Schéma 67).

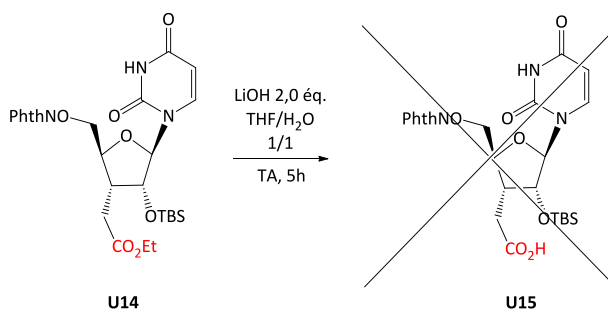


Schéma 67 : Déprotection de la fonction acide carboxylique de **U14** par saponification.

⁵¹⁵ K. Hirota, Y. Kitade, K. Shimada, S. Senda, Y. Maki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, 1293-1297.

Une telle ouverture du groupe phthaloyle par un nucléophile avait déjà été mise en évidence dans notre équipe. En effet, nous avons constaté que le groupe phthaloyle s'ouvrait réversiblement en présence de méthanol en milieu basique (Schéma 68).³⁹⁹

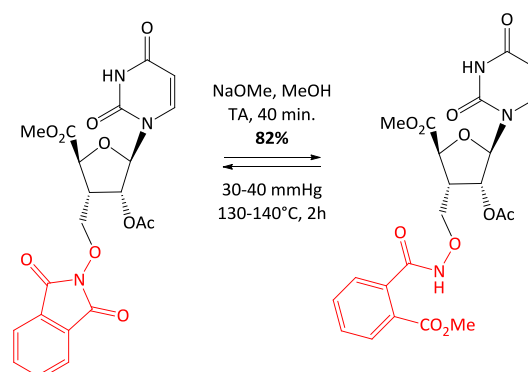


Schéma 68 : Ouverture réversible du groupement phthaloyle.³⁹⁹

Le triméthylsilanolate de potassium TMSOK a montré sa capacité à saponifier une grande variété d'esters.^{507,508,516} Nous mettons donc à réagir le composé **U14** avec un équivalent de TMSOK dans le THF anhydre. On ne note aucun avancement après 3 heures à TA. L'ajout de 2 équivalents supplémentaires mène à une ouverture du phthaloyle. En effet, la RMN ¹H du brut révèle une profonde modification du spectre au niveau des H^{Phth} (Figure 149).

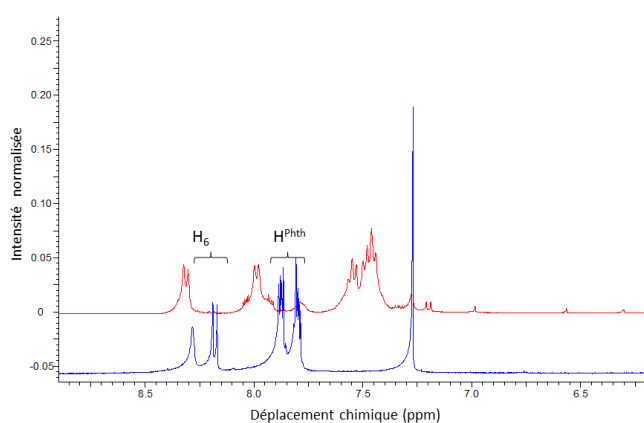


Figure 149 : Superposition au niveau de la région des protons aromatiques des spectres RMN ¹H de **U14** (en bleu) et du brut réactionnel (en rouge).

Afin de contourner les problèmes de stabilité du groupement phthaloyle en milieu basique, nous avons alors envisagé une réduction de l'ester éthylique par le DIBAL-H. Ce type de réduction d'ester est décrit sur des dérivés d'uridine.⁵¹⁷ Cependant, le composé **U14** ne réagit pas en présence de DIBAL-H dans le THF, même avec 15 équivalents d'hydrure à TA (Schéma 69).

⁵¹⁶ M. Lovrić, I. Cepanec, M. Litvić, A. Bartolinčić, V. Vinković, *Croat. Chem. Acta* **2007**, *1*, 109-115.

⁵¹⁷ A. J. Lawrence, J. B. J. Pavey, M. Y. Chan, R. A. Fairhurst, S. P. Collingwood, J. Fisher, R. Cosstick, I. A. O'Neil, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2761-2767.

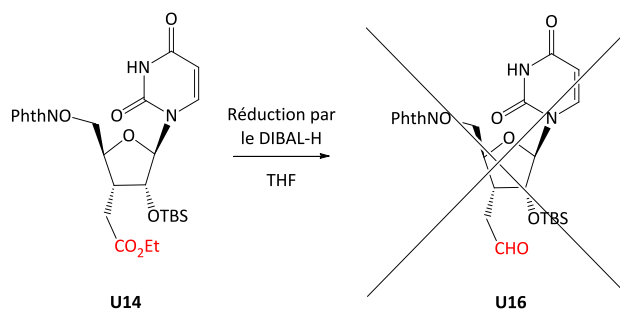


Schéma 69 : Réduction de la fonction ester du composé **U14**.

Etant donné les échecs précédents, nous nous sommes tournés vers une autre méthode permettant d'hydrolyser des esters en milieu neutre. En effet, de très bons nucléophiles (comme des ions iodures) peuvent cliver des esters via une réaction de type S_N2 . Il a ainsi été montré qu'un ester méthylique peut être clivé par l'iodure de lithium dans le DMF (solvant favorisant les S_N2) en chauffant.⁵¹⁸ Malheureusement, la réaction de **U14** avec jusqu'à 7,5 équivalents de LiI dans le DMF à 90°C ne conduit à la formation d'aucun nouveau produit.

III.2.b. Synthèse et déprotection du *N*-penténoylaminoxy ester **U17**

Etant donné les difficultés rencontrées précédemment, nous choisissons de travailler avec un nouveau groupement protecteur pour la fonction *N*-oxyamine. Notre choix s'est porté sur le groupement pent-4-énoyle (Figure 150).

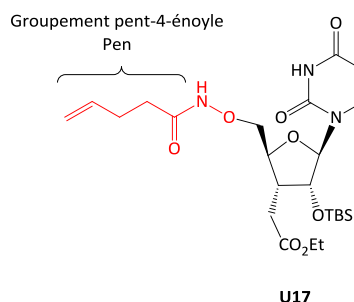


Figure 150 : Structure du *N*-penténoylaminoxy ester **U17**.

L'intérêt principal de ce groupement est lié à sa déprotection. Des conditions douces orthogonales aux conditions de déprotection de l'hydroxyle en position 2' et de l'acide carboxylique du composé **U17** suffisent. En effet, la fonction aminoxy se déprotège alors avec de l'iode en milieu aqueux via un mécanisme d'iodolactonisation (Schéma 70).⁵¹⁹ Ce groupement protecteur a été utilisé par quelques équipes.^{520,521}

⁵¹⁸ P. D. G. Dean, *J. Chem. Soc.* **1965**, 6655-6655.

⁵¹⁹ M. Lodder, S. Golovine, A. L. Laikhter, V. A. Karginov, S. M. Hecht, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 794-803.

⁵²⁰ M. Lodder, S. Golovine, S. M. Hecht, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 778-779.

⁵²¹ J. E. Hudak, H. H. Yu, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16127-16135.

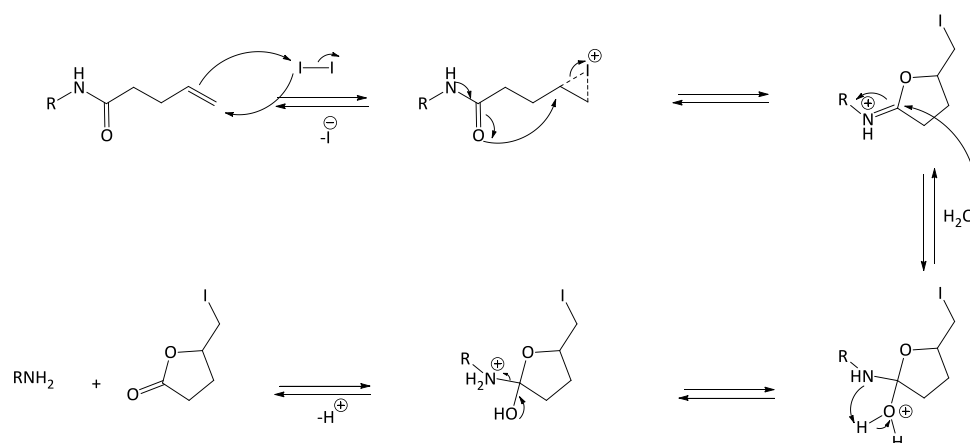


Schéma 70 : Mécanisme de déprotection d'une amine protégée par un groupe penténoyle.

III.2.b.i. Synthèse du *N*-penténoylaminoxy ester **U17**

Nous envisageons l'incorporation du groupement penténoyle par protection de la fonction *N*-oxyamine obtenue précédemment par hydrazinolyse (Schéma 71).

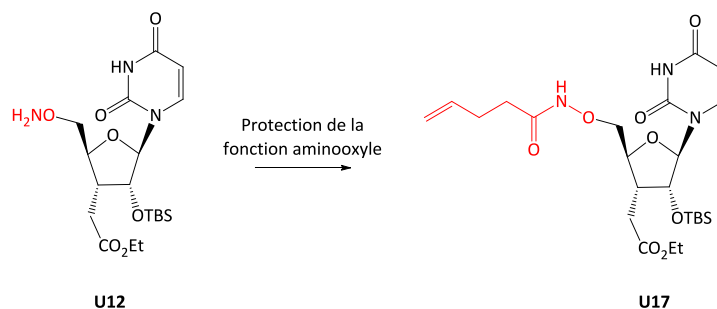


Schéma 71 : Préparation du *N*-penténoylaminoxy ester **U17** à partir de l'oxyamine **U12**.

Cette protection peut être effectuée grâce à l'anhydride pent-4-énoïque **I2**.⁵²² La synthèse de cet anhydride **I2** a été décrite par l'équipe de V. Blandin (Schéma 72).⁵²³ Cependant, la réaction entre l'oxyamine **U12** (1 éq.) et l'anhydride **I2** (1,1 éq.) à 0°C pendant 15 minutes dans un système de solvant CH₂Cl₂/MeOH 1/1 conduit à un brut réactionnel complexe et difficile à purifier.

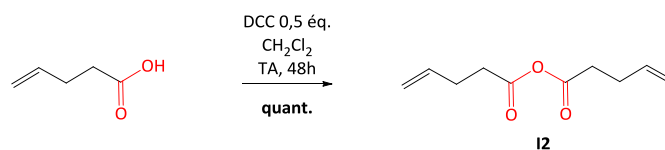


Schéma 72 : Préparation de l'anhydride pent-4-énoïque **I2**.

Un meilleur résultat a été obtenu en effectuant un couplage classique entre le composé aminoxyyle **U12** et l'acide pent-4-énoïque.⁵¹⁹ En effet, la réaction de l'oxyamine **U12** avec l'acide pent-4-énoïque (1,1 éq.) en présence de DCC (1,1 éq.) et de HOBT (1,1 éq.) dans le dichlorométhane conduit en une nuit à TA au produit attendu avec un rendement de 31% (Schéma 73). Ce rendement faible s'explique par les nombreux sous-produits observés et par une purification par chromatographie sur colonne complexe.

⁵²² R. Madsen, C. Roberts, B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7920-7926.

⁵²³ J. Lawrence, L. Cointeaux, P. Maire, Y. Vallee, V. Blandin, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3125-3141.

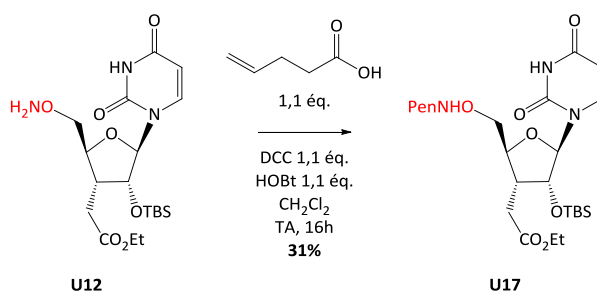


Schéma 73 : Préparation du *N*-pentényloxy ester **U17** par couplage peptidique.

III.2.b.ii. Déprotection du *N*-pentényloxy ester **U17**

Il nous faut maintenant travailler à la déprotection du *N*-pentényloxy ester **U17**.

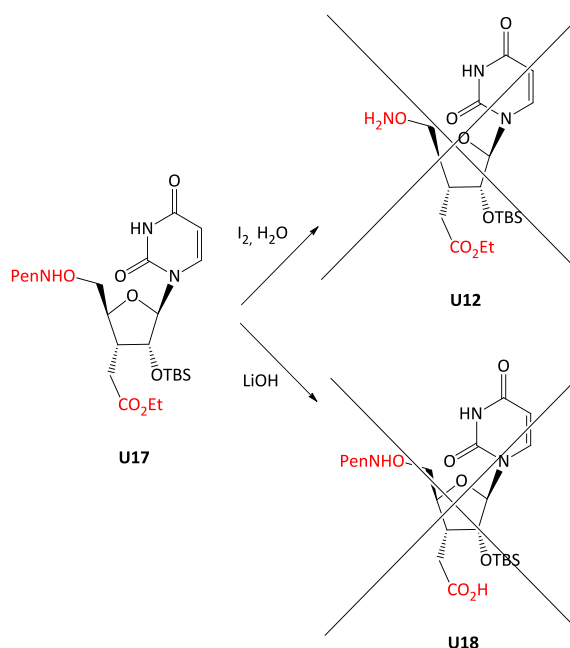


Schéma 74 : Déprotection de la fonction *N*-oxyamine et de la fonction acide carboxylique du composé **U17**.

Malheureusement, les essais de saponification du composé **U17** avec la lithine conduisent à une dégradation (Schéma 74). En utilisant du diiode en milieu aqueux, nous n'avons pas réussi non plus à déprotéger la fonction aminoxye proprement (Schéma 74).

Etant donné ces nombreux échecs inexplicables, nous nous sommes concentrés sur la préparation de dinucléosides.

IV. VERS LA SYNTHÈSE DE DINUCLEOSIDES D'URIDINE ET DE THYMININE

En parallèle des travaux précédents et dans la continuité de précédents travaux du laboratoire,^{396,399} nous nous sommes penchés sur la synthèse de dinucléosides (Figure 151). Le premier dinucléoside cible est un dinucléoside d'uridine et de thymidine **D1** (Figure 151 à gauche). Afin d'étudier l'influence de la longueur du lien internucléosidique sur la flexibilité du composé et donc sur ses capacités d'appariements avec le brin d'acides nucléiques complémentaire, nous nous

intéressons également au dinucléoside **D2** (Figure 151 au milieu) qui présente 5 liaisons internucléosidiques au lieu de 6. Enfin, nous étudierons l'influence de la base nucléique et de la présence de l'hydroxyle en position 3' en préparant et en étudiant le dinucléoside **D3** (Figure 151 à droite).

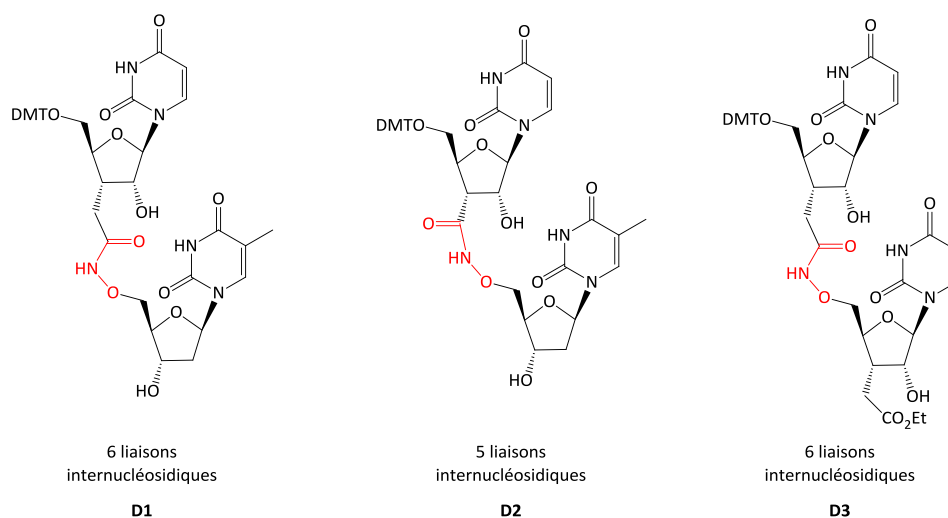


Figure 151 : Dinucléosides cibles.

Une fois synthétisé, ces dinucléosides pourront être incorporés dans des séquences oligonucléotidiques par synthèse sur support solide.

IV.1. Approche rétrosynthétique des dinucléosides cibles

Les dinucléosides cibles peuvent être obtenus par couplage peptidique entre le monomère présentant une fonction aminooxyle $-ONH_2$ et le monomère présentant une fonction acide carboxylique $-CO_2H$ (Schéma 75). Les hydroxyles libres sont protégés par un groupe *tert*-butyldiméthylsilyle, sensible aux ions fluorures.

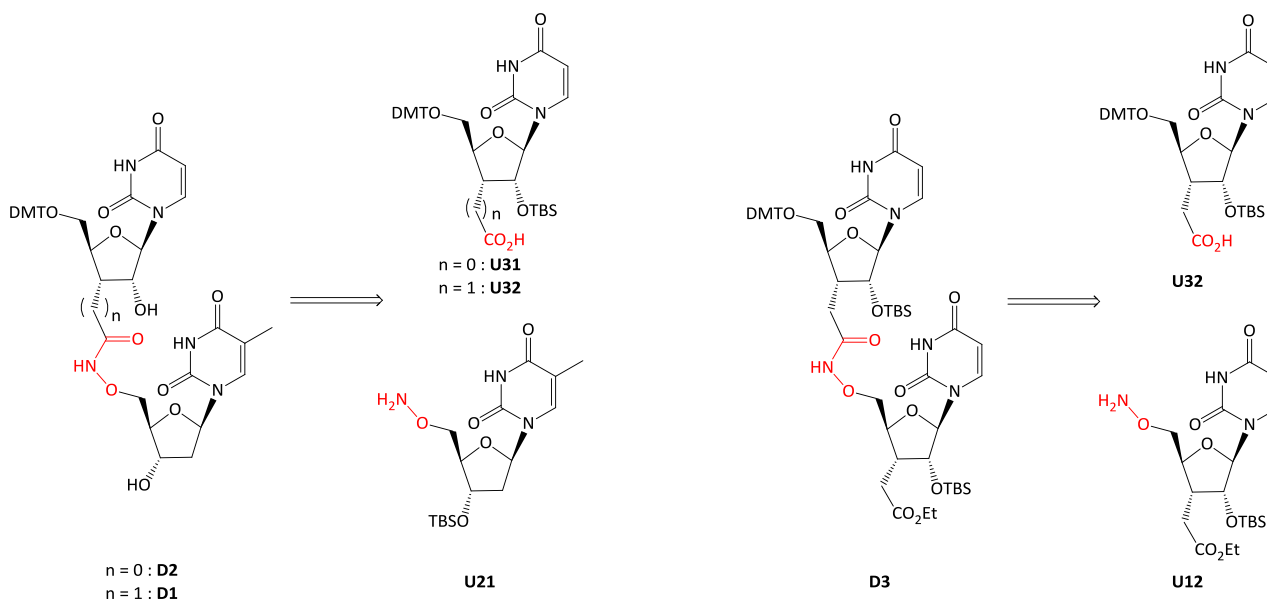


Schéma 75 : Approche rétrosynthétique des dinucléosides cibles.

L'oxyamine **U12** a déjà été préparée précédemment. Quant à l'oxyamine **U21**, elle peut être préparée par une réaction de Mitsunobu régiosélective sur la thymidine suivie d'une protection de l'hydroxyle en position 3' et d'une hydrazinolyse (Schéma 76).

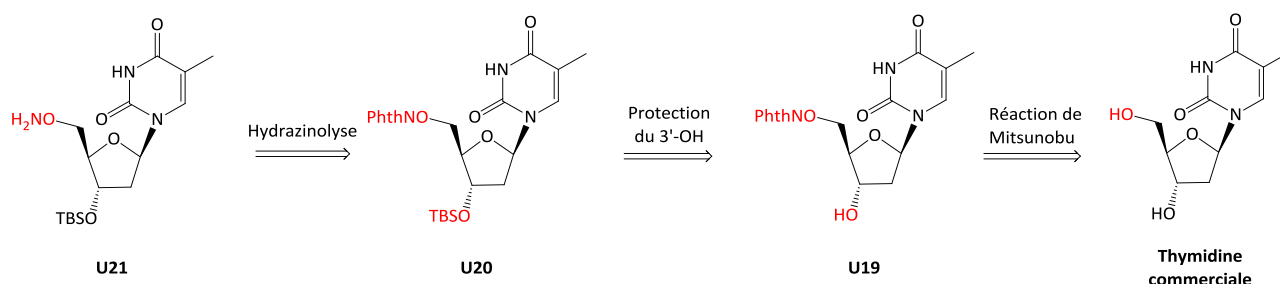


Schéma 76 : Approche rétrosynthétique de la thymidine aminooxyle **U21**.

L'uridine acide carboxylique **U32** peut être obtenue par une voie similaire à celle vue précédemment. En effet, une protection par un groupe 4,4'-diméthoxytrityle DMT de l'alcool **U6** conduit au composé **U29** qui fournit, après saponification, l'acide carboxylique cible **U32** (Schéma 77). Le groupe DMT est particulièrement sensible en milieu acide (plus sensible que le groupe trityle),⁵²⁴ si bien qu'il demande une vigilance particulière (ajout de triéthylamine dans l'éluant de la colonne de chromatographie). Il est usuellement introduit en faisant réagir l'alcool avec le chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle (DMTCl) dans la pyridine. La vitesse de tritylation peut être augmentée par l'ajout de nitrate d'argent (AgNO₃) ou de 4-diméthylaminopyridine DMAP.

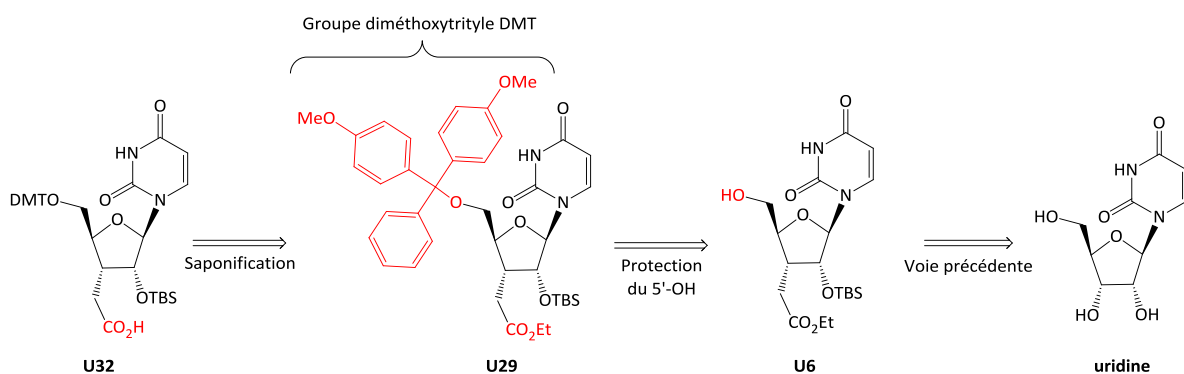


Schéma 77 : Schéma rétrosynthétique pour l'obtention de l'uridine acide carboxylique **U32**.

L'uridine acide carboxylique **U31** demande une voie de synthèse différente (Schéma 78). L'alcène exocyclique **U22** est obtenu par une réaction de Wittig sur la cétone **U4**. Par la suite, une hydroboration stéréosélective suivie d'une modification du groupement protecteur en position 5' et d'une oxydation conduit à l'acide carboxylique **U31**.

⁵²⁴ A. K. Pathak, V. Pathak, L. E. Seitz, K. N. Tiwari, M. S. Akhtar, R. C. Reynolds, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 7755-7757.

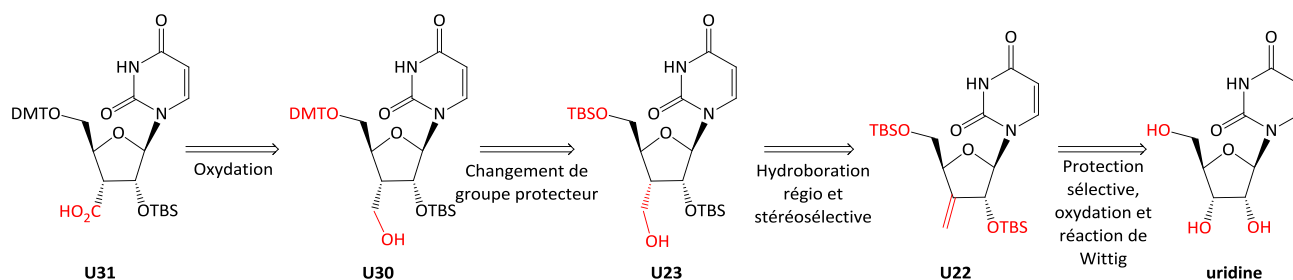


Schéma 78 : Schéma rétrosynthétique pour l'obtention de l'uridine acide carboxylique **U31**.

IV.2. Synthèse des dinucléosides cibles

IV.2.a. Préparation du monomère thymidine **U21**

Les travaux de Sandrine Peyrat (ancienne doctorante du laboratoire), reprenant le travail de l'équipe de Sanghvi,³⁵⁶ ont permis d'obtenir l'oxyamine dérivée de la thymidine **U21** en 3 étapes avec un rendement global de 82% (Schéma 79).³⁹⁶ La première étape est une réaction de Mitsunobu. Cette réaction, fortement sensible à l'encombrement stérique, se fait sélectivement sur l'hydroxyle primaire. On notera qu'une lente addition du DIAD (une goutte toutes les 10 secondes) est nécessaire pour atteindre une conversion satisfaisante. L'hydroxyle en position 3' est protégé par un groupe *tert*-butyldiméthylsilyle, l'imidazole ajouté en excès jouant le rôle de base et de catalyseur nucléophile. Une hydrazinolyse fournit quantitativement le produit attendu qui ne nécessite pas de purification.

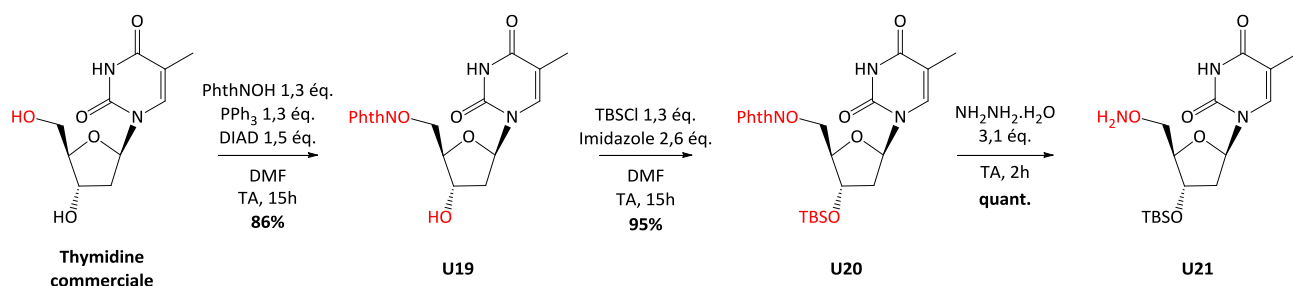


Schéma 79 : Préparation du 5'-*O*-amino-2'-désoxy-2'-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)thymidine **U21** à partir de la thymidine.³⁹⁶

IV.2.b. Préparation des monomères uridines **U31** et **U32**

IV.2.b.i. Difficultés rencontrées lors de la préparation de l'uridine acide carboxylique **U31**

D'après l'analyse rétrosynthétique du Schéma 78, la première étape est une réaction de Wittig sur la cétone **U4**. Pour cela, d'anciens travaux du laboratoire⁵²⁵ ont été repris. L'ylure de phosphore est généré *in situ* par action du *tert*-butanolate de potassium sur le sel de phosphonium correspondant commercial. Après purification par chromatographie sur gel de silice, le produit est obtenu sous forme d'une huile légèrement jaune avec un bon rendement de 70% (Schéma 80).

⁵²⁵ Y. Gong, H. Sun, J. Xie, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6027-6033.

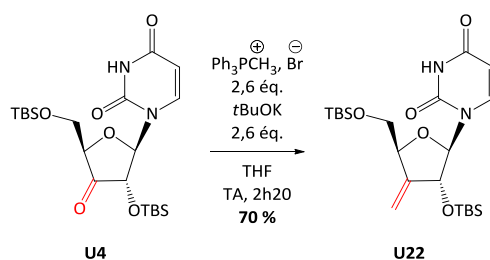


Schéma 80 : Préparation du 3'-désoxy-3'-méthylène-2',5'-di-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)uridine **U22**.

L'alcène **U22** doit ensuite être soumis à une réaction d'hydroboration. L'hydroboration est une réaction transformant un alcène en un alcool, découverte par H. C. Brown (Prix Nobel de Chimie en 1979).⁵²⁶ Elle se fait en deux étapes :

- addition du borane sur l'alcène : cette étape est concertée et se fait sur la face de l'alcène la moins encombrée. L'hydrogène et le bore se fixent sur la même face de l'alcène. Pour des raisons stériques et électroniques, le bore se fixe sur l'atome de carbone le moins encombré.
- oxydation de l'alkylborane qui libère l'alcool.

Par conséquent, cette réaction est régiosélective (régiosélectivité dite anti-Markovnikov) et stéréosélective. Cette sélectivité peut être améliorée par l'utilisation de boranes encombrés (Figure 152).

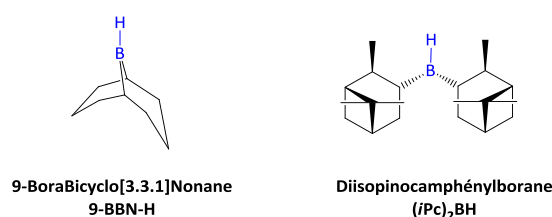


Figure 152 : Exemples de boranes encombrés. La liaison B-H réactive est indiquée en bleu.

L'hydroboration de l'alcène **U22** doit être régio et stéréosélective. Le produit anti-Markovnikov correspond au produit désiré. Par ailleurs, afin de prédire la face d'approche, nous cherchons la conformation stable de **U22** par calcul DFT en B3LYP/6-31G(d,p) avec le logiciel Gaussian 09 (Figure 153). On constate qu'aucune des faces diastéréotopes de l'alcène n'est nettement plus encombrée que l'autre. Il est par conséquent difficile de prédire la stéréosélectivité et de savoir si le composé ribo sera formé majoritairement par rapport au composé xylo.

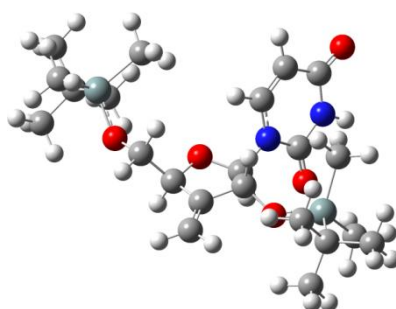


Figure 153 : Conformation obtenue pour le composé **U22** par calcul DFT dans la base 6-31G(d,p) avec le logiciel Gaussian 09. Aucune des faces diastéréotopes de l'alcène n'apparaît plus encombrée que l'autre.

⁵²⁶ H. C. Brown, *Tetrahedron* **1961**, 12, 117-138.

Suivant des précédents travaux du laboratoire,⁵²⁵ nous avons effectué un essai d'hydroboration sur l'alcène **U22**. En suivant un mode opératoire classique (addition du borane BH_3 suivie d'une oxydation du trialkylborane par l'eau oxygénée), le produit de départ est consommé. Malheureusement, aucun produit n'est isolé car on observe une dégradation du composé (Schéma 81).

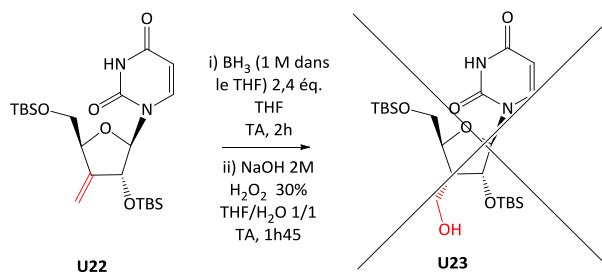


Schéma 81 : Essai d'hydroboration sur le composé **U22**.

Winqvist et Strömbreg⁵²⁷ ont étudié la stéréosélectivité de l'hydroboration du 3'-désoxy-3'-méthylène-2',5'-di-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)uridine **U22** et du 3'-désoxy-3'-méthylène-5'-*O*-(monométhoxytrityl)uridine **U24**. Ils ont testé différents conditions (solvant, température, durée de réaction) et deux boranes ($BH_3.Me_2S$ ou le 9-borabicyclo[3.3.1]nonane (9-BBN-H)). Un excellent ratio en composé ribo est obtenu en faisant réagir le composé **U24** avec le 9-BBN-H dans le THF à 20°C pendant 20 heures (Schéma 82). Les ratios ribo/xylo souvent médiocres obtenus lors de cette étude révèlent la faible différence d'encombrement entre les deux faces de l'alcène (Figure 153).

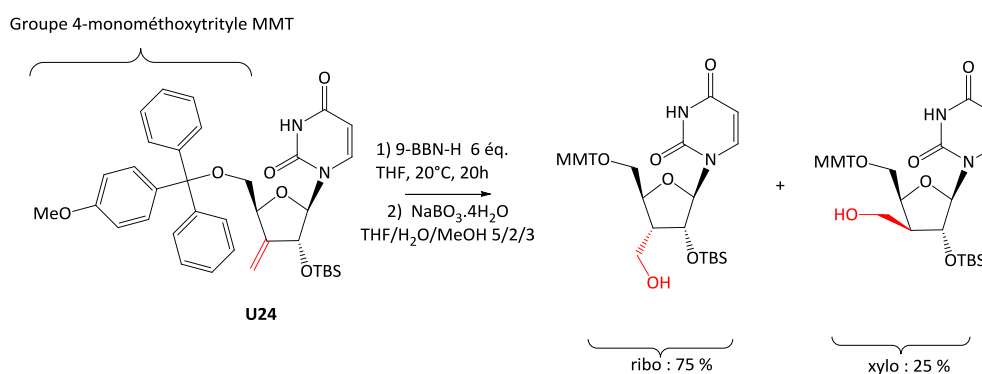


Schéma 82 : Hydroboration sélective de l'alcène **U24**.⁵²⁷

Il nous faut donc réaliser l'hydroboration sur l'alcène présentant un groupement MMT en position 5'. Notre dinucléoside cible comportant un groupe DMT, nous choisissons de remplacer le MMT par le DMT, ce qui ne devrait pas modifier la sélectivité (structure très proche). Cela nous amène à changer notre voie de synthèse en inversant l'ordre de plusieurs étapes de synthèse (Schéma 83) : le groupe DMT est incorporé dans la synthèse avant l'oxydation en cétone.

⁵²⁷ A. Winqvist, R. Strömbreg, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4305-4311.

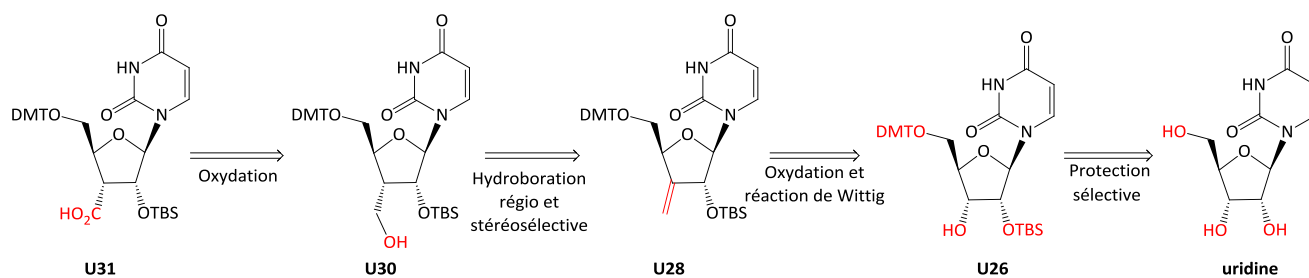


Schéma 83 : Nouvelle approche rétrosynthétique pour l'acide carboxylique U31.

Hakimelahi et al⁴⁹⁹ ont décrit la préparation du 5'-O-(diméthoxytrityl)-2'-O-(tert-butylidiméthylsilyl)uridine U26 à partir de l'uridine en deux étapes :

- une première étape de tritylation sélective utilisant DMTCl en présence d'AgNO₃ dans la pyridine ;
- une deuxième étape de silylation sélective en position 2' utilisant TBSCl, AgNO₃ et la pyridine.

En suivant ce mode opératoire (Schéma 84), nous avons obtenu le composé U25 avec un rendement de 64%. Par contre, nos essais de silylation (TBSCl, AgNO₃, pyridine) en position 2' mènent à une conversion très faible et ce, même en ajoutant davantage de réactif, en changeant l'ordre d'ajout des réactifs, en augmentant le temps de réaction ou en remplaçant AgNO₃ par AgClO₄. La conversion n'augmente pas mais plusieurs produits se forment. Par conséquent, le composé U26 n'a jamais pu être obtenu.

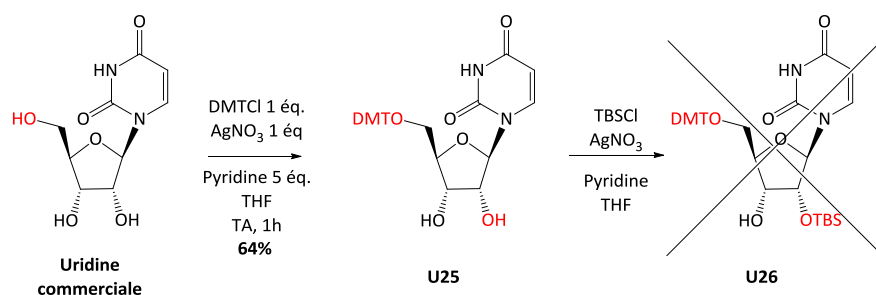


Schéma 84 : Préparation du 5'-O-(diméthoxytrityl)uridine U25 et protection de U25.

Etant donné ces échecs, nous choisissons alors d'effectuer la tritylation plus tard dans la synthèse. Cela nous amène à modifier l'approche rétrosynthétique selon le Schéma 85. Cette option a l'avantage de garder davantage d'étapes de synthèse mises au point précédemment. En effet, l'alcène U22 a déjà été obtenu.

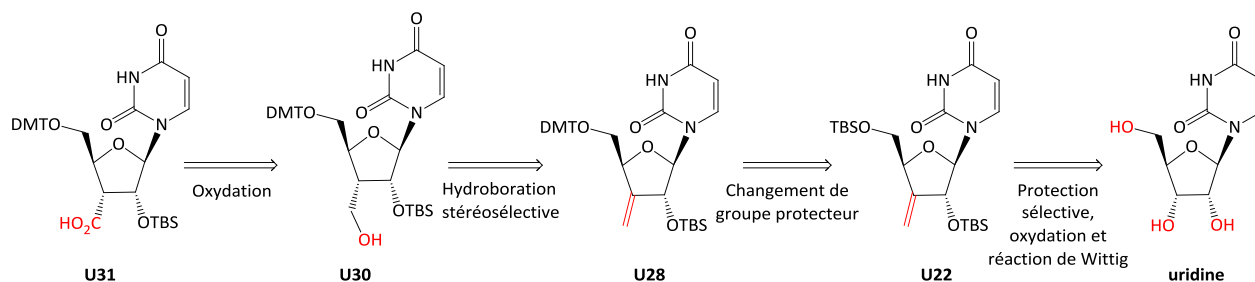


Schéma 85 : Nouvelle approche rétrosynthétique pour U31.

Il faut donc déprotéger l'alcool en position 5' de U22 pour obtenir U27. Cette déprotection doit être sélective et ne pas déprotéger l'alcool en position 2'. Un alcool silylé primaire étant plus

sensible en milieu acide qu'un alcool silylé secondaire, un contrôle soigné des conditions devrait nous permettre d'effectuer cette réaction et de trouver le meilleur compromis entre conversion totale et non déprotection de l'hydroxyle en position 2'. Nous choisissons donc d'effectuer cette déprotection avec l'acide trifluoroacétique aqueux à 0°C et de la suivre attentivement par CCM. Avec un tel mode opératoire, l'alcool attendu **U27** est obtenu avec un rendement de 65%. 15% du produit de départ est également récupéré (Schéma 86).

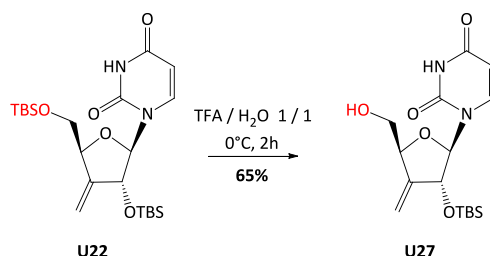


Schéma 86 : Déprotection sélective du composé **U22**.

Cet alcool **U27** est prêt à être protégé pour donner le 3'-désoxy-5'-*O*-(diméthoxytrityl)-3'-méthylène-2'-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)uridine **U28**. En raison de l'indisponibilité temporaire du DMTCI chez notre fournisseur, les essais de tritylation ont été effectués avec le chlorure de trityle TrCl. Cela n'est censé modifier en rien cette réaction. Les différents essais de protection avec un groupement trityle sont résumés dans le Tableau 9. L'utilisation du TrCl dans la pyridine (entrée 1) conduit à une réaction incomplète, même après l'ajout de TrCl supplémentaire ou après chauffage à reflux ou après 3 jours d'agitation. L'ajout du catalyseur nucléophile DMAP, que ce soit en quantité catalytique (entrée 2) ou en excès (entrée 3) ne permet pas non plus d'atteindre une conversion satisfaisante. Ces difficultés de tritylation sont surprenantes étant donné qu'il s'agit d'un alcool primaire peu encombré. Il nous faut donc trouver une méthode de tritylation plus performante.

	Conditions	Résultats
Entrée 1	TrCl 1,2 éq. pyridine reflux	<ul style="list-style-type: none"> Réaction incomplète après 5 heures à reflux Ajout de 1 éq. de TrCl et reflux une nuit : réaction incomplète Après 3 jours d'agitation, réaction toujours incomplète et bloquée
Entrée 2	TrCl 1,2 éq. DMAP 0,3 éq. pyridine	<ul style="list-style-type: none"> Agitation à TA une nuit : réaction incomplète Ajout de 2,0 éq. de DMAP et 0,3 éq. de TrCl : incomplet après 3 jours d'agitation Ajout de 2,0 éq. de DMAP et 0,3 éq. de TrCl : incomplet après 24 heures d'agitation
Entrée 3	TrCl 1,2 éq. DMAP 4 éq. pyridine	<ul style="list-style-type: none"> Réaction incomplète après une nuit à TA Ajout de 2 éq. de DMAP et de 0,3 éq. de TrCl : toujours incomplet après 24 heures

Tableau 9 : Essais de protection de **U27** par un trityle.

IV.2.b.ii. Difficultés rencontrées lors de la préparation de l'uridine acide carboxylique **U32**

La synthèse de l'uridine acide carboxylique **U32** nécessite la protection de l'alcool **U6** précédemment obtenu (Schéma 77). Pour cela, plusieurs essais détaillés dans le Tableau 10 ont été réalisés afin de transformer le composé **U6** en composé **U29** (Schéma 87).

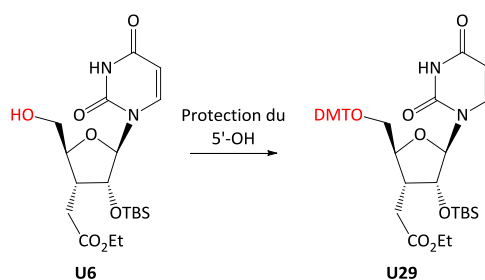


Schéma 87 : Protection du composé U6.

	Conditions opératoires	Résultats
Entrée 1	DMTCl 1 éq., AgNO ₃ 1 éq., pyridine 5 éq., THF	Apparition du produit mais il reste du produit de départ même après ajout supplémentaire de 1 éq. d'AgNO ₃ et de DMTCl et 10 jours d'agitation
Entrée 2	DMTCl 1,1 éq., DMAP 0,2 éq., pyridine	Apparition du produit mais il reste du produit de départ même après ajout supplémentaire de 0,5 éq. de DMAP et de DMTCl et chauffage à 65°C, puis 100°C puis 140 °C
Entrée 3	DMTCl 1,1 éq., Et ₃ N 2 éq., pyridine	Apparition d'un produit mais il reste du produit de départ même après ajout supplémentaire de 0,5 éq. de DMTCl et 1 éq. d'Et ₃ N et chauffage à 65°C, puis 100°C puis 140 °C
Entrée 4	DMTCl 1,1 éq., Et ₃ N 2 éq., pyridine	Chauffage à 140 °C pendant 6 heures. Apparition du produit mais il reste du produit de départ

Tableau 10: Synthèse du composé U29.

L'utilisation de conditions classiques (DMTCl en présence d'AgNO₃ dans la pyridine, entrée 1) conduit à une réaction très incomplète même après des ajouts supplémentaires de réactifs ou après 10 jours d'agitation. L'utilisation du catalyseur nucléophile DMAP (entrée 2) conduit à un résultat identique et ce, même après ajout de réactif ou chauffage. La triéthylamine (entrées 3 et 4) n'améliore pas la conversion.

En étudiant de près les modes opératoires rapportés par Li et Iccirilli⁵²⁸ qui ont également rencontré des problèmes lors de protections analogues, nous notons qu'en plus de la coévaporation avec la pyridine, un large excès de DMTCl et de DMAP peut être utilisé afin de protéger la position 5' du nucléoside.

Une co-évaporation préalable du substrat avec la pyridine ne permet pas non plus d'améliorer la conversion. De grands excès de DMTCl et de DMAP améliorent légèrement la conversion. Un rendement maximal de 74% a pu être obtenu dans la pyridine après addition de 5,3 équivalents de DMTCl et 2,3 équivalents de DMAP en différentes fractions et 5 nuits d'agitation à TA entrecoupés de chauffage à 120°C.

IV.2.b.iii. Utilisation du tétrafluoroborate de 4,4'-diméthoxytrityle

Les précédents résultats montrent qu'il est nécessaire de travailler sur l'étape de tritylation. D'autres équipes rencontrent des difficultés similaires. Ainsi, Hansen et al⁵²⁹ ont travaillé sur l'introduction du groupement protecteur DMT en position 5' du 2'-désoxy-5-méthylcytidine. Ils ont également rapporté que les conditions telles que DMTCl/DMAP/pyridine ou DMTCl/AgNO₃

⁵²⁸ N. S. Li, J. A. Piccirilli, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 1198-1210.

⁵²⁹ A. S. Hansen, A. Thalhammer, A. H. El-Sagheer, T. Brown, C. J. Schofield, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21, 1181-1184.

conduisent à des conversions incomplètes et ainsi à de faibles rendements. Ils se sont alors penchés sur l'utilisation du tétrafluoroborate de 4,4'-diméthoxytrityle DMT^+ , BF_4^- qui est un très bon réactif employé dans des protections « difficiles » de nucléosides. Ce dernier leur a permis d'atteindre des réactions complètes.

La synthèse du tétrafluoroborate de 4,4'-diméthoxytrityle a été effectuée en deux étapes, avec un excellent rendement dans les conditions du Schéma 88.⁵³⁰

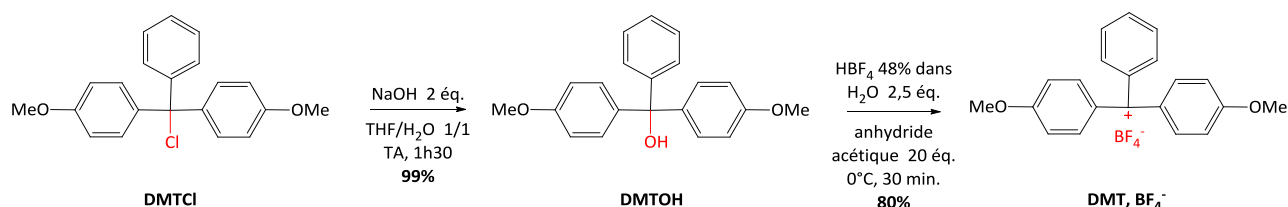


Schéma 88 : Préparation du tétrafluoroborate de 4,4'-diméthoxytrityle.

L'utilisation de ce sel nécessite un solvant et une base destinée à piéger le proton de l'alcool.⁵³¹ Le solvant doit permettre de solubiliser efficacement les composés. De plus, le solvant et la base choisis ne doivent pas se coordonner avec le sel DMT^+ , BF_4^- en formant un adduit acide/base de Lewis. Il a été montré⁵³¹ que le THF et la 2,6-lutidine offrent un bon compromis. Plus récemment, des travaux ont montré⁵²⁹ que le rendement de la tritylation est augmentée en remplaçant la 2,6-lutidine par la base de Hünig (ou DIPEA) et en ajoutant le DMT^+ , BF_4^- par portion. Par ailleurs, l'expérience a révélé que l'ajout de Li_2CO_3 est indispensable à l'obtention d'un bon rendement car il permet de neutraliser le tétrafluoroborate d'ammonium ou de pyridinium.⁵³¹

Pour la protection en position 5' de nucléosides, l'équipe de Hansen⁵²⁹ a utilisé 3 équivalents de Li_2CO_3 , 5 équivalents de DIPEA et 1,5 à 2 équivalents de DMT^+ , BF_4^- additionnés par portion dans du THF à TA. Le nucléoside et le carbonate de lithium sont préalablement séchés sous vide. La solution du nucléoside, de Li_2CO_3 et de DIPEA dans le THF est chauffée pour dissoudre les réactifs avant l'addition de DMT^+ , BF_4^- . Le DMT^+ , BF_4^- est additionné par fraction de 0,25 équivalents toutes les 30 minutes et la réaction est finie en environ 4 heures.

Nous avons donc utilisé ces conditions avec le produit **U27**. Cependant, la réaction est incomplète. N'ayant pas de problèmes de sélectivité, nous avons ajouté des équivalents supplémentaires et augmenté la durée de réaction. Après ajout de 2,5 équivalents de DMT^+ , BF_4^- et 40 heures de réaction à TA, le produit attendu **U28** est obtenu avec un très bon rendement de 83% (Schéma 89). Le rendement obtenu est bon malgré un mélange réactionnel trouble même après chauffage. Afin d'augmenter la solubilité, une réaction a été menée dans le DMF, mais aucune amélioration n'a été notée. En effet, le DMF est une bonne base de Lewis qui se coordine avec le cation DMT^+ , ce qui diminue sa réactivité.

⁵³⁰ C. Bleasdale, S. B. Ellwood, B. T. Golding, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 803-805.

⁵³¹ M. K. Lakshman, B. Zajc, *Nucleosides Nucleotides* **1996**, *15*, 1029-1039.

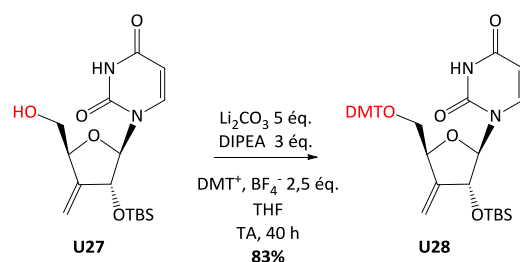


Schéma 89 : Protection en position 5' par le groupement DMT formant **U28**.

Ce même protocole a été appliqué sur le composé **U6** (Schéma 90). Malgré un milieu réactionnel trouble, le rendement est bon. Cette réaction est plus facile à mener que les voies de protection « classiques ». On pourra noter que, pour certains essais, la réaction était complète après l'ajout de 2 équivalents de DMT^+ , BF_4^- .

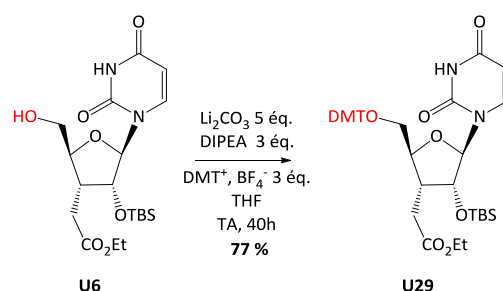


Schéma 90 : Préparation du 3'-désoxy-5'-O-(diméthoxytrityl)-3'-(éthoxycarbonylméthyl)-2'-O-(tert-butylidiméthylsilyl)uridine **U29**.

Etant donné les succès permis par l'utilisation du DMT^+ , BF_4^- , nous avons cherché à utiliser cette méthode dans la per-6-O-tritylation de l' α -cyclodextrine qui est également limitée par des faibles conversions.⁵³² Ces essais n'ont malheureusement pas abouti à un résultat satisfaisant même avec une activation micro-onde.⁵³³

IV.2.b.iv. Préparation de l'uridine acide carboxylique **U31**

Le composé protégé **U28** peut maintenant être utilisé dans des réactions d'hydroboration sélectives en utilisant le protocole rapporté par Winqvist et Strömbreg.⁵²⁷ L'utilisation de ce protocole avec le composé **U28** conduit à la formation incomplète de deux produits plus polaires sans le DMT (Schéma 91). Afin d'empêcher la déprotection du DMT, la même réaction a alors été conduite en ajoutant un équivalent de DIPEA ou 6 équivalents de lutidine. Malgré ces ajouts de base, le groupement DMT est perdu lors de cette réaction. Ce problème de déprotection s'explique par la plus grande sensibilité en milieu acide du DMT par rapport au MMT. Aucune référence à ce problème n'a été décrite dans la publication de Winqvist et Strömbreg.⁵²⁷

⁵³² P. Zhang, A. Wang, L. Cui, C. C. Ling, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1612-1615.

⁵³³ C. O. Kappe, B. Pieber, D. Dallinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1088-1094.

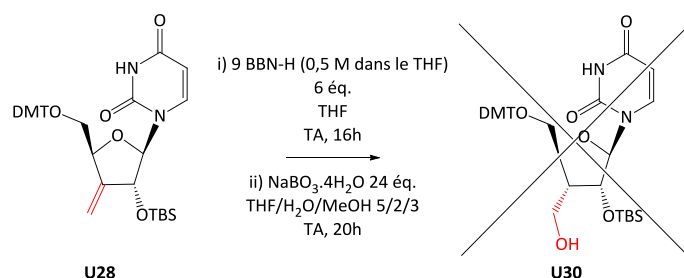


Schéma 91 : Essai d'hydroboration sur le composé **U28**.

Il nous faut alors remplacer le groupe 4,4'-diméthoxytrityle DMT par un groupe 4-monométhoxytrityle MMT c'est-à-dire qu'il faut travailler avec le composé **U24** étudié dans la littérature.⁵²⁷ Pour des raisons de temps, nous avons alors choisi de nous concentrer sur la préparation de l'acide carboxylique **U32** et d'abandonner celle d'**U31**.

IV.2.b.v. Préparation de l'uridine acide carboxylique **U32**

Il reste à saponifier l'ester **U29** pour obtenir le monomère **U32**. Cela peut être effectué avec la lithine dans un mélange MeOH/eau. Classiquement, dans les saponifications avec la lithine, le milieu réactionnel est neutralisé par résine échangeuse de cations. Cette résine ne peut pas être utilisée dans le cas du produit protégé par le DMT en position 5' car un milieu acide (même très faiblement) suffit à déprotéger le groupement DMT. Il faut alors utiliser avec précaution une solution saturée de NH_4Cl . Ce protocole permet d'obtenir une conversion totale après 3 jours de réaction (Schéma 92). Le produit **U32** est désormais prêt à être utilisé dans des réactions de couplage.

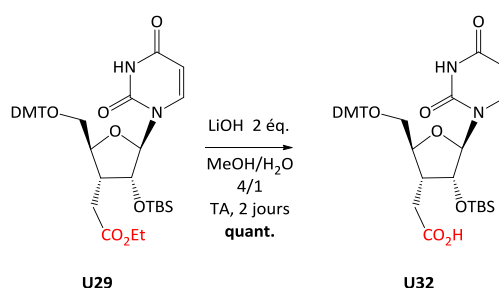


Schéma 92 : Préparation du 3'-(carboxyméthyl)-3'-désoxy-5'-O-(diméthoxytrityl)-2'-O-(tert-butyl diméthylsilyl)uridine **U32** par saponification.

IV.2.c. Réactions de couplage

Ayant préparé les deux monomères, nous nous sommes intéressés à la préparation du premier dinucléoside cible par couplage peptidique entre l'oxyamine **U21** et l'acide carboxylique **U32**. Pour cela, l'acide carboxylique **U32** (1,1 équivalent) est mis à réagir avec l'oxyamine **U21** en présence d'EDC.HCl (1,1 équivalent) et d'HOAt (1,3 équivalent) dans du DMF anhydre sous argon. Après une nuit à TA, le brut réactionnel obtenu présente de nombreuses taches en CCM et un spectre RMN ^1H complexe. Une purification sur colonne de silice (avec un éluant contenant 3% de triéthylamine) ne permet pas d'obtenir une fraction pure avec un produit présentant des spectres RMN ^1H et ^{13}C exploitables (Schéma 93). Ces spectres ne peuvent pas être expliqués par la présence de plusieurs conformères. Ne disposant pas de spectromètre de masse en routine, nous n'avons pas pu nous assurer de la présence ou non du dinucléoside **U33**.

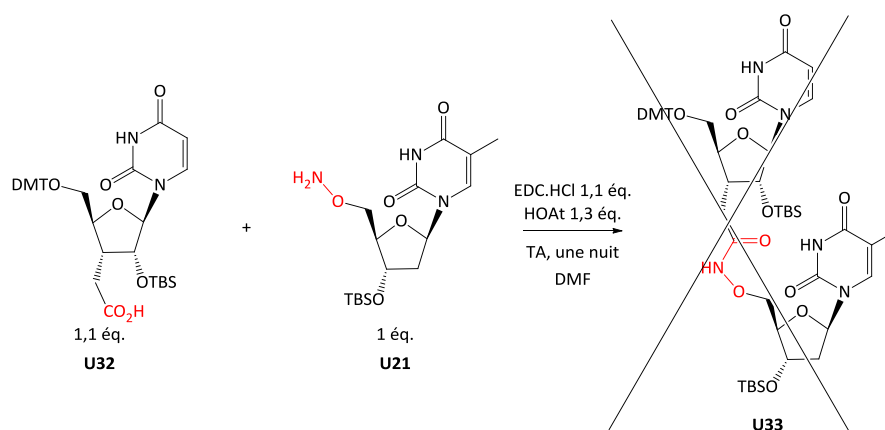


Schéma 93 : Réaction de couplage entre l'acide carboxylique **U32** et l'oxyamine **U21**.

Une réaction de couplage similaire a été effectuée pour préparer le dinucléoside **U34** (Schéma 94). Cependant, de la même manière que pour **U33**, on observe de nombreuses tâches sur CCM et une purification sur plaque préparative (avec un éluant contenant 3% de triéthylamine) ne permet pas d'obtenir une fraction pure.

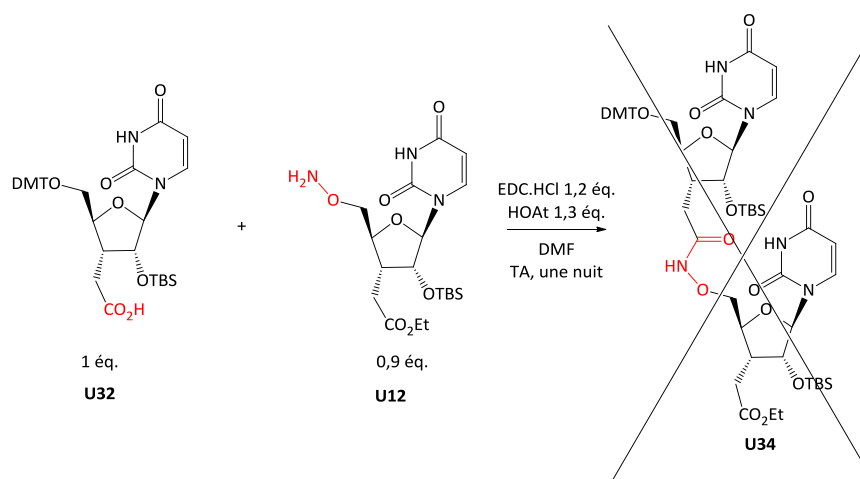
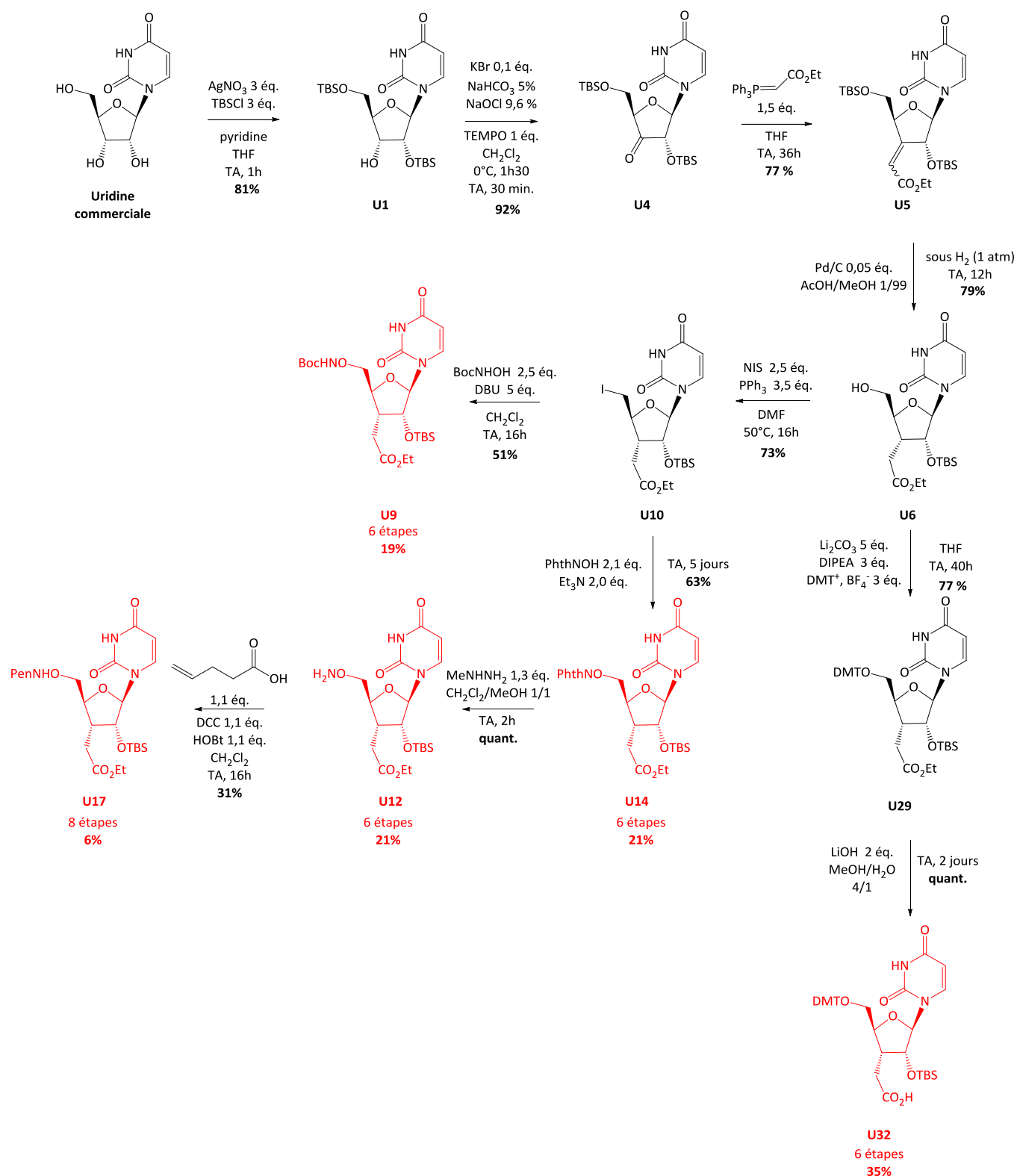


Schéma 94 : Réaction de couplage entre l'acide carboxylique **U32** et l'oxyamine **U12**.

Par manque de techniques de purification (HPLC préparative), nous avons abandonné ces synthèses de dimères.

V. CONCLUSION ET BILAN

Nous avons préparé en quelques étapes différents nucléosides aminoxy acides à partir de l'uridine (Schéma 95). Cependant, la déprotection de ces composés pose problème. Par conséquent, nous n'avons pas réussi à avancer dans la synthèse d'oligomères de nucléosides aminoxy acides.



Sch\u00e9ma 95 : Pr\u00e9paration des nucl\u00e9osides aminoxyacides **U9**, **U12**, **U14** et **U17** \u00e0 partir de l'uridine.

En parall\u00e8le de ces travaux, nous nous sommes int\u00e9ress\u00e9s \u00e0 la synth\u00e8se de dinucl\u00e9osides. 2 monom\u00e8res n\u00e9cessaires (**U12** et **U32**) ont \u00e9t\u00e9 pr\u00e9par\u00e9s (Sch\u00e9ma 95). Malheureusement, les essais de couplage n'ont pas abouti. Les difficult\u00e9s rencontr\u00e9es avec les compos\u00e9s aminoxyyles seront discut\u00e9es dans le chapitre suivant. Etant donn\u00e9 les difficult\u00e9s rencontr\u00e9es dans cette voie de synth\u00e8se, nous avons pr\u00e9f\u00e9r\u00e9 concentrer nos efforts sur la deuxi\u00e8me voie de synth\u00e8se qui consiste en la *N*-glycosylation des d\u00e9riv\u00e9s ribofuranoides aminoxyacides.

CHAPITRE 4
VERS LA SYNTHÈSE D'OLIGOMÈRES DE NUCLEOSIDES AMINOXY
ACIDES A PARTIR DU GLUCOSE

I. INTRODUCTION

Dans ces travaux de thèse, l'objectif est de créer une nouvelle génération d'oligonucléotides modifiés : les oligomères de nucléosides aminoxy acides. Le chapitre précédent a porté sur la synthèse d'oligomères de nucléosides aminoxy acides **O1** et **O2** via la modification du nucléoside. En raison de difficultés diverses, cette synthèse n'a pas pu aboutir.

Dans cette deuxième partie de travaux de thèse, nous nous intéressons à la synthèse de ces mêmes oligomères de nucléosides aminoxy acides **O1** et **O2** via la modification du ribose.

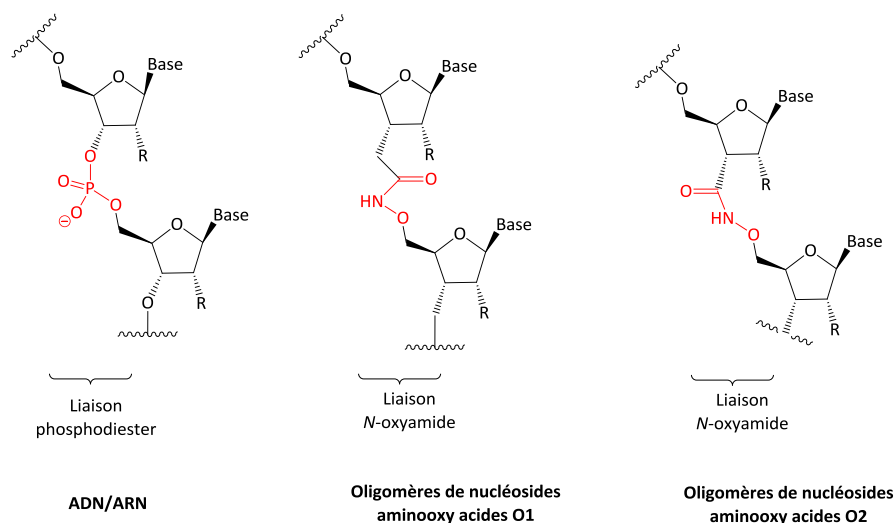


Figure 154 : Structures de l'ADN et l'ARN (à gauche) ainsi que des oligomères de nucléosides aminoxy acides cibles (**O1** au milieu, **O2** à droite). R = H ou OH.

Par ailleurs, ce travail pourra s'inscrire dans la continuité de précédents travaux du laboratoire⁵²⁵ et sera l'occasion de préparer et d'étudier les oligomères de ribofuranoides aminoxy acides **O3** et **O4** (Figure 155). Les oligomères **O3** présentent 6 liaisons entre deux riboses successifs et les oligomères **O4** 5 liaisons. Les propriétés (en particulier structurales) de ces nouveaux oligomères pourront être comparées à celles des oligomères précédemment préparés dans l'équipe.

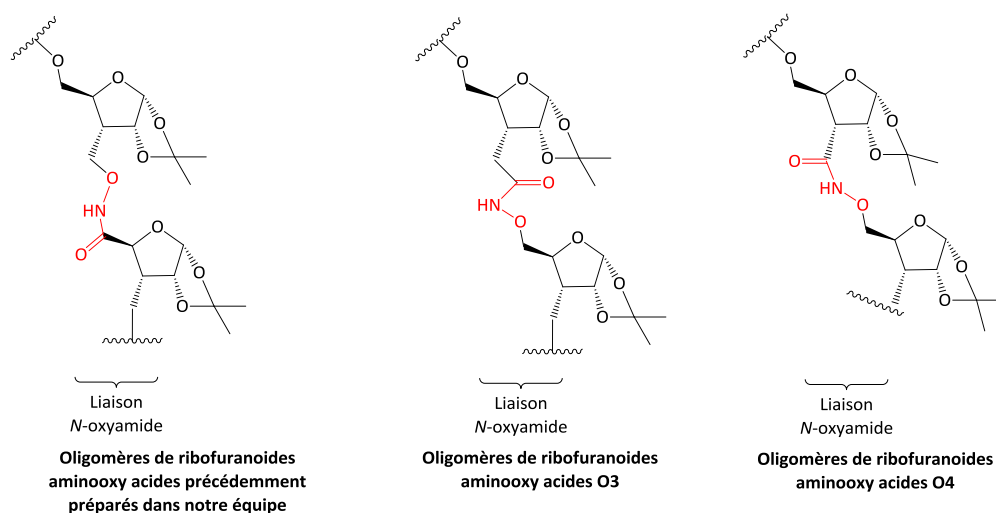


Figure 155 : A gauche : Oligomères de ribofuranoides aminoxy acides déjà préparés dans notre équipe.⁵²⁵ Au milieu et à droite : Oligomères de ribofuranoides aminoxy acides cibles **O3** et **O4**.

On peut noter que les oligomères de ribofuranoides aminooxy acides **O3** et **O4** peuvent, après déprotection, acétylation et *N*-glycosylation de Vorbrüggen, conduire aux oligomères de nucléosides aminooxy acides **O1** et **O2**.⁵³⁴

II. APPROCHE RETROSYNTHETIQUE DES OLIGOMERES DE NUCLEOSIDES AMINOOXY ACIDES CIBLES

Afin de préparer les oligomères de nucléosides aminooxy acides **O1**, il nous faut synthétiser le monomère nucléoside présentant une fonction aminooxyle protégée et une fonction acide carboxylique protégée. Ce monomère peut être obtenu par *N*-glycosylation du dérivé ribofuranoides aminooxy acide protégé correspondant, lui-même préparé à partir du D-(+)-glucose (Schéma 96). Le grand intérêt de cette voie est qu'il s'agit d'une synthèse convergente : les monomères nucléosides aminooxy acides protégés avec différentes bases nucléiques pourront être préparés à partir du même ribofuranoides aminooxy acide protégé.

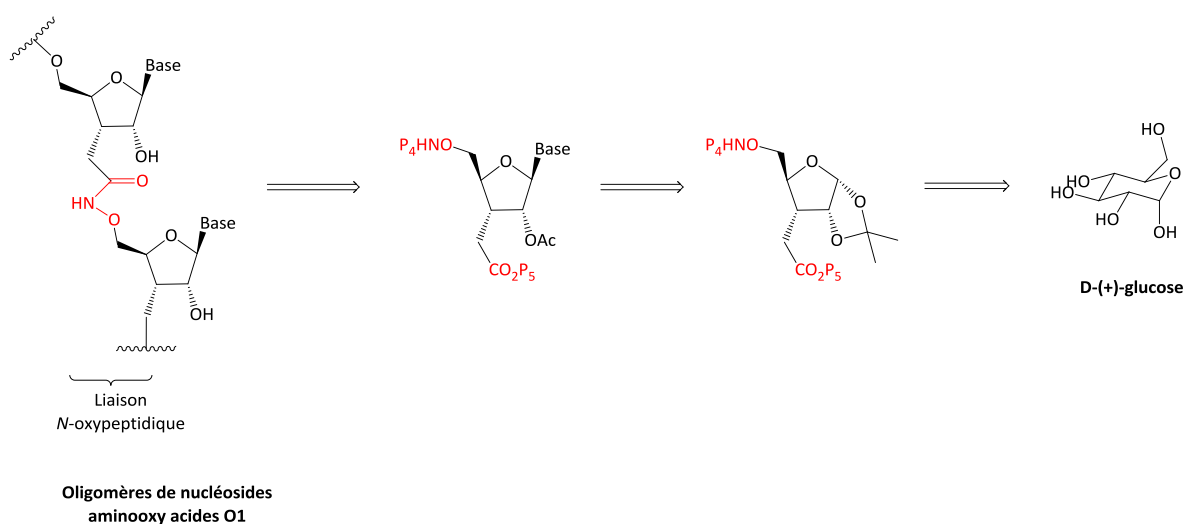


Schéma 96 : Préparation des oligomères de nucléosides aminooxy acides **O1** à partir du D-(+)-glucose. P₄ et P₅ désignent des groupements protecteurs.

Il nous reste à déterminer les groupements protecteurs P₄ et P₅ du monomère nucléoside aminooxy acide. Notre choix s'est porté sur un groupement phthaloyle pour la fonction aminooxyle et une fonction ester allylique pour la fonction acide carboxylique (Figure 156 à gauche). Les conditions de déprotection de ces deux fonctions sont orthogonales. Le choix de la protection de l'acide carboxylique par un ester allylique s'explique principalement par les conditions de déprotection douces et sélectives de ce groupement (Pd⁰ en présence d'un nucléophile).^{535,536} Protéger la fonction aminooxyle sous forme d'un phthaloyle facilite les étapes d'introduction de la liaison N-O (réaction de Mitsunobu ou substitution nucléophile) et de déprotection (hydrazinolyse). Ce monomère nucléoside serait obtenu par *N*-glycosylation du monomère ribofuranoides aminooxy acide protégé correspondant (Figure 156 à droite). Les hydroxyles en position 1 et 2 de ce monomère ribofuranoides sont protégés sous forme d'un acétal dont les conditions de déprotection (milieu acide) sont orthogonales à celles de la fonction aminooxyle et de la fonction acide carboxylique.

⁵³⁴ J. Sengupta, A. Bhattacharjya, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6860-6863.

⁵³⁵ H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1984**, *23*, 71-72.

⁵³⁶ S. Makino, Y. Ueno, M. Ishikawa, Y. Kayakawa, T. Hata, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2775-2778.

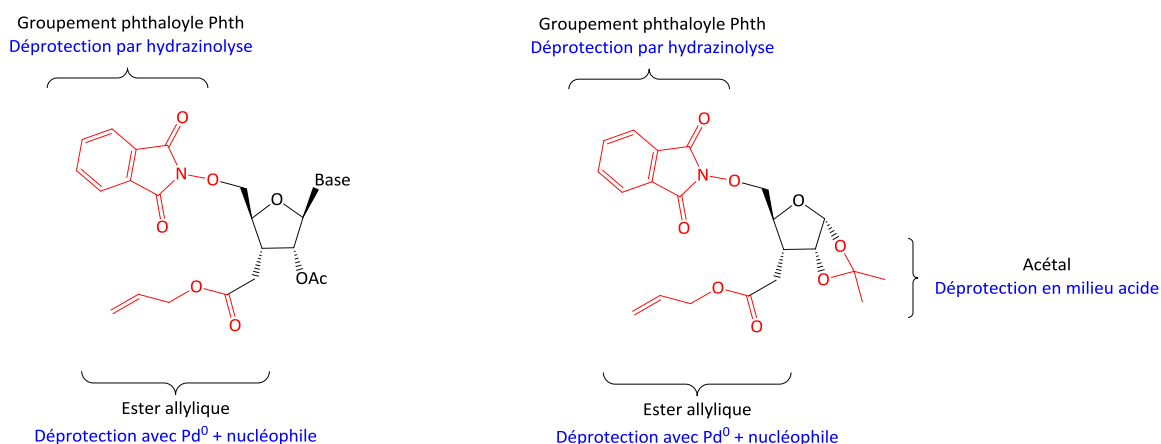


Figure 156 : Choix des groupements protecteurs du monomère nucléoside aminoxy acide (à gauche) et du monomère ribofuranoïde aminoxy acide (à droite). Les conditions de déprotection des fonctions clés sont indiquées en bleu.

La liaison N-O peut être introduite par une réaction de Mitsunobu avec le *N*-hydroxyphthalimide. Cela nous conduit à nous intéresser à la formation de l'alcool en position 5 du ribose. Cet alcool **G9** peut être obtenu après déprotection, coupure oxydante et réduction du composé diacétal **G5**. Ce dernier peut provenir de la réduction stéréosélective de la double liaison C=C de l'ester allylique α,β -insaturé **G4** obtenu par réaction de Wittig sur la cétone **G2**. Cette cétone provient de la protection en diacétal suivie de l'oxydation du D-(+)-glucose (Schéma 97). Durant cette synthèse, il faudra porter attention à la stéréosélectivité de l'étape de réduction de la double liaison carbone-carbone et s'assurer de l'absence d'épimérisation.

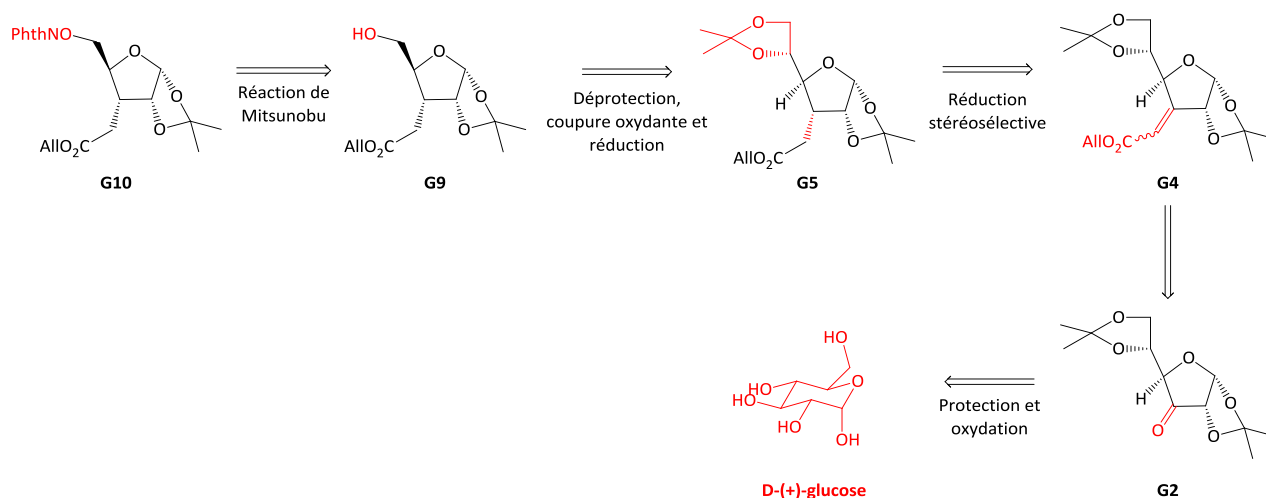
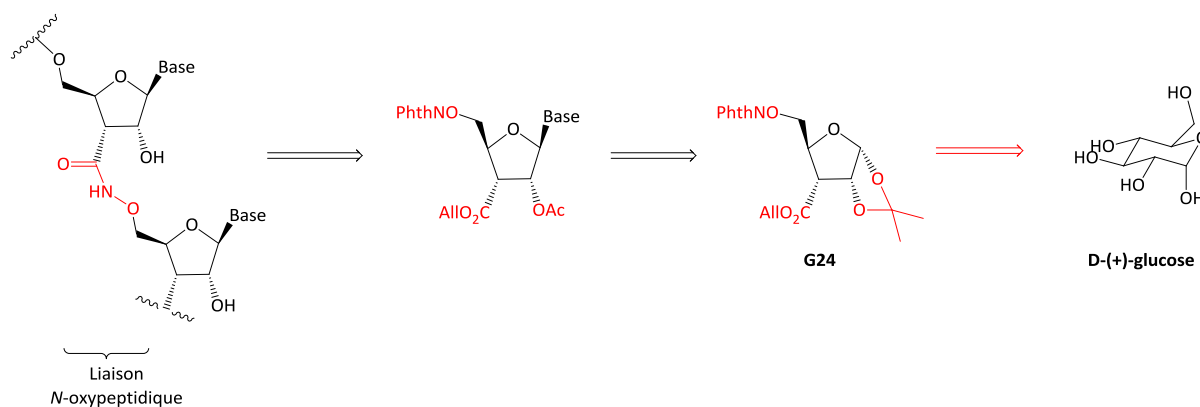


Schéma 97 : Approche rétrosynthétique du monomère ribofuranoïde phthalimidoxy ester **G10**.

Une démarche analogue avec les mêmes groupements protecteurs peut être appliquée pour la synthèse des oligomères de nucléosides aminoxy acides **O2** (Schéma 98) : le monomère nucléoside provient de la *N*-glycosylation du dérivé ribofuranoïde aminoxy acide protégé, lui-même obtenu à partir du D-(+)-glucose.



Oligomères de nucléosides
aminooxy acides **O2**

Schéma 98 : Approche rétrosynthétique des oligomères de nucléosides aminooxy acides **O2** à partir du D-(+)-glucose.

La synthèse du monomère ribofuranoïde aminooxy acide protégé demande quelques ajustements par rapport à la synthèse précédente (Schéma 99). En effet, l'acide carboxylique **G19** peut être obtenu par une réaction d'oxydation de l'alcool **G18** obtenu par une réaction de Wittig suivie d'une hydroboration avec la cétone **G2**. Cet acide carboxylique est ensuite estérifié en ester **G20**. La suite de la synthèse est similaire à celle du Schéma 97.

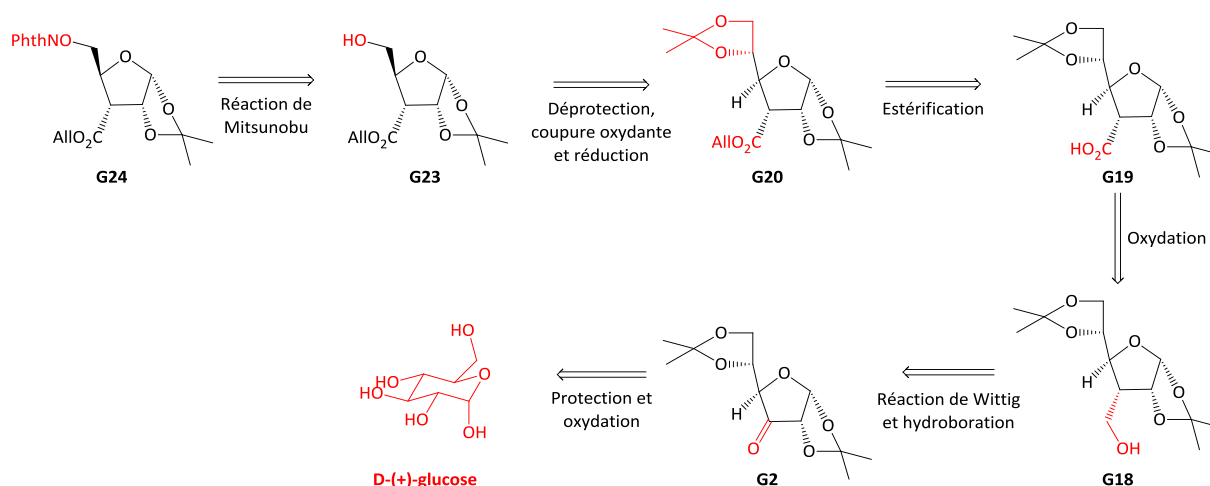


Schéma 99 : Approche rétrosynthétique du monomère ribofuranoïde phthalimidoxy ester **G22**.

Les travaux de ce chapitre ont été effectués en parallèle de ceux du chapitre précédent.

III. SYNTHÈSE DES RIBOFURANOÏDES AMINOOXY ACIDES

III.1. Synthèse et déprotection du phthalimidoxy ester **G10**

III.1.a. Synthèse du phthalimidoxy ester **G10**

III.1.a.i. Préparation du diacétal ester **G5**

Lorsqu'il est protégé avec deux acétonides sous contrôle thermodynamique, le D-(+)-glucose est sous forme ribofuranose. Dans le di-*O*-isopropylidène-D-glucose, tous les hydroxyles à l'exception

de celui en position 3 sont protégés. Par conséquent, ce composé nous permettra de travailler sur la fonctionnalisation du carbone C₃.

Ce composé est obtenu en traitant le D-(+)-glucose avec l'acétone en présence d'un acide de Brønsted ou de Lewis (FeCl₃,⁵³⁷ H₂SO₄,⁵³⁸ H₃PO₄ avec ZnCl₂,⁵³⁹ etc.). Le diiode a montré son utilité dans des réactions très diverses (estérifications, cycloadditions, etc.).⁵⁴⁰ En particulier, il permet de catalyser des acétalisations de manière relativement douce et sélective.^{541,542} Ainsi, la réaction du D-(+)-glucose avec du diiode (0,21 équivalents) dans l'acétone à reflux pendant 3 heures conduit, après traitement, au di-*O*-isopropylidène-D-glucose **G1** avec un rendement de 83% (Schéma 100).

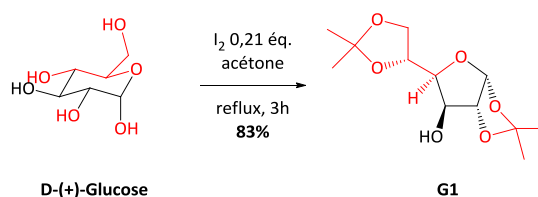


Schéma 100 : Préparation du 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène-D-glucose **G1**.

L'hydroxyle en position 3 est prêt à être oxydé. Ces oxydations se font usuellement avec des composés de chrome (VI),^{543,544} avec l'oxydation de Swern ou ses variantes,⁵⁴⁵ avec le dioxyde de ruthénium (IV),⁵⁴⁶ etc. Nous avons alors préféré utiliser les mêmes conditions douces et propres que pour l'oxydation du 2',5'-di-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)uridine **U1** en 3'-oxo-2',5'-di-*O*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)uridine **U4**.

Ainsi, nous avons mis à réagir en milieu biphasique le di-*O*-isopropylidène-D-glucose **G1** avec du TEMPO (1 équivalent) en présence de NaOCl (berlingot d'eau de Javel) et de KBr (0,1 équivalent). Après 1h30 d'agitation à 0°C et 30 minutes à TA, nous obtenons un brut réactionnel non analysable par CCM. Le spectre RMN ¹H de ce brut révèle qu'il est composé de deux produits en proportions variables selon les essais. Les deux produits, trainants sur silice, ne sont pas purifiables par chromatographie sur colonne. Un des produits est identifié comme étant la cétone **G2**. L'autre produit **G3** n'est pas identifié et nous faisons l'hypothèse qu'il s'agit du produit résultant de l'épimérisation en C₄⁵⁴⁷ ou de l'hydrate de la cétone. Pour des raisons de temps, nous ne cherchons pas à exploiter davantage cette méthode et préférons nous tourner vers une oxydation au chrome (VI) en suivant le mode opératoire d'Ellermann.⁵⁴⁴ Ainsi, la réaction du di-*O*-isopropylidène-D-glucose **G1** avec du PDC (dichromate de pyridinium, 0,71 équivalent) en présence d'anhydride acétique (4,18 équivalents) dans le dichlorométhane au reflux pendant 30 minutes puis sous agitation durant une nuit à TA fournit, après filtration sur galette de silice, la cétone **G2** attendue avec un rendement de 71% (Schéma 101).

⁵³⁷ S. G. Deshpande, T. Pathak, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2255-2258.

⁵³⁸ S. Hanessian, O. M. Saavedra, F. Xie, N. Amboldi, C. Battistini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 439-442.

⁵³⁹ S. Quant, R. W. Wechselberger, M. A. Wolter, K. H. Wörner, P. Schell, J. W. Engels, C. Griesinger, H. Schwalbe, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6649-6652.

⁵⁴⁰ A. K. Banerjee, W. Vera, H. Mora, M. S. Laya, L. Bedoya, E. V. Cabrera, *J. Sci. Ind. Res.* **2006**, *65*, 299-308.

⁵⁴¹ K. P. R. Kartha, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3415-3416.

⁵⁴² A. M. Ona, T. Shiina, A. Ono, M. Kainosho, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2793-2796.

⁵⁴³ B. Doboszewski, P. Herdewijn, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5551-5562.

⁵⁴⁴ M. Ellermann, R. Paulini, R. Jakob-Roetne, C. Lerner, E. Borroni, D. Roth, A. Ehler, W. B. Schweizer, D. Schlatter, M. G. Rudolph, F. Diederich, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6369-6381.

⁵⁴⁵ V. V. Filichev, M. Brandt, E. B. Pedersen, *Carbohydr. Res.* **2001**, *333*, 115-122.

⁵⁴⁶ S. Torii, T. Inokuchi, S. Matsumoto, T. Saeki, T. Oki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 2108-2110.

⁵⁴⁷ K. N. Slessor, A. S. Tracey, *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 3989-3995.

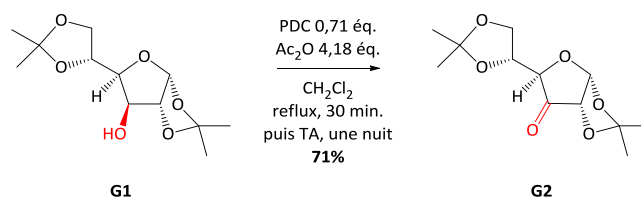


Schéma 101 : Oxydation par le PDC du 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène- α -D-glucose **G1** en 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène-3-oxo- α -D-glucosé **G2**.

Après nos travaux, une oxydation de **G1** au TEMPO⁵⁴⁸ a été publiée dans la littérature : l'oxydation dans un milieu eau/CH₂Cl₂ de l'alcool **G1** en présence de NaBr (0,1 équivalent), de TEMPO (0,5 mol%) et de NaOCl (1,45 équivalent, berlingot d'eau de Javel) à -5/-10°C pendant 35 minutes fournit après traitement et avec un rendement d'environ 90% un mélange de la cétone **G2** et de l'hydrate de cétone **G3** (Schéma 102). Les proportions de **G2** et **G3** sont variables. Une purification par distillation sous pression réduite est nécessaire pour obtenir la cétone **G2** pure. Ce résultat est cohérent avec nos travaux et permet d'identifier le sous-produit obtenu.

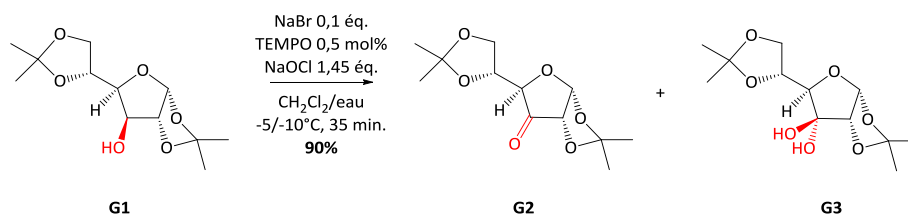


Schéma 102 : Oxydation par le TEMPO du 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène-D-glucose **G1** en 1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène-3-oxo- α -D-glucosé **G2**.⁵⁴⁸

Cette cétone peut maintenant être engagée dans une réaction de Wittig pour former l'ester allylique α,β -insaturé **G4**. Cela demande de préparer le phosphonium correspondant **I4**. Pour préparer ce dernier, il faut d'abord synthétiser l' α -bromoester **I3** correspondant. Nous suivons pour cela le mode opératoire mis au point par l'équipe d'Hoye.⁵⁴⁹ Le bromure de bromoacétyle est mis à réagir avec l'alcool allylique (1,05 équivalent) en présence de pyridine (1,04 équivalent) dans le dichlorométhane pendant une nuit à TA. L' α -bromoester **I3** est obtenu sous forme d'une huile jaunâtre très volatile avec un rendement de 95% (Schéma 103). Le bromure de phosphonium **I4** est ensuite préparé en faisant réagir **I3** avec la triphénylphosphine dans le minimum de toluène à TA pendant 4 heures (Schéma 103).⁵⁵⁰

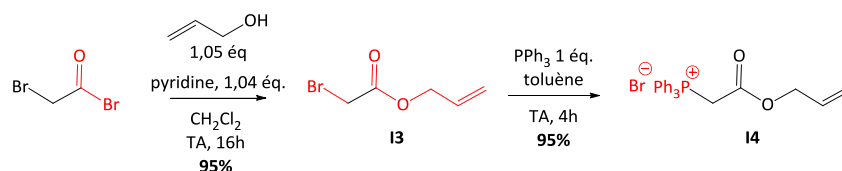


Schéma 103 : Préparation du bromure de phosphonium **I4**.

L'équipe de Winssenger a effectué une réaction de Wittig avec le phosphonium **I4**.⁵⁵¹ Nous avons donc adapté leur protocole : la cétone **G2** est mise à réagir avec le bromure de phosphonium **I4** en présence de la diisopropyléthylamine (DIPEA, 1,3 équivalent) dans le toluène à 80°C pendant une heure. L'ester α,β -insaturé **G4** est obtenu sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères

⁵⁴⁸ M. Turks, V. Rodins, E. Rolava, P. Ostrovskis, S. Belyakov, *Carbohydr. Res.* **2013**, 375, 5-15.

⁵⁴⁹ T. R. Hoye, J. Jeon, L. C. Kopel, T. D. Ryba, M. A. Tennakoon, Y. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 6151-6155.

⁵⁵⁰ F. Castañeda, C. Aliaga, C. Acuña, P. Silva, C. A. Bunton, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2008**, 5, 1188-1208.

⁵⁵¹ F. Debaene, J. A. Da Silva, Z. Pianowski, F. J. Duran, N. Winssinger, *Tetrahedron* **2007**, 63, 6577-6586.

que nous n'avons pas cherché à identifier étant donné que l'étape suivante est une réduction de la double liaison carbone-carbone (Schéma 104). Lors de différents essais, nous avons pu constater l'importance d'ajouter à chaud la DIPEA. En effet, si celle-ci n'est pas ajoutée lorsque le milieu réactionnel est chaud, on observe de très nombreuses réactions secondaires.

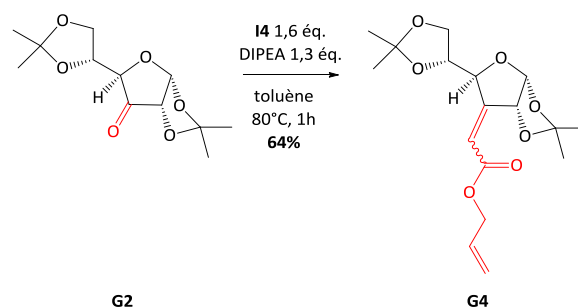


Schéma 104 : Réaction de Wittig pour former l'ester allylique α,β -insaturé **G4** sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères.

Il nous faut maintenant réduire chimiosélectivement et stéréosélectivement la double liaison C=C de l'ester α,β -insaturé **G4**. Cette réduction devant être sélective de la double liaison conjuguée, une hydrogénation classique n'est pas envisageable. En générant *in situ* du borure de nickel Ni_2B qui a une activité proche de celle du nickel de Raney,⁵⁵² le système $\text{NiCl}_2/\text{NaBH}_4$ a permis de réduire des doubles liaisons d'esters α,β -insaturés.^{553,554} Par conséquent, l'ester allylique α,β -insaturé **G4** est mis à réagir avec $\text{NiCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,36 équivalent) et NaBH_4 (8 équivalents) dans du méthanol pendant 1 heure à 0°C et une nuit à TA. Malheureusement, la RMN ^1H du brut réactionnel obtenu montre que la double liaison allylique a été réduite. Le composé **G5** n'a donc pas pu être obtenu par cette méthode (Schéma 105).

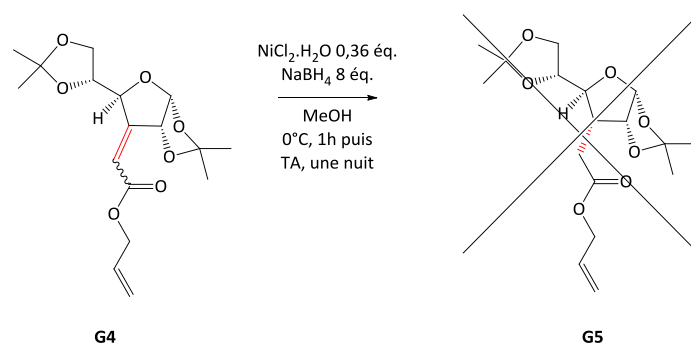


Schéma 105 : Essai de réduction de la double liaison C=C de l'ester allylique α,β -insaturé **G4** en utilisant le système $\text{NiCl}_2/\text{NaBH}_4$ dans le méthanol.

Afin de favoriser l'addition conjuguée, nous avons décidé de mener cette réduction avec NaBH_4 seulement. Ainsi, nous avons mis à réagir l'ester α,β -insaturé **G4** avec 2 équivalents de NaBH_4 pendant une nuit à TA. Sur CCM, on note la formation de deux produits non révélables sous irradiation à 254 nm. L'analyse RMN ^1H du brut réactionnel révèle qu'il y a eu réduction de la liaison C=C de l'ester α,β -insaturé mais aussi partiellement de la liaison C=C allylique. Nous avons enfin effectué cette réaction dans les mêmes conditions en ajoutant du chlorure de lithium pour activer l'électrophilie de l'ester. Le résultat obtenu est similaire : la double liaison allylique est réduite.

⁵⁵² C. A. Brown, H. C. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 1003-1005.

⁵⁵³ A. Dondoni, D. Perrone, M. T. Semola, *J. Org. Chem.* **1996**, *60*, 7927-7933.

⁵⁵⁴ J. Xie, A. Molina, S. Czernecki, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 481-498.

Cette réduction chimiosélective nous paraissant compliquée à contrôler, nous préférons contourner cette difficulté en passant par l'ester éthylique α,β -insaturé qui ne posera pas de problèmes de chimiosélectivité lors de la réduction de la double liaison carbone-carbone. Nous modifions donc l'approche rétrosynthétique selon le Schéma 106.

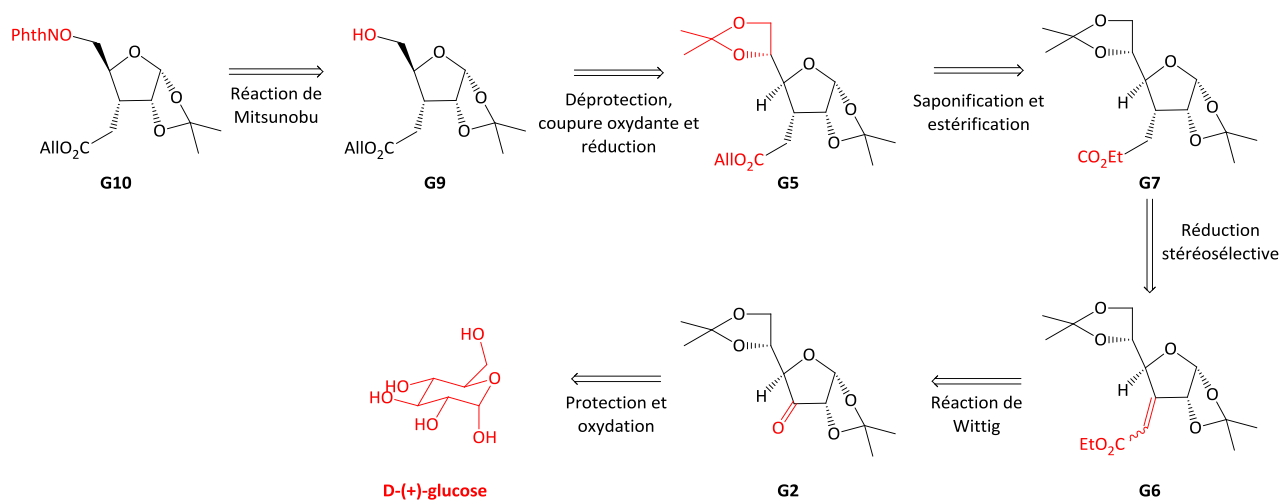


Schéma 106 : Nouvelle approche rétrosynthétique.

Dans cette nouvelle approche, la réaction de Wittig doit être effectuée avec le phosphorane **11**. En suivant les travaux de Xavier et Rauter,⁵⁵⁵ la cétone **G2** est mise à réagir avec le phosphorane **11** (1,26 équivalent) dans le dichlorométhane à reflux pendant 3 heures. L'ester éthylique α,β -insaturé **G6** est obtenu sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères avec un rendement de 77% (Schéma 107).

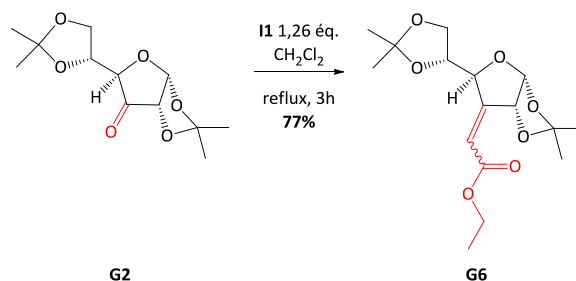


Schéma 107 : Réaction de Wittig pour former l'ester éthylique α,β -insaturé **G6** sous forme d'un mélange de deux diastéréoisomères.

L'étape suivante est la réduction de la double liaison carbone-carbone. La face inférieure de la double liaison étant encombrée par l'acétal en position 1,2, la réduction devrait se faire sur la face supérieure et mener ainsi au produit attendu avec une bonne stéréosélectivité. Cette réduction peut se faire par hydrogénation catalytique⁵⁵⁶ ou avec le borohydrure de sodium.⁵⁵⁷ Nous choisissons de l'effectuer avec NaBH_4 (8 équivalents) dans le méthanol pendant 3 jours à TA. L'ester attendu est obtenu quantitativement (Schéma 108). La vérification de la configuration du carbone asymétrique nouvellement formé est effectuée en comparant les caractérisations du produit obtenu avec celles du produit décrit dans la littérature.⁵⁵⁶ On pourra relever la facilité pratique de cette méthode par

⁵⁵⁵ N. M. Xavier, A. P. Rauter, *Org. Lett.* **2007**, 9, 3339-3341.

⁵⁵⁶ M. Himmelbauer, J. B. Farcet, J. Gagnepain, J. Mulzer, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 8214-8244.

⁵⁵⁷ L. Liu, M. H. D. Postema, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8602-8603.

rapport aux méthodes d'hydrogénation classiques qui requiert la manipulation de nickel de Raney ou de Pd/C avec de hautes pressions en dihydrogène.

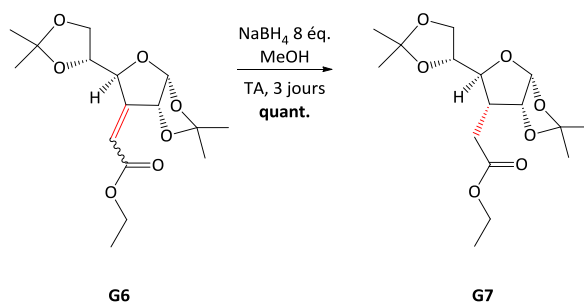


Schéma 108 : Réduction de l'ester éthylique α,β -insaturé **G6** pour former l'ester **G7**.

Transformer cet ester éthylique **G7** en ester allylique **G5** demande de le saponifier.⁵⁵⁸ Cette saponification s'effectue avec des conditions classiques (LiOH 21,7 équivalents dans THF/eau 1/1 pendant une nuit à TA) et fournit l'acide carboxylique attendu **G8** avec un rendement de 78% (Schéma 109). La formation de l'ester allylique **G5** s'effectue avec des conditions de substitution nucléophile : bromure d'allyle (6 équivalents), NaHCO₃ (2,5 équivalents) dans le DMF à 60°C pendant 3 jours.⁵⁵⁹ Une purification par chromatographie sur colonne de silice fournit l'ester **G5** avec un rendement de 70% (Schéma 109).

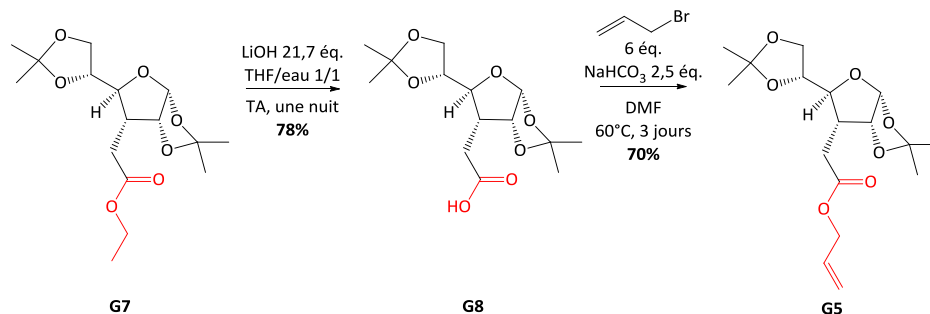


Schéma 109 : Saponification de l'ester **G7** puis formation de l'ester allylique **G5**.

III.1.a.ii. Préparation de l'alcool **G9**

Nous avons donc réussi à contourner la difficulté de la réduction chimiosélective de l'ester allylique α,β -insaturé **G4** et avons obtenu l'ester **G5**. Il nous faut maintenant transformer sélectivement⁵⁶⁰ l'acétal en position 5,6 en alcool. Cet acétal est plus sensible en milieu acide que l'acétal en position 1,2. Le passage de ce diacétal à l'alcool correspondant est décrit dans la littérature sur des structures proches (Schéma 110).⁵⁶¹

⁵⁵⁸ M. H. D. Postema, J. L. Piper, L. Liu, J. Shen, M. Faust, P. Andreana, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4748-4754.

⁵⁵⁹ M. S. Stanley, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6421-6430.

⁵⁶⁰ G. Guillermin, M. Muzard, C. Glapski, S. Pilard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5803-5807.

⁵⁶¹ H. B. Mereyala, R. R. Gadikota, *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 743-751.

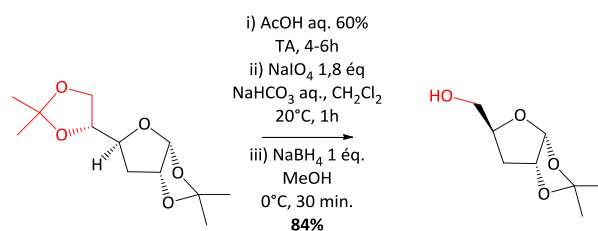


Schéma 110 : Formation de l'alcool en position 5 à partir du diacétal.⁵⁶¹

Nous traitons donc le diacétal **G5** par de l'acide acétique aqueux à 75%. Afin de prendre le maximum de précautions vis-à-vis de l'acétal en position 1,2, nous effectuons cette réaction à 0°C pendant 45 minutes. Comme aucune déprotection ne se produit, on laisse la température remonter à TA et on agite pendant 2 heures. La réaction n'avançant pas, on chauffe à 40°C pendant 2 heures : un nouveau produit se forme. La RMN ¹H du brut réactionnel montre qu'il y a bien eu déprotection sélective de l'acétal en position 5,6 (rendement brut 87%). Le diol vicinal obtenu doit maintenant subir un clivage oxydant. Pour cela, il est mis à réagir avec 2,2 équivalents de NaIO₄ dans un milieu EtOH/eau 5/1 pendant 30 minutes à 0°C. La RMN ¹H du brut confirme la formation de l'aldéhyde (rendement brut 87%). Une purification de cet aldéhyde conduit à une importante perte de matière. La réduction de l'aldéhyde non purifié par NaBH₄ (2 équivalents) dans le méthanol pendant une nuit à TA mène à la formation de l'alcool **G9** avec un rendement brut de 86%. L'alcool est donc obtenu avec un rendement brut de 65% à partir du diacétal **G5** (Schéma 111). On notera que le spectre RMN ¹H de l'alcool brut obtenu est très propre alors que ce n'est pas le cas de ceux des intermédiaires diol et aldéhyde.

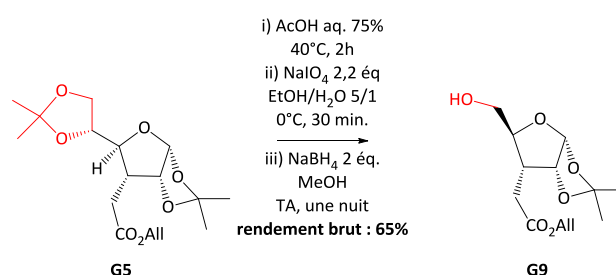


Schéma 111 : Préparation de l'alcool **G9** à partir du diacétal **G5**.

Un nouvel examen de la littérature nous a alors guidés vers une réaction permettant la préparation de l'alcool **G9** directement à partir de l'ester α,β -insaturé **G4**. En effet, l'équipe de Robins a préparé l'alcool suivant directement à partir de l'ester éthylique α,β -insaturé **G6** et ce, sans purification des intermédiaires et avec un excellent rendement (Schéma 112).⁵⁶² L'acide périodique H₅IO₆ permet la déprotection de l'acétal en position 5,6 et la coupure oxydante du diol obtenu. La deuxième étape est la réduction par NaBH₄ de l'aldéhyde et de la double liaison C=C de l'ester α,β -insaturé. La réduction de la double liaison C=C se fait sélectivement sur la face supérieure. Cette stéréosélectivité s'explique par la réaction initiale entre l'hydroxyle en position 5 et le borohydrure, dirigeant ce dernier sur la face supérieure de l'ester α,β -insaturé.⁵⁶³

⁵⁶² M. Xie, D. A. Berges, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5178-5179.

⁵⁶³ K. Lee, D. F. Wiemer, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7808-7812.

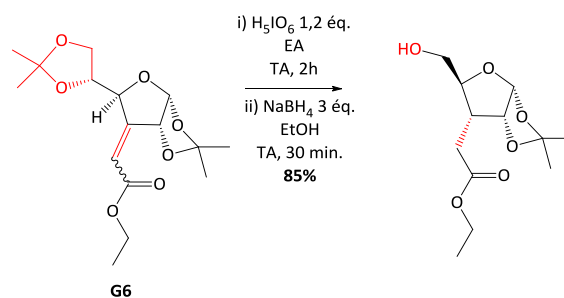


Schéma 112 : Préparation de l'alcool à partir de l'ester allylique α,β -insaturé **G6**.⁵⁶³

Nous avons donc appliqué ce mode opératoire similaire sur l'ester allylique α,β -insaturé **G4**. Ainsi, ce dernier a été mis à réagir avec 1,2 équivalents de H_5IO_6 dans l'acétate d'éthyle à TA pendant 2 heures puis avec 3 équivalents de NaBH_4 dans l'éthanol à TA pendant 30 minutes. Après purification par chromatographie sur gel de silice, l'alcool **G9** est obtenu avec un rendement de 63% (Schéma 113). Aucune réduction de la double liaison $\text{C}=\text{C}$ allylique n'est observée.

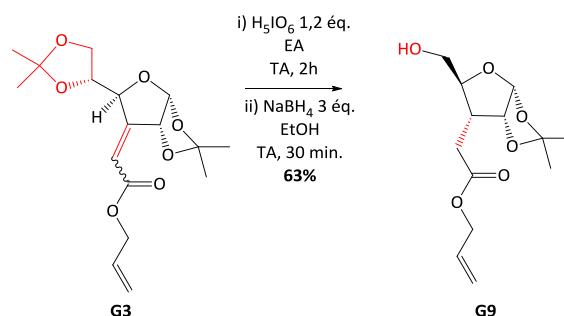


Schéma 113 : Préparation de l'alcool **G9** à partir de l'ester allylique α,β -insaturé **G3**.

Cette réaction est particulièrement intéressante car elle permet d'éviter plusieurs étapes et de simplifier la préparation de l'alcool **G9** à partir du D-(+)-glucose (Schéma 114). Ainsi, l'alcool **G9** est obtenu à partir de la cétone **G2** en deux étapes avec un rendement de 40% alors qu'avec la voie précédente, l'alcool **G9** est obtenu à partir de la cétone **G2** en quatre étapes avec un rendement brut de 35%.

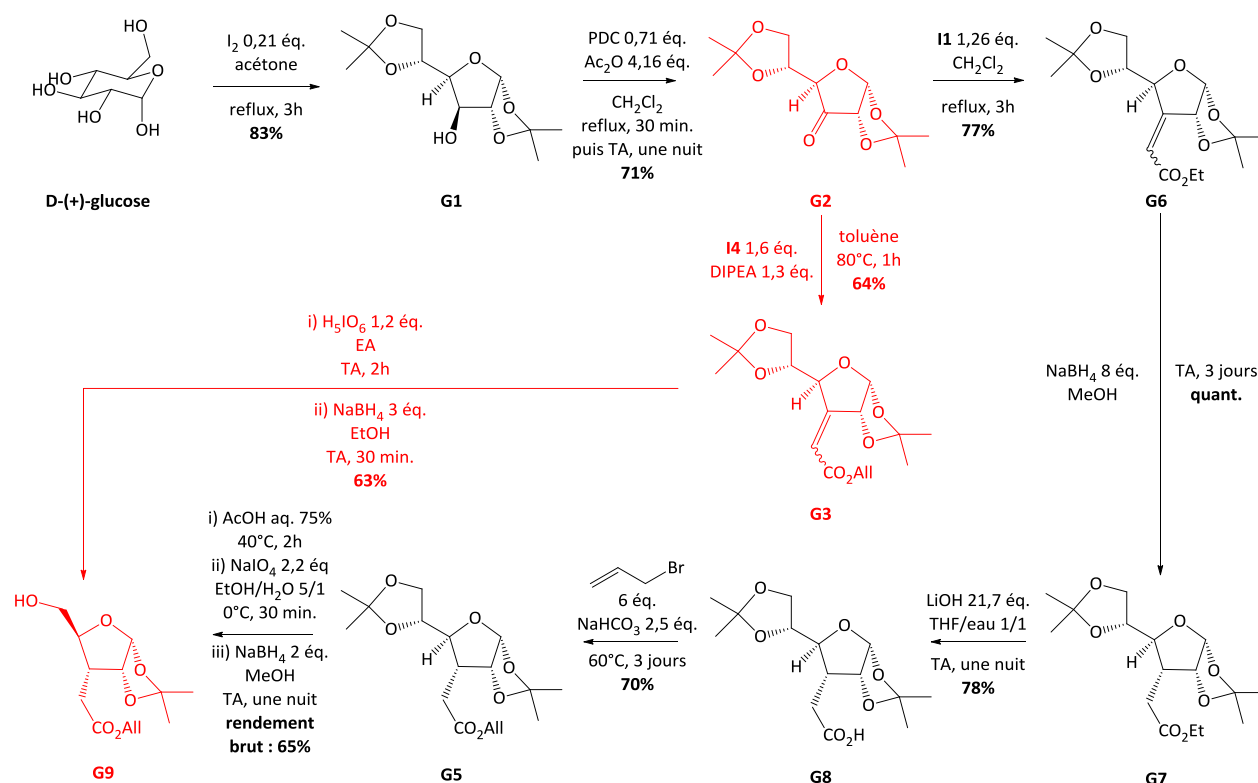


Schéma 114 : Voies de préparation de l'alcool G9 à partir du D-(+)-glucose.

III.1.a.iii. Introduction de la liaison N-O par une réaction de Mitsunobu

Une réaction de Mitsunobu avec le *N*-hydroxyphthalimide est effectuée avec des conditions classiques : à une solution de l'alcool (1 équivalent) dans le toluène à 0°C sont ajoutés PPh₃ (1,3 équivalent), PhthNOH (1,3 équivalent) puis le DIAD (1,5 équivalent) en goutte à goutte. Une couleur rouge brune intense est observée lors de l'ajout de DIAD et après une nuit à TA, l'alcool G9 est totalement converti en phthalimidoxy ester G10 (Schéma 115). Malheureusement, après une purification par chromatographie sur silice, le produit est pollué par de grandes quantités de 1,2-hydrazinedicarboxylate de diisopropyle qui provient du DIAD (Figure 157). De longues colonnes avec différents systèmes de solvant (AE/EP, CH₂Cl₂/MeOH) ou plusieurs colonnes n'y changent rien car l'acylhydrazine traîne tout au long de l'élution.

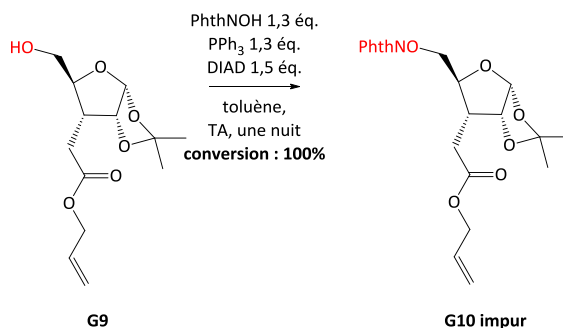


Schéma 115 : Réaction de Mitsunobu sur l'alcool pour former le phthalimidoxy ester G10 contenant de grandes quantités de 1,2-hydrazinedicarboxylate de diisopropyle.

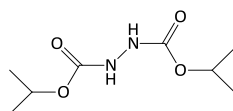


Figure 157 : Structure du 1,2-hydrazinedicarboxylate de diisopropyle.

Ce produit étant un solide, il est possible de le faire précipiter. Malheureusement, des précipitations dans différents solvants ou mélanges de solvants (Et₂O, EP/Et₂O, eau/glace, etc.) ou des recristallisations (EP/Et₂O, Et₂O), ne permettent pas d'éliminer le 1,2-hydrazinedicarboxylate de diisopropyle.

Etant donné que c'est le sous-produit issu du DIAD qui nous pose des difficultés de purification, nous avons donc choisi de remplacer le DIAD par l'azodicarboxylate de di-*tert*-butyle (DBAD).^{339,509} En effet, le DBAD et son acylhydrazine sont converties en produits gazeux par traitement en milieu aqueux acide (Schéma 116). Malheureusement, aucune réaction n'est observée.

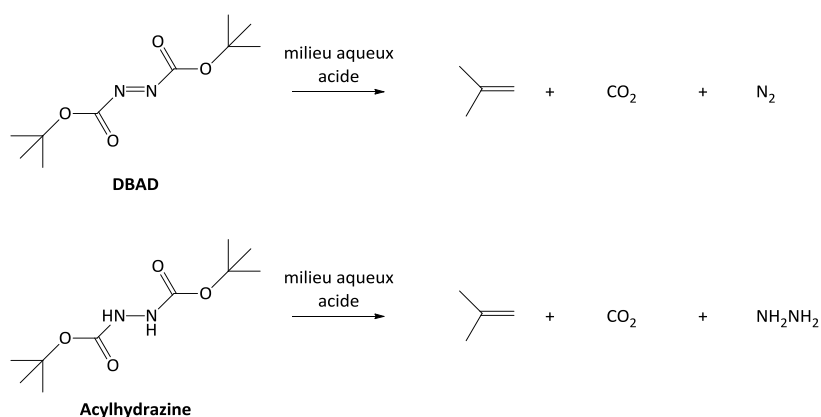


Schéma 116 : Elimination du DBAD et de son acylhydrazine en milieu acide aqueux.⁵⁰⁹

Une équipe a montré la possibilité d'effectuer des réactions de Mitsunobu en remplaçant le DIAD par des azopyridines et en utilisant des acides carboxyliques comme nucléophiles.^{564,565} Ces azopyridines sont facilement obtenues à partir de l'aminopyridine correspondante (Schéma 117).

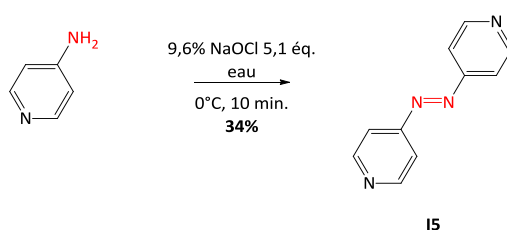


Schéma 117 : Préparation du 4,4'-azopyridine I5.

Nous avons donc mis à réagir l'alcool G9 avec 1,3 équivalent de PhthNOH, 1,3 équivalent de PPh₃ et 1,2 équivalent de I5 dans l'acétonitrile à TA pendant 1h30. Aucune réaction ne se produit. Un chauffage à reflux pendant 1h30 ne permet pas d'avoir une réaction. Cela s'explique par la moindre acidité de PhthNOH par rapport aux acides carboxyliques avec lesquels cette réaction est décrite.⁵⁶⁴

⁵⁶⁴ N. Iranpoor, H. Firouzabadi, D. Khalili, S. Motevalli, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4882-4887.

⁵⁶⁵ N. Iranpoor, H. Firouzabadi, D. Khalili, *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 6913-6915.

D'autres équipes rencontrent des difficultés dans la purification de la réaction de Mitsunobu.⁵⁶⁶ Des solutions très diverses pour l'élimination du 1,2-hydrazinedicarboxylate d'alkyle ont été trouvées :

- utilisation d'azodicarboxylates d'alkyle en quantité catalytique grâce à l'emploi de diacétate d'iodobenzène $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ comme cooxydant ;⁵⁶⁷
- mise au point de nouveaux réactifs permettant une réaction de Mitsunobu catalytique avec une catalyse au $\text{Fe}(\text{II})$ et une oxydation par l'air ;⁵⁶⁸
- mise au point de carboxylates d'azocarbonamide dissymétriques⁵⁶⁹ ou de l'azodicarboxylate de di-2-méthoxyéthyle (DMEAD)⁵⁷⁰ permettant une purification du résidu d'acylhydrazine par un traitement aqueux standard.

Etant donné les difficultés rencontrées lors des étapes ultérieures (cf. ci-dessous), il n'est pas possible de travailler avec le phthalimidooxy ester **G10** contenant de grandes quantités de 1,2-hydrazinedicarboxylate de diisopropyle. Plutôt que d'essayer les nombreuses méthodes listées ci-dessus, nous avons préféré contourner cette réaction de Mitsunobu en introduisant le groupe phthaloyle par une réaction de substitution nucléophile.

III.1.a.iv. Introduction de la liaison N-O par réaction de substitution nucléophile

Etant donné les grandes difficultés rencontrées dans la purification du phthalimidooxy ester **G10**, nous avons alors envisagé d'introduire le groupement phthaloyle par une réaction de substitution nucléophile. Cela demande de transformer l'hydroxyle du composé **G9** en un bon groupe partant. En raison de sa facilité d'introduction et de sa très bonne nucléofugacité, un groupe mésyle est choisi. Le composé mésylé **G11** est obtenu par des conditions classiques de mésylation avec un rendement de 70% (Schéma 118).

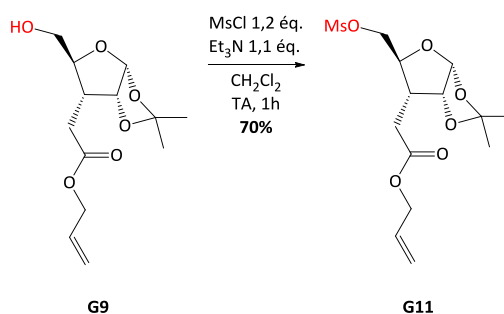


Schéma 118 : Préparation du composé mésylé **G11**.

Pour la réaction de substitution nucléophile, nous choisissons comme solvant le DMF. La réaction entre le composé mésylé **G11** et le *N*-hydroxyphthalimide est extrêmement lente à TA si bien que nous augmentons le nombre d'équivalents de PhthNOH et de DBU et chauffons à 70°C le mélange réactionnel. Un tel mode opératoire fournit le composé **G10** pur avec un rendement de 62% (Schéma 119). Aucune élimination ne se produit et le rendement moyen observé s'explique par une conversion incomplète.

⁵⁶⁶ R. Dembinski, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2763-2772.

⁵⁶⁷ T. Y. S. But, P. H. Toy, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9636-9637.

⁵⁶⁸ D. Hirose, T. Taniguchi, H. Ishibashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4613-4617.

⁵⁶⁹ D. P. Furkert, B. Breitenbach, L. Juen, I. Sroka, M. Pantin, M. A. Brimble, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 7806-7809.

⁵⁷⁰ K. Hagiya, N. Muramoto, T. Misaki, T. Sugimura, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6109-6114.

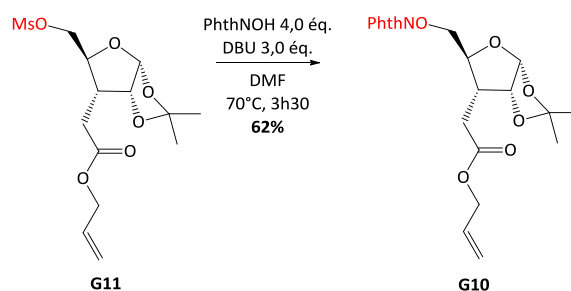


Schéma 119 : Préparation du phthalimidoxy ester **G10** par réaction de substitution nucléophile sur le composé mésylé **G11**.

Bien qu'ayant un rendement moyen, cette réaction nous permet d'obtenir le phthalimidoxy ester **G10** pur.

III.2.b. Déprotection de la fonction aminooxyle et de la fonction acide carboxylique du phthalimidoxy ester **G10**

III.2.b.i. Déprotection de la fonction aminooxyle du composé **G10**

La déprotection d'une fonction aminooxyle protégée par un groupe phthaloyl s'effectue par hydrazinolyse. La littérature faisant état de réactions entre des esters méthyliques et l'hydrazine,^{571,572,573} il faut veiller aux conditions utilisées. Différentes conditions répertoriées dans le Tableau 11 ont été testées. L'utilisation de 1,4 équivalent de méthylhydrazine dans le solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1/1 mène après 2 heures à TA à la formation d'un nouveau produit (entrée 1). Malheureusement, on note, après traitement, la présence d'un grand nombre de tâches sur CCM. De plus, les spectres RMN ^1H du produit obtenu sont parfois très complexes. Suspectant une dégradation, nous choisissons de diminuer le temps de réaction et d'augmenter le nombre d'équivalents de méthylhydrazine (entrée 2). On obtient le même résultat. Nous décidons alors d'effectuer la réaction avec 1,1 équivalent d'hydrazine hydratée (plus réactive que la méthylhydrazine) dans le méthanol à 0°C (entrée 3). De nouveau, l'oxyamine **G12** est obtenue quantitativement mais semble se dégrader (Schéma 120). Par ailleurs, les tentatives pour isoler le chlorhydrate de l'oxyamine **G12** sont restées vaines.⁵⁷⁴

	Conditions
Entrée 1	MeNHNH_2 (1,4 \u00e9q.), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1/1, TA, 2 heures
Entrée 2	MeNHNH_2 (3 \u00e9q.), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1/1, TA, 20 minutes
Entrée 3	$\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,1 \u00e9q.), MeOH, 0°C , 20 minutes

Tableau 11 : Conditions de déprotection de la fonction aminooxyle de **G10**.

⁵⁷¹ R. L. Hinman, D. Ulton, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1895-1900.

⁵⁷² W. J. Theuer, J. A. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *29*, 3734-3735.

⁵⁷³ F. E. Condon, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3608-3615.

⁵⁷⁴ S. M. Johnson, H. M. Petrassi, S. K. Palaninathan, N. N. Mohamedmohaideen, H. E. Purkey, C. Nichols, K. P. Chiang, T. Walkup, J. C. Sacchettini, K. B. Sharpless, J. W. Kelly, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1576-1587.

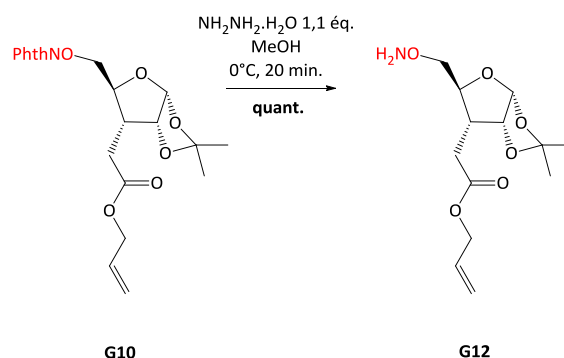


Schéma 120 : Déprotection de la fonction aminooxyle pour obtenir **G12**.

En conclusion, nous avons donc pu obtenir quantitativement l'oxyamine **G12** à partir de **G10**. Celle-ci devra être utilisée sans attendre dans les étapes ultérieures.

III.2.b.ii. Déprotection de la fonction acide carboxylique de **G10**

Une fonction acide carboxylique protégée sous forme d'un ester allylique se déprotège avec du palladium au degré d'oxydation 0 en présence d'un nucléophile (Schéma 121).⁵⁷⁵ D'autres nucléophiles⁵⁷⁵ sont utilisables : *n*BuNH₂, Et₃N, HCOOH/*n*BuNH₂, etc. De la triphénylphosphine (0,25 éq.) peut être ajoutée pour faciliter la réduction du Pd(II) en Pd(0). Ces déprotections se font usuellement très facilement et avec d'excellents rendements.

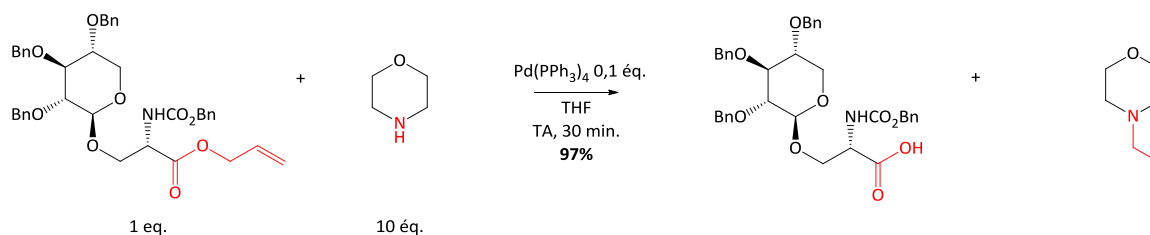
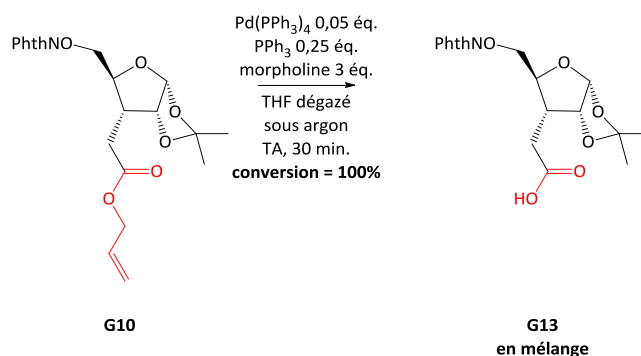


Schéma 121 : Déprotection d'un ester allylique avec du Pd(0) en présence de morpholine.

Le complexe Pd(PPh₃)₄ est préalablement purifié par recristallisation dans l'éthanol absolu sous atmosphère inerte. Il prend alors une couleur jaune poussin. La réaction à TA pendant 1 heure du phthalimidooxy ester **G10** avec 0,05 équivalent de Pd(PPh₃)₄, 0,25 équivalent de PPh₃ et 3 équivalents de morpholine dans le THF dégazé sous argon conduit, après traitement, à un mélange de différents composés. Ce mélange semble contenir l'acide carboxylique attendu **G13** et de nombreux sous-produits non identifiants. La réaction menée dans les mêmes conditions mais sans PPh₃ conduit au même résultat.

Malheureusement, même en travaillant sur la neutralisation du mélange réactionnel (ajout d'acide formique), sur le traitement post réaction (acidification de la phase aqueuse avec l'acide citrique, lavage avec une solution aqueuse d'HCl 1 M, etc.) et sur la purification du produit (par chromatographie sur colonne), nous ne parvenons pas à obtenir une fraction pure. L'acide carboxylique **G13** n'a donc pu être obtenu qu'en mélange complexe (Schéma 122). Nous ne savons pas expliquer l'origine de ces difficultés.

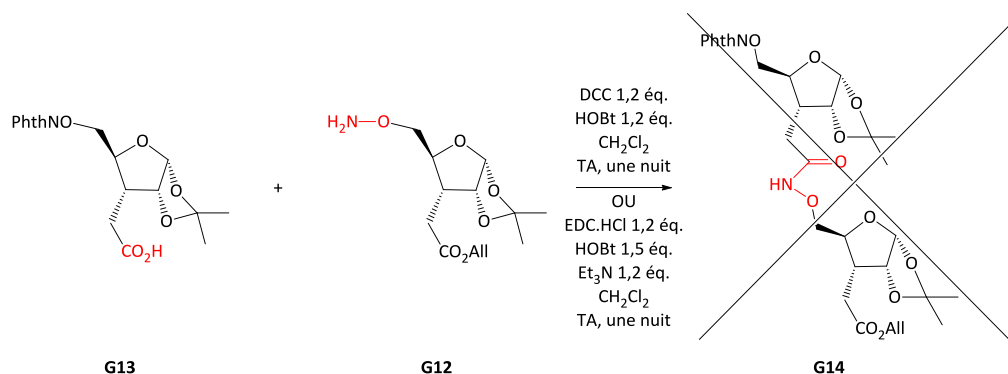
⁵⁷⁵ J. H. Rigby, T. L. Moore, S. Rege, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 2400-2402.

Schéma 122 : Déprotection de la fonction acide carboxylique de **G10**.

Des complexes de ruthénium en présence d'acide formique et de triéthylamine peuvent déprotéger un acide carboxylique protégé sous forme d'un ester allylique.⁵⁷⁶ Nous n'avons malheureusement pas eu le temps d'essayer de telles conditions.

III.2.b.iii. Essais de formation de la liaison *N*-oxyamide

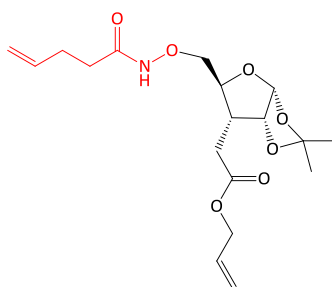
Bien que ni l'oxyamine **G12** ni l'acide carboxylique **G13** ne soit obtenu pur, nous nous sommes penchés sur la synthèse du dimère **G14**. Des essais utilisant la DCC et HOBT dans le dichlorométhane ou EDC.HCl, HOBT et Et₃N dans le dichlorométhane conduisent à la présence de nombreuses tâches sur CCM (Schéma 123). Les tentatives de purification ne nous ont amenés à isoler que la *N*-acylurée. Un résultat similaire est obtenu avec une oxyamine fraîchement préparée.

Schéma 123 : Echec de la réparation du dimère **G14** à partir de **G12** et **G13**.

III.2.b.iv. Conclusion : choix d'un nouveau groupe protecteur pour la fonction aminooxyle

Etant donné nos échecs de déprotection de la fonction acide carboxylique et des difficultés rencontrées avec l'aminooxy ester **G12**, nous choisissons de changer de groupe protecteur et de travailler avec le *N*-penténylaminooxy ester **G15** (Figure 158). Les avantages d'un tel groupement ont été vus dans le chapitre précédent.

⁵⁷⁶ Y. Maruyama, T. Sezaki, M. Tekawa, T. Sakamoto, I. Shimizu, A. Yamamoto, *J. Organomet. Chem.* **1994**, 473, 257-264.



G15

Figure 158 : Structure du *N*-penténylaminooxy ester G15.

Avant de préparer le *N*-penténylaminooxy ester **G15**, nous avons vérifié que les conditions de déprotection de la fonction aminooxyle étaient compatibles avec la présence de l'ester allylique. Pour cela, l'ester allylique α,β -insaturé **G4** est mis en présence de 3 équivalents de diiode dans un milieu MeCN/MeOH/AcOH 3/1/0,001 à reflux pendant 2 heures. La RMN ^1H du brut obtenu montre que l'ester allylique n'est pas sensible à ces conditions.

Nous avons également vérifié qu'aucune isomérisation de la double liaison C=C du groupement penténoyle ne se produisait. Pour cela, une solution de l'acide pent-4-énoïque et de 0,02 équivalents de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ dans le THF dégazé est agitée sous argon pendant 3 heures. Aucune isomérisation n'est mise en évidence.

III.2. Synthèse et déprotection du *N*-penténylaminooxy ester G15

III.2.a. Synthèse du *N*-penténylaminooxy ester G15

Ce composé peut être préparé à partir de l'aminooxy ester **G12**. Différentes conditions opératoires ont été testées (Tableau 12). Pour obtenir le *N*-penténylaminooxy ester **G15**, nous utilisons des conditions de couplage classiques avec 1,2 équivalent d'acide pent-4-énoïque, 1,2 équivalent de DCC, 1,2 équivalent d'HOBt dans le dichlorométhane pendant une nuit à TA (entrée 1). Le produit attendu **G15** est obtenu avec un faible rendement de 24%. Nous faisons l'hypothèse que ce rendement s'explique par la faible quantité d'oxyamine **G12** engagée. Nous effectuons donc la réaction sur une plus grande quantité de produit (entrée 2) mais le rendement n'est pas amélioré. Nous choisissons alors de passer par l'ester activé formé par réaction entre l'acide pent-4-énoïque et le *N*-hydroxysuccinimide (entrée 3).⁵⁷⁷ La réaction est encore moins propre et le produit **G15** n'est pas isolé. Nous essayons alors un autre agent de couplage : le diéthylcyanophosphonate (DEPC).⁵⁷⁸ Ce dernier a précédemment montré son utilité dans le couplage entre une oxyamine et un acide carboxylique.⁵⁷⁹ Malheureusement, le rendement obtenu est encore plus faible (entrée 4). Ayant constaté que les faibles rendements obtenus proviennent de perte de produit lors de la purification sur colonne, nous choisissons d'effectuer cette protection avec des conditions facilitant la purification. Dans cette optique, le composé *N*-oxyamine **G12** est mis à réagir avec l'anhydride pent-4-énoïque **I2** (entrée 5). La réaction est très rapide et complète. Cependant, le rendement n'excède pas 30%.

⁵⁷⁷ G. Vincent, C. Kouklovsky, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2972-2980.

⁵⁷⁸ K. Hayashi, Y. Hamada, T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5075-5076.

⁵⁷⁹ A. Malapelle, R. Ramozzi, J. Xie, *Synthesis* **2009**, 888-890.

	Quantité d'oxyamine G12	Conditions	Résultats
Entrée 1	82 mg	Acide pent-4-énoïque (1,2 éq.), DCC (1,2 éq.), HOBT (1,2 éq.), CH ₂ Cl ₂ , TA, une nuit	Produit obtenu avec un rendement de 24%
Entrée 2	513 mg	Idem	Produit obtenu avec un rendement de 19%
Entrée 3	40 mg	Acide pent-4-énoïque (1,05 éq.), <i>N</i> -hydroxysuccinimide (1,1 éq.), DCC (1,1 éq.), CH ₂ Cl ₂ , TA, 1h30	Nombreux produits en CCM. Produit non isolé
Entrée 4	100 mg	Acide pent-4-énoïque (1 éq.), DEPC (1,5 éq.), Et ₃ N (3 éq.), DMF, TA, 36 heures	Produit obtenu avec un rendement de 11%
Entrée 5	266 mg	I2 (1,6 éq.), CH ₂ Cl ₂ /MeOH 4/1, 0°C, 45 minutes	Produit obtenu avec un rendement de 30%

Tableau 12 : Préparation du composé **G15** à partir de **G12**. Tous les produits ont été purifiés par une chromatographie sur colonne de silice.

Aucun des modes opératoires testés ne fournit le produit **G15** avec un rendement satisfaisant. Les mauvais rendements obtenus ne proviennent pas des conditions de réactions mais de la perte de composés lors de la purification sur colonne. Dans la suite de ce travail, nous choisissons d'effectuer cette protection avec l'anhydride pent-4-énoïque **I2** (Schéma 124).

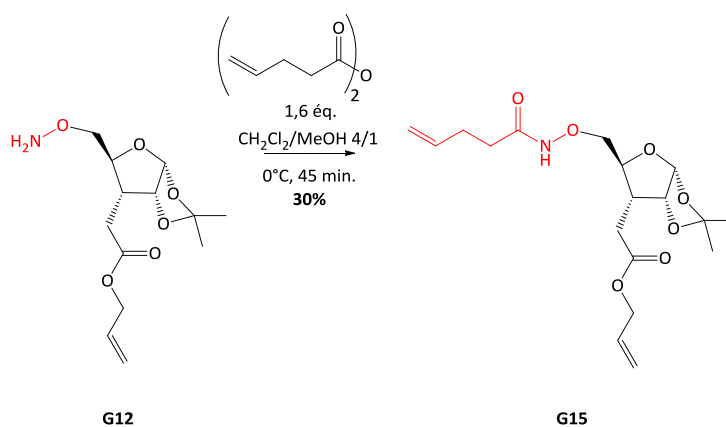


Schéma 124 : Préparation du *N*-pentényloxy ester **G15** à partir de l'aminooxy ester **G12**.

III.2.b. Déprotection de la fonction aminooxyle et de la fonction acide carboxylique du *N*-pentényloxy ester **G15**

III.2.b.i. Déprotection de la fonction acide carboxylique de **G15**

Nous avons vu qu'une telle déprotection se fait avec du Pd(0) en présence d'un nucléophile. Différentes conditions répertoriées dans le Tableau 13 ont été utilisées. Deux nucléophiles (morpholine et HCO₂H/Et₃N) ont été testés (entrées 1 et 2). Ces conditions conduisent à la consommation du produit de départ et à un mélange complexe. Nous modifions alors le traitement post-réaction (entrées 1 à 3). Malheureusement, aucune amélioration n'est notée. Par conséquent, nous n'avons donc pas réussi à obtenir l'acide carboxylique **G16** (Schéma 125).

	Conditions	Traitements	Résultats
Entrée 1	Pd(PPh ₃) ₄ 0,05 éq., PPh ₃ 0,25 éq., morpholine 5 éq., THF, TA, 15 minutes	Ajout d'eau. Lavage au CH ₂ Cl ₂ . Acidification de la phase aqueuse avec de l'acide citrique à 0,5 M. Extraction au CH ₂ Cl ₂	Mélange très complexe non purifiable
Entrée 2	Pd(PPh ₃) ₄ 0,05 éq., PPh ₃ 0,25 éq., Et ₃ N 2 éq., HCO ₂ H 2 éq., THF, TA, 3 heures	Ajout de CH ₂ Cl ₂ et d'une solution d'acide citrique à 0,5 M. Extraction au CH ₂ Cl ₂	
Entrée 3	Pd(PPh ₃) ₄ 0,05 éq., PPh ₃ 0,3 éq., morpholine 3 éq., THF, TA, 2h30	Ajout de 3 éq. de HCO ₂ H à 0°C. Ajout d'une solution d'acide citrique 0,5 M. Extraction au CH ₂ Cl ₂	

Tableau 13 : Essais de déprotection de la fonction acide carboxylique de **G15**. Toutes ces réactions sont effectuées dans un solvant dégazé et sous argon.

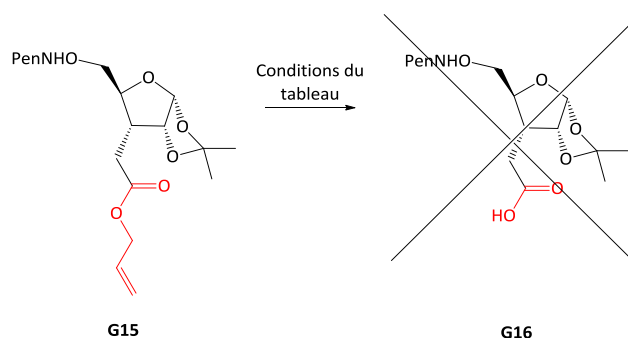


Schéma 125 : Echec de la déprotection de la fonction acide carboxylique de **G15**.

III.2.b.ii. Déprotection de la fonction aminooxyle de **G15**

La déprotection de la fonction aminooxyle (3 équivalents de diiode dans THF/eau à TA pendant 15 minutes) conduit également à une dégradation. L'oxyamine **G12** n'a pas pu être obtenue proprement (Schéma 126).

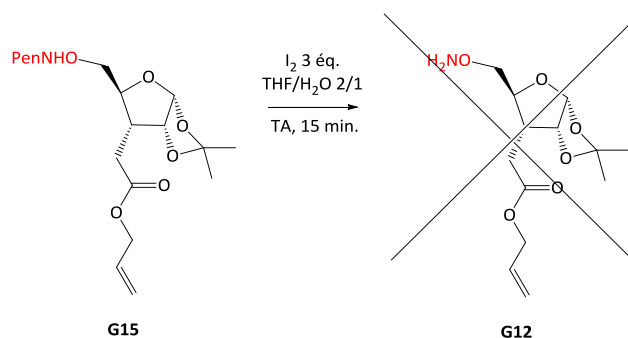


Schéma 126 : Echec de la déprotection de la fonction aminooxyle de **G15**.

III.3. Synthèse du phthalimidoxy ester **G24**

Nous nous intéressons maintenant à la voie de synthèse présentée sur le Schéma 99. Ce travail a été effectué en parallèle du précédent.

La cétone **G2** a été obtenue précédemment. Nous pouvons donc nous pencher directement sur la réaction de Wittig. Pour cela, nous avons repris d'anciens travaux du laboratoire⁵²⁵ et avons obtenu l'alcène **G17** correspondant avec un rendement de 74% (Schéma 127).

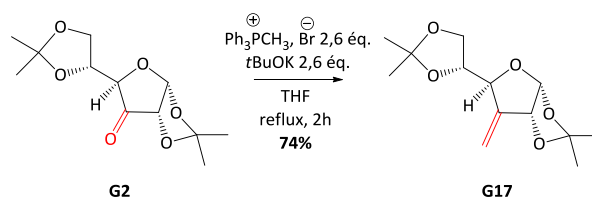


Schéma 127 : Réaction de Wittig conduisant au 3-désoxy-1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène-3-méthylène- α -D-glucofuranose **G17**.

Cet alcène **G17** est engagé dans une réaction d'hydroboration formant l'alcool **G18**.⁵²⁵ Pour cela, il est mis à réagir avec 2,6 équivalents de borane dans le THF anhydre pendant 2 heures à TA. Le trialkylborane résultant est oxydé avec l'eau oxygénée en présence de soude. Après purification sur colonne de silice, l'alcool est obtenu avec un rendement de 65% (Schéma 128).

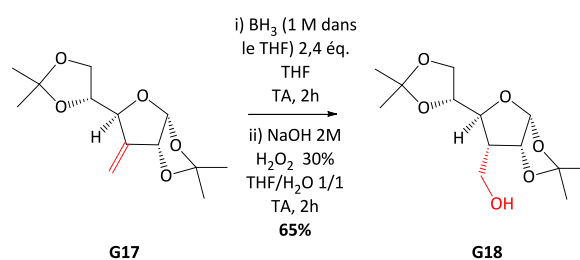


Schéma 128 : Réaction d'hydroboration formant l'alcool **G18**.

Cet alcool est prêt à être oxydé en acide carboxylique. L'équipe de Zhang a oxydé l'hydroxyle en position 5' d'un nucléoside avec du TEMPO (quantité catalytique) en présence de bis(acétoxy)-iodobenzène (BAIB, quantité stœchiométrique) qui joue le rôle de cooxydant.⁵⁸⁰ Décrite en 1999 par Epp et Widlanski,⁵⁸¹ une telle oxydation présente l'intérêt de s'effectuer sans sels métalliques et de former l'iodobenzène et l'acide acétique comme seuls sous-produit, ce qui facilite les purifications. Ainsi, la réaction de l'alcool pendant 3 heures à TA avec du TEMPO (0,20 équivalent) et du BAIB (2,0 équivalent) dans un milieu acétonitrile/eau 1/1 fournit, après une simple précipitation dans l'éther diéthylique, l'acide carboxylique avec un rendement de 59% (Schéma 129).

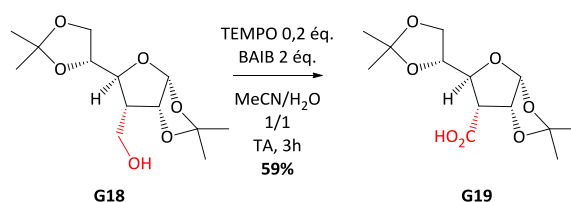


Schéma 129 : Préparation du 3-carboxy-3-désoxy-1,2:5,6-di-*O*-isopropylidène- α -D-glucofuranose **G19** par oxydation.

Il s'agit maintenant de préparer l'ester allylique **G20**. Pour cela, différentes conditions sont testées (Tableau 14). Des conditions de couplage classiques (entrées 1, 2 et 3)⁵⁸² fournissent un mélange de nombreux produits. L'ajout d'un grand excès d'alcool allylique (entrée 4) ne change rien. Nous essayons ensuite des conditions basiques permettant la formation de l'ester par substitution nucléophile sur le bromure d'allyle (entrée 5 et 6). L'utilisation du carbonate de césium (entrée 5) mène à la formation de plusieurs produits. Cela provient probablement de la basicité trop importante de Cs_2CO_3 . Ce sont finalement les mêmes conditions que celles utilisées pour l'ester **G5** qui conduisent à la formation de l'ester attendu avec un excellent rendement de 95% (entrée 6 et

⁵⁸⁰ Y. Xu, H. Jin, Z. Yang, L. Zhang, L. Zhang, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5228-5239.

⁵⁸¹ J. B. Epp, T. S. Widlanski, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 293-295.

⁵⁸² B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 522-524.

Schéma 130). On note qu'un grand excès de bromure d'allyle et de NaHCO₃ est nécessaire pour que la réaction soit complète.

	Conditions	Résultats
Entrée 1	alcool allylique (1,1 éq.), DCC (1,1 éq.), DMAP (0,1 éq.), DMF, TA, une nuit	Consommation du produit de départ. Nombreux produits en CCM
Entrée 2	alcool allylique (2 éq.), DCC (1 éq.), HOAt (1 éq.), AE, TA, une nuit	Consommation du produit de départ. Nombreux produits en CCM
Entrée 3	alcool allylique (1,1 éq.), EDC (1,5 éq.), HOBT (1,5 éq.), CH ₂ Cl ₂ , TA, une nuit	Consommation du produit de départ. Nombreux produits en CCM
Entrée 4	alcool allylique (8 éq.), EDC (1,5 éq.), HOBT (1,5 éq.), CH ₂ Cl ₂ , TA, une nuit	Consommation du produit de départ. Nombreux produits en CCM
Entrée 5	bromure d'allyle (3 éq.), Cs ₂ CO ₃ (2,5 éq.), DMF, 50°C, une nuit	Formation de plusieurs produits
Entrée 6	bromure d'allyle (2 éq.), NaHCO ₃ (1,5 éq.), DMF, 50°C, une nuit puis bromure d'allyle (1,5 éq.), NaHCO ₃ (1 éq.), TA, 3 jours	Formation de l'ester G20 (rendement de 95%)

Tableau 14 : Formation de l'ester allylique **G20**.

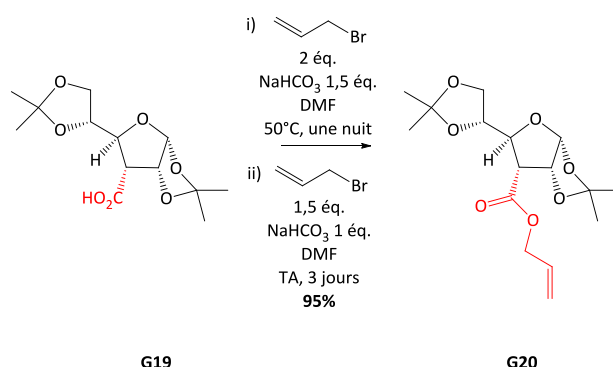


Schéma 130 : Formation de l'ester **G20** par substitution nucléophile.

Le diacétal **G20** doit maintenant être transformé en alcool **G23**. De la même manière que pour **G5**, le diol 5,6 est déprotégé par un traitement à 40°C pendant 1h30 dans l'acide acétique aqueux à 75% (rendement brut 53%). Ce diol **G20** est clivé de façon oxydative par l'action de 2,2 équivalents de NaIO₄ à 0°C pendant 35 minutes dans un milieu EtOH/eau 5/1 et l'aldéhyde correspondant **G22** est obtenu quantitativement (Schéma 131). Il reste à réduire l'aldéhyde **G22** pour obtenir l'alcool **G23**.

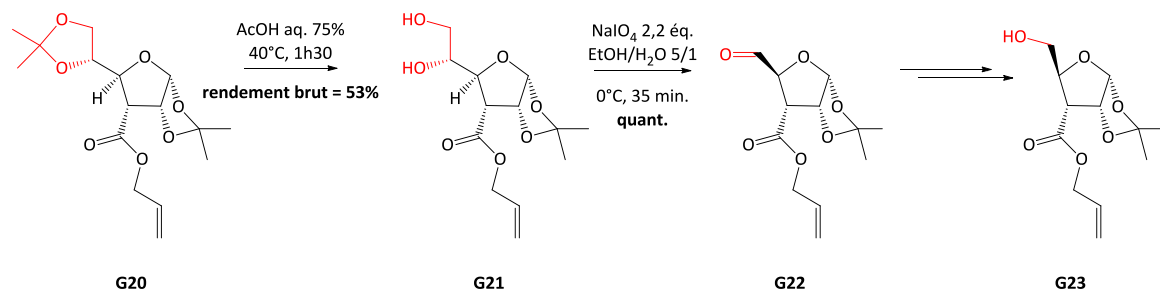


Schéma 131 : Voie de préparation de l'alcool **G23** à partir du diacétal **G20**.

Pour des raisons de temps et suite à la réussite de l'obtention de l'alcool **G9** directement à partir de l'ester α,β -insaturé **G4**, nous avons alors préféré nous concentrer sur la voie de synthèse précédente et nous ne sommes pas allés plus loin dans la synthèse du phthalimidooxy ester **G24**.

III.4. Conclusion

Ni le groupement phthaloyle, ni le groupement penténoyle ne nous ont permis d'obtenir les monomères déprotégés. Les problèmes rencontrés sont similaires à ceux rencontrés dans la série uridine (chapitre 3).

Pour des raisons de temps, nous avons préféré nous concentrer sur la préparation de nucléosides phthalimidooxy esters.

IV. PREPARATION DES NUCLEOSIDES PHTHALIMIDOOXY ESTERS

IV.1. Déprotection de l'acétonide **G10**

La déprotection de l'acétal en position 1,2 nécessite des conditions assez dures. Nous avons repris des conditions opératoires précédemment utilisées dans notre équipe.³⁹⁹ Ainsi, l'acétonide **G10** est agité pendant une nuit dans un milieu acide et acylant (H_2SO_4 concentré, Ac_2O , AcOH). Cela conduit avec un rendement de 41% au diacétate **G25** sous forme de deux diastéréoisomères en rapport 9/1 (Schéma 132).

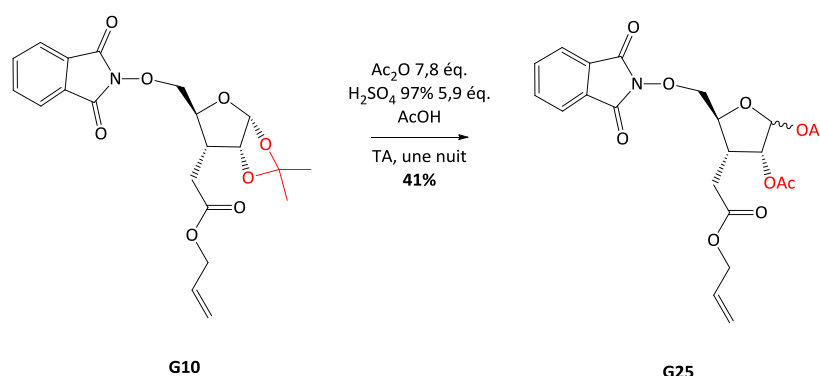


Schéma 132 : Formation du diacétate **G25** par déprotection de l'acétal **G10**.

Nous avons fait attention à bien neutraliser le milieu avant concentration afin d'éviter toute dégradation lors de la concentration. Malgré cela, un rendement faible est obtenu. En effet, on observe une perte de produit importante lors de la purification par chromatographie sur colonne. D'autres équipes obtiennent aussi des rendements faibles avec cette déprotection/acylation.⁵⁸³

IV.2. Préparation des monomères pyrimidiques

Les nucléosides peuvent être synthétisés par une *N*-glycosylation de Vorbrüggen,^{584,585} initiée par Hilbert et Johnson et utilisant des riboses acétates et des bases nucléiques silylées en présence

⁵⁸³ M. J. Robins, B. Doboszewski, V. A. Timoshchuk, M. A. Peterson, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2939-2945.

⁵⁸⁴ H. Vorbrüggen, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 509-520.

⁵⁸⁵ G. E. Hilbert, T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, *52*, 4489-4494.

d'un acide de Lewis comme le triflate de triméthylsilyle (TMSOTf). La stéréosélectivité est assurée par la présence du groupe participant acétate. En revanche, des problèmes de régiosélectivité peuvent être rencontrés.

Le diacétate brut **G25** obtenu précédemment est suffisamment pur pour les étapes de *N*-glycosylation. Pour éviter des problèmes de solubilité et de polarité trop importante, la cytosine est protégée par un groupe benzoyle. Par ailleurs, les bases nucléiques sont silylées *in situ* par le *N,O*-bis(triméthylsilyl)acétamide (BSA).⁵⁸⁶ Nous adoptons donc un protocole classique de la littérature :^{587,588,589} une solution du diacétate **G25** (1 équivalent), de nucléobase (1,5 équivalent) et de BSA (4,5 équivalents) dans l'acétonitrile anhydre est chauffée à reflux pendant 30 minutes sous argon, permettant la silylation de la base nucléique. Après refroidissement à TA, TMSOTf (1,5 équivalent) est ajouté et le mélange réactionnel est porté au reflux pendant 2h-2h30 (Schéma 133). Après traitement et purification, le nucléoside attendu est obtenu (Figure 159).

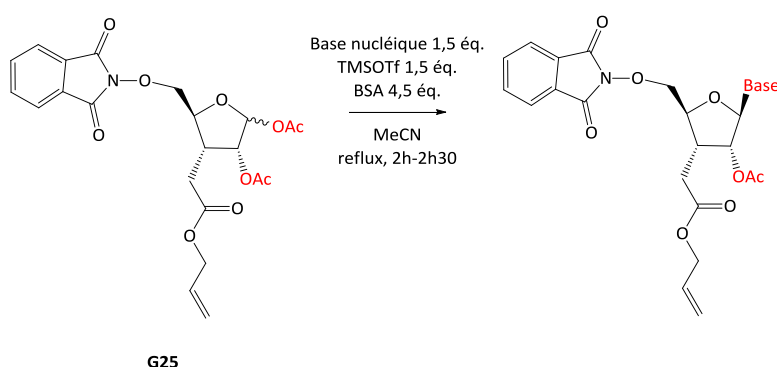


Schéma 133 : *N*-glycosylation pour obtenir les dérivés nucléosides phthalimidoxy esters. Base nucléique : uracile, thymine ou *N*-benzoylcytosine.

Ces conditions ont été utilisées avec les différentes bases pyrimidiques (uracile, thymine et *N*-benzoylcytosine), ce qui a permis d'obtenir le monomère uridine **G26** (rendement 50%), thymidine **G27** (rendement 52%) et cytosine **G28** (rendement 58%) (Figure 159). Une attention toute particulière a été portée lors du traitement de fin de réaction afin de ne pas perdre de produit dans la phase aqueuse. Toutefois, les rendements obtenus sont moyens. Cela s'explique par la faible pureté du diacétate de départ et par la perte de produit lors de la purification sur colonne.

⁵⁸⁶ V. Caplar, M. Zinić, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4455-4458.

⁵⁸⁷ S. Hanessian, J. Waggoner, B. L. Merner, R. D. Giacometti, M. E. Østergaard, E. E. Swayze, P. P. Seth, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9064-9075.

⁵⁸⁸ M. Sekiguchi, S. Obika, Y. Harada, T. Osaki, R. Somjing, Y. Mitsuoka, N. Shibata, M. Masaki, T. Imanishi, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1306-1316.

⁵⁸⁹ P. J. Hrdlicka, J. S. Jepsen, C. Nielsen, J. Wengel, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1249-1260.

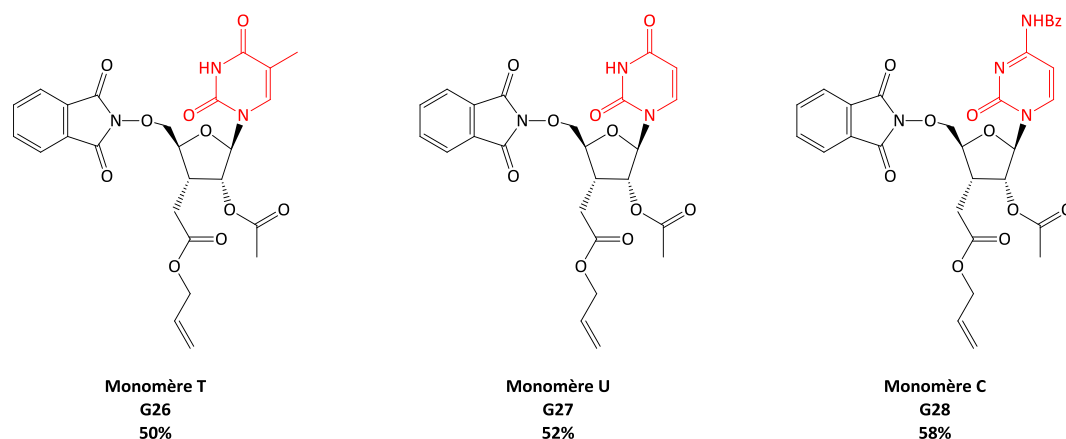


Figure 159 : Monomères pyrimidines préparés par *N*-glycosylation de **G25**. Les rendements obtenus sont indiqués. La base C est protégée.

IV.3. Préparation des monomères puriques

Pour obtenir les monomères puriques, les bases nucléiques polyfonctionnelles correspondantes doivent être protégées. Ainsi, on travaille avec la 6-*N*-benzoyladénine et la 2-*N*-acétyl-6-*O*-diphénylcarbamoyleguanine⁵⁹⁰ (Figure 160) et on exploite le mode opératoire précédent (à la différence près que, pour la base 2-*N*-acétyl-6-*O*-diphénylcarbamoyleguanine, le solvant acétonitrile est remplacé par le 1,2-dichloroéthane pour des raisons de solubilité).

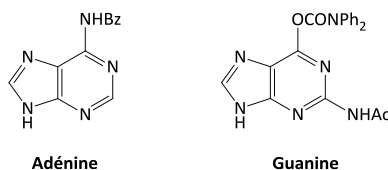


Figure 160 : Bases puriques protégées utilisées dans la réaction de *N*-glycosylation.

Malheureusement, l'utilisation du mode opératoire précédent ne nous a pas permis d'isoler les nucléosides phthalimidoxy esters correspondants. En effet, on obtient, après réaction, de très nombreux produits sur CCM. La purification sur colonne de silice ou sur plaque préparative de silice ne mène à rien. Pourtant, des réactions de *N*-glycosylation avec des bases nucléiques purines sont décrites dans la littérature⁵⁹¹ même si les rendements obtenus sont parfois médiocres,^{592,593} en particulier à cause de problèmes de sélectivité.

Nous avons manqué de temps pour mettre au point ces réactions de *N*-glycosylation. Par exemple, on aurait pu envisager une irradiation micro-onde.⁵⁹⁴

⁵⁹⁰ R. Zou, M. J. Robbins, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 1436-1437.

⁵⁹¹ W. Zhu, G. Gumina, R. F. Schinazi, C. K. Chu, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6423-6431.

⁵⁹² M. Aljarah, S. Couturier, G. Gosselin, C. Math, C. Périgaud, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1125-1128.

⁵⁹³ E. Rozners, Y. Liu, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9841-9848.

⁵⁹⁴ N. V. Nikolaus, J. Božilović, J. W. Engels, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 889-892.

V. ANALYSE DES DIFFICULTES RENCONTREES

V.1. Bilan et poursuite d'autres travaux du laboratoire : synthèse d'oligomères de *N*-oxy PNA

V.1.a. Bilan des travaux de thèse d'Olivier Noel

Lors de sa thèse soutenue en septembre 2013, Olivier Noel s'est penché sur la synthèse d'oligomères de *N*-oxy PNA. Ces travaux lui ont permis d'obtenir 4 monomères (**T**, **C**, **A** et **G**, Figure 161) puis de les déprotéger et de les coupler pour obtenir 3 dimères (**TT**, **AA** et **TC**, Figure 162).

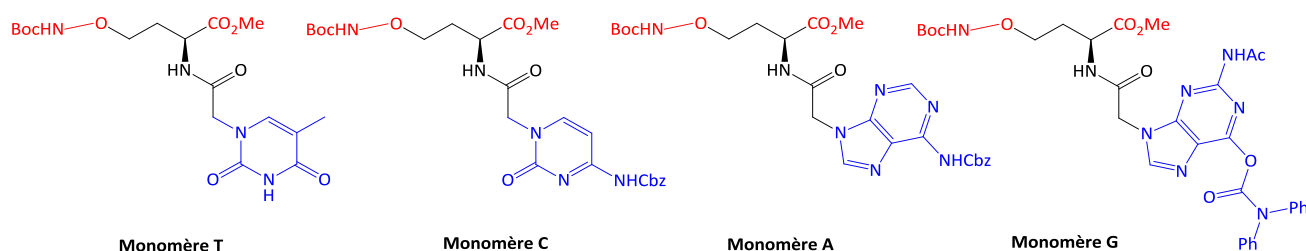


Figure 161 : Structure des monomères de *N*-oxy PNA obtenus par Olivier Noel. La base nucléique des monomères cytosine, adénine et guanine est protégée. Les bases nucléiques sont dessinées en bleu et les fonctions aminooxyles protégées et acides carboxyliques protégées en rouge.

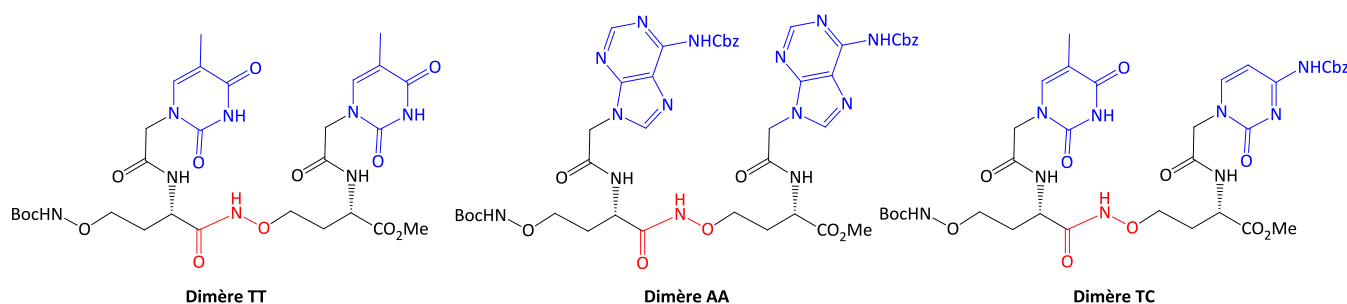


Figure 162 : Structure des dimères de *N*-oxy PNA obtenus par Olivier Noel. Les bases nucléiques A et C sont protégées. Les bases nucléiques sont dessinées en bleu et la liaison *N*-oxyamide en rouge.

Cependant, les réactions de couplage d'un monomère aminooxyle et d'un monomère acide carboxylique ont des rendements faibles : 29% pour le dimère TT, 31% pour le dimère AA et 59% pour le dimère TC. En effet, les CCM des milieux réactionnels présentent de très nombreuses tâches. La purification par chromatographie sur colonne est longue et compliquée. De plus, il s'ajoute à cela des problèmes de solubilité des dimères dans les solvants usuels.

V.1.b. Poursuite de la synthèse de dimères et de tétramères

En parallèle des travaux présentés précédemment, nous avons travaillé à la poursuite de la synthèse de dimères et de tétramères de *N*-oxy PNA. En raison des difficultés rencontrées, nous avons apporté plusieurs modifications par rapport aux modes opératoires utilisés par Olivier Noel.

Premièrement, la déprotection de la fonction aminooxyle des monomères se fait en générant *in situ* du HCl par la réaction entre le chlorure d'acétyle et le méthanol. Un risque d'acylation existe. Pour l'éviter, nous agitions pendant 30 minutes à 0°C la solution de chlorure d'acétyle avant d'ajouter l'oxyamine protégée. Cela ne diminue pas le nombre de tâches sur les CCM. Nous décidons alors

d'utiliser une solution commerciale d'HCl à 2 mol/L dans l'éther diéthylique.⁵⁹⁵ Les CCM présentent toujours autant de tâches.

Par ailleurs, la réalisation de CCM 2D met en évidence la dégradation partielle des composés sur silice. Nous remplaçons donc la silice par de l'alumine. Malheureusement, aucune amélioration n'est à noter. Les purifications des composés par plaque préparative de silice ou d'alumine ne permettent pas non plus d'isoler des fractions pures.

Enfin, afin de simplifier la purification des produits après les réactions de couplage, nous avons utilisé l'agent de couplage DEPC.⁵⁷⁹ Aucune amélioration n'est observée et les purifications sont toujours aussi complexes.

Nous avons appliqué ces modifications à la synthèse d'un tétramère TTTT (Schéma 134). Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à isoler une fraction nous permettant d'identifier formellement le tétramère TTTT.

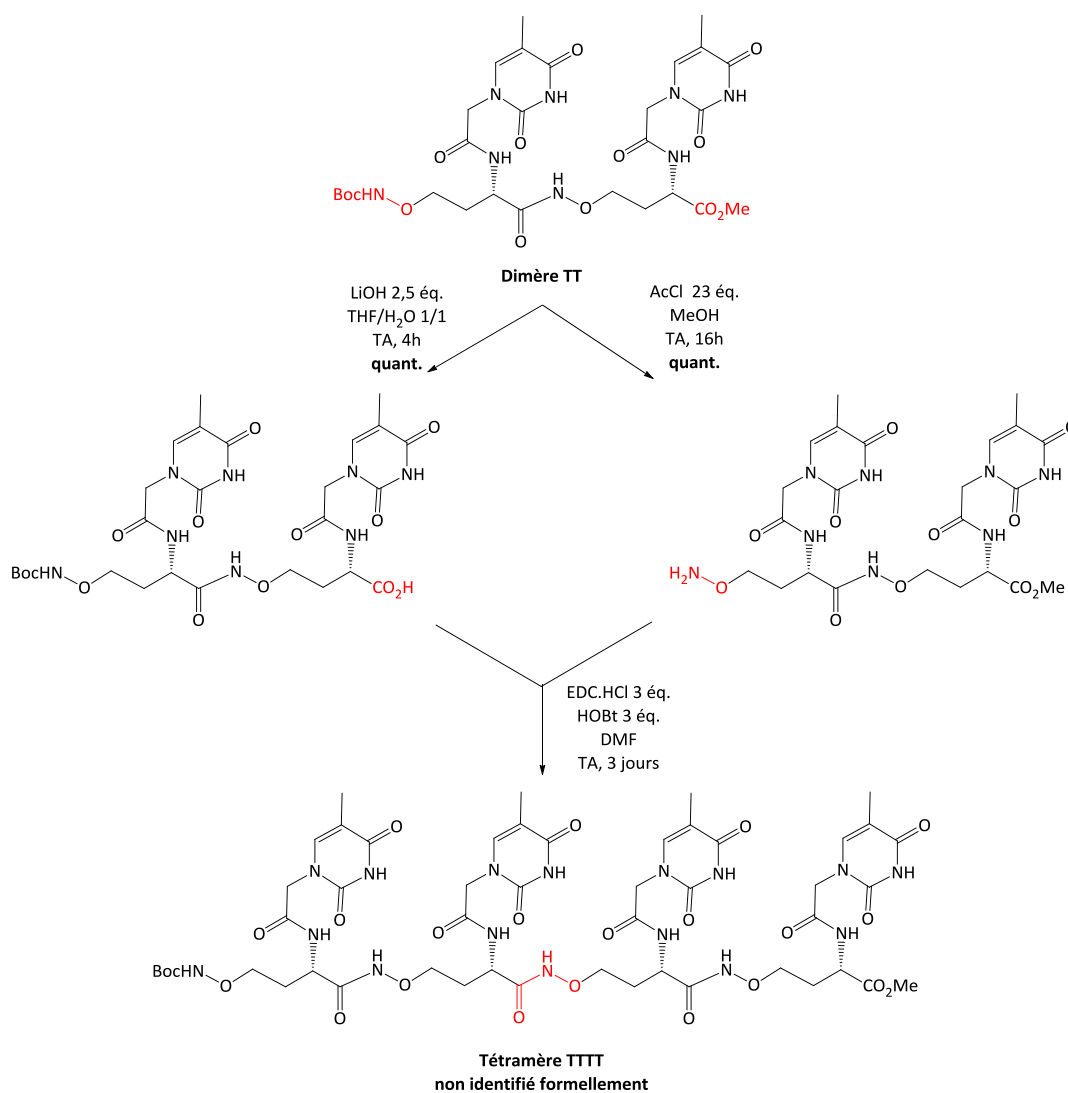


Schéma 134 : Préparation d'un tétramère TTTT.

⁵⁹⁵ M. Gobbin, S. Armaroli, L. Banfi, A. Benicchio, G. Carzana, G. Fedrizzi, P. Ferrari, G. Giacalone, M. Giubileo, G. Marazzi, R. Micheletti, B. Moro, M. Pozzi, P. E. Scotti, M. Torri, A. Cerri, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4601-4608.

La purification de ces composés n'est pas réalisable avec les méthodes à notre disposition au laboratoire. L'achat récent d'une HPLC devrait nous offrir une meilleure séparation et nous permettre d'avancer dans la synthèse de ces oligomères.

V.2. Analyse parallèle de ces différentes synthèses

V.2.a. Aperçu des difficultés rencontrées

V.2.a.i. Difficultés rencontrées avec l'aminooxy ester **G12**

De nombreuses difficultés ont été rencontrées lors de ces synthèses, en particulier avec l'aminooxy ester **G12**. Afin d'essayer de comprendre l'origine des difficultés, nous allons nous arrêter sur différents faits expérimentaux concernant **G12**.

En effet, nous avons précédemment remarqué que, lors de la préparation du composé **G12**, les résultats obtenus ne sont pas toujours reproductibles. Les spectres RMN ^1H du composé brut obtenu lors de réactions d'hydrazinolyse peuvent être très différents. Les CCM de ce composé présentent de très nombreuses tâches. Toute tentative de purification par chromatographie sur colonne ou par plaque préparative sur silice ou sur alumine avec des éluants divers (contenant parfois de la triéthylamine ou de l'acide acétique) conduit à une importante (environ 80%) perte de masse. Des CCM 2D sur silice ou sur alumine mettent en évidence la dégradation du composé. Pourtant, on trouve dans la littérature des exemples de composés aminooxyles purifiés par recristallisation ou par chromatographie sur silice.⁵⁹⁶ Nous avons également constaté lors de concentration à l'évaporateur rotatif de solutions de **G12** que le produit, étant initialement une huile incolore, devenait un solide blanc. Ce solide blanc est insoluble dans tous les solvants organiques usuels (CH_2Cl_2 , MeOH, DMF, dioxane, etc.) alors que le produit formé lors de l'hydrazinolyse l'était ! On peut donc faire l'hypothèse que des oligomères complexes se forment.

Les réactions menées avec l'aminooxy ester **G12** conduisent à de très faibles rendements (cf. préparation du *N*-penténylaminoxy ester **G15**). Ainsi, des essais de réactions de couplage peptidique utilisant des conditions classiques (DCC ou EDC.HCl avec HOAt ou HOBt) avec l'acide carboxylique **G13** ou avec l'acide aminé protégé BocGlyOH ne permettent pas d'isoler un produit. Une équipe japonaise⁵⁹⁷ a montré la possibilité d'utiliser le méthanolate de sodium comme catalyseur des réactions de formations d'amides à partir d'esters méthyliques et d'amines. Malheureusement, cette méthode ne nous a pas permis de coupler l'oxyamine **G12** avec des acides carboxyliques.

Par ailleurs, le spectre de masse haute résolution de l'aminooxy ester **G12** présente plusieurs signaux (Figure 163). L'analyse de ces différents pics est donnée dans le Tableau 15. Les composés identifiés (dimères, composé cyclisé, etc.) correspondent à des réactions entre la fonction aminooxyle ou le NH de la liaison *N*-oxyamide et l'ester allylique. Toutefois, il n'est pas possible de savoir quand ces composés se sont formés (avant ou lors de la mesure du spectre de masse).

⁵⁹⁶ V. Duléry, O. Renaudet, C. Philouze, P. Dumy, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 894-900.

⁵⁹⁷ T. Ohshima, Y. Hayashi, K. Agura, Y. Fujii, A. Yoshiyama, K. Mashim, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5434-5436.

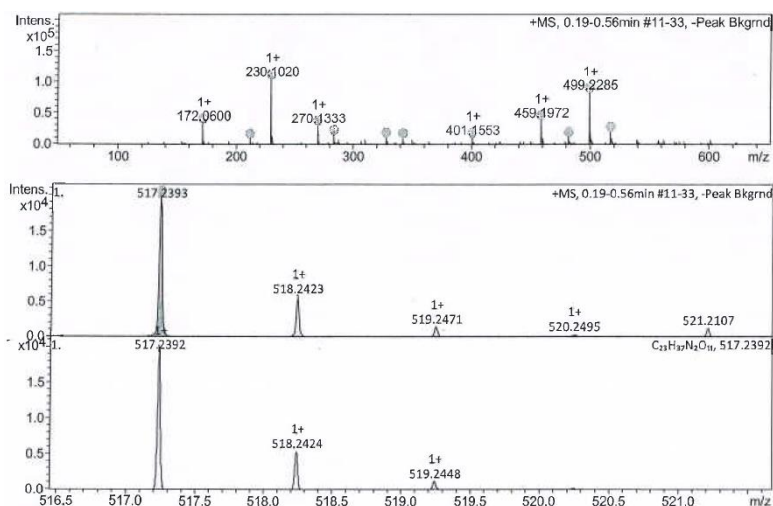


Figure 163 : Spectre de masse haute résolution de l'oxyamine G12 (ionisation ESI).

m/z observé	Formule brute	Structure [M+H] ⁺	m/z calculé
517,2393	C ₂₃ H ₃₇ N ₂ O ₁₁ ou C ₂₁ H ₂₅ N ₁₆ O ou C ₃₆ H ₂₉ N ₄		517,2392 (100,0%), 518,2426 (24,9%), 519,2459 (3,0%), 519,2435 (2,3%)
499,2285	C ₂₃ H ₃₅ N ₂ O ₁₀ ou C ₂₁ H ₂₃ N ₁₆	composé précédant -H ₂ O	499,2287 (100,0%), 500,2320 (24,9%), 501,2354 (3,0%), 501,2329 (2,1%)
459,1972	C ₂₀ H ₃₁ N ₂ O ₁₀ ou C ₁₈ H ₁₉ N ₁₆		459,1974 (100,0%), 460,2007 (21,6%), 461,2041 (2,2%), 461,2016 (2,1%)
270,1333	C ₁₃ H ₂₀ NO ₅		270,1336 (100,0%), 271,1370 (14,1%), 272,1379 (1,0%)
230,1020	C ₁₀ H ₁₆ NO ₅		230,1023 (100,0%), 231,1057 (10,8%), 232,1066 (1,0%)

Tableau 15 : Analyse des différents pics du spectre de masse haute résolution de l'oxyamine G12.

ou 7 chaînons est particulièrement favorable. Cette réaction nécessite une agitation à TA de 2 heures à 5h30.

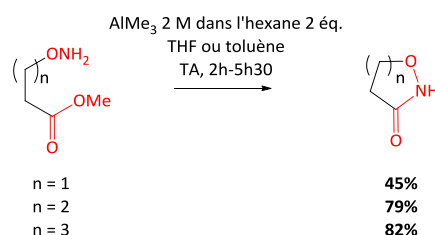


Schéma 135 : Cyclisation par réaction entre une *N*-oxyamine et un ester méthylique.⁶⁰⁰ Pour $n = 4$, avec 4 équivalents de Me_3Al dans du toluène et une agitation pendant 6 jours à TA, seul des traces de produits sont obtenues.

Ici, nous ne sommes pas en présence d'acide de Lewis. Il n'empêche que sur les spectres de masse, nous avons pu mettre en évidence la présence de produits résultants de la réaction entre l'oxyamine et l'ester (Tableau 15). Aucune difficulté n'est rencontrée lors de la synthèse d'aminooxyacides lorsque l'acide carboxylique est protégé sous forme d'un ester *tert*-butylique. Ces problèmes se rencontrent avec des esters méthyliques, éthyliques ou allyliques, plus réactifs avec des nucléophiles que les esters *tert*-butyliques. Il est donc probable qu'il se produise des réactions parasites avec les esters. Des transacylations ont déjà été mises en évidence dans notre équipe. Ainsi, un ancien doctorant du laboratoire (Yanchun Gong, thèse soutenue en 2012) a mis en évidence des transacylations entre une fonction aminooxyle et un groupe acétate (Schéma 136).³⁹⁹

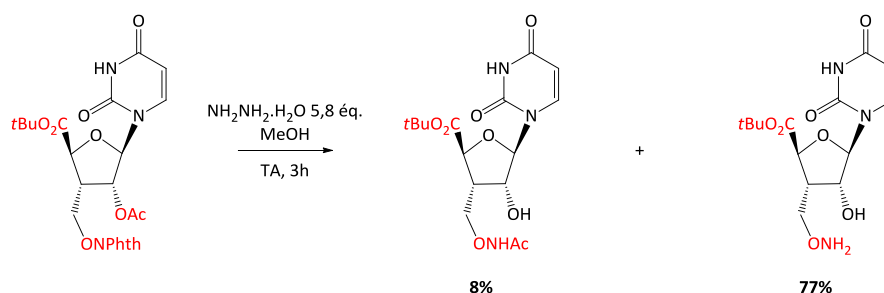


Schéma 136 : Réaction de transacylation entre une fonction aminooxyle et un -OAc.³⁹⁹

Pour supprimer ce risque de transacylation, il faudrait protéger les acides carboxyliques sous forme d'esters *tert*-butyliques.^{397,485,525,601,602,603,604,605,606}

V.2.b.ii. Réaction avec des dérivés carbonylés

Par ailleurs, les fonctions aminooxyles sont très réactives vis-à-vis des dérivés carbonylés. Ainsi, les composés aminooxyles peuvent réagir avec des impuretés carbonylées de solvant. Cette sensibilité rend leurs synthèses et leurs conservations difficiles.⁶⁰⁷

⁶⁰¹ D. Yang, F. F. Ng, Z. J. Li, Y. D. Wu, K. W. K. Chan, D. P. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9794-9795.

⁶⁰² I. Shin, M. Lee, J. Lee, M. Jung, W. Lee, J. Yoon, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7667-7675.

⁶⁰³ F. Chen, K. S. Song, Y. D. Wu, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 743-755.

⁶⁰⁴ X. Li, Y. D. Wu, D. Yang, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1428-1438.

⁶⁰⁵ X. Li, D. Yang, *Chem. Commun.* **2006**, 3367-3379.

⁶⁰⁶ D. Yang, D. W. Zhang, Y. Hao, Y. D. Wu, S. W. Luo, N. Y. Zhu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6719-6722.

⁶⁰⁷ G. Mezö, I. Szabó, I. Kertész, R. Hegedüs, E. Orbán, U. Leurs, S. Bösze, G. Halmos, M. Manea, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 39-46.

V.2.b.iii. Sur-réaction d'oxyamines monoprotégées et des NH de liaisons *N*-oxyamides

En travaillant sur la synthèse de *N*-oxy PNA, un ancien doctorant du laboratoire (Olivier Noel) a constaté qu'une *N*-oxyamine protégée par un groupement Boc pouvait être réactive vis-à-vis d'électrophiles (Schéma 137).

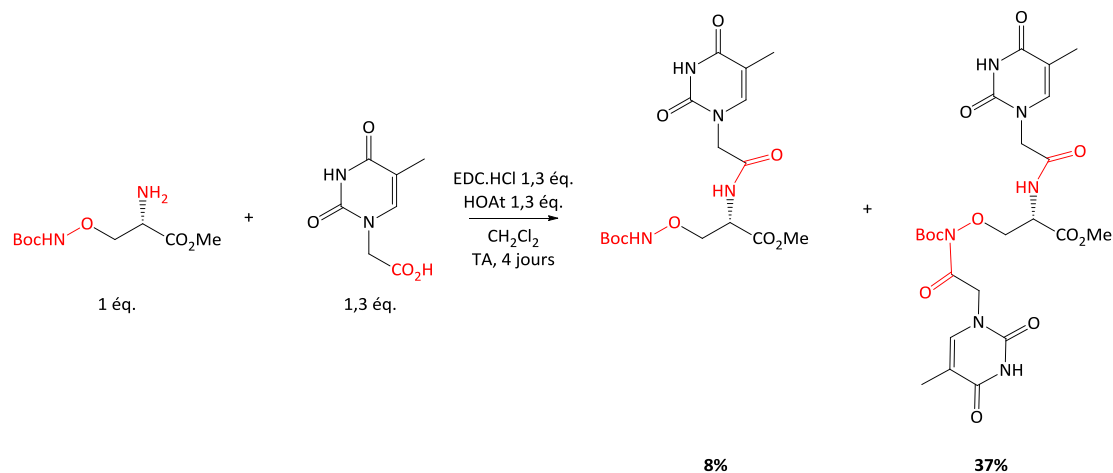


Schéma 137 : Formation d'un produit secondaire résultant d'une suracylation (résultat d'Olivier Noel non publié).

Lorsqu'un autre doctorant du laboratoire (Yanchun Gong) a cherché à passer de l'ester *tert*-butylique à l'ester méthylique, il a noté une méthylation de l'azote de l'oxyamine protégée et également un faible rendement (Schéma 138).³⁹⁹

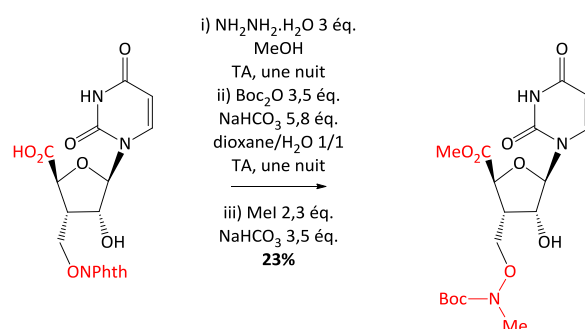


Schéma 138 : Passage d'un acide carboxylique à un ester méthylique résultant en une méthylation de l'azote de la fonction aminooxyle protégée par un groupement Boc et à un faible rendement.³⁹⁹

Ces problèmes de sur-réaction des NH des oxyamines mais aussi des NH de liaisons *N*-oxyamides sont récurrents.^{608,609,610,611,612} La suracylation est d'autant plus importante que le milieu est basique.⁶¹⁰ Une telle suracylation pourrait expliquer certaines difficultés rencontrées précédemment.

V.2.b.iv. Conclusion et solutions envisageables

En conclusion, l'hypothèse que nous pouvons avancer pour expliquer les difficultés est la possibilité de réactions parasites très diverses (en intramoléculaire, en intermoléculaire sur eux-

⁶⁰⁸ C. Jiménez-Castells, B. G. de la Torre, R. Gutiérrez Gallego, D. Andreu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5155-5158.

⁶⁰⁹ N. Zhang, R. Yang, D. Zhang-Negrerie, Y. Du, K. Zhao, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8705-8711.

⁶¹⁰ I. P. Decostaire, D. Lelièvre, H. Zhang, A. F. Delmas, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7057-7060.

⁶¹¹ V. Duléry, O. Renaudet, P. Dumy, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11952-11958.

⁶¹² S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturnyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.

mêmes ou avec d'autres composés) dès qu'un groupe -NH d'oxyamines ou de liaison *N*-oxyamides est disponible.

Afin d'éviter cette sur-réaction, la fonction aminooxyle doit être doublement protégée. Cette double protection peut se faire avec deux groupements Boc (Schéma 139).⁶¹³ Sur cet exemple, la deuxième protection se fait en présence de DMAP. On note que cette protection se fait majoritairement sur la fonction aminooxyle par rapport à la fonction amine. Il n'y a ensuite plus de problèmes de suracylation (Schéma 139).

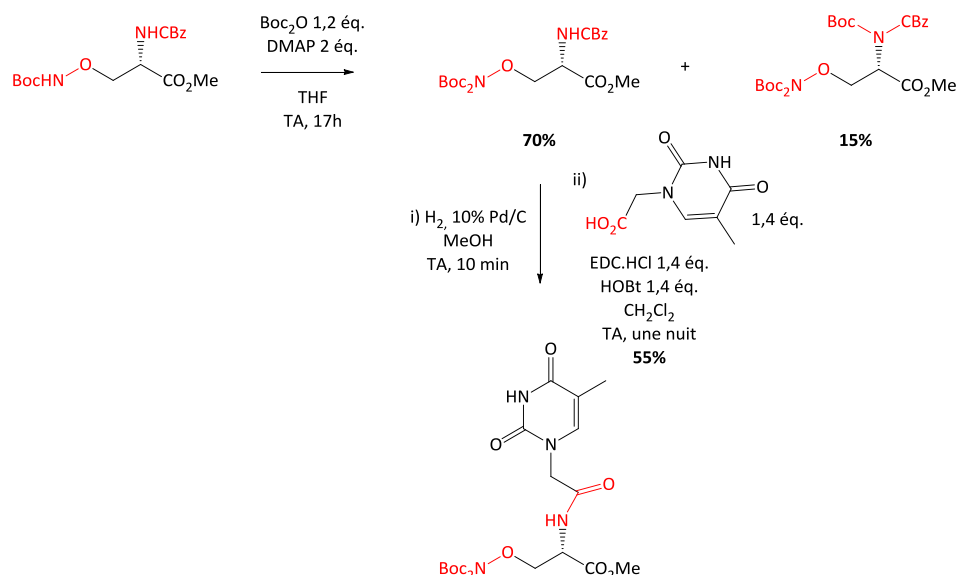


Schéma 139 : Double protection de la fonction aminooxyle pour régler les difficultés de suracylation.⁶¹³

Le groupement protecteur éthoxyéthylidène (introduit par substitution nucléophile et déprotégé en milieu acide) pourrait constituer une solution (Schéma 140).^{360,574,612} En effet, ce groupe permet d'éviter les problèmes de suracylation qui sont peut être responsables des difficultés rencontrées.^{611,612}

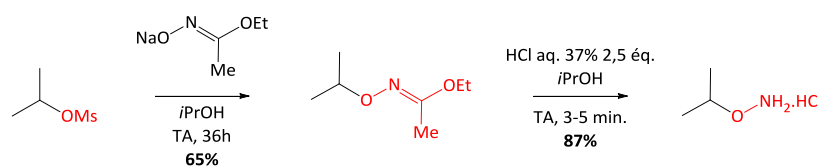


Schéma 140 : Préparation de composés *N*-oxyamines par alkylation du *N*-hydroxyacétimide d'éthyle et déprotection de la fonction aminooxyle en milieu acide.

V. CONCLUSION ET BILAN

Nous avons préparé deux monomères ribofuranoides aminooxy acides protégés **G10** et **G15** (Schéma 141). Comme dans le chapitre précédent, nous avons rencontré des problèmes de déprotection des fonctions aminooxyles et acides carboxyliques.

⁶¹³ O. Noel, J. Xie, *Synthesis* **2013**, 45, 134-140.

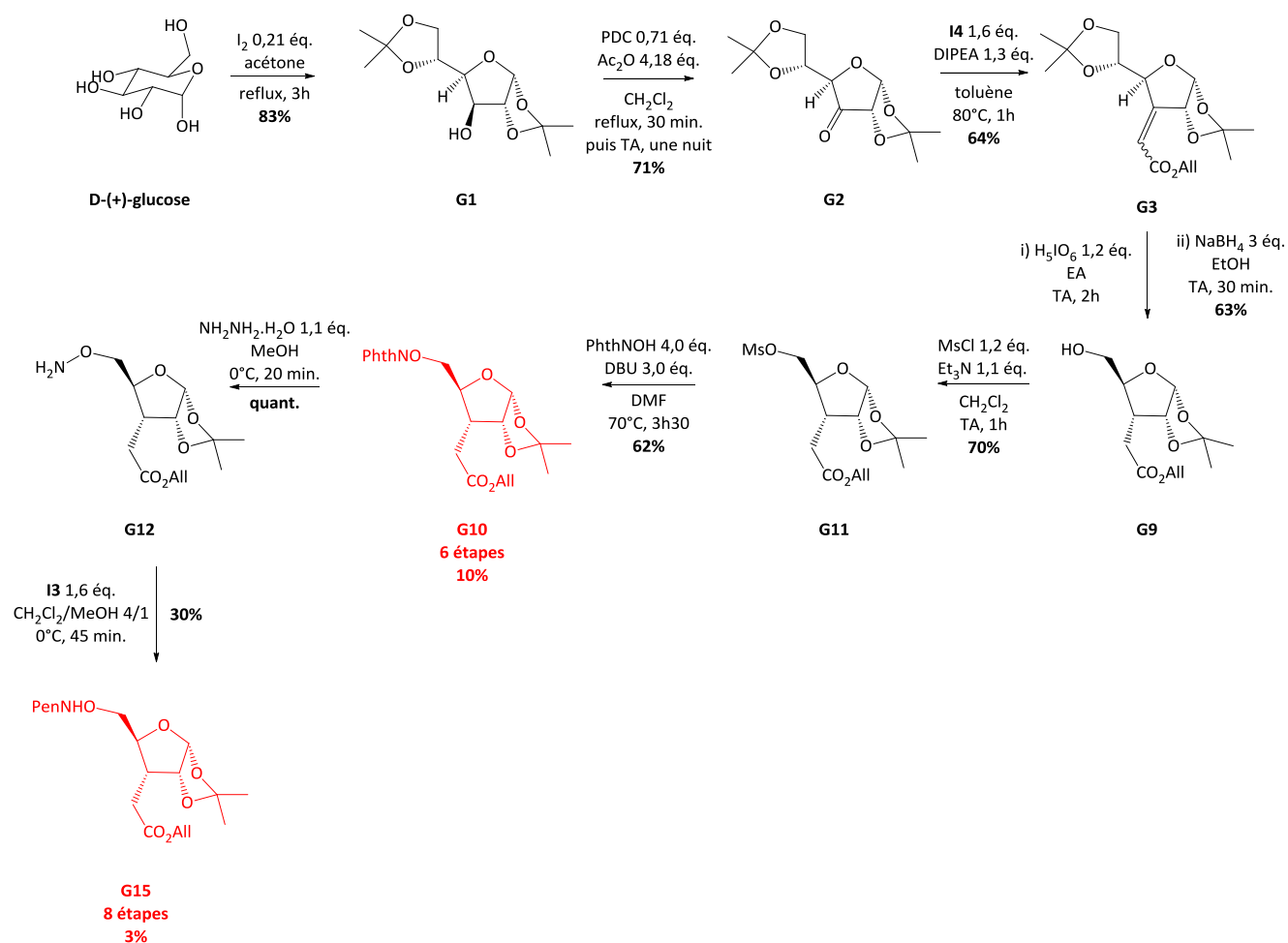


Schéma 141 : Préparation des monomères ribofuranoides aminoxy acides **G10** et **G15** protégés.

A partir du phthalimidoxy ester **G10**, nous avons préparé différents nucléosides phthalimidoxy esters. La réaction de *N*-glycosylation a bien fonctionné avec les bases pyrimidiques (Schéma 142). Malheureusement, aucun nucléoside purique n'a pu être obtenu.

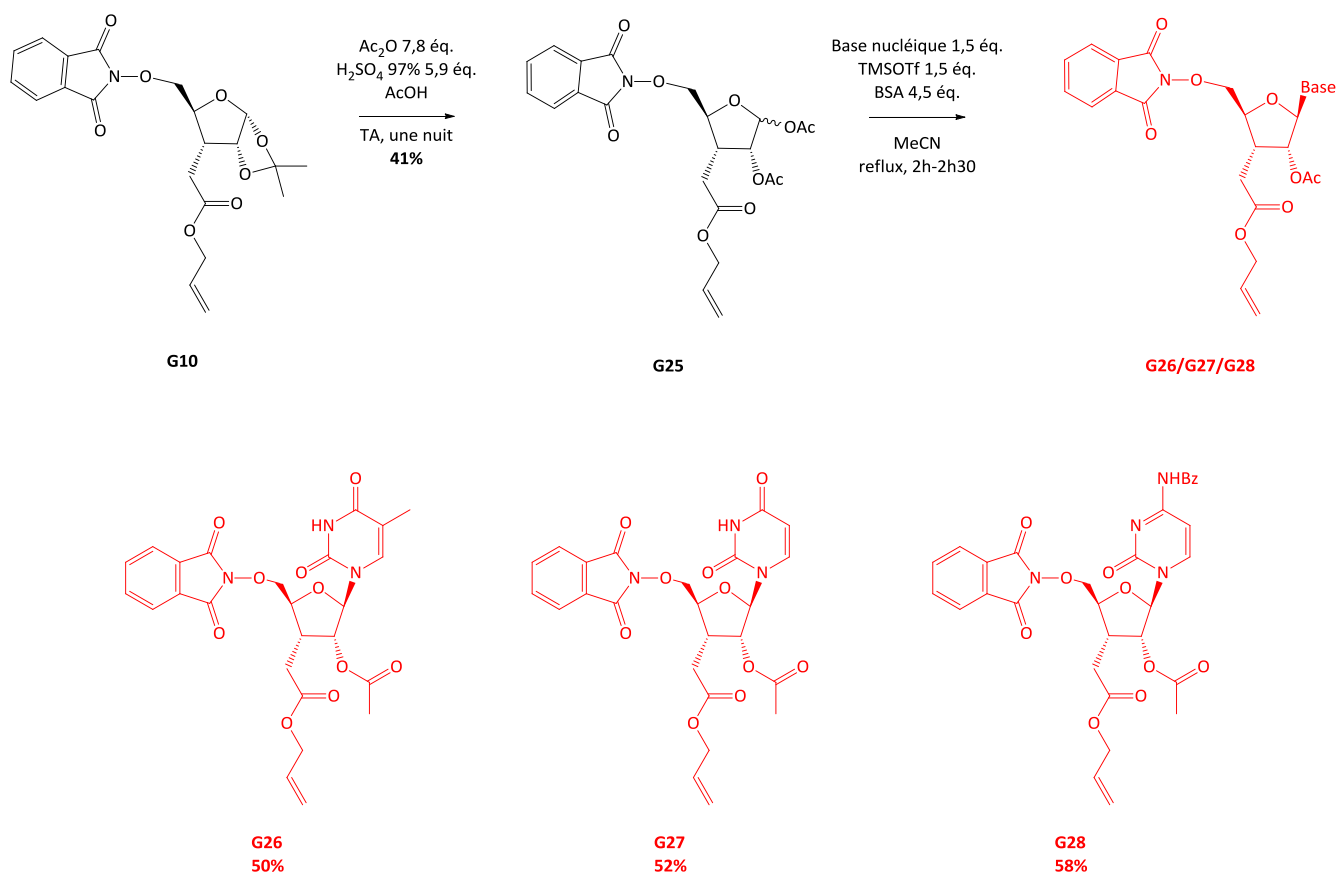


Schéma 142 : En haut : Préparation de nucléosides phthalimidooxy esters. En bas : Nucléosides phthalimidooxy esters obtenus.

Ce chapitre a été l'occasion de réfléchir à l'origine des difficultés rencontrées avec les composés aminooxyles. Il semblerait que la trop grande réactivité de ces composés aminooxyles soit problématique et nous empêche de mener à bien nos objectifs.

En raison de la capacité des liaisons *N*-oxyamides et des fonctions aminooxyles à former des liaisons hydrogène, de tels composés peuvent adopter des conformations bien particulières. Dans le prochain chapitre, nous allons nous attarder sur l'étude des conformations privilégiées par ces composés.

CHAPITRE 5
ANALYSE STRUCTURALE DES OLIGOMERES DE RIBOFURANOIDES
AMINOXY ACIDES ET DE *N*-OXY PNA

I. INTRODUCTION

Dans les deux chapitres précédents, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'oligomères de ribofuranoides aminooxy acides **O3** et de *N*-oxy PNA (Figure 165). Il nous faut maintenant étudier la structure de ces composés.

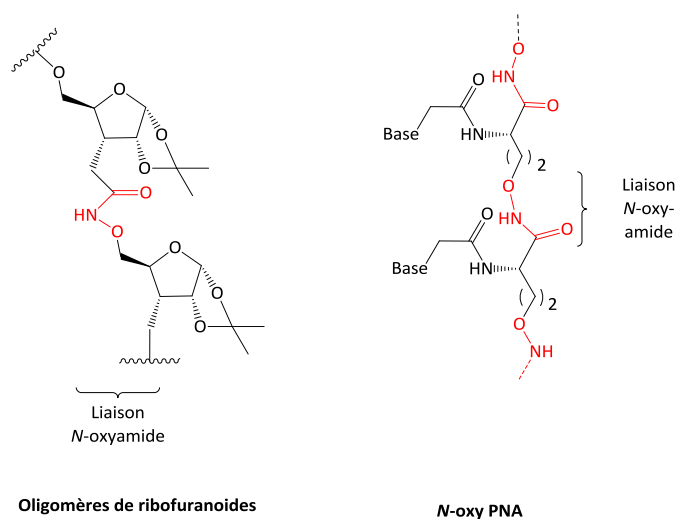


Figure 165 : Structures des composés étudiés dans ce chapitre.

Pour ce faire, nous allons exploiter et confronter les résultats de différentes techniques d'analyse structurale. Nous nous baserons sur des études structurales de composés analogues publiées dans la littérature.

Les études par RMN 2D de ce chapitre ont été réalisées en collaboration avec Christie Aroulanda de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO) avec des spectromètres Bruker 400 MHz. Les études par spectroscopie infrarouge (IR) en solution ont été réalisées par Olivier Noel lors de sa thèse sur les *N*-oxy PNA.

II. TECHNIQUES D'ANALYSE STRUCTURALE D'OLIGOMERES DE RIBOFURANOIDES AMINOOXY ACIDES ET DE *N*-OXY PNA

II.1. La spectroscopie RMN

La spectroscopie RMN en milieu liquide est une technique de choix pour l'analyse structurale de nombreuses molécules organiques. Etant donné la structure des composés étudiés, les noyaux d'intérêt pour ces travaux sont le proton ^1H et le carbone ^{13}C . Les séquences 1D classiques (^1H , ^{13}C , DEPT (*Distortionless Enhanced Polarization Transfer*)) ne permettant pas une analyse structurale approfondie, il faut exploiter des expériences 2D.⁶¹⁴

⁶¹⁴ M. Bria, P. Watkin, *L'Act. Chim.* **1997**, *2*, 14-35.

II.1.a. La spectroscopie RMN à deux dimensions

Avant toute analyse de structure 3D, il nous faut d'abord réaliser une attribution complète des spectres RMN ^1H et ^{13}C . Pour cela, nous disposons de certaines séquences 2D s'intéressant à des corrélations homonucléaires. Ainsi, la séquence COSY 90 (*CORrelation SPECTROSCOPY*) est particulièrement utile. Cette séquence a pour objet de corrélérer les signaux de noyaux ^1H couplés scalairement. D'autres séquences 2D s'intéressent à des corrélations hétéronucléaires. Par exemple, l'expérience HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) corrèle un proton ^1H et un carbone ^{13}C directement liés. L'expérience HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) met en évidence des couplages entre un proton ^1H et un carbone ^{13}C séparés de plus d'une liaison (2, 3 ou 4).

Une fois l'attribution faite, une expérience NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) corrèle des protons ^1H proches dans l'espace. Ces couplages dipolaires à travers l'espace ne dépendent pas du nombre de liaisons les séparant et sont d'autant plus importants que ces protons sont proches dans l'espace. En effet, l'effet Overhauser nucléaire (NOE) décroissant de manière inversement proportionnel à la distance entre les noyaux puissance 6, des signaux peuvent être détectés pour des distances entre protons inférieures à 4 Å.

Toutes les séquences 2D utilisées dans ces travaux sont résumées dans le Tableau 16.⁶¹⁴ Ces études ont été effectuées en collaboration avec Christie Aroulanda de l'ICMMO.

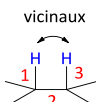



	Expérience	Dimension F2	Dimension F1	Exemples d'informations obtenues
Corrélations homonucléaires	COSY 90	$\delta_{\text{H}}, J_{\text{HH}}$	$\delta_{\text{H}}, J_{\text{HH}}$	 vicinaux $^n J_{\text{HH}} (n \leq 3)$
	NOESY	$\delta_{\text{H}}, J_{\text{HH}}$	$\delta_{\text{H}}, J_{\text{HH}}$	 N.O.E.
Corrélations hétéronucléaires	HSQC	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}, J_{\text{HH}}$	 $^1 J_{\text{CH}}$
	HMBC	δ_{C}	$\delta_{\text{H}}, J_{\text{HH}}$	 $^n J_{\text{CH}} (n > 1)$

Tableau 16 : Résumé de quelques séquences 2D homonucléaires et hétéronucléaires.⁶¹⁴ n désigne le nombre de liaisons covalentes séparant les atomes couplés. Les protons ou les carbones corrélés sont indiqués en bleu et le nombre de liaisons les séparant en rouge.

La détermination des protons ^1H reliés par effet NOE est cruciale. En effet, elle nous donne des informations sur la proximité spatiale de deux protons. Cela nous permet de proposer des conformations compatibles avec les effets NOE observés.

Par exemple, l'équipe de D. Yang a étudié le dipeptide de la Figure 166.⁶¹⁵ Elle a pu mettre en évidence des effets NOE plus ou moins forts entre certains protons de la molécule (Figure 166 à gauche). Ainsi, le proton de l'amide et le proton en position α de l'amide doivent être très proches dans l'espace tandis que le proton de l'amide et le proton en position β de l'amide sont plus éloignés. Ces informations permettent de proposer ou d'éliminer des structures. La structure obtenue par diffraction aux rayons X (Figure 166 à droite) est cohérente avec les effets NOE observés.

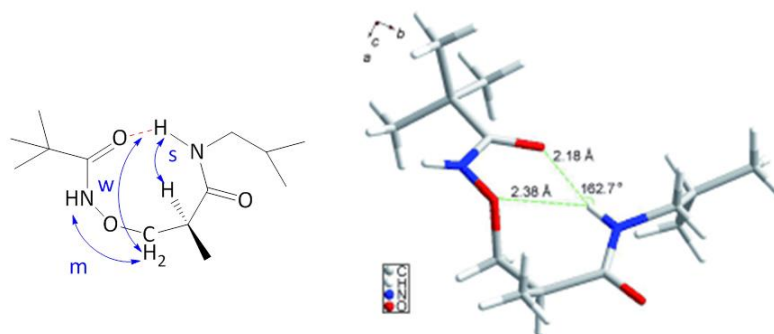


Figure 166 : A gauche : Structure du dipeptide étudié et résumé des effets NOE observés (s : fort (*strong*); m : moyen (*medium*) et w : faible (*weak*)). La liaison hydrogène est indiquée en pointillés rouges. A droite : Structure du dipeptide étudié obtenue par diffraction aux rayons X.⁶¹⁵

II.1.b. Dilutions et dosages en RMN ^1H

Les spectres RMN ^1H et en particulier les signaux attribués à des protons susceptibles d'être engagés dans des liaisons hydrogène dépendent de la concentration du composé d'intérêt dans le solvant. En effet, un proton impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire est peu sensible à son environnement si bien que son déplacement chimique ne dépend pas de la concentration. A l'inverse, les protons non impliqués dans une liaison hydrogène intramoléculaire mais susceptibles de former des liaisons hydrogène (avec une autre molécule du composé ou avec le solvant) sont fortement sensibles à leur environnement.

Un raisonnement analogue est applicable lors de dosages, c'est-à-dire lors de l'ajout d'un autre solvant dans une solution initiale. Un proton impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire est peu sensible à son environnement si bien que son déplacement chimique dépend peu de la nature du solvant. Cela est valable tant que le solvant ne détruit pas la structuration. A l'inverse, le signal d'un proton non impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire mais susceptible d'en former dépend de la nature du solvant.

Nous pouvons illustrer cela par des travaux de l'équipe de Dan Yang⁶¹⁶ qui a étudié le composé de la Figure 167. Le proton H_a n'est pas engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire. Par conséquent, son déplacement chimique varie avec la concentration et avec la nature du solvant (Figure 168 et Figure 169). Les protons H_b et H_c sont engagés dans une liaison hydrogène intramoléculaire ; leurs déplacements chimiques varient très peu lors d'expériences de dilution ou de dosage.

⁶¹⁵ Z. G. Jiao, X. W. Chang, W. Ding, G. J. Liu, K. S. Song, N. Y. Zhu, D. W. Zhang, D. Yang, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 1791-1799.

⁶¹⁶ F. Chen, K. S. Song, Y. D. Wu, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 742-755.

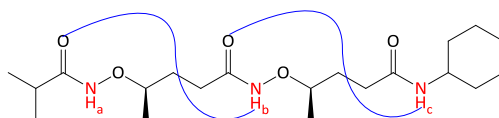


Figure 167 : Composé étudié par l'équipe de Dan Yang.⁶¹⁶ Les protons NH étudiés sont indiqués en rouge et indicés par les lettres a, b ou c. Les deux traits bleus correspondent à des liaisons hydrogène.

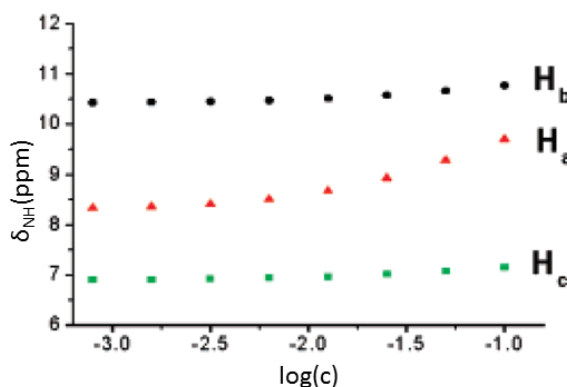


Figure 168 : Variations des déplacements chimiques des protons NH du composé étudié en fonction du logarithme de la concentration (mol/L) en composé dans CHCl_3 à TA.⁶¹⁶

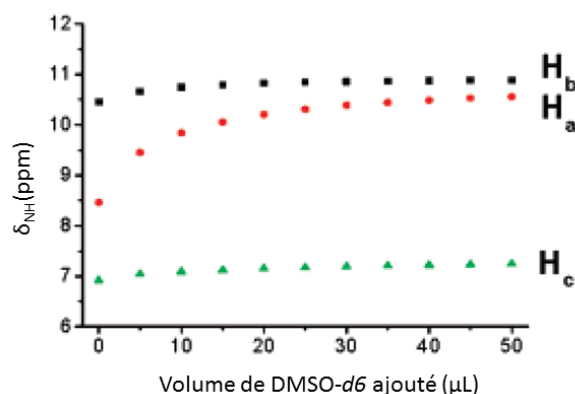


Figure 169 : Variations des déplacements chimiques des protons NH du composé étudié en fonction du volume de DMSO-*d*₆ ajouté à 500 μL d'une solution à 5 mmol/L du composé étudié dans CHCl_3 à TA.⁶¹⁶

Il ne faut pas oublier que l'échelle de temps d'acquisition de la RMN ^1H fait que le déplacement chimique observé est une moyenne, pondérée par leurs proportions relatives, des déplacements chimiques des différents conformères.

II.2. La spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge utilise les propriétés d'absorption de rayonnement du domaine infrarouge avec des transitions entre niveaux vibrationnels. Cette technique, facile d'utilisation, est précieuse pour mettre en évidence des liaisons hydrogène. Dans notre cas, l'étude des bandes de vibrations d'élongation de liaisons N-H d'amides ou de *N*-oxyamides est cruciale.

Etant donné l'échange rapide entre les états avec liaisons hydrogène et les états sans liaisons hydrogène et l'échelle de temps de la spectroscopie RMN, la valeur observée pour chaque proton en RMN ^1H représente usuellement une moyenne pondérée de ces différents états. A l'inverse, l'échelle de temps de la spectroscopie infrarouge est suffisamment courte pour pouvoir distinguer clairement les bandes de vibration d'élongation de liaisons N-H impliquées dans des liaisons hydrogène de celles

de liaisons N-H libres. Par conséquent, la région des bandes d'élongation des liaisons N-H du spectre infrarouge fournit des informations précises sur les liaisons hydrogène présentes dans un solvant donné. Les bandes d'absorption IR d'une liaison N-H d'un amide non liée par liaison hydrogène sont entre 3450 et 3400 cm^{-1} ; ceux d'une liaison N-H d'un *N*-oxyamide non lié par liaison hydrogène sont entre 3400 et 3340 cm^{-1} . Les bandes d'absorption de liaisons N-H d'amides ou de *N*-oxyamides liées par liaison hydrogène apparaissent respectivement vers 3300 cm^{-1} et 3200 cm^{-1} .⁶¹⁷ En effet, lorsqu'une liaison N-H est engagée dans une liaison hydrogène, elle est affaiblie donc d'après la loi de Hooke, la bande de vibration d'élongation de cette liaison sort à un nombre d'onde plus faible. Les spectres doivent être pris à des concentrations faibles (typiquement 2 mmol/L) afin de s'affranchir de liaisons hydrogène intermoléculaires.

Par exemple, l'équipe de Dan Yan⁶¹⁷ a étudié par spectroscopie IR en solution le composé de la Figure 170. Dans la région des bandes de vibration d'élongation des liaisons N-H des amides (Figure 170 à droite), on note la présence de 4 bandes majeures qui ont été attribuées (Tableau 17). Il est donc possible d'identifier les atomes engagés dans une liaison hydrogène, ce qui fournit des indications sur la (ou les) conformation(s) majoritaire(s).

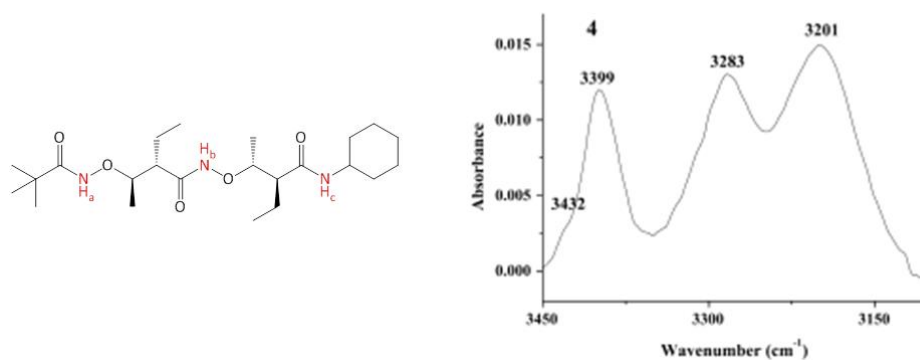


Figure 170 : A gauche : Structure du composé étudié. Les liaisons N-H étudiées sont indiquées en rouge et indicés par les lettres a, b ou c. A droite : Région des bandes d'absorption des liaisons N-H du spectre infrarouge (2 mmol/L, CH_2Cl_2 , TA) après soustraction du spectre de CH_2Cl_2 pur.⁶¹⁷

Nombre d'onde (cm^{-1})	Attribution	Commentaires
3432	Bande de vibration d'élongation de la liaison N- H_c de l'amide	Non lié par liaison hydrogène
3399	Bande de vibration d'élongation de la liaison N- H_a du <i>N</i> -oxyamide	Non lié par liaison hydrogène
3283	Bande de vibration d'élongation de la liaison N- H_c de l'amide	Lié par liaison hydrogène
3201	Bande de vibration d'élongation de la liaison N- H_b du <i>N</i> -oxyamide	Lié par liaison hydrogène

Tableau 17 : Attribution des 4 bandes majeures du spectre infrarouge.⁶¹⁷ Le léger épaulement à 3432 cm^{-1} indique que les conformations ne présentant pas de liaison hydrogène impliquant N- H_c sont en proportion très faible.

Les études par spectroscopie infrarouge en solution des monomères et des dimères de *N*-oxy PNA présentées dans ce chapitre ont été réalisées par Olivier Noel lors de sa thèse.

⁶¹⁷ Y. H. Zhang, K. Song, N. Y. Zhu, D. Yang, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 577-587.

II.3. Modélisation théorique

De nos jours, la géométrie tridimensionnelle d'une molécule peut être prédite grâce à la modélisation moléculaire. Celle-ci élabore et applique un modèle mathématique permettant de représenter les molécules à l'échelle microscopique. Nous nous contenterons ici d'une brève présentation des différents outils de modélisation théorique à notre disposition.

Il est à noter que les résultats obtenus par RMN (par exemple les constantes de couplages scalaires, les distances issues d'études NOESY, etc.) peuvent être intégrés comme contraintes lors des calculs théoriques.

Pour chaque conformère trouvé, un calcul de fréquence de vibration permettra de s'assurer qu'il s'agit bien d'un minimum.

II.3.a. Mécanique moléculaire ou méthodes quantiques

II.3.a.i. Mécanique moléculaire

La mécanique moléculaire est une méthode d'analyse conformationnelle basée sur l'utilisation de champs des forces empiriques et la minimisation d'énergie. Elle permet de décrire l'énergie en fonction des coordonnées atomiques et de rechercher des minima de l'énergie correspondant à des conformères stables.

L'énergie d'interaction totale E_{tot} est calculée avec un modèle empirique utilisant un champ de forces. Le système est constitué d'un ensemble d'atomes liés par des liaisons et les électrons sont ignorés. Les interactions entre les atomes se décomposent en une composante « intramoléculaire » (énergies de déformation harmoniques des liaisons, des angles et dièdres) et une composante « intermoléculaire » décrivant les interactions entre atomes "non liés" (c'est à dire séparés par plus de deux liaisons). Toutes ces interactions correspondent au champ de forces. E_{tot} dépend de $3N$ variables (N étant le nombre d'atomes de la molécule). Le fait que cette technique calcule l'énergie des atomes (et non pas des électrons) au moyen d'approximations semi-classiques apporte une grande simplification. Cette simplification permet de travailler sur des molécules de grande taille, telles que les macromolécules biologiques (protéines, acides nucléiques), ou sur des systèmes comportant un grand nombre de molécules.

Le champ de forces qui va être utile dans l'étude de nos composés est nommé AMBER (*Assisted Molecular Building and Energy Refinement*). Ce champ est particulièrement adapté à l'étude de composés comportant des bases nucléiques.^{618,619}

II.3.a.ii. Méthodes quantiques

Les méthodes quantiques sont basées sur le calcul des orbitales moléculaires. Leur complexité augmente rapidement avec le nombre d'électrons. Deux grandes variantes sont :

⁶¹⁸ A. De Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, P. Hoffmann, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 226-229.

⁶¹⁹ A. De Mesmaeker, C. Lesueur, M. O. Bévière, A. Waldner, V. Fritsch, R. M. Wolf, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2790-2794.

- les méthodes de champ auto-cohérent avec les méthodes *ab initio* (tous les termes énergétiques sont calculés) et les méthodes semi-empiriques (les termes énergétiques les plus difficiles à calculer sont estimés à partir de données expérimentales) ;
- les méthodes basées sur la fonctionnelle de la densité (*Density Functional Theory*, DFT). L'énergie électronique E est alors donnée en fonction de la densité électronique, elle-même fonction de la position de l'électron.

II.3.b. Méthodes de recherches de conformères

Nous allons dans la suite nous intéresser à la mécanique moléculaire. L'exploitation de tout l'espace conformationnel étant limitée par le temps de calcul, il n'existe pas de méthode mathématique générale qui permette de trouver le minimum énergétique global. Cette recherche du minimum absolu constitue le véritable enjeu de la modélisation moléculaire.

On ne traite ici que des techniques utilisées dans nos travaux. Ainsi, la recherche « automatique » basée sur l'algorithme de Monte Carlo n'est pas présentée.

II.3.b.i. Recherche « manuelle » ou systématique

Il s'agit de partir d'un très grand nombre de structures différentes et de les optimiser une à une. Toutes les variables doivent être considérées. Le plus facile et le plus employé est de jouer sur les angles dièdres. Cependant, en faisant varier chaque angle dièdre, le temps de calcul devient très vite énorme. Par conséquent, cette méthode est valable lorsque quelques paramètres contrôlent la conformation de la molécule (par exemple pour l'éthane). Elle apporte des résultats de qualité moyenne avec des molécules plus complexes.

II.3.b.ii. Dynamique moléculaire

La dynamique moléculaire est une méthode de modélisation moléculaire. Cette technique a pour but de calculer les mouvements des molécules, le plus souvent à partir des énergies de la mécanique moléculaire, en appliquant les lois de la mécanique classique. Elle permet de simuler l'évolution des systèmes dans le temps.

La dynamique moléculaire peut être employée pour trouver les conformères les plus stables d'une molécule (Figure 171). Pour cela, on simule une augmentation de température du système, ce qui augmente l'énergie cinétique E_c du système (phase de chauffage en vert sur la Figure 171). Lorsque le système a atteint une certaine énergie totale E_{tot} (avec $E_{tot} = E_c + E_p$), cette énergie est maintenue constante. On laisse alors l'équilibre s'établir, ce qui permet au système d'explorer l'espace conformationnel (phase d'équilibration en bleu sur la Figure 171). L'énergie totale doit être suffisante pour que le système puisse franchir toutes les barrières de potentiel. L'énergie cinétique devenant faible au-dessus de ces barrières, celles-ci sont difficilement franchissables si bien que statistiquement, le système évolue principalement au-dessus des grands puits de potentiel. Afin de trouver les conformations les plus stables, on extrait de ce « film » un grand nombre de conformations à des intervalles de temps réguliers et courts (traits bordeaux sur la Figure 171). Les conformations obtenues sont ensuite optimisées. On obtient une palette de conformères qui contient probablement le conformère le plus bas en énergie

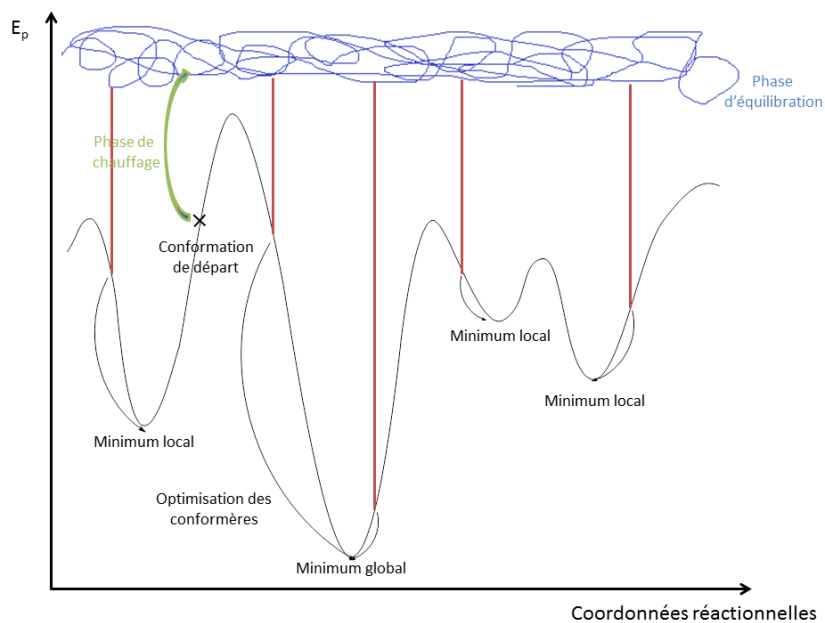


Figure 171 : Principe de la recherche de conformères les plus stables par dynamique moléculaire.

II.3.b.iii. Recuit simulé

La technique de recuit simulée est basée sur les mêmes principes que la recherche de conformères par dynamique moléculaire (Figure 172). Cette technique permet de rechercher directement le conformère le plus stable. Les phases de chauffage (en vert sur la Figure 172) et d'équilibration (en bleu sur la Figure 172) sont plus courtes que précédemment et sont suivies d'une phase de refroidissement (en bordeaux sur la Figure 172). Cela permet de piéger le système dans le puit de potentiel le plus profond. Une minimisation permet d'obtenir le conformère le plus stable).

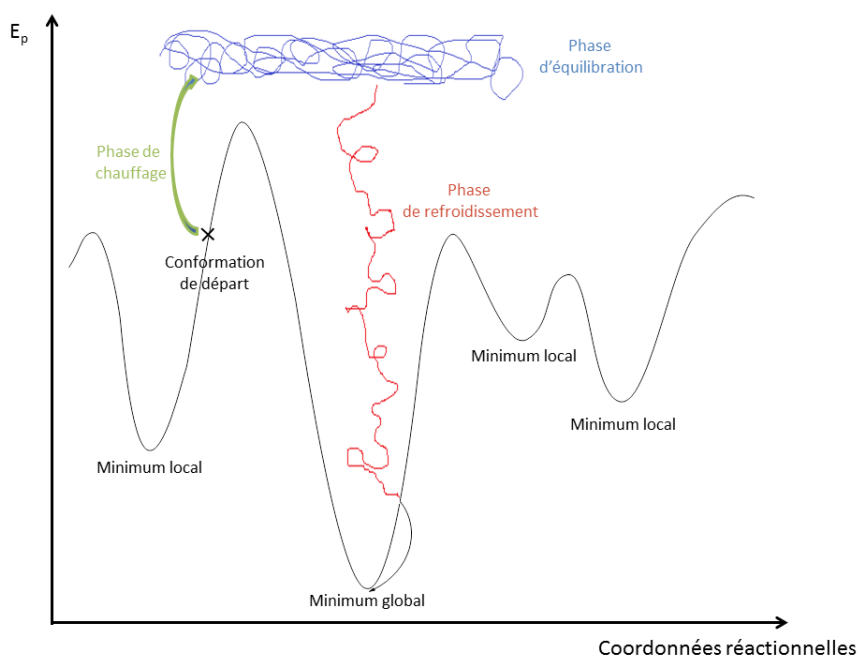


Figure 172 : Principe de la technique du recuit simulé.

II.4. Autres techniques d'analyse structurale

Nous venons de présenter les différentes techniques qui vont être utilisées lors de nos études. Il existe bien d'autres techniques que nous n'avons pu utiliser faute de moyens matériels et de temps : le dichroïsme circulaire, la diffraction aux rayons X, etc.

III. CONFORMATIONS D'OLIGOMERES D'AMINOXY ACIDES DECRITES DANS LA LITTERATURE

Afin d'adopter une structure secondaire bien définie, les peptides d'acides aminés doivent comporter un nombre important (au moins une dizaine) de résidus.⁶²⁰ Or, l'étude de la littérature montre que les peptides d'aminooxy acides adoptent une structure bien définie dès qu'ils comportent deux résidus. Cette organisation est due à la capacité des liaisons *N*-oxyamides de s'engager dans des liaisons hydrogène intramoléculaires. Ces structures peuvent être des α - , β - , γ -turns (coudes)⁶⁰⁵ ou des hélices.

III.1. Les α -aminooxy acides

En 1996, l'équipe de Dan Yang⁶⁰¹ a étudié la structure de peptides contenant des α -aminooxy acides. Ils ont mis en évidence la formation par liaison hydrogène d'un cycle à 8 chaînons appelé α N-O turn (Figure 173).

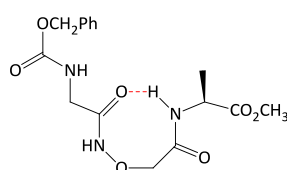


Figure 173 : Exemple d' α N-O turn.⁶⁰¹ La liaison hydrogène responsable de la formation du cycle à 8 est indiquée en rouge.

Des oligomères homochiraux d' α -aminooxy acides forment une hélice dont la structure est indépendante de la présence de chaînes latérales.³⁹⁷ Ainsi, le squelette du composé de la Figure 174 forme une structure en hélice droite avec des cycles à 8 formés grâce à des liaisons hydrogène. Il y a donc 4 α N-O turns consécutifs. De telles structures et leurs variantes (coudes inverses) ont été analysées de manière approfondie par des études théoriques, RMN (2D, dilution, dosage), IR, de dichroïsme circulaire ou de diffraction des rayons X.^{485,486,621,622,623,}

⁶²⁰ R. P. Chang, S. H. Gellman, W. F. D. Grado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232.

⁶²¹ Y. D. Wu, D. P. Wang, K. W. K. Chan, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11189-11196.

⁶²² D. Yang, J. Qu, W. Li, D. P. Wang, Y. Ren, Y. D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14452-14457.

⁶²³ J. Wei, X. Shao, M. Gong, B. Zhu, Y. Cui, Y. Gao, R. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2986-2989.

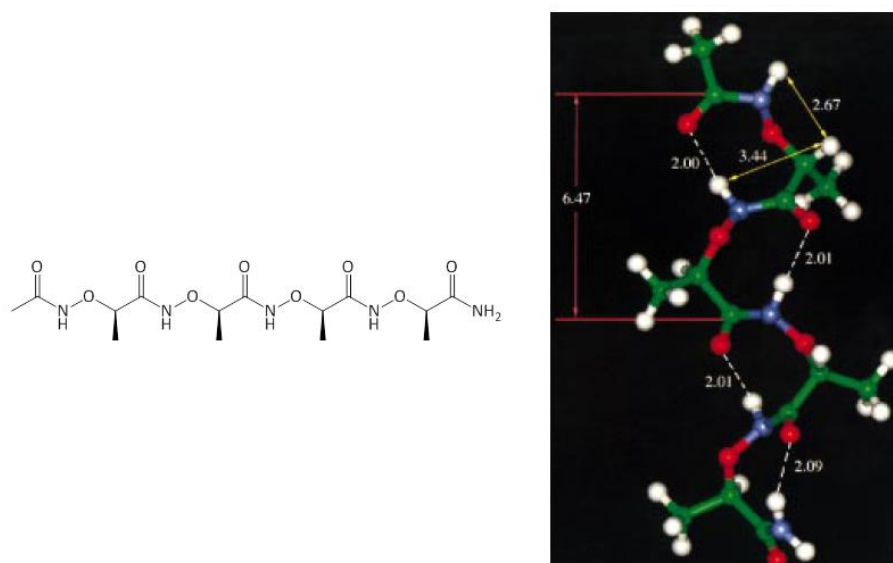


Figure 174 : A gauche : Structure du composé étudié. A droite : Structure du composé calculée par la méthode HF/6-31G(d).³⁹⁷

En 2003,⁶²⁴ cette même équipe a montré que des peptides composés alternativement d' α -aminoxy acides et d' α -amino acides peuvent former des γ -turns qui sont des cycles à 7 chaînons (Figure 175).

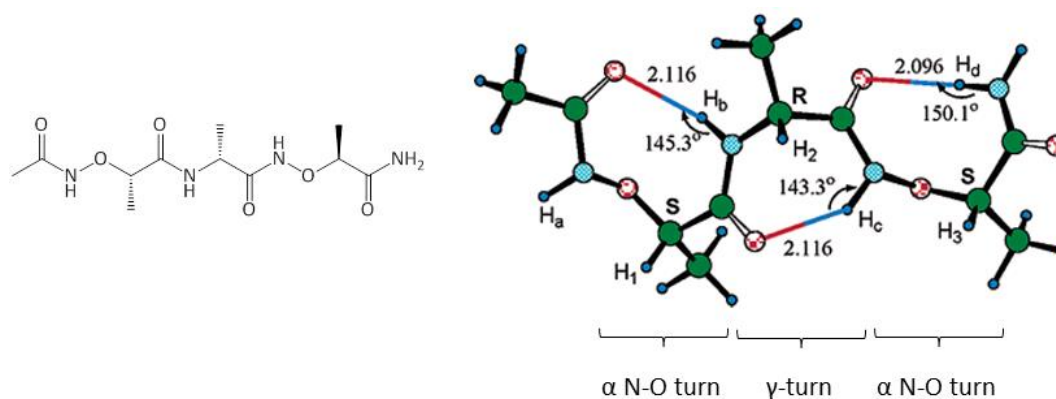


Figure 175 : A gauche : Structure du peptide étudié. A droite : Conformation la plus stable calculée par la méthode HF/6-31G(d,p).⁶²⁴

III.2. Les β -aminoxy acides

L'équipe de Yang a, par la suite, étudié des peptides de β -aminoxy acides.⁶²⁵ La présence d'un atome de carbone supplémentaire fait que la structure est moins contrainte.

De la même manière que les peptides d' α -aminoxy acides forment des cycles à 8 chaînons appelés α N-O turns, les peptides de β -aminoxy acides forment des hélices avec des cycles à 9

⁶²⁴ D. Yang, W. Li, J. Qu, S. W. Luo, Y. D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13018-13019.

⁶²⁵ D. Yang, Y. H. Zhang, N. Y. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9966-9967.

chainons appelés β N-O turns (Figure 176).⁶²⁵ De nombreux peptides de β -aminoxy acides formant de telles structures ont été étudiés.^{606,615,617,626}

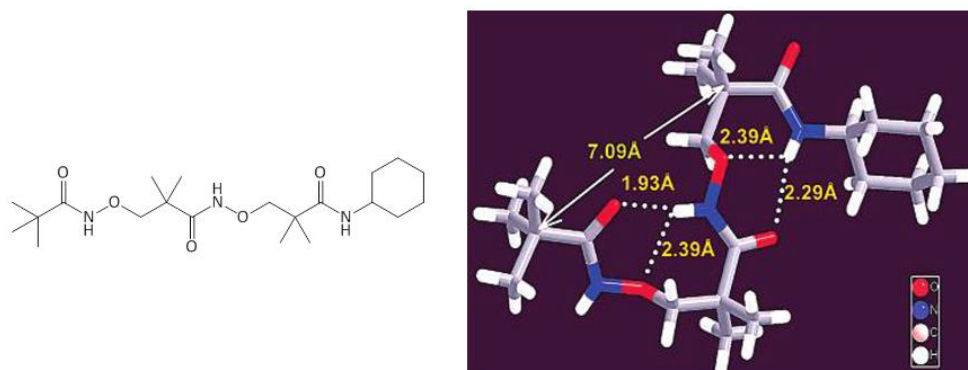


Figure 176 : A gauche : Structure du composé étudié. A droite : Structure de ce composé déterminée par diffraction aux rayons X.⁶²⁵

III.3. Les γ -aminoxy acides

L'équipe de Yang s'est enfin intéressée aux peptides de γ -aminoxy acides.^{603,627} Elle a montré que ces derniers forment des structures en coudes et en hélice avec des cycles à 10 chainons (appelés γ N-O turns) formés par liaison hydrogène (Figure 177).

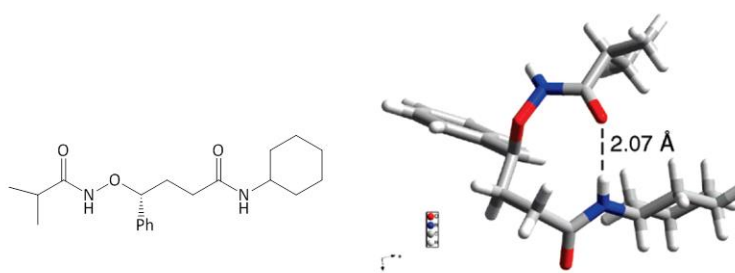


Figure 177 : A gauche : Structure du composé étudié. A droite : Structure de ce composé déterminée par diffraction aux rayons X.⁶²⁷

IV. ETUDES CONFORMATIONNELLES DES OLIGOMERES DE N-OXY PNA

Nous avons vu que, grâce à leur capacité à former des liaisons hydrogène, les peptides d'aminoxy acides forment des structures secondaires bien définies. Les *N*-oxy PNA sont donc aussi susceptibles d'adopter des conformations intéressantes. Nous allons les étudier dans ce paragraphe.

IV.1. Etude des monomères de *N*-oxy PNA

Nous allons commencer par étudier trois monomères de *N*-oxy PNA dont les structures sont rappelées sur la Figure 178.

⁶²⁶ D. Yang, Y. H. Zhang, B. Li, D. W. Zhang, J. C. Y. Chan, N. Y. Zhu, S. W. Luo, Y. D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6956-6966.

⁶²⁷ F. Chen, N. Y. Zhu, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15980-15981.

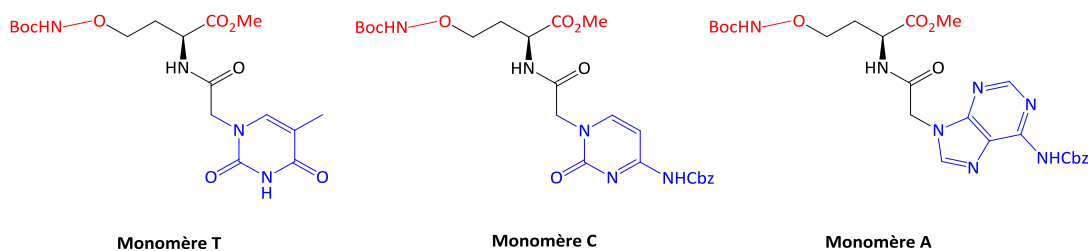


Figure 178 : Structure des monomères de *N*-oxy PNA obtenus par Olivier Noel. La base nucléique des monomères cytosine et adénine est protégée. Les bases nucléiques sont dessinées en bleu et les fonctions aminooxyles protégées et acides carboxyliques protégées en rouge.

IV.1.a. Etude du monomère thymine

IV.1.a.i. Spectre infrarouge en solution

Le spectre infrarouge du monomère thymine en solution dans le chloroforme à 0,5 mmol/L a été mesuré par Olivier Noel (Figure 179). En raison de son caractère peu dissociant et de sa polarité moyenne, le dichlorométhane a été choisi comme solvant.

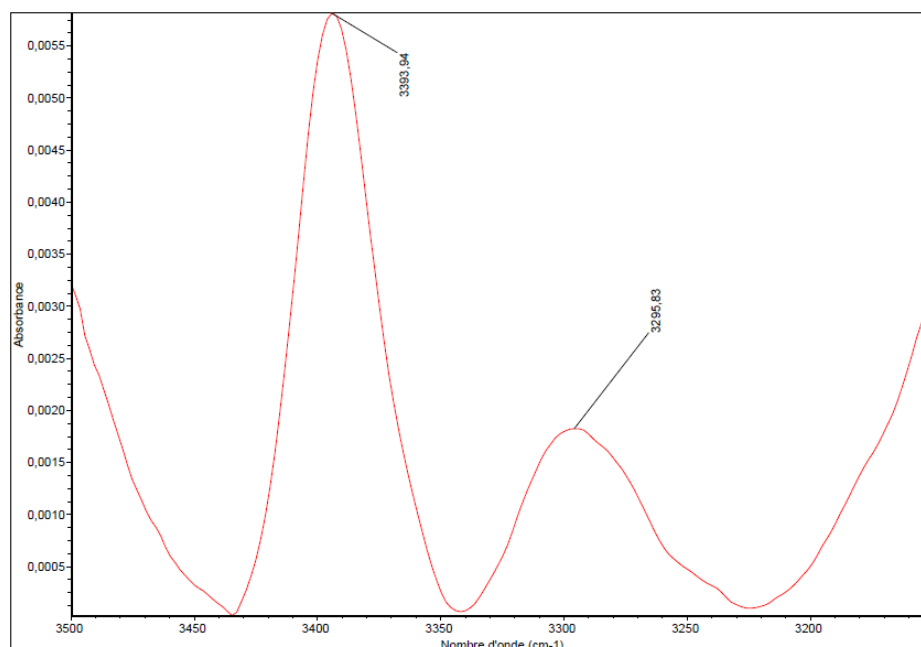


Figure 179 : Région des bandes d'élongation des liaisons N-H du spectre infrarouge du monomère thymine en solution à 0,5 mmol/L dans le chloroforme à TA. Le spectre du chloroforme pur a été soustrait.

On observe une bande très large (recouvrant probablement plusieurs bandes) vers 3400 cm^{-1} et une autre vers 3300 cm^{-1} . On peut faire l'hypothèse que la large bande à 3400 cm^{-1} correspond à des bandes de vibration d'élongation de liaisons N-H libres d'oxycarbamates et d'amides et que la large bande à 3300 cm^{-1} correspond à des liaisons N-H liés d'amides. Aucune bande vers 3200 cm^{-1} n'est observée indiquant qu'il n'y a pas de liaison hydrogène intramoléculaire avec le NH de l'oxycarbamate dans ce composé.

Ce spectre confirme la présence de liaisons hydrogène impliquant des NH mais il ne nous est pas possible à ce stade de proposer une structure pour le monomère thymine.

IV.1.a.ii. Etude par RMN 2D

L'étude est faite dans le chloroforme deutéré. Etant donné la moindre sensibilité de la RMN par rapport à la spectroscopie IR, la concentration en monomère thymine est multipliée par un facteur 50. L'attribution a été faite grâce à des séquences COSY, HSQC et HMBC. Le spectre NOESY est donné sur la Figure 180.

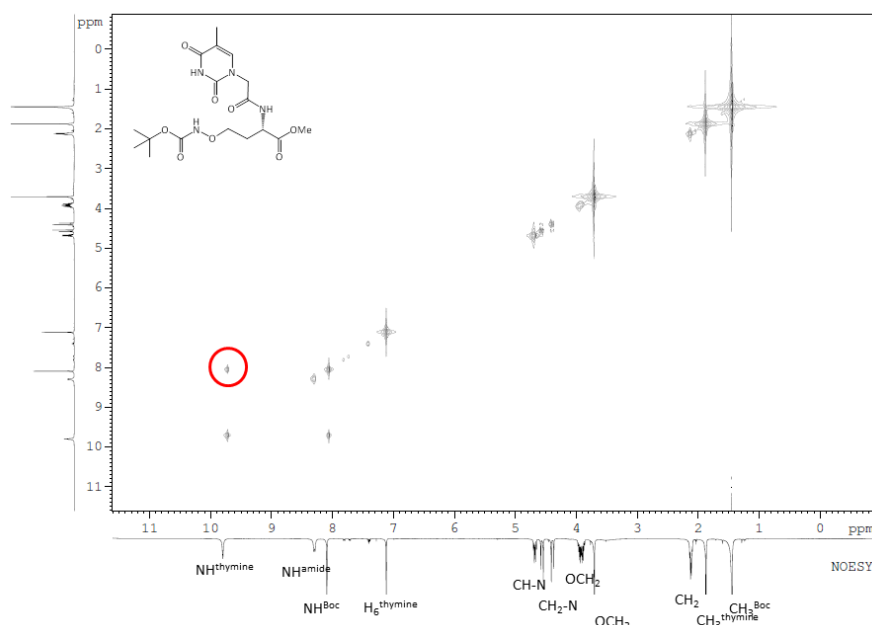


Figure 180 : Spectre NOESY du monomère thymine en solution dans CDCl_3 à la concentration de 27 mmol/L (spectromètre Brüker 400 MHz). La corrélation NOE observée est encadrée en rouge. L'attribution du spectre RMN ^1H est indiquée en bas de la figure.

Seul deux protons sont corrélés sur ce spectre : il s'agit du proton de la fonction aminooxyle protégée par un groupement Boc et du proton NH de la base thymine (Figure 181). Ces deux protons sont donc proches dans l'espace. Cela signifie que la base nucléique se rapproche de la fonction aminooxyle protégée.

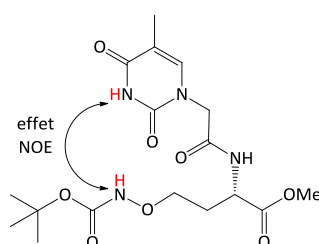


Figure 181 : Effet NOE entre deux protons du monomère thymine en solution dans le CDCl_3 . Les protons mis en jeu sont indiqués en rouge.

En prévision de problèmes de solubilité des dimères dans le chloroforme, nous avons alors répété cette étude dans le $\text{DMSO}-d_6$. Malheureusement, ce solvant est très polaire et dissociant si bien que nous n'observons plus aucun effet NOE. Ainsi, ce solvant dissocie totalement la ou les liaison(s) hydrogène responsable(s) de la structuration. Il n'est donc pas possible d'effectuer cette étude dans le DMSO.

IV.1.a.iii. Suivi par RMN ^1H d'expériences de dilution et de dosage

Afin de déterminer les protons NH engagés dans des liaisons hydrogène, nous menons une expérience de dosage (Figure 182). Pour cela, on ajoute des volumes successifs de 5 μL de DMSO- d_6 à 500 μL d'une solution du monomère thymine à 5 mmol/L dans CDCl_3 à TA. Ces additions sont réalisées jusqu'à 9% en volume.

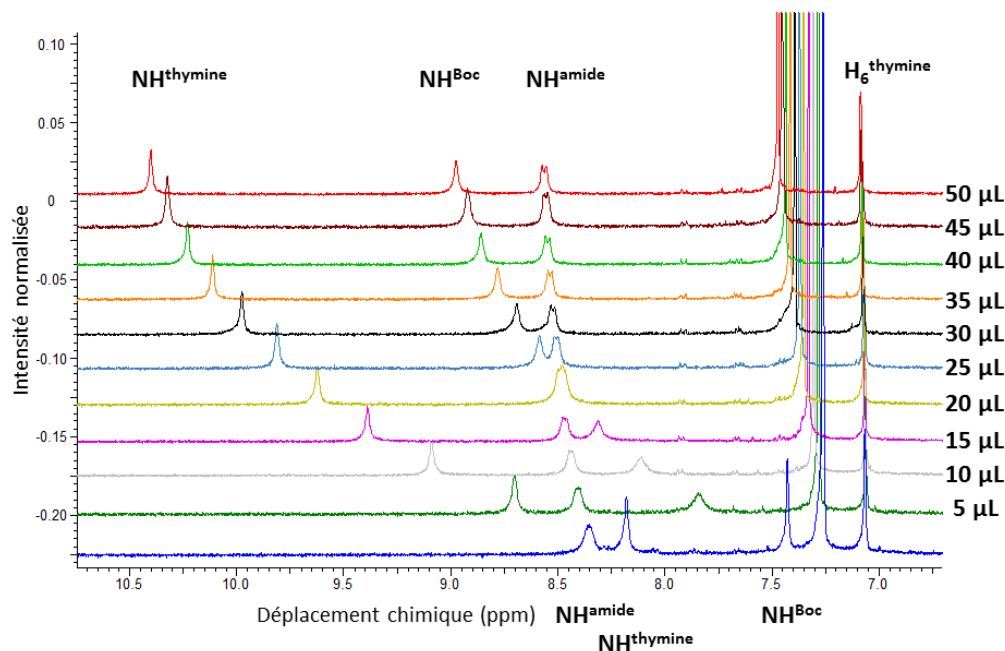


Figure 182 : Région des pics des protons NH des spectres RMN ^1H obtenus par ajout de DMSO- d_6 à 500 μL d'une solution du monomère thymine à 5 mmol/L dans CDCl_3 à TA. Le volume de DMSO- d_6 ajouté est indiqué à droite. L'attribution est effectuée grâce aux résultats du paragraphe précédent.

On constate que les déplacements chimiques des protons $\text{NH}^{\text{thymine}}$ et NH^{Boc} varient de manière importante avec la nature du solvant (variation d'environ 2,2 ppm et 1,5 ppm de 0% à 9% de DMSO). A l'inverse, le pic du NH^{amide} dépend très peu de la nature du solvant (variation de 0,15 ppm). Cela signifie que les protons $\text{NH}^{\text{thymine}}$ et NH^{Boc} ne sont pas engagés dans des liaisons hydrogène intramoléculaires tandis que le proton NH^{amide} l'est.

On s'intéresse maintenant à une expérience de dilution (Figure 183). Les déplacements chimiques des protons $\text{NH}^{\text{thymine}}$ et NH^{Boc} varient de manière importante avec la dilution (variation d'environ 1,5 ppm et 0,5 ppm de 100 mmol/L à 2,5 mmol/L). A l'inverse, le pic du NH^{amide} dépend très peu de la dilution. On arrive donc aux mêmes conclusions que lors de l'expérience de dosage : les protons $\text{NH}^{\text{thymine}}$ et NH^{Boc} ne sont pas engagés dans des liaisons hydrogène intramoléculaires tandis que le proton NH^{amide} l'est.

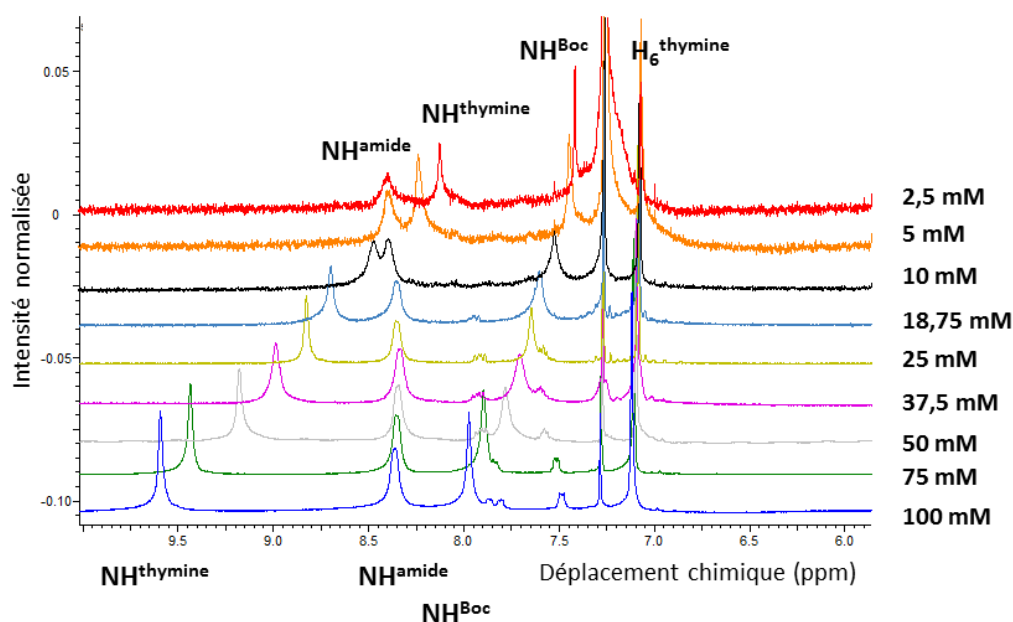


Figure 183 : Région des pics des protons NH des spectres RMN ¹H obtenus lors de dilutions successives d’une solution du monomère thymine dans CDCl₃ à TA. Les concentrations en monomère thymine sont indiquées à droite.

IV.1.a.iv. Recherche des conformations les plus stables par dynamique moléculaire et par recuit simulé

Les calculs ont été menés avec le logiciel Hyperchem 8.0 en utilisant le champ de force AMBER (paramètres amber2). Les minimisations ont été effectuées dans le vide avec l’algorithme Polak-Ribière (gradient conjugué) avec un gradient final RMS (*Root Mean Square*) inférieur à 0,1 kcal/(mol.Å).

La recherche des minima en énergie a été effectuée par dynamique moléculaire et par recuit simulé. Les conditions précises sont indiquées dans le Tableau 18.

	Temps de chauffage (ps)	Temps d’équilibration (ps)	Temps de refroidissement (ps)	Pas (ps)	Température initiale (K)	Température finale (K)	Pas de température (K)	Echantillonnage (ps)
Dynamique moléculaire	4	15	0	0,001	0	2000	1	0,5
	4	25	0	0,001	0	2500	1	0,5
Recuit simulé	4	4	15	0,001	0	2000	1	0,5
	4	4	20	0,001	0	2500	1	0,5

Tableau 18 : Conditions utilisées en dynamique moléculaire et en recuit simulé pour trouver les conformères les plus stables. Toutes ces simulations sont faites dans le vide à une température qui n’est pas maintenue constante.

Ces 4 méthodes différentes nous ont permis d’obtenir les 5 conformères de la Figure 184.

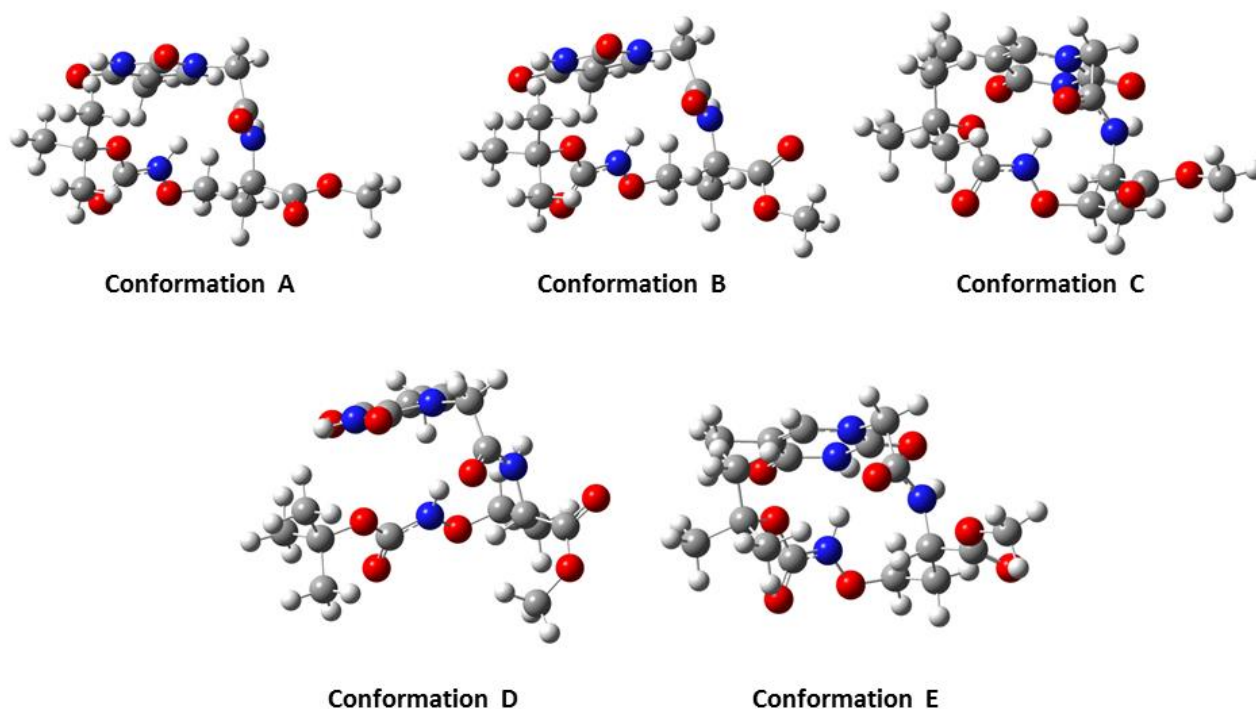


Figure 184 : Conformations les plus basses en énergie obtenues par dynamique moléculaire et par recuit simulé en phase gaz (logiciel Hyperchem, MM AMBER).

Nous définissons deux angles dièdres α et β (Figure 185) qui permettent de caractériser l'orientation de la base par rapport au squelette. Les caractéristiques des 5 conformations obtenues sont résumées dans le Tableau 19.

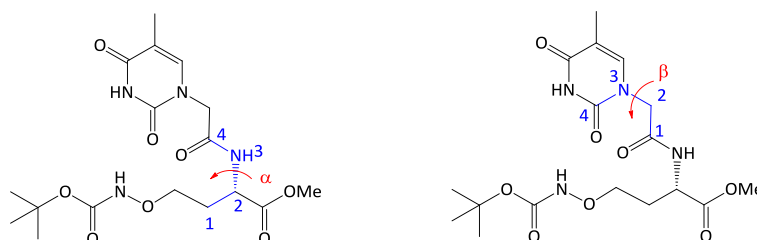


Figure 185 : A gauche : Définition de l'angle dièdre α . A droite : Définition de l'angle dièdre β .

	E (kcal/mol)	d(NH ^{thymine} /NH ^{Boc}) (Å)	α (°)	β (°)	Présence d'une liaison hydrogène ?
Conformation A	0	3,84	156	- 90	Aucune
Conformation B	0,408	3,87	155	- 90	Aucune
Conformation C	0,596	3,67	151	89	Entre NH ^{amide} et C ₂ =O ^{thymine} (2,16 Å et 163°)
Conformation D	0,625	3,84	156	- 90	Aucune
Conformation E	0,933	3,71	148	89	Entre NH ^{amide} et C ₂ =O ^{thymine} (2,18 Å et 162°)

Tableau 19 : Energie et description des conformères les plus stables du monomère thymine. La distance entre le proton du NH de la thymine et le proton de l'oxyamine protégée par un groupement Boc est indiquée. Lorsqu'une liaison hydrogène se forme, la longueur de la liaison hydrogène et l'angle formé par les 3 atomes impliqués sont indiqués. La référence en énergie est prise par rapport au conformère le plus stable trouvé.

Pour ces 5 conformations, la distance entre le $\text{NH}^{\text{thymine}}$ et le NH^{Boc} est inférieure à 4 Å, ce qui est compatible avec l'observation d'un effet NOE. Seul les conformations C et E présentent une liaison hydrogène (entre NH^{amide} et $\text{C}_2=\text{O}^{\text{thymine}}$). Aucune liaison hydrogène ne faisant intervenir la fonction aminooxyle protégée n'est mise en évidence.

On constate que toutes ces conformations adoptent une allure globale semblable. En effet, pour ces 5 conformations, la base nucléique vient se rapprocher de la fonction aminooxyle protégée. Afin de mieux étudier ces conformations et de nous assurer qu'il n'existe pas de conformations avec une allure générale bien différente, nous avons alors déterminé l'énergie du conformère optimisé en fonction des angles dièdres α et β . Les résultats sont rapportés sur le graphique de la Figure 186.

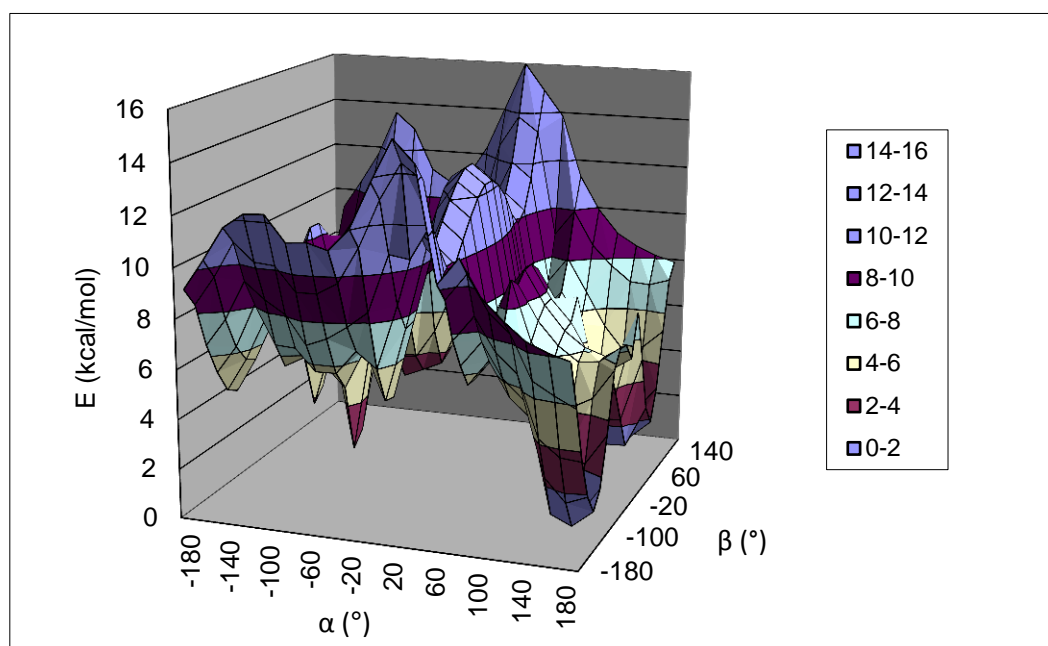


Figure 186 : Energie du monomère thymine en fonction des angles dièdres α et β (MM AMBER, logiciel Hyperchem). La référence en énergie est prise par rapport au conformère le plus stable trouvé.

On remarque qu'il y a deux zones bien précises du graphique pour lesquelles les conformères obtenus sont plus stables. Il s'agit des régions $\alpha \approx 150^\circ$ et $\beta \approx -90^\circ$ ou $\alpha \approx 150^\circ$ et $\beta \approx 90^\circ$. Les conformères trouvés (Tableau 19) se trouvent dans ces deux régions. Lorsque $\beta \approx 90^\circ$, une liaison hydrogène entre NH^{amide} et $\text{C}_2=\text{O}^{\text{thymine}}$ se forme alors qu'il n'y a pas de liaisons hydrogène lorsque $\beta \approx -90^\circ$.

Cette tendance de la base nucléique à se rapprocher de la fonction aminooxyle protégée peut s'expliquer par des interactions de Van der Waals (dipôle-dipôle, dipôle-dipôle induit, dipôle induit-dipôle induit).

Conformément aux travaux de Dan Yang et à d'autres travaux de la littérature,^{628,629} nous avons alors optimisé les 5 conformères précédemment obtenus par calcul DFT avec la méthode B3LYP/6-31G(d,p). La molécule se déplie complètement et la distance entre le $\text{NH}^{\text{thymine}}$ et le NH^{Boc} n'est plus compatible avec l'observation d'un effet NOE entre ces deux protons. On a alors choisi de

⁶²⁸ S. Chandrasekhar, N. Kiranmai, M. U. Kiran, A. S. Devi, G. P. K. Reddy, M. Idris, B. Jagadeesh, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6962-6964.

⁶²⁹ K. R. Gore, S. Harikrishina, P. I. Pradeepkumar, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 9956-9962.

travailler dans la base 6-311++G(d,p). Le résultat est identique. Les calculs DFT ne nous permettent pas de modéliser correctement ce monomère.

IV.1.a.v. Conclusion

Les différentes études réalisées suggèrent l'existence de conformations dans lesquelles le proton de la liaison amide est engagé dans une liaison hydrogène. Cette liaison hydrogène se fait avec l'oxygène O lié au carbone C₂ de la base thymine.

On note une tendance de la base nucléique à se rapprocher de la fonction aminooxyle protégée. Dans les conformères trouvés, la fonction aminooxyle protégée par un groupement Boc n'est pas engagée dans une liaison hydrogène.

IV.1.b. Etude du monomère cytosine

IV.1.b.i. Spectre infrarouge en solution

De la même manière que pour le monomère thymine, les études ont été commencées par une étude par spectroscopie infrarouge en solution. La région des bandes d'élongation des liaisons N-H du spectre infrarouge du monomère cytosine en solution à 0,5 mmol/L dans le chloroforme à TA est rapportée sur la Figure 187.

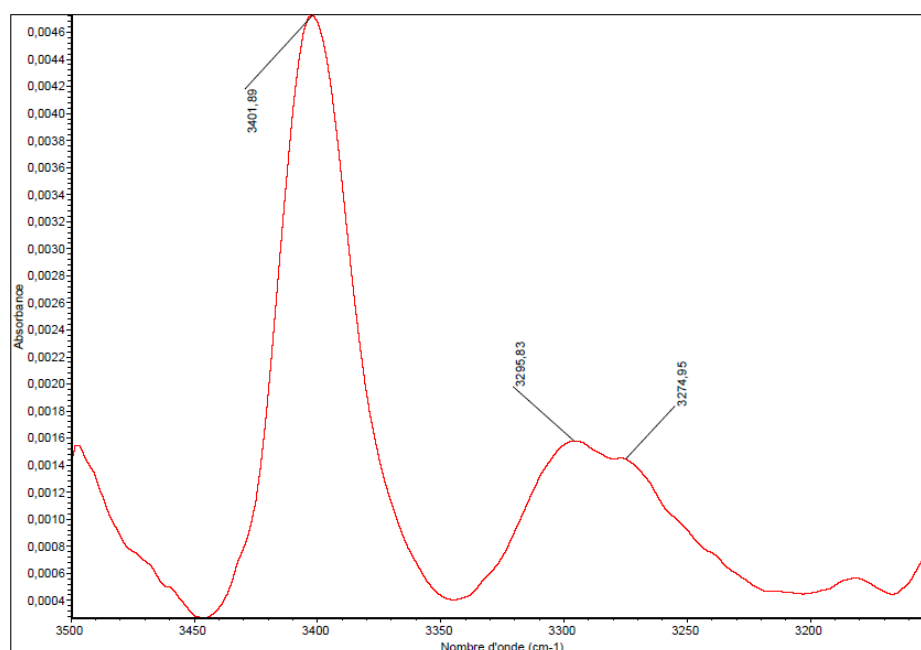


Figure 187 : Région des bandes d'élongation des liaisons N-H du spectre infrarouge du monomère cytosine en solution à 0,5 mmol/L dans le chloroforme à TA. Le spectre du chloroforme pur a été soustrait.

On observe une bande très large (recouvrant probablement plusieurs bandes) vers 3400 cm⁻¹ et une autre vers 3280 cm⁻¹. On peut faire l'hypothèse que la large bande à 3400 cm⁻¹ correspond à des bandes de vibration d'élongation de liaisons N-H libres d'oxycarbamates, de carbamates et d'amides et que la large bande à 3280 cm⁻¹ correspond à des liaisons N-H liés d'amides. Aucune bande vers 3200 cm⁻¹ n'est observée indiquant qu'il n'y a pas de liaisons hydrogène intramoléculaires avec les NH de l'oxycarbonate ou du carbonate dans ce composé.

IV.1.a.ii. Suivi par RMN ^1H d'une expérience de dosage

Afin de déterminer les liaisons N-H impliquées dans des liaisons hydrogène, nous avons effectué une expérience de dosage similaire à celle effectuée avec le monomère thymine. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 188.

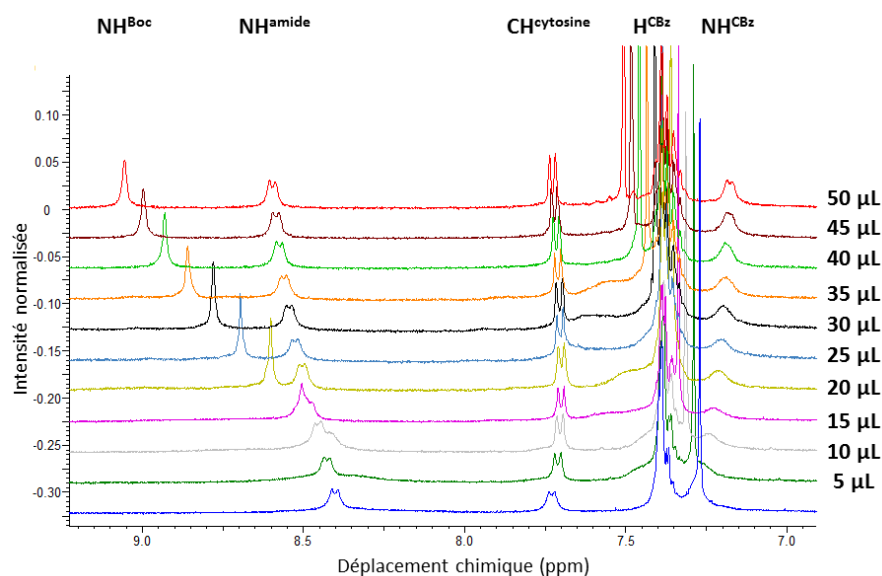


Figure 188 : Région des pics des protons NH des spectres RMN ^1H obtenus par ajout de DMSO- d_6 à 500 μL d'une solution du monomère cytosine à 5 mmol/L dans CDCl_3 à TA. Le volume de DMSO- d_6 ajouté est indiqué à droite. L'attribution est effectuée grâce à des spectres COSY et HSQC.

Les variations absolues des déplacements chimiques des protons NH lors de l'ajout de DMSO- d_6 sont résumées dans le Tableau 20.

	Variations absolues du déplacement chimique
NH^{Boc}	0,8 ppm
NH^{amide}	0,2 ppm
NH^{CBz}	0,15 ppm

Tableau 20 : Variations absolues des déplacements chimiques des protons NH lors de l'ajout de DMSO- d_6 à 500 μL d'une solution du monomère cytosine à 5 mmol/L dans CDCl_3 à TA. Les ajouts sont faits jusqu'à 9% en volume de DMSO- d_6 dans le chloroforme.

Le déplacement chimique du proton NH^{Boc} dépend fortement de la nature du solvant. Par conséquent, ce proton n'est pas engagé dans une liaison hydrogène intramoléculaire. Pour les protons NH^{amide} et NH^{CBz} , la variation est faible (0,15 ppm et 0,2 ppm).

IV.1.b.iii. Recherche des conformations les plus stables par dynamique moléculaire et par recuit simulé

Avec la même méthode que celle utilisée avec le monomère thymine, nous avons obtenu les 5 conformères de la Figure 189. Leurs énergies relatives sont répertoriées dans le Tableau 21.

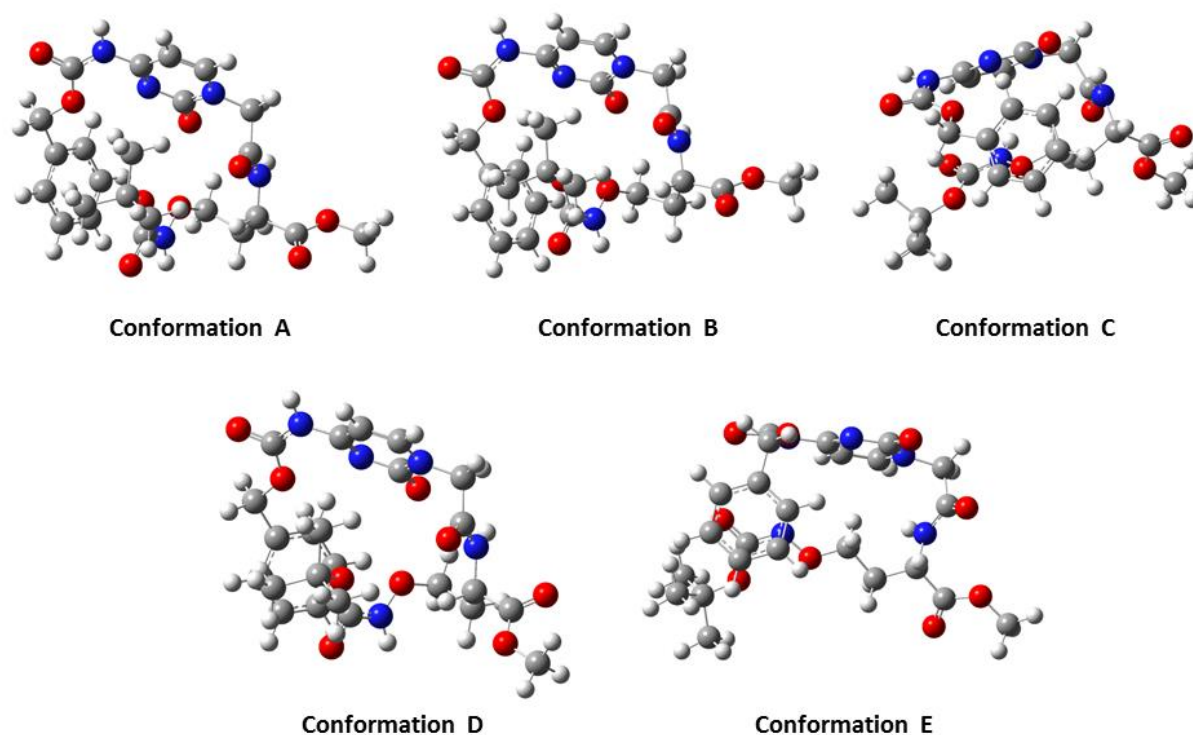


Figure 189 : Conformations les plus basses en énergie obtenues par dynamique moléculaire et par recuit simulé en phase gaz (logiciel Hyperchem, MM AMBER).

	E (kcal/mol)
Conformation A	0
Conformation B	0,107
Conformation C	0,113
Conformation D	0,477
Conformation E	0,860

Tableau 21 : Energie des conformères les plus stables du monomère cytosine. La référence en énergie est prise par rapport au conformère le plus stable trouvé.

On remarque que les conformations obtenues sont « compactes » et ont des structures relativement proches. En effet, la base nucléique vient systématiquement se replier près de la fonction aminooxyle protégée. Cela s'explique probablement par des interactions de Van Der Waals stabilisantes (dipôle-dipôle, dipôle-dipôle induit et dipôle induit-dipôle induit). Pour les conformations A, B, D et E, le cycle aromatique benzoyle est empilé sur la fonction aminooxyle protégée.

Aucun des conformères obtenus ne présente de liaison hydrogène.

IV.1.b.iv. Conclusion

Les différentes études suggèrent l'existence de plusieurs conformères stables. Certains de ces conformères présentent des liaisons hydrogène, d'autres non.

Faute de temps, nous n'avons pas pu réaliser d'autres études (RMN 2D entre autres). Avec les données disponibles, nous pouvons seulement affirmer que le proton NH^{Boc} n'est pas engagé dans

une liaison hydrogène intramoléculaire. Il ne nous est pas possible de proposer un ou des conformères favorisés.

IV.1.c. Etude du monomère adénine

IV.1.c.i. Spectre infrarouge en solution

De la même manière que pour le monomère thymine, les études ont été commencées par une étude par spectroscopie infrarouge en solution. La région des bandes d'élongation des liaisons N-H du spectre infrarouge du monomère adénine en solution à 0,5 mmol/L dans le chloroforme à TA est rapportée sur la Figure 190.

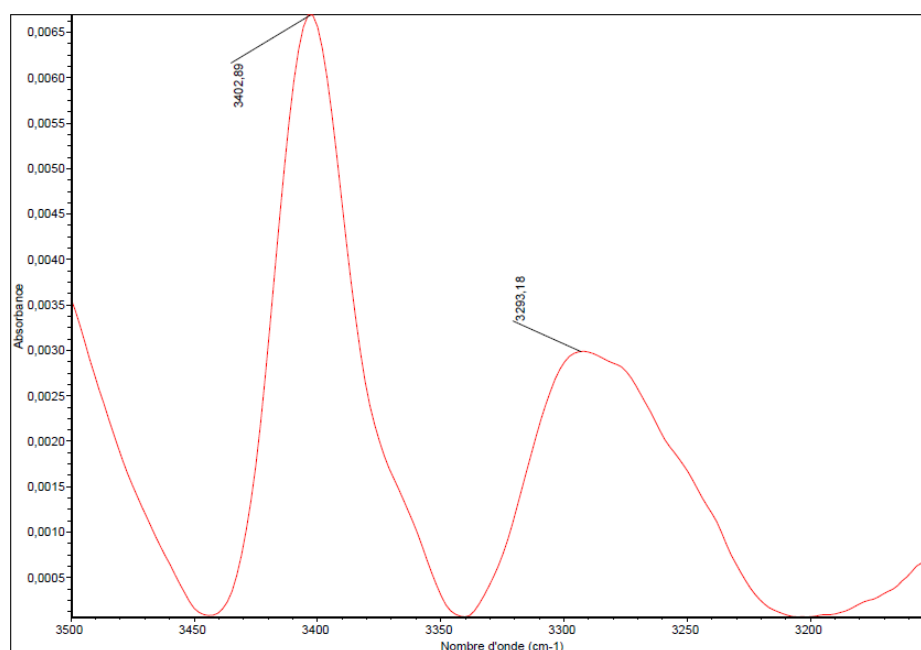


Figure 190 : Région des bandes d'élongation des liaisons N-H du spectre infrarouge du monomère adénine en solution à 0,5 mmol/L dans le chloroforme à TA. Le spectre du chloroforme pur a été soustrait.

On observe une bande très large (recouvrant probablement plusieurs bandes) vers 3400 cm⁻¹ et une autre vers 3330 cm⁻¹. On peut faire la même hypothèse que précédemment : la large bande à 3400 cm⁻¹ correspond à des bandes de vibration d'élongation de liaisons N-H libres d'oxycarbamates, de carbamates et d'amides et la large bande à 3300 cm⁻¹ correspond à des liaisons N-H liés d'amides. Aucune bande vers 3200 cm⁻¹ n'est observée indiquant qu'il n'y a pas de liaisons hydrogène intramoléculaires avec les NH des oxycarbamates ou des carbamates dans ce composé.

IV.1.c.ii. Suivi par RMN ¹H d'une expérience de dosage

Afin de déterminer les liaisons N-H impliquées dans des liaisons hydrogène, nous avons effectué une expérience de dosage similaire à celle effectuée avec le monomère thymine. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 191.

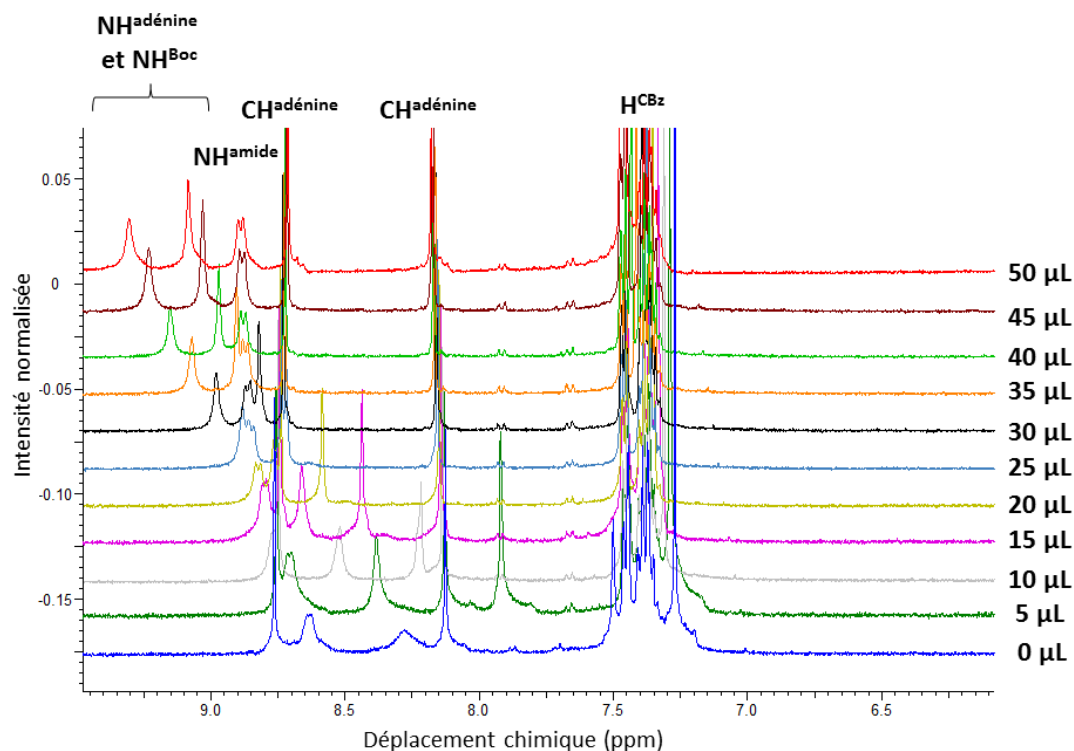


Figure 191 : Région des pics des protons NH des spectres RMN ¹H obtenus par ajout de DMSO à 500 µL d’une solution du monomère adénine à 5 mmol/L dans CDCl₃ à TA. Le volume de DMSO ajouté est indiqué à droite. L’attribution est effectuée grâce à des spectres COSY et HSQC.

Les variations absolues des déplacements chimiques des protons NH^{adénine}, NH^{Boc} et NH^{amide} sont répertoriées dans le Tableau 22.

	Variations absolues
NH ^{Boc} ou NH ^{adénine}	1,7 ppm
NH ^{Boc} ou NH ^{adénine}	1,0 ppm
NH ^{amide}	0,3 ppm

Tableau 22 : Variations absolues des déplacements chimiques des protons NH lors de l’ajout de DMSO-*d*₆ à 500 µL d’une solution du monomère cytosine à 5 mmol/L dans CDCl₃ à TA. Les ajouts sont faits jusqu’à 9% en volume de DMSO-*d*₆ dans le chloroforme.

On peut en conclure qu’il existe des conformations dans lesquelles les protons NH^{Boc} et NH^{adénine} ne sont pas engagés dans des liaisons hydrogène intramoléculaires.

IV.1.c.iii. Recherche des conformations les plus stables par dynamique moléculaire et par recuit simulé

Le même protocole que précédemment a permis d’obtenir les 5 conformères de la Figure 192. Leurs énergies relatives sont données dans le Tableau 23.

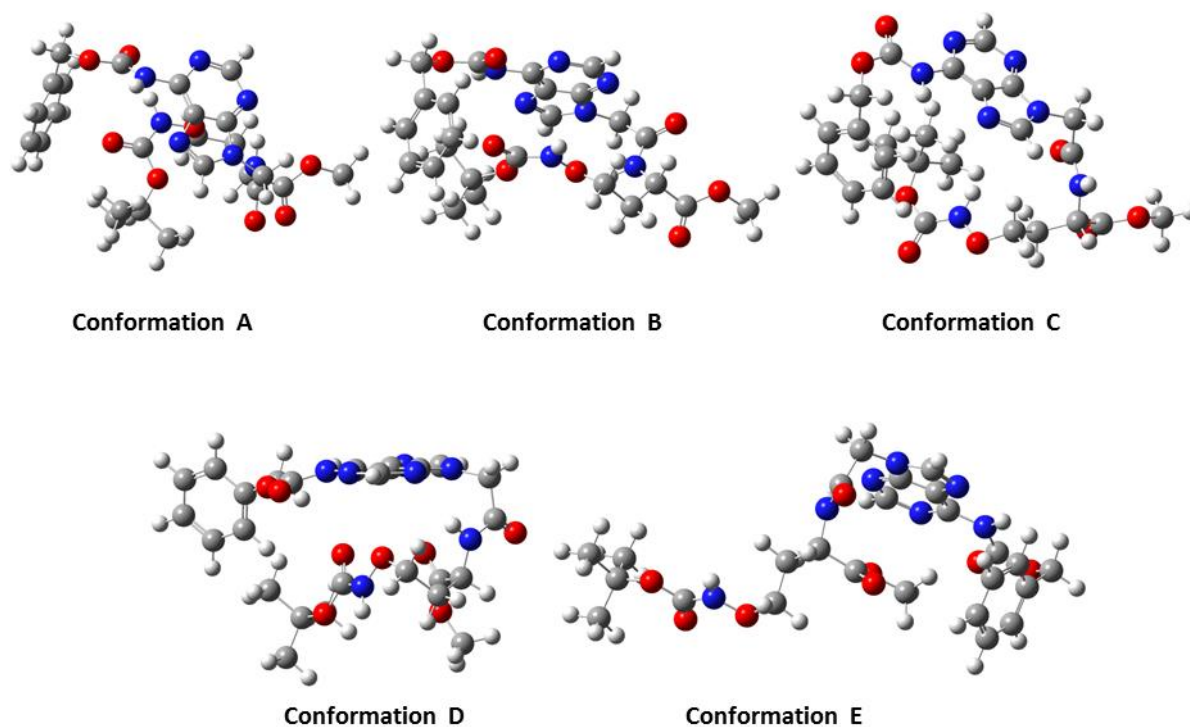


Figure 192 : Conformations les plus basses en énergie obtenues par dynamique moléculaire et par recuit simulé en phase gaz (logiciel Hyperchem, MM AMBER).

	E (kcal/mol)
Conformation A	0
Conformation B	0,040
Conformation C	2,38
Conformation D	2,91
Conformation E	3,97

Tableau 23 : Energie des conformères les plus stables du monomère adénine. La référence en énergie est prise par rapport au conformère le plus stable trouvé.

Pour les conformations A, B, C et D, la base nucléique vient se rapprocher de la fonction aminooxyle protégée. Cela conduit à des conformations très compactes. Cela est probablement rendu possible par des interactions de Van Der Waals. Aucune des conformations obtenues ne présente de liaison hydrogène.

IV.1.c.iv. Conclusion

Les résultats obtenus par spectroscopie IR, par RMN 1D et par modélisation moléculaire suggèrent l'existence de plusieurs conformères. Certains de ces conformères présentent des liaisons hydrogène, d'autres non. Il faudrait d'autres études complémentaires par RMN 2D.

IV.2. Etude de dimères

Nous nous intéressons maintenant à l'analyse structurale des dimères préparés par Olivier Noel. Leurs structures sont rappelées sur la Figure 193.

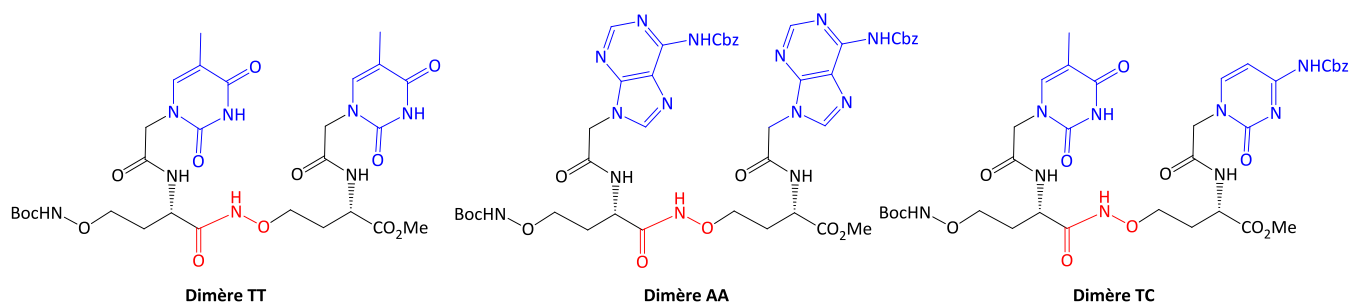


Figure 193 : Structure des dimères de *N*-oxy PNA obtenus par Olivier Noel. Les bases nucléiques adénine et cytosine sont protégées. Les bases nucléiques sont dessinées en bleu et la liaison *N*-oxyamide en rouge.

IV.2.a. Etude du dimère TT

IV.2.a.i. Spectre infrarouge en solution

Le spectre infrarouge du dimère TT en solution dans le chloroforme à 0,5 mmol/L a été mesuré (Figure 194).

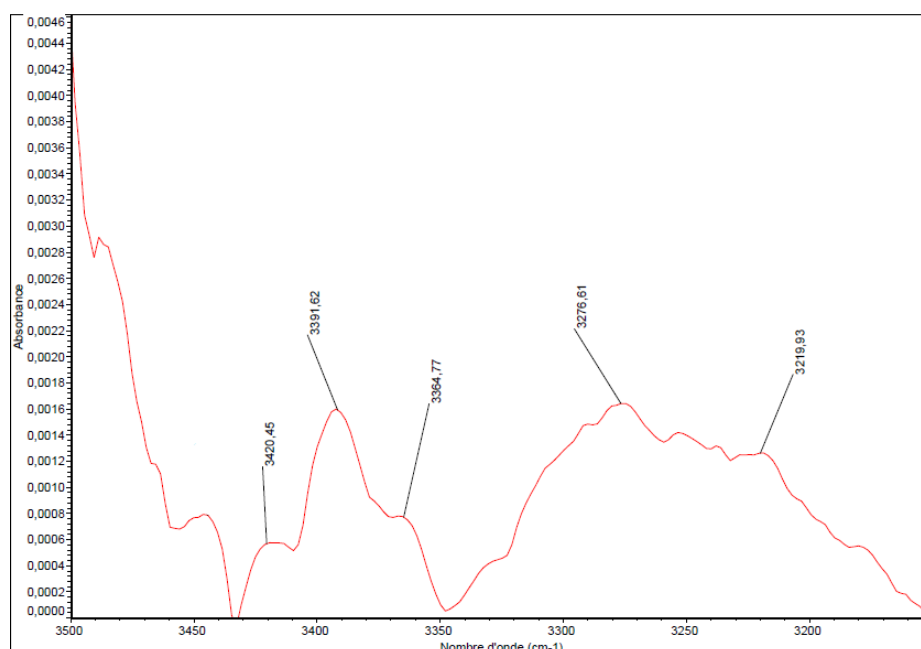


Figure 194 : Région des bandes d'élongation des liaisons N-H du spectre infrarouge du dimère TT en solution à 0,5 mmol/L dans le chloroforme à TA. Le spectre du chloroforme pur a été soustrait.

On est de suite frappé par la grande complexité de ce spectre dans la région des bandes de vibrations d'élongation des liaisons N-H. Des bandes d'élongations à 3420, 3392 et 3365 cm^{-1} sont observées et correspondent aux vibrations d'élongations des liaisons N-H libres des amides, de la liaison *N*-oxyamide et de la fonction aminooxyle protégée. Une très large bande à 3277 cm^{-1} correspond aux vibrations d'élongations des liaisons N-H liées des amides et un large épaulement observé à 3220 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation des liaisons N-H liées de la liaison *N*-oxyamide ou de l'oxycarbamate.

IV.2.a.ii. Etude par RMN 2D

Le dimère TT n'étant pas très soluble dans le chloroforme, les études ont été effectuées dans le DMSO-*d*₆. Cependant, dans ce solvant, le spectre NOESY ne montre aucune corrélation. Le DMSO

a donc détruit toute la structuration liée aux liaisons hydrogène. On ne peut donc pas faire l'étude de ce dimère dans le DMSO-*d*₆.

Nous n'avons pas eu le temps de tester un autre solvant.

IV.2.a.iii. Recherche des conformations les plus stables par dynamique moléculaire et par recuit simulé

Le même protocole que précédemment a permis d'obtenir les 5 conformères de la Figure 195.

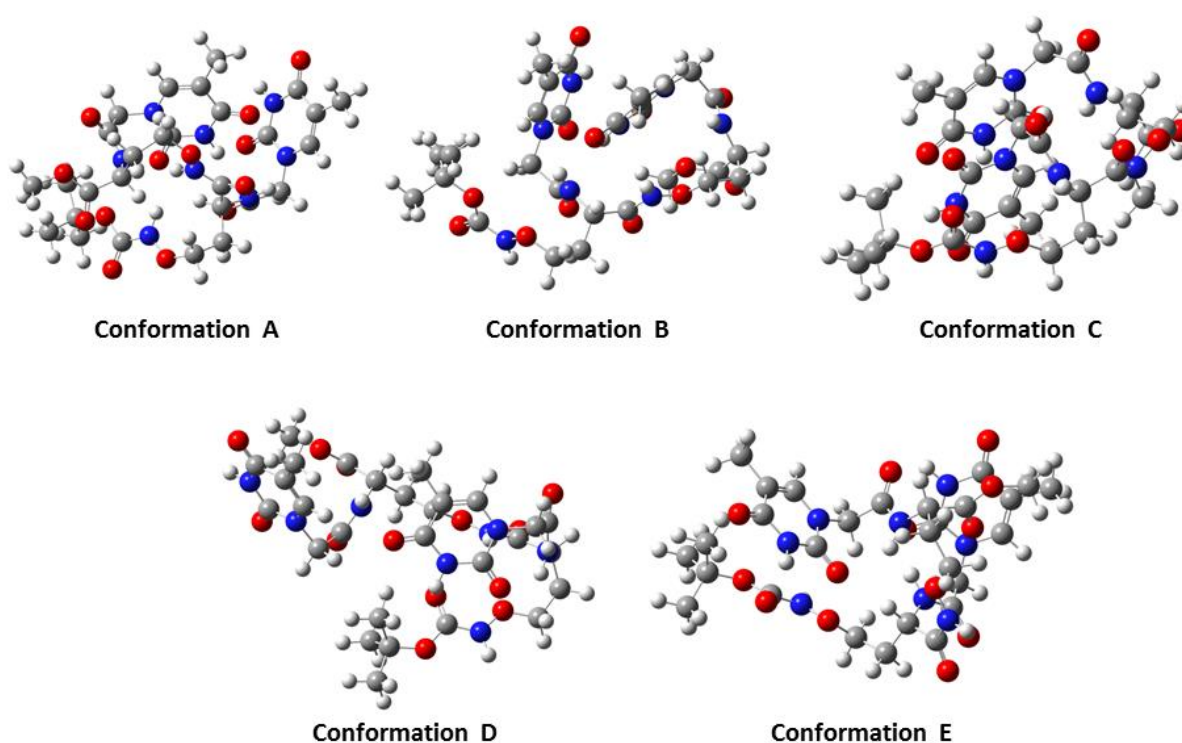


Figure 195 : Conformations les plus basses en énergie obtenues par dynamique moléculaire et par recuit simulé en phase gaz (logiciel Hyperchem, MM AMBER).

	E (kcal/mol)
Conformation A	0
Conformation B	0,981
Conformation C	1,08
Conformation D	2,68
Conformation E	2,92

Tableau 24 : Energie des conformères les plus stables du dimère TT. La référence en énergie est prise par rapport au conformère le plus stable trouvé.

Pour les conformères B et C, les bases nucléiques sont empilées. Aucun des conformères ne présente de liaisons hydrogène. Les conformations obtenues ont des structures très variables et il n'est pas possible d'énoncer des généralités.

IV.2.a.iv. Conclusion

Les études par spectroscopie infrarouge et par modélisation moléculaire suggèrent l'existence de plusieurs conformères. Certains de ces conformères présentent des liaisons hydrogène, d'autres non. Ces études sont à poursuivre.

IV.2.b. Etude du dimère AA

IV.2.a.i. Spectre infrarouge en solution

Le spectre infrarouge du dimère AA en solution dans le chloroforme à 0,5 mmol/L a été mesuré (Figure 196).

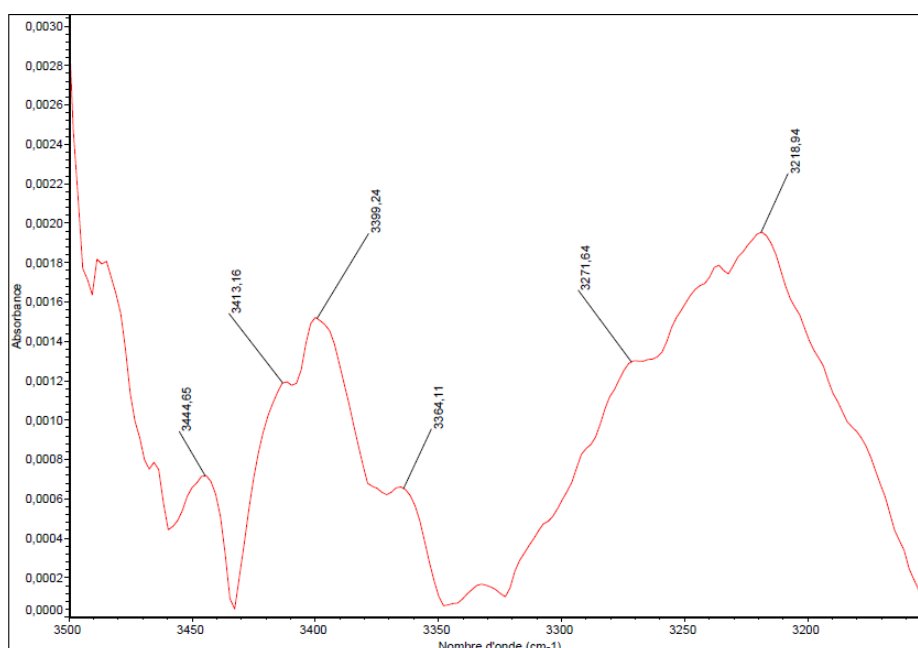


Figure 196 : Région des bandes d'élongation des liaisons N-H du spectre infrarouge du dimère AA en solution à 0,5 mmol/L dans le chloroforme à TA. Le spectre du chloroforme pur a été soustrait.

On retrouve une grande complexité pour ce spectre dans la région des bandes de vibrations d'élongation des liaisons N-H. Le spectre IR du dimère AA ressemble à celui du dimère TT. Des bandes à 3413, 3399 et 3364 cm^{-1} sont observées pour les vibrations d'élongations des liaisons N-H libres et une très large bande à 3219 cm^{-1} avec un large épaulement à 3272 cm^{-1} est observée. Les bandes vers 3220 cm^{-1} indiquent clairement qu'au moins une liaison hydrogène intramoléculaire se forme avec le NH de la liaison *N*-oxyamide, de l'oxycarbamate ou des carbamates du dimère AA.

IV.2.b.ii. Recherche des conformations les plus stables par dynamique moléculaire et par recuit simulé

Le même protocole que précédemment a permis d'obtenir les 5 conformères de la Figure 197. Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 25.

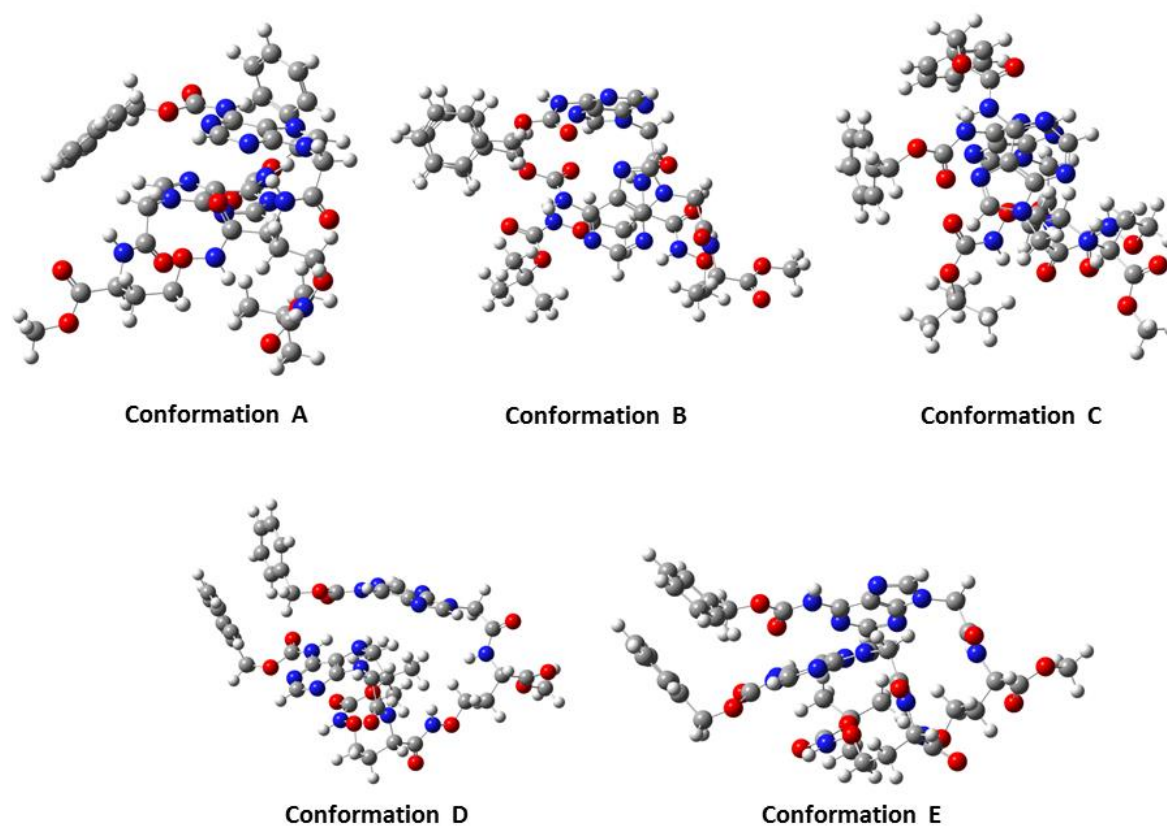


Figure 197 : Conformations les plus basses en énergie obtenues par dynamique moléculaire et par recuit simulé en phase gaz (logiciel Hyperchem, MM AMBER).

	E(kcal/mol)	Liaisons hydrogène impliquant la liaison <i>N</i> -oxyamide ou l'oxycarbamate ?	Remarques
Conformation A	0	Entre NH ^{oxyamide} et CO ^{Boc} (3,15 Å et 173°)	Bases nucléiques empilées
Conformation B	1,31	Aucune	Groupes benzoyles empilés
Conformation C	1,49	Aucune	Un groupe benzoyle et une base nucléique empilés
Conformation D	3,17	Aucune	RAS
Conformation E	3,39	Aucune	Groupes benzoyles empilés

Tableau 25 : Energie et description des conformères les plus stables du dimère AA. Lorsqu'une liaison hydrogène se forme, la longueur de la liaison hydrogène et l'angle formé par les 3 atomes impliqués sont indiqués. La référence en énergie est prise par rapport au conformère le plus stable trouvé.

Seul un des conformères présente une liaison hydrogène faisant intervenir la liaison *N*-oxyamide. Les conformations obtenues semblent plutôt gouvernées par l'empilement des cycles aromatiques (π -stacking).

IV.2.b.iii. Conclusion

Les études par spectroscopie infrarouge et par modélisation moléculaire suggèrent l'existence de plusieurs conformères. Certains de ces conformères présentent des liaisons

hydrogène, d'autres non. Il faudrait d'autres études (RMN 2D, diffraction aux rayons X, etc.) pour pouvoir conclure sur cette analyse structurale.

IV.2.c. Etude du dimère TC

IV.2.c.i. Spectre infrarouge en solution

Le spectre infrarouge du dimère TC en solution dans le chloroforme à 0,5 mmol/L a été mesuré (Figure 198).

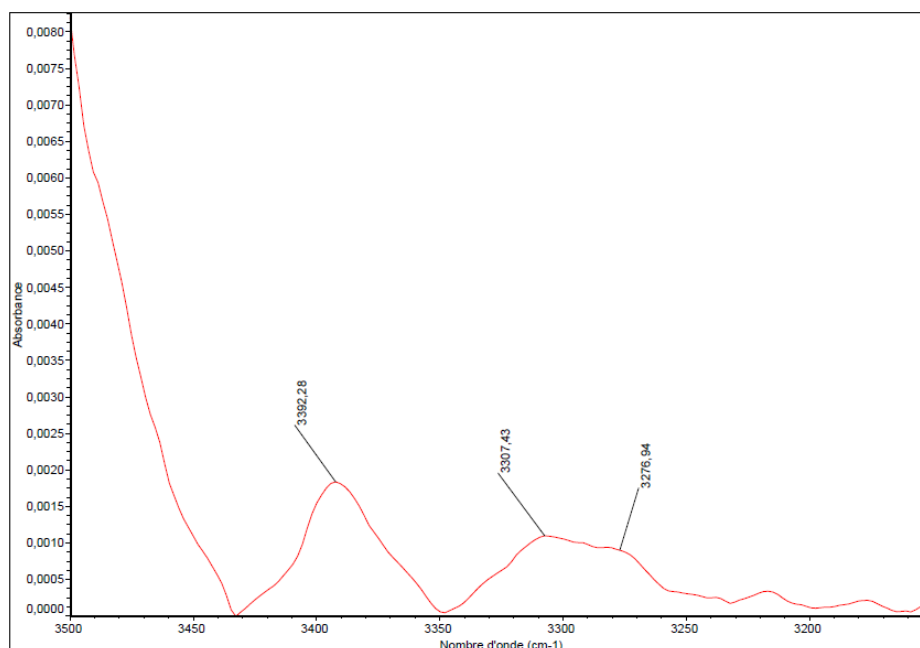


Figure 198 : Région des bandes d'élongation des liaisons N-H du spectre infrarouge du dimère TC en solution à 0,5 mmol/L dans le chloroforme à TA. Le spectre du chloroforme pur a été soustrait.

On retrouve une grande complexité pour ce spectre dans la région des bandes de vibrations d'élongation des liaisons N-H. On observe une bande à 3392 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation de liaisons N-H libres. Une autre large bande est observée à 3307 cm^{-1} et peut correspondre à la vibration d'élongation des liaisons N-H liées des amides. Aucune bande vers 3200 cm^{-1} n'est observée indiquant qu'il n'y a pas de liaisons hydrogène intramoléculaire avec les NH des N-oxyamides ou des oxycarbamates dans ce composé.

IV.2.c.ii. Recherche des conformations les plus stables par dynamique moléculaire et par recuit simulé

Le même protocole que précédemment a permis d'obtenir les 5 conformères de la Figure 199. Les caractéristiques de ces conformères sont résumées dans le Tableau 26.

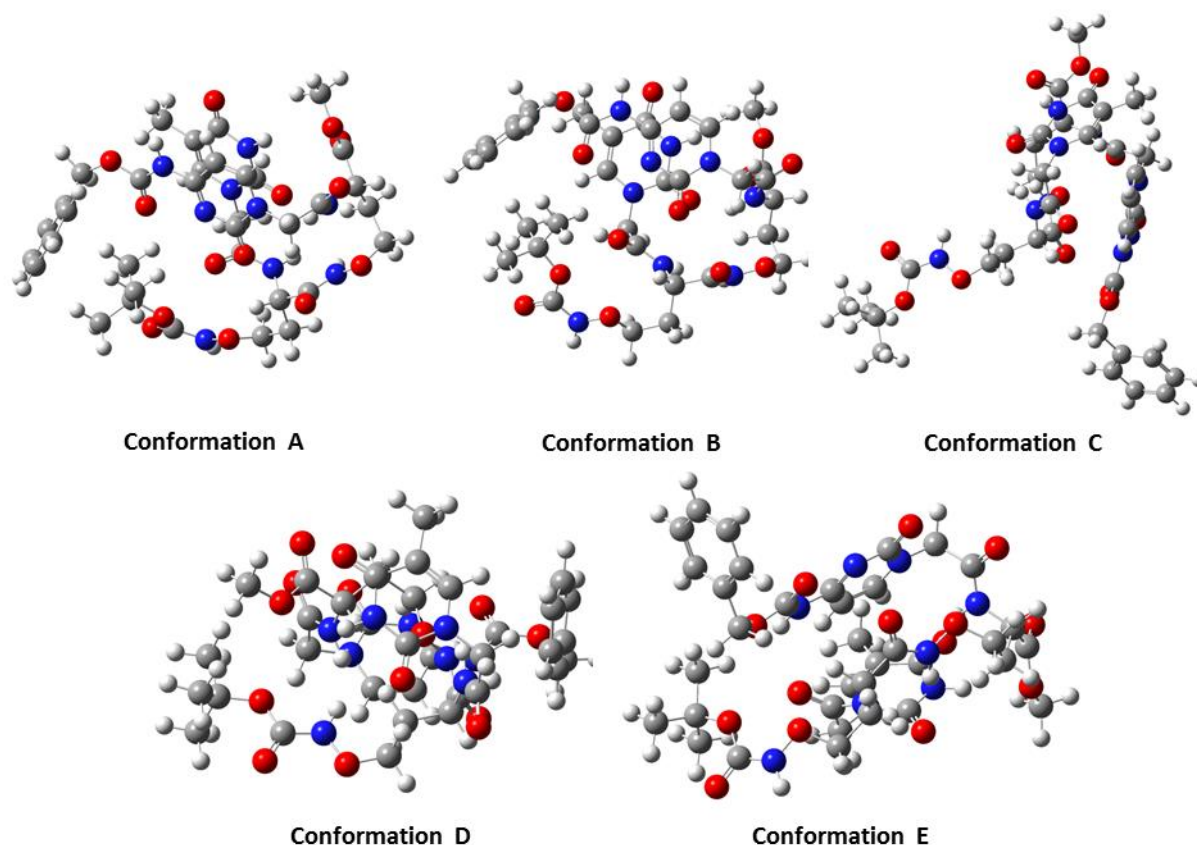


Figure 199 : Conformations les plus basses en énergie obtenues par dynamique moléculaire et par recuit simulé en phase gaz (logiciel Hyperchem, MM AMBER).

	E (kcal/mol)	Liaisons hydrogène impliquant la liaison <i>N</i> -oxyamide ou l'oxycarbamate ?	Remarques
Conformation A	0	Aucune	Bases nucléiques empilées
Conformation B	0,280	Aucune	Bases nucléiques empilées
Conformation C	2,49	Entre NH ^{oxyamide} et C ₂ =O ^{thymine} (2,66 Å et 165°)	RAS
Conformation D	3,05	Aucune	RAS
Conformation E	3,15	Entre NH ^{oxyamide} et C ₂ =O ^{thymine} (2,61 Å et 165°)	RAS

Tableau 26 : Energie et description des conformères les plus stables du dimère TC. Lorsqu'une liaison hydrogène se forme, la longueur de la liaison hydrogène et l'angle formé par les 3 atomes impliqués sont indiqués.

On obtient des conformations très différentes. Seul deux conformères présentent une liaison hydrogène.

IV.2.c.iii. Conclusion

Les études par spectroscopie infrarouge et par modélisation moléculaire suggèrent l'existence de plusieurs conformères. Certains de ces conformères présentent des liaisons hydrogène, d'autres non. Les études sont donc à poursuivre.

V. ETUDES CONFORMATIONNELLES DES OLIGOMERES DE RIBOFURANOIDES AMINOXY ACIDES

V.1. Etude du dimère O3

En parallèle de notre travail de synthèse des oligomères de ribofuranoïdes aminoxy acides (cf. chapitre 4), nous avons cherché à déterminer les conformations adoptées majoritairement par ces composés. Pour cela, nous avons commencé par nous intéresser au dimère **O3** (Figure 200).

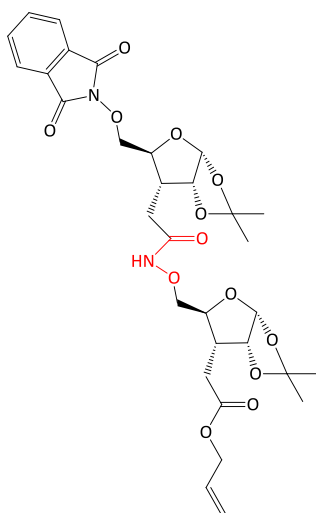


Figure 200 : Structure du dimère **O3** étudié. La liaison *N*-oxyamide est indiquée en rouge.

V.1.a. Méthode d'étude

La recherche des conformères les plus stables s'est faite en suivant des travaux sur des peptides de β -aminoxy acides comportant un ribose.⁶³⁰ La surface d'énergie potentielle est d'abord scannée. Pour cela, on part de différentes structures de départ (dessinées aléatoirement) qu'on optimise par calcul DFT au niveau B3LYP/6-31G(d,p). Les 8 minima obtenus sont alors redéfinis au niveau B3LYP/6-311++G(d,p). Il reste alors à comparer leurs énergies pour déterminer les 5 conformères les plus stables.

Tous ces calculs ont été effectués avec le logiciel Gaussian 09. Pour chaque conformère trouvé, un calcul de fréquence de vibration permet de s'assurer qu'il s'agit bien d'un minimum.

V.1.b. Résultats

L'application de cette méthode avec le dimère **O3** nous a permis d'identifier les 5 conformères de la Figure 201. On constate que des conformations très diverses sont obtenues. Quatre de ces conformères présentent une liaison hydrogène entre le NH de la liaison *N*-oxyamide et le CO du groupe phthaloyl (Tableau 27). On retrouve bien qu'une liaison *N*-oxyamide est facilement engagée dans une liaison hydrogène.

⁶³⁰ S. Chandrasekhar, C. L. Rao, M. S. Reddy, G. D. Sharma, M. U. Kiran, P. Naresh, G. K. Chaitanya, K. Bhanuprakash, B. Jagadeesh, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9443-9446.

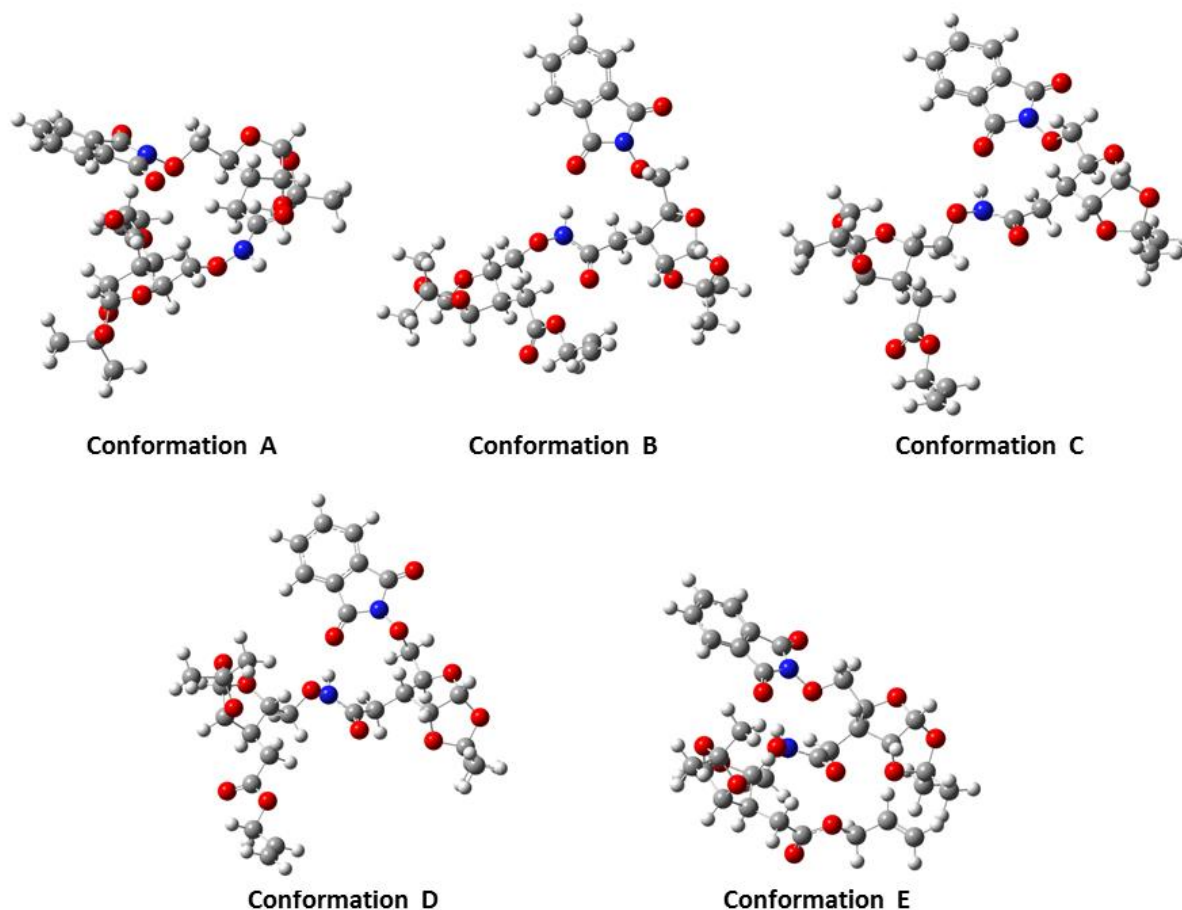


Figure 201 : Conformations les plus basses en énergie obtenues par calcul DFT en phase gaz (logiciel Gaussian 09, B3LYP/6-311G++(d,p)).

	E (kcal/mol)	Présence de liaisons hydrogène impliquant la liaison <i>N</i> -oxyamide ?
Conformation A	0	Aucune
Conformation B	0,129	Entre NH ^{oxyamide} et CO ^{Phth} (2,06 Å et 172°)
Conformation C	1,16	Entre NH ^{oxyamide} et CO ^{Phth} (2,08 Å et 169°)
Conformation D	1,61	Entre NH ^{oxyamide} et CO ^{Phth} (2,05 Å et 172°)
Conformation E	2,03	Entre NH ^{oxyamide} et CO ^{Phth} (2,06 Å et 171°)

Tableau 27 : Energie et description des conformères les plus stables du dimère **O3** (DFT, B3LYP/6-311G++(d,p)). La référence en énergie est prise par rapport au conformère le plus stable trouvé.

N'étant malheureusement pas parvenus à le synthétiser, notre travail s'est arrêté à cette étude théorique. Il nous a tout de même permis de proposer 5 conformères dont 4 présentent une liaison hydrogène impliquant la liaison *N*-oxyamide.

V.2. Etude du trimère **O3**

La même méthode utilisant la DFT a été utilisée pour le trimère **O3** dont la structure est rappelée sur la Figure 202.

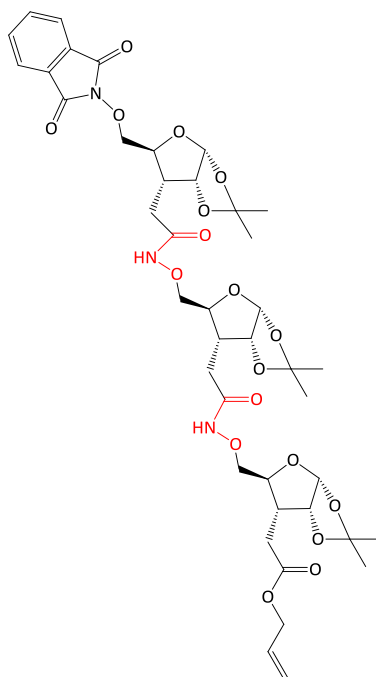


Figure 202 : Structure du trimère **O3** étudié. Les liaisons *N*-oxyamides sont indiquées en rouge.

Les 5 conformères identifiés sont donnés sur la Figure 203. Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 28.

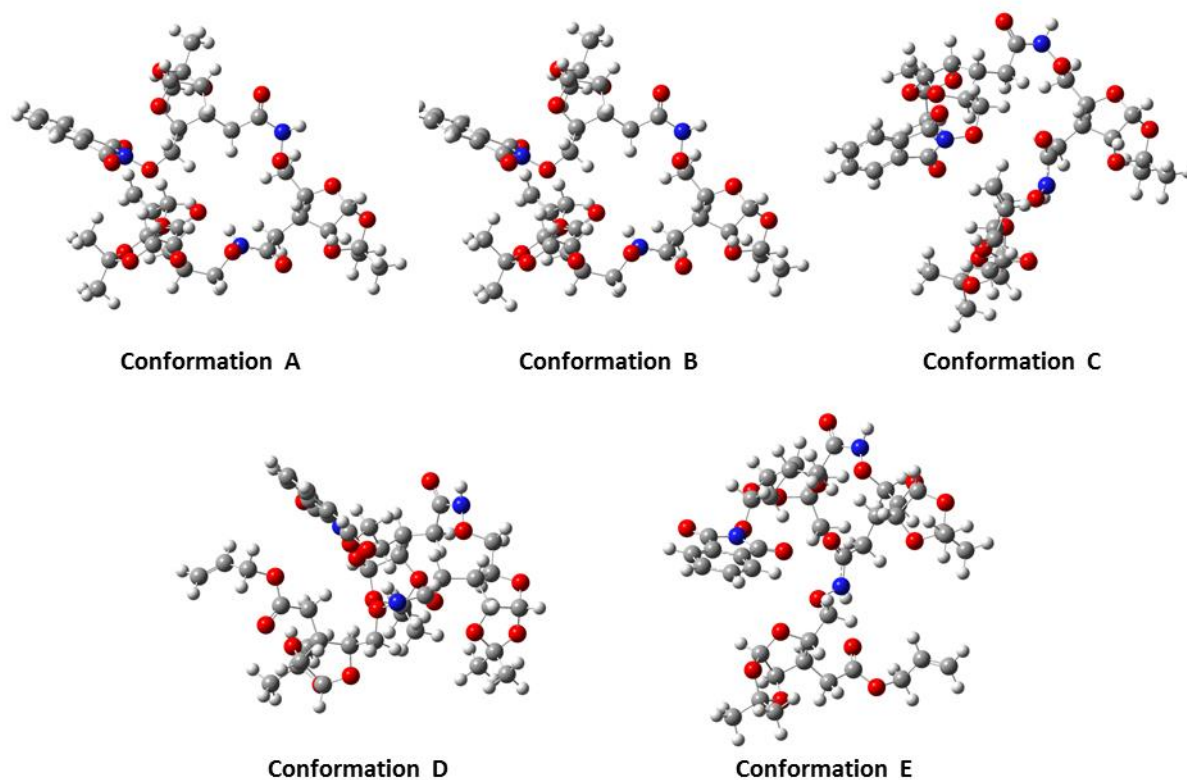


Figure 203 : Conformations les plus basses en énergie obtenues par calcul DFT en phase gaz (logiciel Gaussian 09, B3LYP/6-311G++(d,p)).

	E(kcal/mol)	Présence de liaisons hydrogène impliquant les liaisons <i>N</i> -oxyamides ?
Conformation A	0	Entre le NH de la deuxième liaison <i>N</i> -oxyamide et CO ^{All} (2,10 Å et 157°). Formation d'un cycle à 9
Conformation B	1,97	Aucune
Conformation C	2,96	Aucune
Conformation D	3,23	Entre le NH de la deuxième liaison <i>N</i> -oxyamide et CO ^{P^hth} (2,10 Å et 158°)
Conformation E	21,7	Aucune

Tableau 28 : Energie et description des conformères les plus stables du trimère **O3** (DFT, B3LYP/6-311G++(d,p)). La référence en énergie est prise par rapport au conformère le plus stable trouvé.

Ces structures sont très différentes l'une de l'autre. Dans toutes ces conformations, le ribose central a une conformation C_{3'}-endo. Deux des conformations trouvées présentent une liaison hydrogène faisant intervenir le NH d'une des liaisons *N*-oxyamides. En particulier, la conformation A présente un cycle à 9 semblable à un β N-O turn (Figure 204).

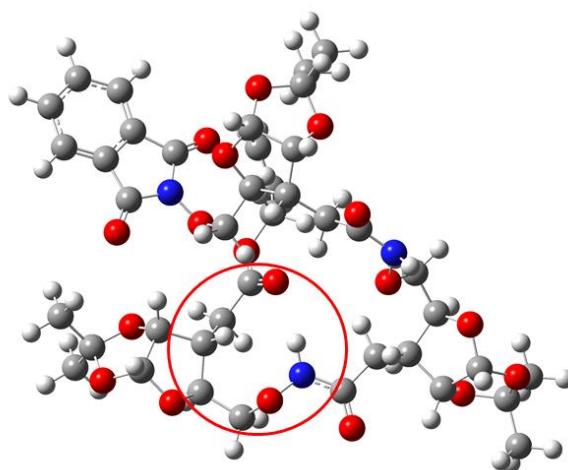


Figure 204 : Formation d'un cycle à 9 (entouré en rouge) dans la conformation A.

N'étant malheureusement pas parvenus à le synthétiser, notre travail s'est arrêté à cette étude théorique. Il nous a tout de même permis de proposer 5 conformères dont 2 présentent une liaison hydrogène impliquant la liaison *N*-oxyamide.

VI. CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'analyse structurale des monomères et des dimères de *N*-oxy PNA ainsi que d'un dimère et d'un trimère de ribofuranoides aminoxy acides.

Pour le monomère thymine, les études par RMN (2D, dilution, dosage), par spectroscopie IR en solution et par modélisation moléculaire permettent de proposer deux conformations favorisées (Figure 205). Dans ces conformations, on observe une liaison hydrogène entre le NH^{amide} et le C₂=O de la thymine. De plus, la base nucléique se replie et se rapproche de la fonction aminoxy protégée par un Boc.

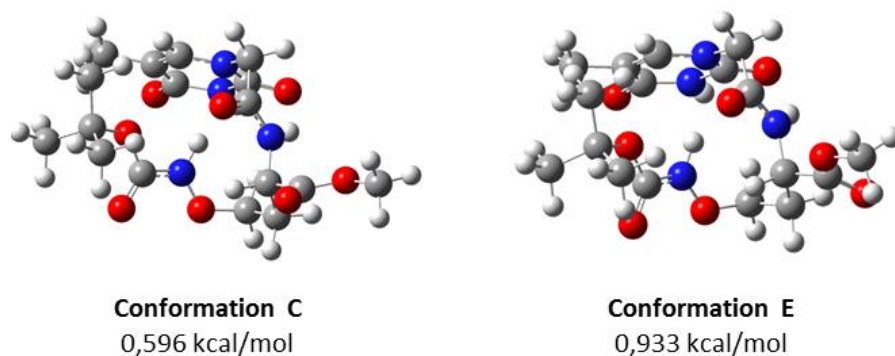


Figure 205 : Conformations les plus basses en énergie obtenues par dynamique moléculaire et par recuit simulé en phase gaz (logiciel Hyperchem, MM AMBER) et cohérentes avec les études RMN (2D, dilution, dosage) et les études par spectroscopie IR. La référence en énergie est prise par rapport au conformère le plus stable trouvé.

Les études concernant les monomères adénine et cytosine sont encore en cours. Il semble que plusieurs conformères présentant ou non des liaisons hydrogène soient en équilibre.

Les dimères de *N*-oxy PNA ont été étudiés par spectroscopie IR en solution et par modélisation moléculaire. Plusieurs conformères sont en équilibre. Avant de pouvoir proposer des conformations stables, il faut réaliser d'autres études (RMN 2D, etc.). Cependant, nous rencontrons avec les dimères des problèmes de solubilité dans les solvants usuels. Il nous faut donc trouver un solvant permettant de solubiliser les dimères et ce, sans détruire la structuration due aux liaisons hydrogène.

Nous nous sommes également intéressés à la conformation adoptée par un dimère et un trimère de ribofuranoides aminooxy acides. N'étant pas parvenus à les synthétiser, nous n'avons pu que les modéliser par calculs DFT. Nous avons mis en évidence l'existence de conformations stables dans lesquelles les liaisons *N*-oxyamides sont impliquées dans des liaisons hydrogène intramoléculaires.

Par la suite, il faudrait se pencher sur l'influence du solvant dans les modélisations moléculaires. Par ailleurs, les composés étant des solides, des déterminations de structure par diffraction des rayons X sont envisageables.

CHAPITRE 6
RIBOSONDES
DEVELOPPEMENT DE SONDAS CHIMIQUES CIBLANT LE RIBOSE DE
L'ARN
ETUDE DU MECANISME SHAPE

I. INTRODUCTION

L'ARN est une biomolécule au rôle capital dans les trois lignées du monde vivant (archées, procaryotes et eucaryotes). Ses fonctions sont très nombreuses et variées et ne s'arrêtent pas au support du génome de virus et à la traduction de l'ADN en protéines. Il a été montré que les ARN interviennent dans le contrôle de l'expression des gènes (micro-ARN, ARN interférents, etc.), dans la catalyse de réactions biologiques, dans la défense antivirale, etc. Le rôle et le mode de fonctionnement de beaucoup d'ARN sont d'ailleurs inconnus à l'heure actuelle. Ainsi, des milliers de longs ARN non codants ont été mis en évidence.^{631,632} Ils ont un rôle clef dans de nombreuses fonctions biologiques (fonction neuronale, développement, etc.) et, par conséquent, dans de nombreuses maladies (cancers, maladies génétiques, etc.).⁶³³

Beaucoup de ces fonctions dépendent de la capacité de l'ARN à adopter des structures complexes. La grande diversité de fonctions des ARN est d'ailleurs étroitement liée à leur grande diversité structurale. Ainsi, comprendre la fonction de ces nombreux ARN et élucider les mécanismes les faisant intervenir nécessitent une connaissance approfondie de leur structure. Dans ce but, au cours des dernières années, un grand nombre d'études ont été dédiées à l'élucidation de la structure des ARN. Cependant, aucune des techniques mises au point à l'heure actuelle n'apporte une complète satisfaction.

Dans le cadre de cette thèse, un projet en collaboration avec Philippe Fossé et Olivier Mauffret du Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée (LBPA) de l'ENS Cachan a été mis au point afin de développer et d'étudier des sondes chimiques ciblant les nucléotides non appariés d'un ARN.

II. DETERMINATION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE D'ARN

II.1. Relations structure-fonction des ARN

II.1.a. Rappels sur la structure des ARN

La structure d'un ARN est déterminée par l'enchaînement des différentes bases nucléiques et par un réseau complexe d'interactions entre les nucléobases (appariements par liaisons hydrogène, empilement). La structure des ARN est ordonnée de façon hiérarchique : la séquence primaire (enchaînement des bases nucléiques) détermine la structure secondaire (réseau d'appariements des bases nucléiques) qui gouverne la structure tertiaire. Le repliement tertiaire affecte très peu la structure secondaire. La structure secondaire a une topologie particulière, composée de régions en hélices où les nucléotides sont appariés (tiges) et de régions où les nucléotides ne sont pas appariés (boucle interne, boucle terminale, renflement) (Figure 206). On notera que ces structures sont fortement dépendantes de l'interaction de l'ARN avec des protéines ou avec de petites molécules.

⁶³¹ C. Xie, J. Yuan, H. Li, M. Li, G. Zhao, D. Bu, W. Zhu, W. Wu, R. Chen, Y. Zhao, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D98-D103.

⁶³² T. Derrien, R. Johnson, G. Bussotti, A. Tanzer, S. Djebali, H. Tilgner, G. Guernec, D. Martin, A. Merkel, D. G. Knowles, J. Lagarde, L. Veeravalli, X. Ruan, Y. Ruan, T. Lassmann, P. Carninci, J. B. Brown, L. Lipovich, J. M. Gonzalez, M. Thomas, C. A. Davis, R. Shiekhattar, T. R. Gingeras, T. J. Hubbard, C. Notredame, J. Harrow, R. Guigo, *Genome Res.* **2012**, *22*, 1775-1789.

⁶³³ I. V. Novikova, S. P. Hennelly, C. S. Tung, K. Y. Sanbonmatsu, *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 3731-3746.

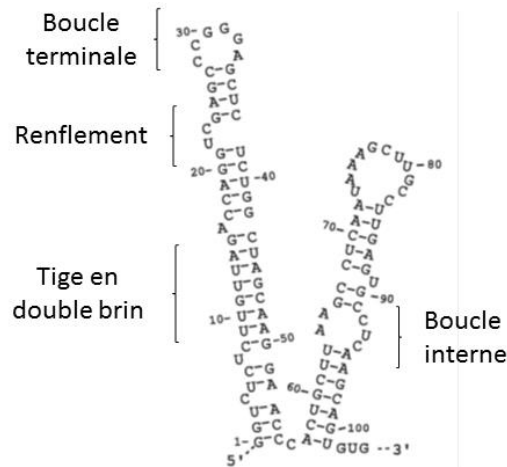


Figure 206 : Structure de la région R de l'ARN du VIH-1.

On comprend très vite qu'une molécule d'ARN d'une certaine taille (plus d'une centaine de nucléotides) peut adopter un grand nombre de structures secondaires ayant des stabilités proches. Toutefois, on constate expérimentalement qu'une molécule d'ARN adopte un nombre limité de structures secondaires.

II.1.b. Importance de la structure des ARN pour leur fonction biologique

On constate que les ARN ne remplissent leurs fonctions biologiques qu'une fois repliés sur eux-mêmes en ayant adopté des structures tridimensionnelles difficilement prévisibles. En effet, les fonctions des ARN impliquent leurs structures primaires, secondaires et tertiaires. Cependant, la structure secondaire, en général plus stable que les interactions tertiaires, est souvent considérée comme le point clef de la fonction des ARN et du mécanisme impliquant ces ARN. Ainsi, la connaissance de la structure d'ARN viraux est essentielle pour déterminer de nouvelles thérapies antivirales. La dynamique de ces structures a aussi un rôle fondamental. Etant donné son rôle déterminant, la structure d'un ARN peut même être la cible d'un médicament.⁶³⁴

II.2. Méthodes de détermination physiques et algorithmiques de la structure des ARN

Pour déterminer sans ambiguïté la structure des ARN (seuls ou complexés avec des ligands spécifiques), on peut faire appel à différentes techniques, souvent complémentaires.⁶³⁵ Ce paragraphe va traiter des méthodes expérimentales les plus courantes, à savoir la RMN, la diffraction des rayons X et l'utilisation de sondes chimiques ou enzymatiques. Nous ne traiterons pas d'autres techniques moins courantes comme la cryomicroscopie électronique, l'ingénierie d'ARN, la dénaturation thermique ou la spectrométrie de masse.⁶³⁶ La prédiction par calcul sera également abordée.

⁶³⁴ M. P. Robertson, H. Igel, R. Baertsch, D. Haussler, M. Ares, W. G. Scott, *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e5.

⁶³⁵ L. Salmon, S. Yang, H. M. Al-Hashimi, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2014**, *65*, 293-316.

⁶³⁶ B. Felden, *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10*, 286-291.

II.2.a. Détermination de la structure des ARN par RMN

Plus de 40% des structures d'ARN ont été déterminées en utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN).⁶³⁷ La RMN fournit principalement des informations sur la structure locale de protons en solution et fonctionne de manière efficace pour de petites biomacromolécules.

En revanche, les seules données obtenues par RMN permettent difficilement la caractérisation structurale de grands ARN. La dégénérescence de signaux RMN, des problèmes de relaxation et le manque d'informations limitent l'utilisation des techniques traditionnelles en RMN. Heureusement, depuis quelques années, de nouvelles techniques améliorent l'efficacité de l'étude d'ARN par RMN :

- obtention de spectres RMN multidimensionnels qui facilitent les mesures de couplage dipolaire résiduel (CDR) ;⁶³⁶
- stratégies de marquage isotopique additionnel qui peuvent simplifier les spectres RMN de grands ARN ;⁶³⁸
- utilisation d'autres techniques complémentaires. Par exemple, la combinaison de la microscopie électronique (fournissant des informations sur la géométrie globale de macromolécules avec des résolutions de l'ordre du nanomètre) et de la RMN permet une bonne détermination de structures tridimensionnelles d'ARN.⁶³⁷

Récemment, une technique de détermination de la structure d'ARN par RMN à l'état solide a été mise au point.⁶³⁹ La RMN permet également de déterminer la structure de complexes ARN-protéines.⁶⁴⁰ Bien que nécessitant des quantités de produits importantes, la RMN est, à l'heure actuelle, la technique optimale pour étudier des ARN en solution et pour caractériser leurs propriétés dynamiques.

II.2.b. Détermination de la structure des ARN par diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X permet de déterminer la structure tridimensionnelle d'ARN. La principale difficulté dans la détermination de structure d'ARN par diffraction aux rayons X est la nécessité de faire cristalliser l'ARN étudié. En effet, les ARN sont des molécules flexibles difficiles à faire cristalliser en l'absence de protéines. L'existence de nombreux conformères d'ARN posent également de sérieux problèmes à la cristallisation.⁶³⁶ Or, il faut obtenir de grandes quantités d'ARN cristallisé pur et homogène. Heureusement, des progrès dans la préparation des échantillons (production *in vitro* et purification d'ARN⁶⁴¹), dans les techniques de cristallisation, dans l'accès à des rayonnements synchrotrons, dans les logiciels de cristallographie, etc. ont accéléré la détermination de structure par diffraction aux rayons X.⁶⁴² Ainsi, depuis le début des années 2000, la diffraction des rayons X a permis la détermination de la structure d'ARN longs et complexes de natures variées (ribosomes, riboswitches, RNases P de type A et B, etc.).^{643,644} Bien que le nombre de détermination

⁶³⁷ Z. Gong, C. D. Schwieters, C. Tang, *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120445.

⁶³⁸ K. Lu, Y. Miyazaki, M. F. Summers, *J. Biomol. NMR* **2010**, *46*, 113-125.

⁶³⁹ A. Marchanka, B. Simon, G. Althoff-Ospelt, T. Carlomagno, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, Article number 7024.

⁶⁴⁰ C. Dominguez, M. Schubert, O. Duss, S. Ravindranathan, F. H. T. Allain, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *58*, 1-61.

⁶⁴¹ Y. L. Ahmed, R. Ficner, *RNA Biol.* **2014**, *11*, 427-432.

⁶⁴² B. H. M. Mooers, *Methods* **2009**, *47*, 168-176.

⁶⁴³ L. Jenner, S. Melnikov, N. Garreau de Loubresse, A. Ben-Shem, M. Iskakova, A. Urzhumtsev, A. Meskauskas, J. Dinman, G. Yusupova, M. Yusupov, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 759-767.

de structures d'ARN par rayon X augmente lentement, la taille des structures déterminées augmente énormément. Cette technique reste tout de même limitée par des difficultés de cristallisation.

II.2.c. Détermination de la structure des ARN par des algorithmes

La structure d'un ARN peut être prédite à partir de sa séquence grâce à une minimisation de l'énergie libre.⁶⁴⁵ Durant les quinze dernières années, de grands progrès ont été faits dans l'amélioration des programmes informatiques et des algorithmes permettant la détermination de structures.^{646,647} Des tendances se dégagent : utilisation de la mécanique statistique pour améliorer la fidélité de la prédiction, inclusion des pseudo-nœuds dans la prédiction de la structure secondaire et utilisation de séquences homologues (deux ou davantage) pour trouver une structure commune. De nombreux algorithmes ont été développés.⁶⁴⁸

Cette prédiction par le calcul de la structure secondaire d'un ARN est toujours combinée à des données obtenues expérimentalement.^{649,650} Cette utilisation efficace des cartographies obtenues expérimentalement pour contraindre la prédiction permet de lever d'éventuelles ambiguïtés sur la structure. A l'heure actuelle, la seule utilisation d'algorithmes ne permet pas la détermination de structure secondaire d'ARN.

II.3. Détermination de la structure des ARN par des sondes chimiques ou enzymatiques

Une des approches expérimentales envisageables est l'utilisation de sondes chimiques et enzymatiques.⁶⁵¹ Ce peut être une méthode complémentaire des approches physiques précédentes.

II.3.a. Présentation des sondes chimiques et des enzymes permettant la détermination de structure d'ARN

Afin de déterminer la structure d'ARN en solution, des sondes chimiques ou enzymatiques peuvent être utilisées *in vitro* ou *in cellulo*. Ces sondes permettent également d'étudier la structure d'ARN interagissant avec des ligands spécifiques (protéines, acides nucléiques, aptamères, antibiotiques, ions, etc.). Afin de garantir une homogénéité conformationnelle, l'ARN étudié *in vitro* doit être dénaturé et renaturé avant chaque expérience. L'étape de dénaturation s'effectue par une forte augmentation de température tandis que la renaturation est réalisée à une plus basse température.⁶³⁶

Les sondes enzymatiques sont des nucléases (Tableau 29). Ainsi, la ribonucléase U2 rompt préférentiellement les liaisons phosphodiester d'adénosines non appariées mais avec une spécificité non absolue (A > G >> C > U). Ces cartographies utilisant des enzymes présentent certains

⁶⁴⁴ A. V. Kazantsev, A. A. Krivenko, D. J. Harrington, S. R. Holbrook, P. D. Adams, N. R. Pace, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 13392-13397.

⁶⁴⁵ D. H. Mathews, D. H. Turner, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 270-278.

⁶⁴⁶ S. S. Ray, S. K. Pal, *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinf.* **2013**, *10*, 2-17.

⁶⁴⁷ W. N. Moss, *Methods Enzymol.* **2013**, *530*, 3-65.

⁶⁴⁸ S. Ya-Zhou, W. Yuan-Yan, W. Feng-Hua, T. Zhi-Jie, *Chin. Phys. B* **2014**, *23*, 078701.

⁶⁴⁹ S. R. Eddy, *Annu. Rev. Biophys.* **2014**, *43*, 433-456.

⁶⁵⁰ M. Magnus, D. Matelska, G. Łach, G. Chojnowski, M. J. Boniecki, E. Purta, W. Dawson, S. Dunin-Horkawicz, J. M. Bujnicki, *RNA Biol.* **2014**, *11*, 522-536.

⁶⁵¹ C. Ehresmann, F. Baudin, M. Mougél, P. Romby, J. P. Ebel, B. Ehresmann, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 9109-9128.

désavantages : les nucléases sont sensibles à l'encombrement stérique, elles ont des conditions d'hydrolyse optimum qui diffèrent d'une nucléase à l'autre, etc.

Les sondes chimiques sont des agents chimiques (Tableau 29). La sonde chimique la plus utilisée est probablement le diméthylsulfate (DMS) qui modifie les adénosines et les cytosines.⁶⁵² Les nucléotides les plus réactifs aux sondes chimiques sont les non appariés. Grâce à leur petite taille, les sondes chimiques sont peu sensibles à l'encombrement stérique et permettent d'obtenir une résolution à l'échelle du nucléotide. Elles sont souvent spécifiques d'un nucléotide. De plus, les sondes chimiques peuvent réagir avec les protéines, ce qui peut limiter leur utilisation pour cartographier des complexes ARN-protéines.

Sondes	Informations structurales apportées	Masse moléculaire (g/mol)
Enzymatiques		
nucléase S1	nucléotides accessibles dans les régions simple brin	32000
ribonucléase V1	nucléotides appariés ou empilés	15900
ribonucléase T1	guanines accessibles	11000
ribonucléase U2	adénines accessibles	12490
Chimiques		
imidazole	régions simple brin accessibles	68
Pb(OAc) ₂	régions simple brin accessibles	207
éthylnitrosourée	phosphates accessibles	117
radicaux hydroxyles	C _{1'} et C _{4'} accessibles de chaque ribose	17
diméthylsulfate	N ₁ accessibles des adénines, N ₃ accessibles des cytosines, N ₇ accessibles des guanines	126
carbodiimide	N ₃ accessibles des uridines, N ₁ des guanines	424
diéthylpyrocarbonate	N ₇ accessibles des adénines (non empilées)	174
kéthoxal	N ₁ et N ₂ accessibles des guanines	148

Tableau 29 : Sondes chimiques et enzymatiques utilisées couramment pour déterminer la structure d'ARN en solution.⁶³⁶

On notera qu'il existe peu de sondes qui permettent de cibler les régions double brin d'un ARN. La sonde méthidiumpropyl-EDTA (MPE) est un agent intercalant clivant la chaîne phosphodiester de l'ARN au niveau des régions double brins (nucléotides appariés). Elle n'est cependant pas facile d'utilisation et présente une forte spécificité de séquence.^{653,654} La sonde enzymatique RNase V1, est largement utilisée pour l'identification des régions double brin, mais à cause de sa taille relativement importante, elle ne peut pas fournir d'information au niveau des régions qui lui sont inaccessibles.

Bien que présentant certains atouts (conditions natives, utilisation dans des cellules vivantes, etc.), l'utilisation de sondes chimiques ou enzymatiques pour déterminer la structure des ARN présente de nombreux désavantages. La différence de réactivité entre des régions simple ou double

⁶⁵² P. Cordero, W. Kladwand, C. C. VanLang, R. Das, *Biochemistry* **2012**, *51*, 7031-7039.

⁶⁵³ S. A. White, D. E. Draper, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 4049-4064.

⁶⁵⁴ S. A. White, D. E. Draper, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1892-1897.

brins peut être mince. Plusieurs sondes chimiques ou enzymatiques doivent être utilisées en parallèle pour déterminer une structure secondaire d'ARN. La lourdeur de cette technique rend difficile la mise au point d'une procédure générale de détermination à haut débit des structures secondaires d'ARN.

Les structures secondaires sont déterminées en utilisant les résultats obtenus avec les sondes et les algorithmes de prédiction.⁶⁵⁵ Les données expérimentales sont définies comme contraintes lorsqu'on utilise un algorithme.

II.3.b. « In line probing »

Une autre approche a été développée : le « *in-line probing* ». ⁶⁵⁶ Il s'agit de la plus simple des techniques disponibles actuellement pour cartographier chimiquement la structure des ARN. Cette technique est basée sur la tendance des ARN à être hydrolysé différemment selon leur structure. En effet, la liaison phosphodiester peut être hydrolysée lentement et non-enzymatiquement grâce à une attaque nucléophile du 2'-hydroxyle. Cette attaque se fait lorsque le 2'-hydroxyle, le phosphore et l'oxygène en position 5' du nucléotide adjacent sont dans une conformation linéaire. Le 2'-hydroxyle agit alors comme un nucléophile et clive le lien phosphodiester.⁶⁵⁷ Par conséquent, les vitesses d'hydrolyse sont directement reliées à la structure autour de chaque liaison phosphodiester: les nucléotides flexibles (régions simple brin ou en périphérie) peuvent adopter de nombreuses conformations (et donc en particulier la conformation linéaire réactive) et sont donc plus susceptibles de se cliver. Cette technique permet ainsi d'étudier la structure secondaire des ARN.

II.3.c. L'apport de la méthode SHAPE

Nous avons vu qu'une méthode intéressante pour déterminer la structure secondaire d'ARN est l'utilisation de sondes chimiques ou enzymatiques. Cependant, cette technique, nécessitant l'utilisation de plusieurs sondes, est actuellement trop lourde pour une détermination à haut débit des structures. Afin de remplacer plusieurs d'expériences par une seule, il faudrait une sonde chimique qui interroge chaque nucléotide de l'ARN en une seule expérience. Une grande avancée vers cet idéal a été faite en 2005 avec l'apparition de la méthode SHAPE (*Selective 2'-Hydroxylacylation Analyzed by Primer Extension* pour hydroxylacylation sélective en position 2' analysée par extension d'amorce).⁶⁵⁸

II.3.c.i. Principe et mécanisme supposé de la méthode SHAPE

Depuis 2005, la méthode SHAPE a été développée pour cibler spécifiquement les nucléotides flexibles (souvent les nucléotides non appariés) et ce, de façon indépendante de leur nature purique ou pyrimidique. Cette technique s'est développée les dernières années, en particulier sous l'impulsion de l'équipe de Kevin M. Weeks (Figure 207).

⁶⁵⁵ D. H. Mathews, M. D. Disney, J. L. Childs, S. J. Schroeder, M. Zuker, D. H. Turner, *PNAS* **2004**, *101*, 7287-7292.

⁶⁵⁶ J. D. Beaudoin, R. Jodoin, J. P. Perreault, *Methods* **2013**, *64*, 79-87.

⁶⁵⁷ G. A. Soukup, R. R. Breaker, *RNA* **1999**, *5*, 1308-1325.

⁶⁵⁸ E. J. Merino, K. A. Wilkinson, J. L. Coughlan, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4223-4231.

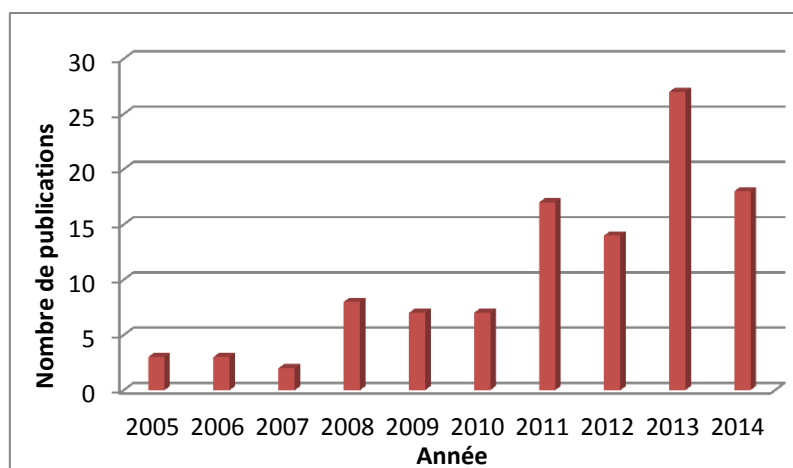


Figure 207 : Nombre de publications depuis 2005 portant sur la méthode SHAPE (recherche Web of Science portant sur « selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension » en « topic »).

La méthode SHAPE est basée sur la mesure de la flexibilité des nucléotides dans un ARN replié. Cette mesure est effectuée en étudiant la réactivité nucléophile de l'hydroxyle en position 2' ; cette dernière étant fortement modulée par la présence de l'anion phosphodiester adjacent.^{659,660} En effet, les hydroxyles en position 2' des régions simple brin ou des régions flexibles d'ARN présentent une forte réactivité tandis que ceux des nucléotides appariés ou engagés dans d'autres types d'interactions présentent une faible réactivité.⁶⁵⁸ Pour expliquer ces observations, l'équipe de Weeks propose que l'attaque de l'électrophile se fasse par le 2'-hydroxyle déprotoné (pKa voisin de 13). Or, cet oxyanion est déstabilisé si la charge négative de la liaison phosphodiester est contrainte à rester proche dans l'espace, ce qui conduit à une baisse de la réactivité (Schéma 143). C'est d'ailleurs cet argument qui permet d'expliquer la différence de pKa entre l'hydroxyle en 2' de l'adénosine (12,2) et celui du 3'-phosphate adénosine (13,4).

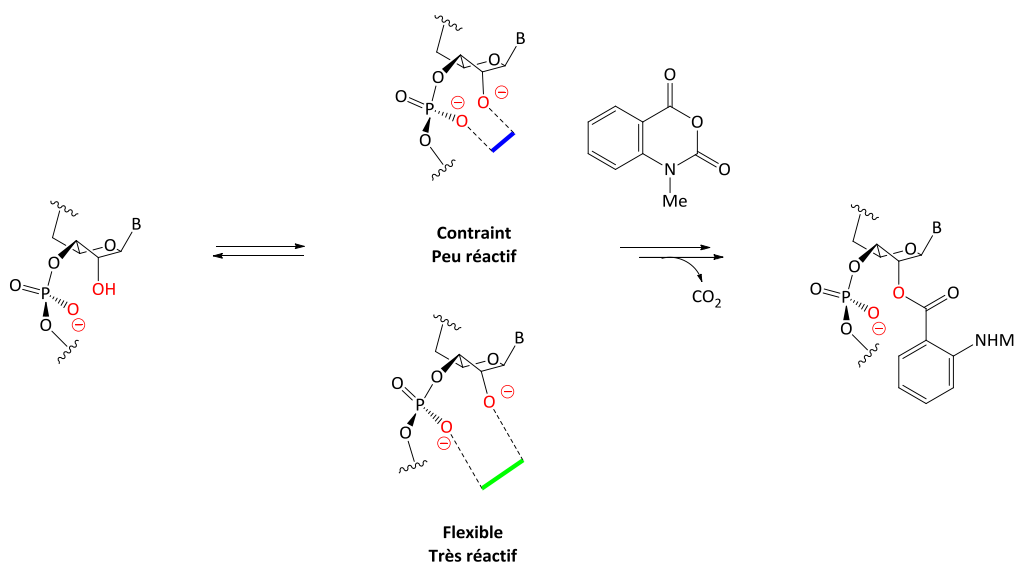


Schéma 143 : Réaction de l'hydroxyle en position 2' du ribose via la formation d'un oxyanion. Les nucléotides dont la conformation est restreinte ne sont pas réactifs en raison de la déstabilisation de l'oxyanion par la liaison phosphodiester voisine chargée négativement.⁶⁵⁸

⁶⁵⁹ S. I. Chamberlin, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 216-224.

⁶⁶⁰ S. I. Chamberlin, E. J. Merino, K. M. Weeks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 14688-14693.

Cependant, cette explication est sujette aux critiques car dans les conditions de l'expérience (milieu aqueux tamponné), il n'y a pas déprotonation de l'hydroxyle. En 2012, Kevin M. Weeks est d'ailleurs revenu sur cette explication en se penchant sur les éléments structuraux déterminants dans la réactivité SHAPE des ARN.⁶⁶¹ En étudiant un cristal d'un ARN 16S particulièrement complexe, il a alors proposé que la réactivité du 2'-hydroxyle est extrêmement sensible à la conformation du nucléotide (Schéma 144). Afin d'expliquer la forte sensibilité de la réactivité à la flexibilité locale du nucléotide, il précise que les nucléotides flexibles peuvent adopter de multiples conformations et que parmi ces conformations, certaines présentent une augmentation de la réactivité du 2'-hydroxyle.

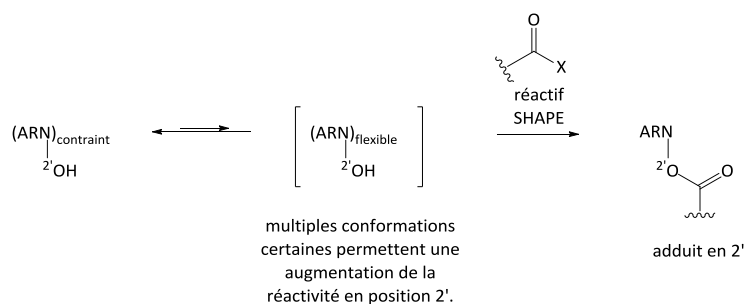


Schéma 144 : Mécanisme SHAPE : la réactivité du 2'-hydroxyle du ribose est gouvernée par la capacité du nucléotide à adopter une conformation qui permet une augmentation de la réactivité du 2'-hydroxyle.⁶⁶¹

La réactivité est augmentée dans des conformations dans lesquelles les atomes d'oxygène non pontants sont du côté opposé à l'hydroxyle en position 2' du ribose. Cette conformation permet la réaction de l'hydroxyle en position 2' en diminuant la déstabilisation électrostatique avec l'oxygène réactif polarisé δ^- (Figure 208).⁶⁶¹ Par ailleurs, la réactivité SHAPE est augmentée par la proximité d'un groupe fonctionnel capable de former une liaison hydrogène avec l'hydroxyle en position 2'. Ces conformations très réactives sont très diverses et incluent les conformations qui permettent des interactions avec des groupes fonctionnels des nucléobases (Figure 209 en haut à gauche et à droite), l'oxygène pro-S non pontant du phosphate (Figure 209 en bas à gauche) et d'autres accepteurs de liaison hydrogène (Figure 209 en bas à droite).⁶⁶¹

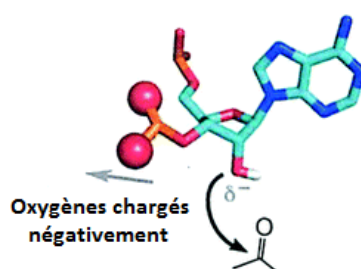


Figure 208 : Orientation des oxygènes chargés négativement du phosphate afin de minimiser l'interaction électrostatique déstabilisante.⁶⁶¹

⁶⁶¹ J. L. McGinnis, J. A. Dunkle, J. H. D. Cate, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6617-6624.

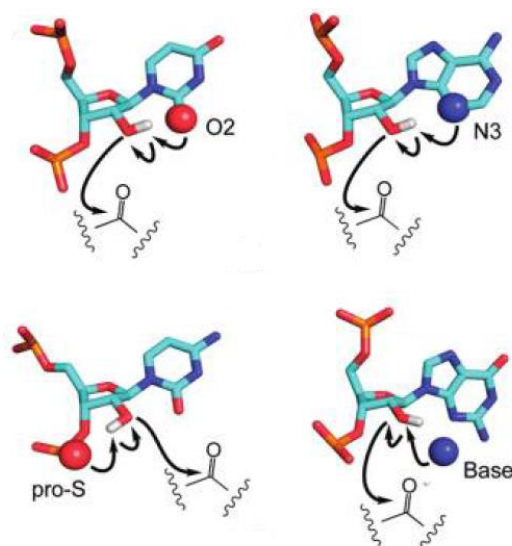


Figure 209 : Exemples de conformations réactives.⁶⁶¹

Par ailleurs, l'équipe de Weeks a étudié l'influence de la nature de la base nucléique sur la réactivité des nucléotides.⁶⁶² Elle a montré que la réactivité des 2'-hydroxyles des résidus A et G est identique et supérieure de respectivement 1,4 et 1,7 fois à celle des résidus U et C. Toutefois, ces différences n'impactent pas la capacité de la méthode SHAPE à établir la structure secondaire d'ARN. Nous notons l'intérêt de cette méthode qui permet d'interroger les nucléobases A, C, G et U au cours de la même expérience. Chaque nucléotide fournit l'information le concernant : la résolution est à l'échelle du nucléotide.

II.3.c.ii. Sondes décrites dans la littérature

En 2005, l'équipe de Weeks⁶⁵⁸ a montré que l'anhydride *N*-méthylisatoïque (NMIA, Figure 210 à gauche) est un agent électrophile capable d'induire une acylation sélective du groupement hydroxyle en position 2' du ribose et que cette acylation est extrêmement sensible à la flexibilité locale. Ils ont exploité le potentiel de cette sonde dans la détermination de la structure de l'ARN_t de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cependant, le NMIA n'est pas très actif. Afin d'augmenter l'électrophilie du carbonyle, le cycle aromatique est substitué par un groupe électroattracteur comme un groupe nitro pour donner l'anhydride 1-méthyl-7-nitroisatoïque (1M7, Figure 210 au milieu).⁶⁶³ Cette sonde chimique réagit plus rapidement que le NMIA pour former des adduits avec les 2'-hydroxyles. Elle possède le même mode d'action que le NMIA. Grâce à cette sonde, les auteurs ont pu déterminer avec précision la structure de la RNase P et ont pu montrer la dépendance de la structure tertiaire vis-à-vis de la concentration en magnésium.

Un nouvel agent électrophile a été plus récemment mis au point par la même équipe.⁶⁶⁴ Il s'agit du cyanure de benzoyle (Figure 210 à droite) qui présente l'inconvénient d'être instable. Subissant une auto-inactivation par hydrolyse (temps de demi-vie de 0,25 seconde à 37°C), le BzCN

⁶⁶² K. A. Wilkinson, S. M. Vasa, K. E. Deigan, S. A. Mortimer, M. C. Giddings, K. M. Weeks, *RNA* **2009**, *15*, 1314-1321.

⁶⁶³ S. A. Mortimer, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4144-4145.

⁶⁶⁴ M. F. Soulière, A. Haller, R. Rieder, R. Micura, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16161-16167.

est idéal pour des analyses quantitatives et résolues en temps des mécanismes de repliement d'ARN et d'assemblage de ribonucléoprotéines.⁶⁶⁵

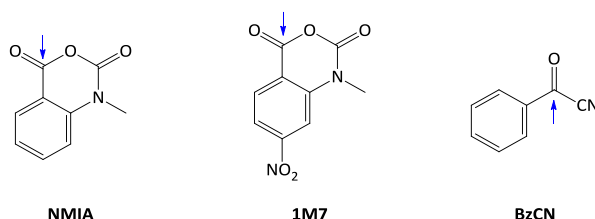


Figure 210 : Structure de l'anhydride *N*-méthylisatoïque (NMIA, à gauche), de l'anhydride 1-méthyl-7-nitroisatoïque (1M7, au milieu) et du cyanure de benzoyle (BzCN, à droite). Les flèches bleues indiquent le carbone électrophile de chaque sonde.

Plus récemment, l'équipe de Chang a mis au point deux sondes chimiques (Figure 211) permettant une étude dans des cellules vivantes.⁶⁶⁶ Ces sondes sont solubles à hautes concentrations dans le milieu cellulaire et sont donc très efficaces pour modifier l'ARN en milieu cellulaire.

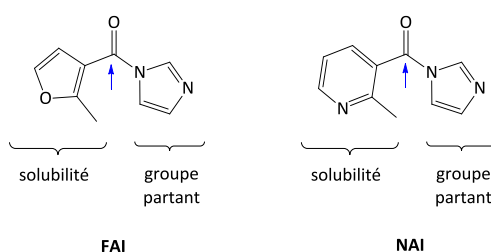


Figure 211 : Structure des sondes acide 2-méthyl-3-furoïque imidazolidine (FAI, à gauche) et acide 2-méthylnicotinique imidazolidide (NAI, à droite) utilisées *in vivo*.⁶⁶⁶ Les flèches bleues indiquent le carbone électrophile de chaque sonde.

On notera que ces sondes, électrophiles, s'hydrolysent en milieu aqueux (Schéma 145) avec des temps d'hydrolyse différents selon la nature de la sonde (Tableau 30).⁶⁶⁷

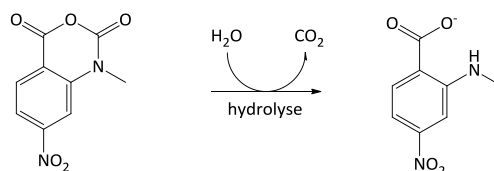


Schéma 145: Hydrolyse compétitive du 1M7 en milieu aqueux.

Sondes chimiques	Temps de demi-réaction d'hydrolyse
FAI	73 minutes
NAI	33 minutes
NMIA	8 minutes
1M7	14 secondes
BzCN	0,25 seconde

Tableau 30 : Temps de demi-réaction d'hydrolyse pour 5 sondes chimiques de la littérature.⁶⁶⁷

⁶⁶⁵ S. A Mortimer, K. M. Weeks, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1413-1421.

⁶⁶⁶ R. C. Spitale, P. Crisalli, R. Flynn, E. A. Torre, E. T. Kool, H. Y. Chan, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 18-22.

⁶⁶⁷ L. Nodin, O. Noël, F. Chaminade, O. Maskri, V. Barbier, O. David, P. Fossé, J. Xie, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 566-570.

Les temps d'hydrolyse sont déterminants dans la réactivité des sondes chimiques. En effet, il y a compétition entre la réaction avec le 2'-hydroxyle du ribose et la réaction d'hydrolyse. Il ressort de l'existence de cette hydrolyse compétitive plusieurs avantages⁶⁶⁸ :

- il n'est pas nécessaire de stopper la réaction car les sondes s'hydrolysent au bout d'un certain temps ;
- le temps d'incubation est court, en particulier pour BzCN, 1M7 et NMIA ;
- les temps d'hydrolyses (Tableau 30) très variables des différentes sondes permettent des études cinétiques et dynamiques.

II.3.c.iii. Traitements des résultats SHAPE

Depuis 2012, l'équipe de Weeks (pourtant pionnière dans le développement de ces sondes chimiques) n'a pas mis au point de nouveaux agents chimiques.⁶⁶⁹ Cette équipe⁶⁷⁰ ainsi que d'autres groupes se sont surtout intéressés à des analyses statistiques poussées des données expérimentales ou à des approches qui intègrent les données expérimentales SHAPE à des prédictions théoriques.^{671,672,673,674,675,676}

Afin d'améliorer la qualité des données, des études récentes ont été effectuées en associant un agent acylant avec une autre sonde chimique ou enzymatique.^{677,678,679} Ainsi, la structure secondaire d'un long (0,87 kB) ARN non codant humain appelé SRA (pour *steroid receptor RNA activator*) a été déterminée expérimentalement en associant plusieurs méthodes : méthode SHAPE, méthode « *in-line* », sonde DMS et sonde RNase V1.⁶⁷⁹ Cette approche fournit des résultats fiables mais demande beaucoup plus de temps de manipulation et n'est donc pas compatible avec une détermination à haut débit.

II.3.c.iv. Points forts et points faibles de la méthode SHAPE

La mise au point de méthodes d'identification à grande échelle des structures secondaires d'ARN est un des enjeux majeurs de la biologie. La caractérisation directe des nucléotides appariés et non appariés est le meilleur moyen pour déterminer précisément la structure secondaire d'un ARN.

A ce titre, nous avons vu que la méthode SHAPE fournit une mesure facile, rapide et quantitative de l'environnement de chaque nucléotide. Etant donné que la réactivité du groupement hydroxyle est peu influencée par l'identité de la base nucléique à laquelle le ribose est fixé, elle permet de sonder l'ensemble des quatre nucléotides en une seule expérience. Elle fonctionne dans diverses conditions et environnements biologiques. Elle possède donc des atouts pour devenir à

⁶⁶⁸ K. M. Weeks, D. M. Mauger, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1280-1291.

⁶⁶⁹ K. A. Steen, G. M. Rice, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13160-13163.

⁶⁷⁰ K. M. Weeks, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 295-304.

⁶⁷¹ S. Ramachandran, F. Ding, K. M. Weeks, N. V. Dokhololyan, *Biochemistry* **2013**, *52*, 595-599.

⁶⁷² Z. Ouyang, M. P. Snyder, H. Y. Chang, *Genome Res.* **2013**, *23*, 377-387.

⁶⁷³ Z. Sükösd, M. S. Swenson, J. Kjems, C. E. Heitsch, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 2807-2816.

⁶⁷⁴ S. M. Vasa, N. Guex, K. A. Wilkinson, K. M. Weeks, M. C. Giddings, *RNA* **2008**, *14*, 1979-1990.

⁶⁷⁵ S. Kirmizialtin, S. P. Hennelly, A. Schug, J. N. Onuchic, K. Y. Sanbonmatsu, *Methods Enzymol.* **2015**, *553*, 215-234.

⁶⁷⁶ D. Loughrey, K. E. Watters, A. H. Settle, J. B. Lucks, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e165.

⁶⁷⁷ G. C. Todd, N. G. Walter, *RNA* **2013**, *19*, 685-700.

⁶⁷⁸ S. Lusvarghi, J. Sztuba-Solinska, K. J. Purzycka, G. T. Pauly, J. W. Rausch, S. F. J. Le Grice, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6637-6649.

⁶⁷⁹ I. V. Novikova, S. P. Hennelly, K. Y. Sanbonmatsu, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 5034-5051.

grande échelle une méthode de détermination de la structure d'ARN et de leur dynamique. Cette technique est actuellement utilisée par de nombreuses équipes pour déterminer des structures secondaires.^{680,681,682}

Cependant, les résultats obtenus par ces sondes ne sont pas toujours sans ambiguïté. En effet, il est observé expérimentalement que certains 2'-hydroxyles de riboses de nucléotides appariés réagissent avec les sondes SHAPE tandis que certains 2'-hydroxyles de riboses de nucléotides non appariés ne réagissent pas. Ainsi, une étude récente⁶⁸³ réalisée avec six ARN différents a montré que les structures secondaires déduites après une analyse au NMIA présentaient des erreurs avec un taux de faux négatifs de 17% et un taux de faux positifs de 21%. Ces résultats sont meilleurs que ceux de modèles établis sans données expérimentales (respectivement 38 et 45%). Les résultats obtenus par la méthode SHAPE ne sont pas rationalisés et, à notre connaissance, aucune équipe ne s'est intéressée à comprendre le mécanisme SHAPE.

II.3.d. Stratégies d'identification des adduits

Après avoir fait réagir la sonde, il faut pouvoir déterminer son lieu d'attaque. Afin de détecter les modifications induites par les sondes, deux méthodes sont envisageables. Le choix entre ces méthodes dépend de la longueur de l'ARN étudié et de la nature de la sonde utilisée.⁶⁵¹

La première utilise des ARN marqués et permet de détecter directement les scissions dans l'ARN provenant de l'hydrolyse par les RNases ou du traitement par les sondes chimiques. Cette méthode, limitée aux ARN contenant moins de 200 nucléotides ou aux 200 premiers ou derniers résidus, ne sera pas utilisée ici.

La seconde approche utilise une extension d'amorce pour détecter les arrêts dans la transcription inverse au niveau des nucléotides modifiés ou clivés. Cette technique permet de tester des régions internes de longs ARN et, est recommandée pour des ARN de petite taille pour cartographier des positions qui ne peuvent être étudiées par coupure chimique. Cette technique sera utilisée dans la suite. Les modifications par réaction chimique ou coupure enzymatique doivent se produire à un taux très faible (pas plus d'une modification par molécule d'ARN). Un oligodésoxyribonucléotide marqué au ³²P servant d'amorce est hybridé avec l'ARN et l'extension de l'amorce est effectuée avec la transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire (AMV). L'extension s'arrête à l'endroit précis où la modification a eu lieu. Finalement, l'ARN est dégradé par un traitement à la soude et l'ADN complémentaire précédemment synthétisé est analysé par électrophorèse sur gel de séquence. L'électrophorèse sur gel de séquence nous donne les positions des nucléotides ayant été modifiés (Figure 212). Des contrôles effectués dans les mêmes conditions (c'est-à-dire en l'absence de la sonde) permettent d'identifier les bandes qui sont dues aux pauses de la transcriptase inverse.

Pour obtenir le maximum d'information à partir du gel de séquence, il est nécessaire que les pauses (sites où s'arrêtent spontanément la transcription inverse, matérialisés par des bandes noires sur l'autoradiographie) soient les moins nombreuses possibles.

⁶⁸⁰ T. Giguère, C. R. Adkar-Purushothama, J. P. Perreault, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98655.

⁶⁸¹ J. Kenyon, L. Prestwood, A. Lever, *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 1251-1255.

⁶⁸² J. K. Grohman, R. J. Gorelick, C. R. Lickwar, J. D. Lieb, B. D. Bower, B. M. Znosko, K. M. Weeks, *Science* **2013**, *340*, 190-195.

⁶⁸³ W. Kladwang, C. C. VanLang, P. Cordero, R. Das, *Biochemistry* **2011**, *50*, 8049-8056.

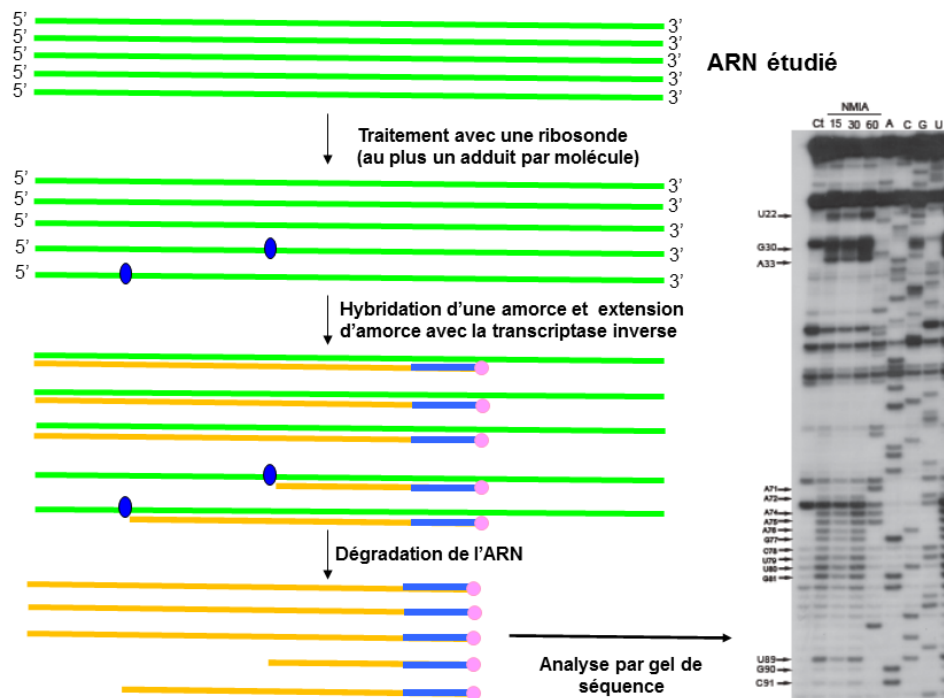


Figure 212 : Stratégie d'identification des modifications induites par la sonde chimique ou enzymatique.

III. NOUVELLES SONDAS CHIMIQUES : DE LEUR CONCEPTION A LA MODULATION DE LEUR PROPRIETES PAR L'UTILISATION DE CATALYSEURS

L'objectif de ce projet est de développer une sonde chimique stable facile d'utilisation et qui permettra d'identifier sans ambiguïté les nucléotides non appariés d'un ARN replié. Il faut pour cela que la sonde synthétisée soit réactive et très sélective des riboses des nucléotides non appariés. De plus, la modulation de la réactivité de cette sonde pourra se faire via l'utilisation de catalyseurs nucléophiles.

III.1. Conception de nouvelles sondes chimiques

III.1.a. Structures de ces nouvelles sondes chimiques

A l'heure actuelle, seulement 13 sondes permettant une acylation en position 2' ont été étudiées et 5 (NMIA, 1M7, BzCN, FAI et NAI) peuvent être utilisées dans des études SHAPE. Ces sondes présentent des noyaux aromatiques. La fonction électrophile de ces sondes est de différentes natures : halogénure d'acyle, azoture d'acyle, anhydrides, etc. Ainsi, par analogie avec les sondes déjà existantes de la littérature, nous avons choisi de concevoir des sondes aromatiques dont la structure générale est donnée sur la Figure 213.

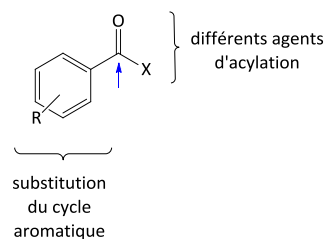


Figure 213 : Structure générale des sondes chimiques envisagées. La carbone électrophile est indiqué par une flèche bleue.

Afin de moduler l'électrophilie du carbone, nous pouvons jouer sur :

- le type d'agent d'acylation (c'est-à-dire sur la nature de X) : nous en avons choisi 5, résumés dans le Tableau 31. Ces composés sont plus ou moins électrophiles. En particulier, nous nous intéresserons à des fluorures d'acyle, moins réactifs que les chlorures d'acyle, qui ont montré une réactivité intéressante dans des réactions de couplage.⁶⁸⁴

X = CN	Cyanure d'acyle	
X = F	Fluorure d'acyle	
X = OCOAr	Anhydride	
	Ester succinimide	
X = OCH₂CN	Ester	

Tableau 31 : Différents type d'agents d'acylation étudiés.

- le substituant R et sa position sur le cycle aromatique. En fonction de son caractère mésomère et inductif et de sa position sur le cycle, ce substituant modifie l'électrophilie du carbone. Par exemple, un substituant inductif attracteur (Br, F par exemple) en position ortho ou para augmente l'électrophilie de la sonde.

Faire varier la nature de la fonction électrophile, la nature et la position du substituant sur le cycle aromatique nous a amené aux 8 sondes de la Figure 214.

⁶⁸⁴ C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.

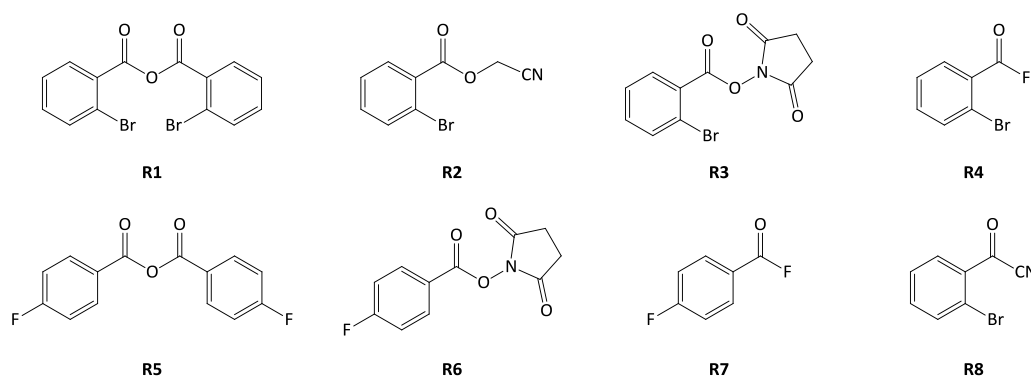


Figure 214 : Conception de sondes SHAPE appelées ribosondes.

III.1.b. Etude théorique de la réactivité de ces nouvelles sondes chimiques

Afin de prédire l'électrophilie relative des sondes chimiques, nous avons évalué l'énergie de l'orbitale basse vacante (BV). En effet, sous contrôle orbitalaire (cinétique), un bon électrophile sera une entité possédant une orbitale BV de basse énergie.

Les géométries ont été optimisées avec les méthodes de la densité de la fonctionnelle hybride B3LYP dans la base 6-31++G(d,p) en utilisant le logiciel Gaussian 09. Les énergies des orbitales BV ont ensuite été déterminées (Figure 215).

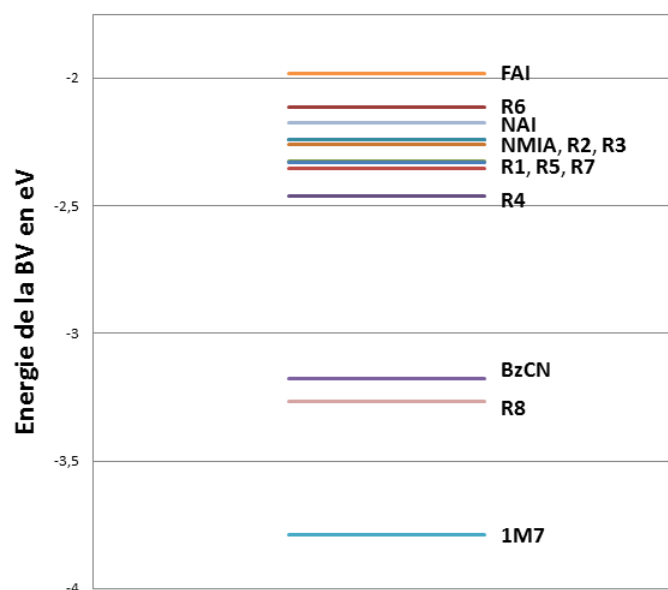


Figure 215 : Energies (en eV) des orbitales basses vacantes (BV) des différentes sondes chimiques étudiées. Ces résultats ont été obtenus à l'aide du logiciel Gaussian 09 en DFT B3LYP/6-31G(d,p)++.

On constate que, comme désiré lors de leur conception, les sondes synthétisées (à l'exception de **R8**) ont une électrophilie comparable à celle du NMIA, du FAI et du NAI. Leur électrophilie est bien inférieure à celle de 1M7 et du BzCN, qui sont décrits comme très réactifs.

Cette relative faible électrophilie peut être compensée par l'ajout de catalyseur.

III.2. Modulation de la réactivité/sélectivité par l'ajout d'un catalyseur

La 4-diméthylaminopyridine (DMAP, Figure 216 à gauche) est le catalyseur nucléophile de choix dont l'efficacité n'est plus à prouver. Grâce au doublet non liant (sp^2) de l'azote du cycle pyridine, la DMAP s'additionne sur le carbone électrophile pour donner un ion acylpyridinium, intermédiaire plus électrophile, sur lequel le nucléophile réagit.

Des catalyseurs dérivés de la DMAP ont également été développés.^{685,686} Ainsi, le catalyseur PPY (Figure 216 au milieu)^{687,688} est un meilleur catalyseur que la DMAP en raison d'effets stéréoélectroniques ($n_N \rightarrow \pi^*_{C=C}$) et stériques (contrainte allylique $A^{1,3}$). Par ailleurs, la superDMAP (Figure 216 à droite)⁶⁸⁹ est un excellent catalyseur grâce à sa capacité à stabiliser l'ion acylpyridinium par interaction avec les paires d'électrons libres des azotes.

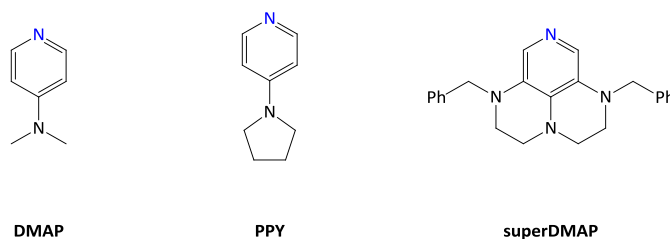


Figure 216 : Structure du 4-diméthylaminopyridine (DMAP, à gauche), du 4-(pyrrolidin-1-yl)pyridine (PPY, au milieu) et du 1,6-dibenzyl-1,2,3,4,5,6-hexahydro-1,3a,6,8-tétraazaphenalène (superDMAP, à droite). L'azote nucléophile est en bleu.

Afin de moduler la réactivité/sélectivité des sondes chimiques, nous envisageons de recourir à toute cette palette de catalyseurs disponibles. A notre connaissance, aucune publication de la littérature ne fait appel à des catalyseurs nucléophiles dans le mécanisme SHAPE.

De manière intéressante, l'équipe de Weeks⁶⁶¹ a montré que la réactivité SHAPE était fortement augmentée avec une catalyse basique générale (Figure 217). Ainsi, l'addition d'une base exogène en solution augmente la réactivité SHAPE. Pour le démontrer, l'équipe de Weeks a étudié en présence de 1M7 la réactivité SHAPE d'un dinucléotide d'adénosine et de désoxycytosine contenant un seul hydroxyle en position 2'. Cette réactivité a été étudiée à un pH constant en présence d'imidazole (présence d'un doublet libre disponible) ou de pyrrole (doublet libre conjugué au sein du cycle aromatique). L'addition d'imidazole à la concentration 1 mol/L permet de multiplier par deux la formation de l'adduit en position 2'. Le pyrrole n'a aucun effet car le doublet non liant de l'azote est engagé dans la conjugaison avec le cycle aromatique. Ces résultats prouvent que la réactivité SHAPE est augmentée par la présence d'une base.

⁶⁸⁵ N. De Rycke, F. Couty, O. R. P. David, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12852-12871.

⁶⁸⁶ A. C. Spivey, S. Arseniyadis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5436-5441.

⁶⁸⁷ A. Hassner, L. R. Krepski, V. Alexanian, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 2069-2076.

⁶⁸⁸ M. R. Heinrich, H. S. Klisa, H. Mayr, W. Steglich, H. Zipse, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4826-4828.

⁶⁸⁹ N. De Rycke, G. Berionni, F. Couty, H. Mayr, R. Goumont, O. R. P. David, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 530-533.

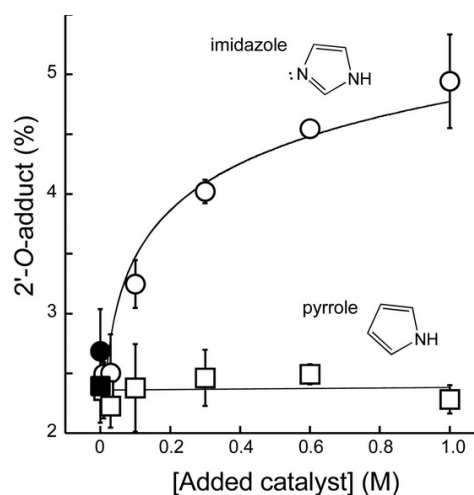


Figure 217 : Effet d'une catalyse basique sur la formation de l'adduit entre le ribose d'un dinucléotide et la sonde chimique 1M7.⁶⁶¹

Cependant, l'imidazole n'a peut-être pas qu'un rôle de base et on peut potentiellement lui attribuer un rôle de catalyseur nucléophile (Schéma 146) : l'imidazole nucléophile s'additionne sur la sonde pour donner une espèce intermédiaire plus réactive. Il y aura ensuite réaction avec le 2'-hydroxyle du ribose. Il s'agirait alors d'un premier exemple de catalyse nucléophile lors d'études SHAPE.

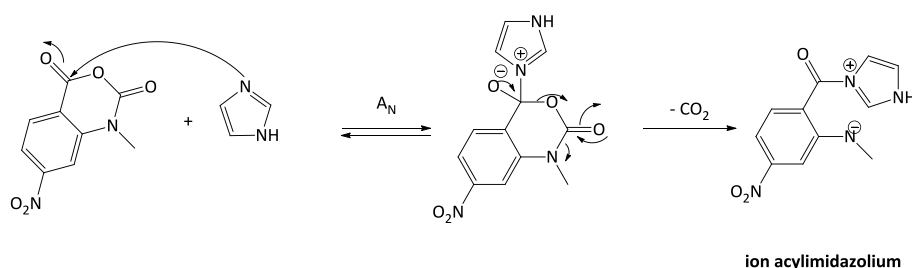


Schéma 146 : Potentiel rôle de catalyseur nucléophile de l'imidazole.

IV. ETUDE DES NOUVELLES SONDAS CHIMIQUES SUR L'EXTREMITÉ 5' DU GENOME DU VIH-1

IV.1. Synthèse et étude des sondes chimiques

IV.1.a. Préparation des sondes

La synthèse des différentes sondes chimiques a été commencée par Olivier Noel (thèse soutenue au PPSM en septembre 2013). Elle utilise des méthodes classiques de formation d'anhydride, d'ester ou de fluorure d'acyle.

Le cyanure de 2-bromobenzoyl **R8** n'a pas pu être isolé et seul l'anhydride **R1** a pu être isolé avec 10% de rendement (Schéma 147).⁶⁹⁰

⁶⁹⁰ Y. Kita, S. Akai, M. Yoshigi, Y. Nakajima, H. Yasuda, Y. Tamura, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 6027-6030.

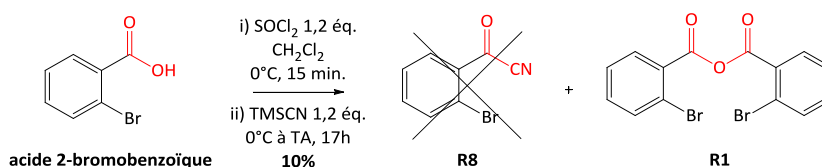


Schéma 147 : Obtention de l'anhydride **R1** au lieu du cyanure d'acyle **R8**.

Ce même anhydride a été obtenu avec un bien meilleur rendement en utilisant des conditions classiques (Schéma 148).

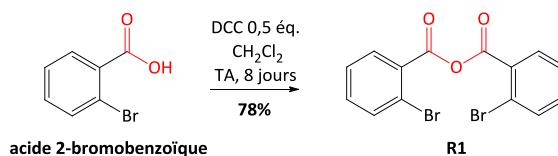


Schéma 148 : Obtention de l'anhydride **R1** par couplage utilisant le DCC.

La sonde chimique **R2** a été synthétisée par substitution nucléophile entre l'acide 2-bromobenzoïque et le 2-chloracétonitrile en présence de triéthylamine dans le THF avec un rendement de 79% (Schéma 149).⁶⁹¹

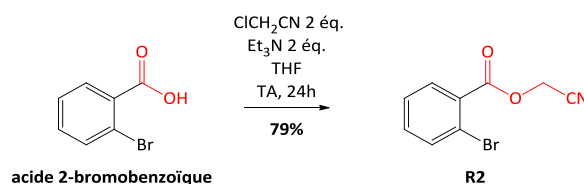


Schéma 149 : Préparation de l'ester **R2**.

Le composé **R3** a été préparé par couplage entre l'acide 2-bromobenzoïque et le *N*-hydroxysuccinimide en présence de DCC avec 31% de rendement (Schéma 150).⁶⁹²

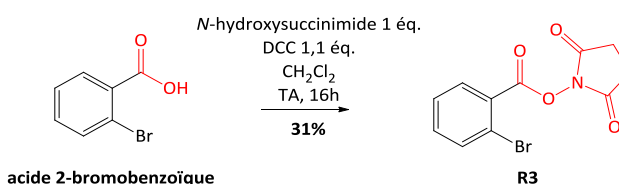


Schéma 150 : Préparation de l'ester succinimide **R3** par couplage de l'acide carboxylique correspondant avec la DCC.

L'agent électrophile **R4** a été synthétisé à partir de l'acide 2-bromobenzoïque en présence de 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazine⁶⁹³ et de pyridine dans l'acétonitrile (Schéma 151).⁶⁹⁴

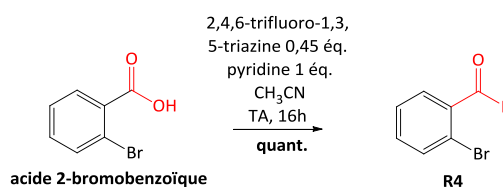


Schéma 151 : Préparation du fluorure d'acyle **R4**.

⁶⁹¹ P. Setzer, G. Forcher, F. Boeda, M. S. M. Pearson-Long, P. Bertus, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 171-180.

⁶⁹² A. Schulze, A. Giannis, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, 346, 252-256.

⁶⁹³ J. A. Birrel, J. N. Desrosiers, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 13872-13875.

⁶⁹⁴ G. O. Alah, J. Welch, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 5396-5402.

L'anhydride **R5** a pu être synthétisé en présence de DCC dans le dichlorométhane avec 63% de rendement.⁶⁹⁵ Le dérivé **R8** provenant du réarrangement de l'*O*-acylisourée a aussi été formé et isolé avec 18% de rendement (Schéma 152).

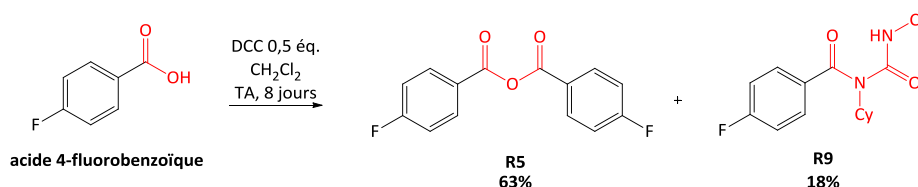


Schéma 152 : Préparation de l'anhydride **R5**.

L'ester activé **R6** a été préparé en couplant l'acide 4-fluorobenzoïque au *N*-hydroxysuccinimide en présence de DCC dans le dichlorométhane (Schéma 153).⁶⁹⁶

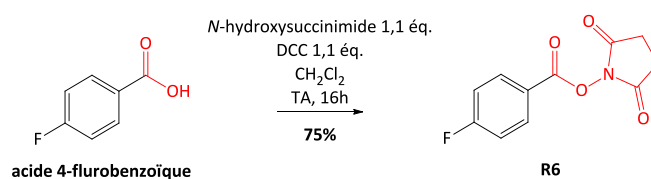


Schéma 153 : Préparation de l'ester activé **R6**.

La sonde chimique **R7** est synthétisée à partir de l'acide 4-fluorobenzoïque en présence de 2,4,6-trifluoro-1,3,5-triazine et de pyridine dans l'acétonitrile. Le rendement est difficile à déterminer car le composé attendu **R7** est très volatil et s'évapore lors du passage à l'évaporateur rotatif. On ne pourra donc le tester qu'en présence d'éther de pétrole (Schéma 154).

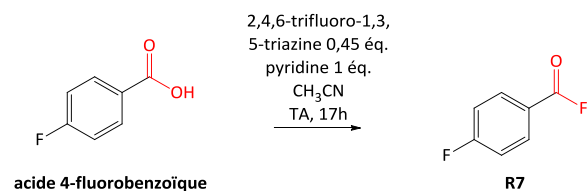


Schéma 154 : Préparation du fluorure d'acyle **R7**, très volatil.

Le catalyseur superDMAP a été fourni par Olivier David de l'Université de Versailles Saint-Quentin. Les catalyseurs DMAP et PPy sont commerciaux.

IV.1.b. Etude de la réactivité des sondes

IV.1.b.i. Hydrolyse de la sonde

Afin d'estimer le temps de demi-réaction d'hydrolyse, nous avons choisi l'anhydride benzoïque (commercial) comme composé modèle. Ce composé présente l'intérêt d'avoir son orbitale BV à une énergie (- 2,21 eV en B3LYP/6-31G++(d,p)) qui correspond approximativement à la moyenne des énergies des BV des ribosondes étudiées. Nous n'avons trouvé dans la littérature aucune méthode systématique de détermination de ces temps d'hydrolyse et aucune précision sur les conditions opératoires (comme la température). Les valeurs peuvent même varier d'une publication à l'autre : le NMIA a été décrit avec un temps de demi-réaction d'hydrolyse de 22

⁶⁹⁵ Y. Li, D. Xue, C. Wang, Z. T. Liu, J. Xiao, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 1320-1322.

⁶⁹⁶ G. Wang, Q. Y. Yu, J. Wang, S. Wang, S. Y. Chen, X. Q. Yu, *RSC Adv.* **2013**, 3, 21306-21310.

minutes⁶⁵⁸ ou de 4 minutes.⁶⁶⁸ Nous avons donc choisi de nous placer au plus proche des conditions du sondage de l'ARN (appelé *probing* en anglais).

Nous effectuons son hydrolyse dans les conditions de l'expérience (1,6 mL H₂O, 0,4 mL tampon ribosonde 5X, 0,2 mL DMSO et 0,2 mL d'une solution d'anhydride benzoïque à 50 mmol/L dans le DMSO) à TA. Le suivi de cette hydrolyse est effectué par spectrophotométrie UV-visible. Le blanc est fait avec 1,6 mL H₂O + 0,4 mL DMSO + 0,4 mL tampon ribosonde 5X. Cependant, à cette concentration en anhydride benzoïque, le milieu se trouble car la limite de solubilité est atteinte. On choisit par conséquent de diluer l'anhydride benzoïque et d'effectuer les manipulations avec une concentration finale en anhydride benzoïque de 0,5 mmol/L. Les résultats sont présentés sur la Figure 218.

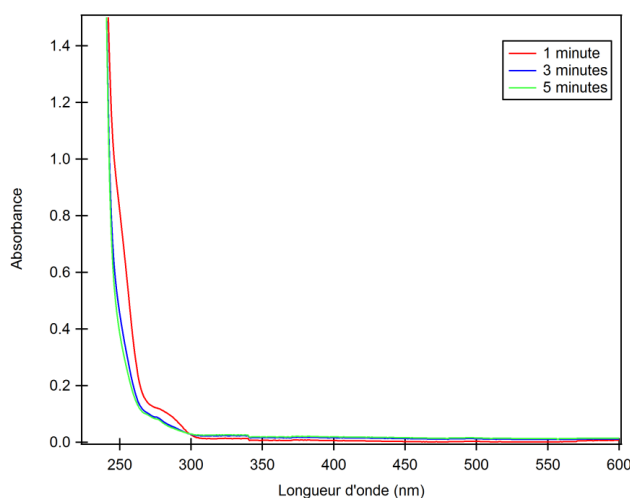


Figure 218 : Suivi par spectrophotométrie UV-visible de l'hydrolyse de l'anhydride benzoïque dans les conditions du sondage de l'ARN à TA.

A 1 minute (spectre réalisé tout de suite après ajout de la sonde et homogénéisation), on note un épaulement qui correspond à la bande d'absorption de l'anhydride. Cet épaulement disparaît après 3 minutes. Cela montre que dans les conditions du sondage de l'ARN, l'anhydride benzoïque est totalement hydrolysé en 3 minutes.

Etant donné la rapidité de l'hydrolyse de l'anhydride benzoïque, nous n'avons pas poursuivi cette étude avec les autres sondes. En effet, le matériel disponible ne nous permet pas de suivre une cinétique si rapide.

On pourra retenir que cette hydrolyse rapide nous permet de nous limiter à des temps d'incubation courts (inférieurs à 5 minutes). Dans l'étude de la réactivité des sondes, il faudra aussi garder à l'esprit l'importance de cette hydrolyse compétitive.

IV.1.b.ii. Réarrangement de Pummerer

Les anhydrides (électrophiles) sont susceptibles de réagir avec le DMSO (nucléophile) selon un réarrangement de Pummerer (Schéma 155).⁶⁹⁷

⁶⁹⁷ L. Horner, P. Kaiser, *Justus Liebigs Anal. Chem.* **1959**, 626, 19-25.

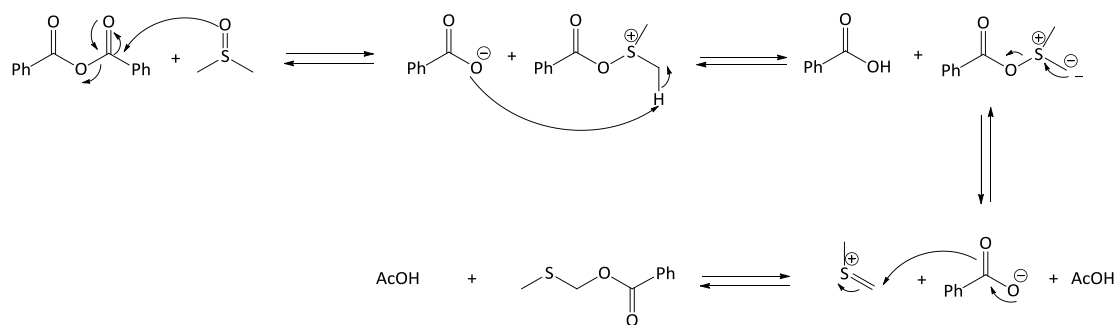


Schéma 155 : Mécanisme proposé pour la réaction de Pummerer avec l'anhydride benzoïque.

Afin de s'assurer de l'absence de réactivité des sondes chimiques étudiées avec le DMSO dans le temps de l'expérience, nous avons effectué des spectres RMN dans le DMSO-*d*₆ du NMIA (Figure 219) et de la sonde **R5** (Figure 220) 45 minutes, 3 heures, 7 heures puis 3 jours après mise en solution.

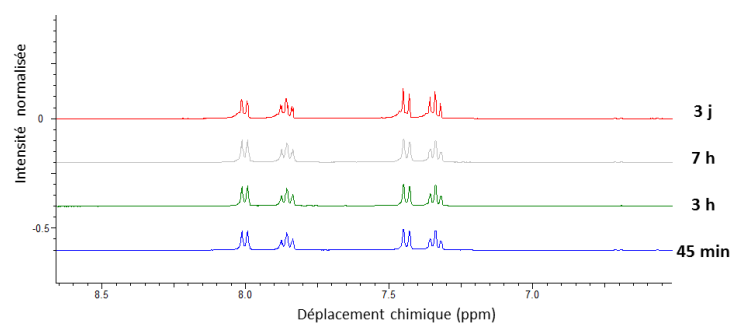


Figure 219 : Spectres RMN ¹H du NMIA dans le DMSO-*d*₆ après 45 minutes, 3 heures, 7 heures et 3 jours.

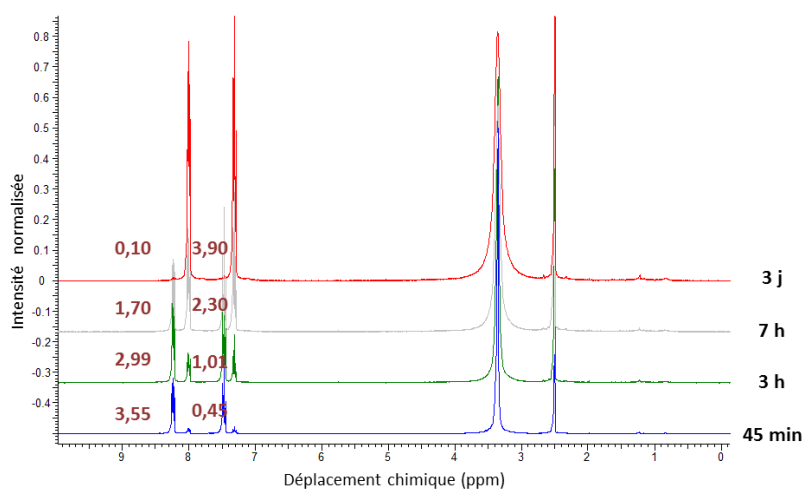


Figure 220 : Spectres RMN ¹H de **R5** dans le DMSO-*d*₆ après 45 minutes, 3 heures, 7 heures et 3 jours. Les intégrations (normalisées sur le nombre de protons de la molécule) sont indiquées en brun.

Même après 3 jours dans le DMSO, le NMIA n'a pas réagi. En revanche, la sonde **R5** a réagi très vite et la réaction est totale après 3 jours. Cependant, on ne note pas l'apparition des signaux correspondants aux groupes CH₃ ou CH₂ du produit attendu. Il s'agit donc probablement plutôt de l'hydrolyse de la sonde avec les traces d'eau résiduelles.

Afin de s'affranchir de cette difficulté, les solutions de ribosondes seront préparées juste avant d'être mises à réagir avec l'ARN.

IV.2. Tests des sondes chimiques sur l'extrémité 5' du génome du VIH-1

Afin de tester les sondes précédemment synthétisées, il nous faut des ARN avec une structure en tige et en boucle pour qu'il y ait des nucléotides appariés et des nucléotides non appariés. Nous avons choisi de tester ces composés sur un ARN étudié précédemment au laboratoire. Notre choix s'est porté sur la région R du VIH-1 qui correspond à l'extrémité 5' du génome du VIH-1.⁶⁹⁸ Ces travaux ont été effectués sous la direction de Philippe Fossé par Françoise Chaminade (ingénieur d'étude au LBPA). Le mode opératoire utilisé correspond à celui de l'équipe de Weeks : les sites de formation de l'adduit en position 2' ont été identifiés par extension d'amorce marquée au ³²P suivie d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant.⁶⁹⁹ On notera que la transcription inverse arrête l'incorporation des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) au niveau du nucléotide précédent le site de l'acylation.

IV.2.a. Tests des ribosondes sans catalyseur

Dans un premier temps, nous avons testé les différentes sondes chimiques dans les conditions « classiques » sans catalyseur. Parmi les sondes synthétisées, seule **R4** a montré une certaine efficacité (Figure 221 et Tableau 32). Cette efficacité est toutefois moins importante que celle du NMIA. On constate également que les modifications obtenues sont cohérentes avec la structure secondaire de l'ARN testé : quasiment tous les nucléotides appariés ne sont pas réactifs tandis que les nucléotides non appariés (et en particulier les nucléotides puriques) des boucles terminales le sont. Cependant, on remarque que les nucléotides A71 et A72 sont faiblement réactifs avec **R4**. Cela est cohérent avec l'observation déjà faite par l'équipe de Kevin M. Weeks : les nucléotides adjacents à un nucléotide simple-brin, à un nucléotide d'un renflement ou à un nucléotide dépareillé peuvent être légèrement réactifs.⁶⁹⁹ Par ailleurs, dès 1 minute d'incubation, cette sonde est active. L'activité maximale est atteinte à partir de 5 minutes d'incubation. Cela est cohérent avec les temps d'hydrolyse des sondes.

⁶⁹⁸ I. Kanevsky, F. Chaminade, D. Ficheux, A. Moumen, R. Gorelick, M. Negroni, J. L. Darlix, P. Fossé, *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 1059-1077.

⁶⁹⁹ K. A. Wilkinson, E. J. Merino, K. M. Weeks, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1610-1616.

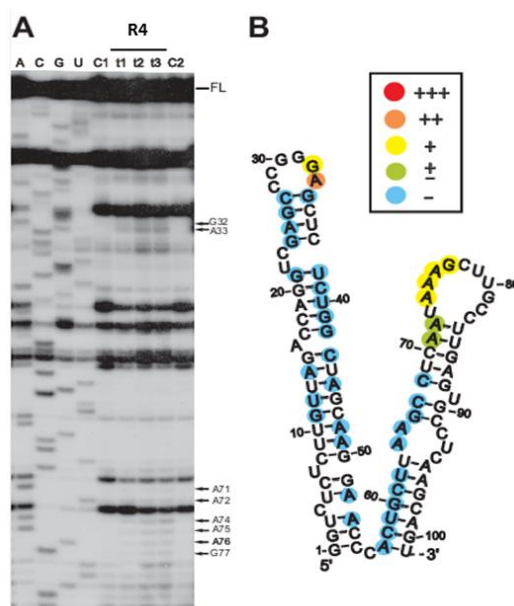


Figure 221 : Etude SHAPE de la région R de l'ARN du VIH-1 avec la sonde **R4**. (A) : Les expériences SHAPE ont été effectuées et analysées par électrophorèse sur un gel dénaturant de polyacrylamide à 8%. C1 et C2 sont des pistes de contrôle : l'ARN (2 pmol) est incubé sans sondes à 37°C pendant 1 minute (C1) et 5 minutes (C2). L'ARN (2 pmol) est incubé avec **R4** (50 nmol) à 37°C pendant 1 minute (piste t1), 5 minutes (piste t2) ou 15 minutes (piste t3). A, C, G et U sont les réactions de séquençage avec les didésoxynucléotides terminaux. FL indique le brin d'ADN complémentaire obtenu lorsque l'ARN n'a pas été modifié. Les flèches indiquent les nucléotides acylés. (B) : Superposition de la réactivité de **R4** sur la structure secondaire de l'ARN étudié. Le code couleur utilisé pour la réactivité est indiqué dans l'encart. L'absence de couleur indique que les nucléotides ne sont pas analysables car ils sont trop proches de l'extrémité 5' terminale ou du site de fixation de l'amorce ou à cause de pauses lors de la transcription inverse.

IV.2.b. Tests des ribosondes avec catalyseur

Les sondes sont ensuite testées en présence de DMAP à un taux catalytique de 6 mol% (Figure 222, Tableau 32 et Figure 223). Les sondes **R1**, **R3**, **R5** et **R6** deviennent actives tandis que **R2** reste inactive. L'inactivité de **R2** même en présence de DMAP peut s'expliquer par la faible électrophilie de l'ester cyanométhyle. L'ordre de réactivité observé (**R5** > **R1**, **R4** > **R3**, **R6**) respecte l'électrophilie relative de ces composés (**R1**, **R4**, **R5** > **R3**, **R6**) qui facilite l'étape d'addition nucléophile de la DMAP. Cet ordre de réactivité respecte également la basicité relative du groupe partant qui facilite la déprotonation de l'alcool après l'addition nucléophile (**R5** > **R1**, **R4** avec $pK_a(p\text{-F-C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}/p\text{-F-C}_6\text{H}_4\text{CO}_2^-) = 4,14$; $pK_a(o\text{-Br-C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}/o\text{-Br-C}_6\text{H}_4\text{CO}_2^-) = 3,20$; $pK_a(\text{HF}/\text{F}^-) = 2,85$).⁶⁸⁶

Par ailleurs, on remarque que la faible activité de **R6** est grandement augmentée en présence de DMAP à un taux catalytique de 50% et l'activité est comparable à celle du NMIA (Figure 223).

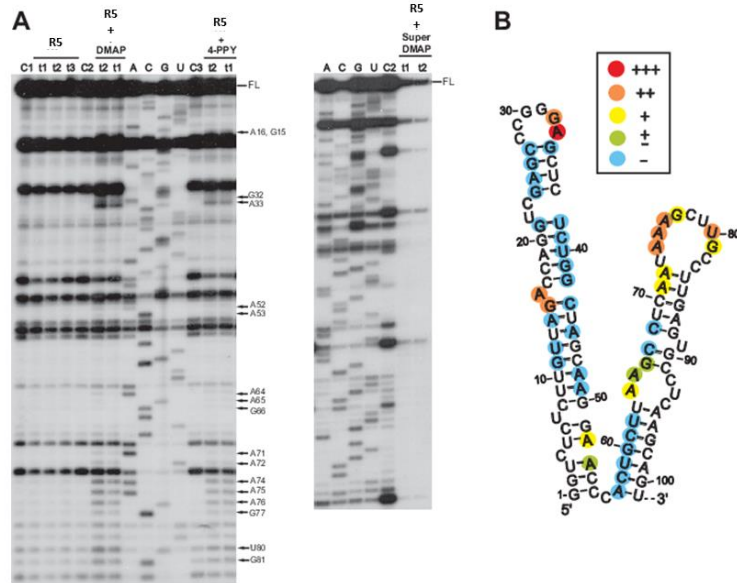


Figure 222 : Activité SHAPE de **R5** en présence de catalyseurs nucléophiles sur la région R de l'ARN du VIH-1. (A) : Pistes de contrôle C1, C2 et C3 : l'ARN (2 pmol) est incubé sans ribosondes à 37°C pendant 1 minute (C1), 5 minutes (C2) et 15 minutes (C3). L'ARN (2 pmol) est incubé avec la sonde **R5** (50 nmol) à 37°C pendant 1 minute (piste t1), 5 minutes (piste t2) et 15 minutes (piste t3) en l'absence et en présence de DMAP (6 mol%), de PPY (6 mol%) et de superDMAP (0,6 mol%). A, C, G et U sont les réactions de séquençage avec les didésoxynucléotides terminaux. (B) : Superposition de la réactivité de **R5** en présence de DMAP à 6 mol% sur la structure secondaire de l'ARN étudié.

Ribosondes	R1	R2	R3	R4	R5	R6	NMIA
Sans DMAP	-	-	-	+	-	-	++++
Avec DMAP	++	-	+	++	+++	+	++++

Tableau 32 : Activité des ribosondes en l'absence et en présence de DMAP (6 mol%).

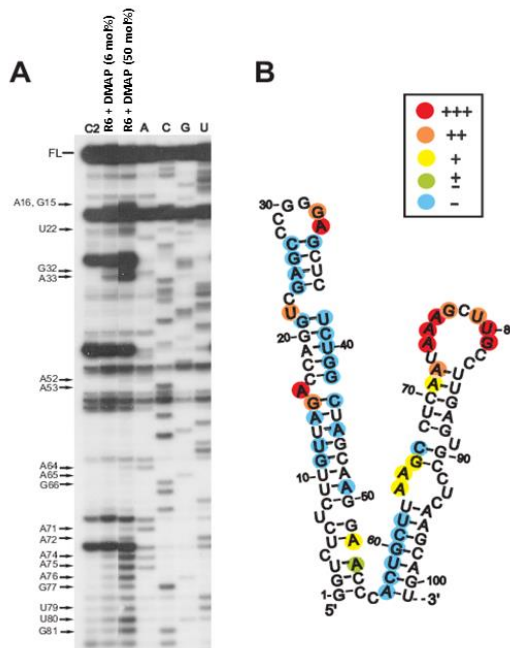


Figure 223 : Activité SHAPE de **R6** en présence de DMAP (6 mol% et 50 mol%) sur la région R de l'ARN du VIH-1. (A) : Piste de contrôle C2 : l'ARN (2 pmol) est incubé sans ribosondes à 37°C pendant 5 minutes. L'ARN (2 pmol) est incubé avec la sonde **R6** (50 nmol) à 37°C pendant 5 minutes en présence de DMAP (6 mol% et 50 mol%). (B) : Superposition de la réactivité de **R6** en présence de DMAP à 50 mol% sur la structure secondaire de l'ARN étudié.

Il reste à nous intéresser à l'action des autres catalyseurs nucléophiles. Pour cela, l'activité de la ribosonde **R5** a été étudiée en présence de PPY et de superDMAP (Figure 222). De manière surprenante, l'activité de **R5** est légèrement plus faible en présence de PPY (6 mol%) qu'en présence de DMAP (6 mol%). En revanche, la superDMAP conduit à un système trop réactif. En effet, même à des taux catalytiques plus faibles (0,6 mol%), la quantité d'ADN complémentaire de longueur maximale (correspondant à un ARN non modifié par la sonde) est trop faible (Figure 222). La superDMAP est donc un catalyseur très puissant, trop puissant même car nos essais de diminution du taux catalytique de superDMAP ne permettent pas d'atteindre une sélectivité suffisante.

Il reste à nous intéresser aux questions de sélectivité. Pour cela, il nous faut comparer les modifications obtenues avec le NMIA, **R1**, **R4** et **R5** qui sont les ribosondes les plus réactives (Figure 224). Les modifications sont similaires, ce qui est un argument pour affirmer que le mécanisme d'action de ces ribosondes est proche de celui du NMIA (acylation en position 2' du ribose).

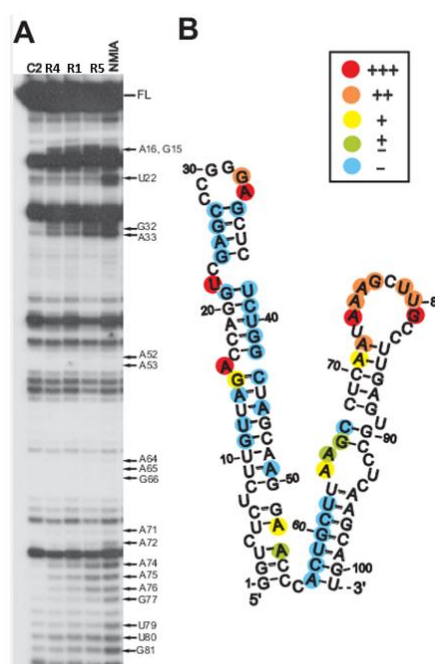


Figure 224 : Comparaison de la sélectivité lors d'expériences SHAPE avec le NMIA, **R1**, **R4** et **R5** sur la région R du VIH-1. (A) : Piste de contrôle C2 : l'ARN (2 pmol) est incubé sans ribosondes à 37°C pendant 5 minutes. L'ARN (2 pmol) est incubé à 37°C pendant 5 minutes en présence de DMAP (6 mol%) et de NMIA, **R1**, **R4** ou **R5** (50 nmol). (B) : Superposition de la réactivité du NMIA en présence de DMAP (6 mol%) sur la structure secondaire de l'ARN étudié.

En conclusion de cette première série d'expériences, les ribosondes synthétisées (à l'exception de **R4**) ne sont pas actives. L'ajout de catalyseur nucléophile comme la DMAP à un taux de 6 mol% permet d'obtenir des systèmes réactifs (sauf avec **R2**). L'anhydride 2-fluorobenzoïque **R5** est plus réactif que l'anhydride 2-bromobenzoïque **R1** et le fluorure de 2-bromobenzoyl **R4** qui sont eux-mêmes plus réactifs que les esters succinimides **R3** et **R6**. Cet ordre d'activation avec la DMAP s'explique par l'électrophilie du groupe carbonyle ainsi que par la basicité du groupe partant qui déprotonne l'alcool après l'addition nucléophile.

Nous ne pouvons exclure que les catalyseurs nucléophiles employés jouent également le rôle de base. En effet, ils sont ajoutés à des taux catalytiques par rapport à la sonde utilisée. Or, celle-ci est en grand excès par rapport à l'ARN (25000 équivalents) qui n'est d'ailleurs que partiellement modifié. Il y a donc bien plus de catalyseurs que d'adduits formés. Ces bases ($pK_a(\text{DMAP}) = 9,2$)

peuvent donc également augmenter la quantité d'adduits formés en captant un proton, conformément à ce qui a été décrit par l'équipe de Weeks.⁶⁶¹

Nous choisissons dans la suite d'étudier plus en détail la sonde **R1** (moyennement réactive en présence de catalyseur) et la sonde **R5** (bien réactive en présence de catalyseur).

V. ETUDE APPROFONDIE DES SONDAS R1 ET R5 EN PRESENCE DES CATALYSEURS DMAP ET SUPERDMAP SUR LA REGION SL1(-) DU GENOME DU VIRUS DE L'HEPATITE C

Pour confirmer que la sonde chimique **R5** est plus réactive que la sonde **R1** quel que soit la nature de l'ARN, nous avons choisi d'étudier plus en détail ces sondes sur un autre ARN. L'ARN choisi correspond au domaine X du virus de l'hépatite C, précédemment étudié au laboratoire⁷⁰⁰ et dont la structure secondaire est donnée ci-dessous (Figure 225). De plus, nous avons essayé de moduler la réactivité des sondes **R1** et **R5** en jouant sur le catalyseur, le taux catalytique et le temps d'incubation.

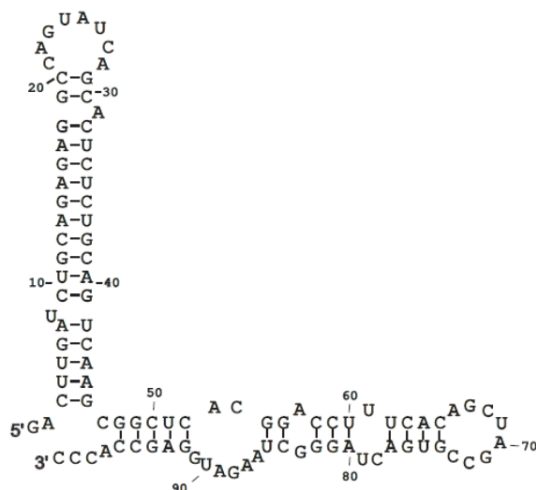


Figure 225 : Structure de la région SL1(-) de l'ARN du virus de l'hépatite C (VHC).

V.1. Tests des ribosondes avec le catalyseur DMAP

L'objectif de cette première série d'expérience est d'étudier l'influence du catalyseur DMAP (en concentration fixée à 6 mol%) et du temps d'incubation. Les résultats (Figure 226) sont comparés à ceux obtenus avec le NMIA seul. Malheureusement, on observe avec cet ARN un grand nombre de pauses lors de la transcription inverse. Une quantification du gel d'électrophorèse donne les résultats indiqués dans le Tableau 33.

⁷⁰⁰ R. Ivanyi-Nagy, I. Kanevsky, C. Gabus, J. P. Lavergne, D. Ficheux, F. Penin, P. Fosse, J. L. Darlix, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2618-2633.

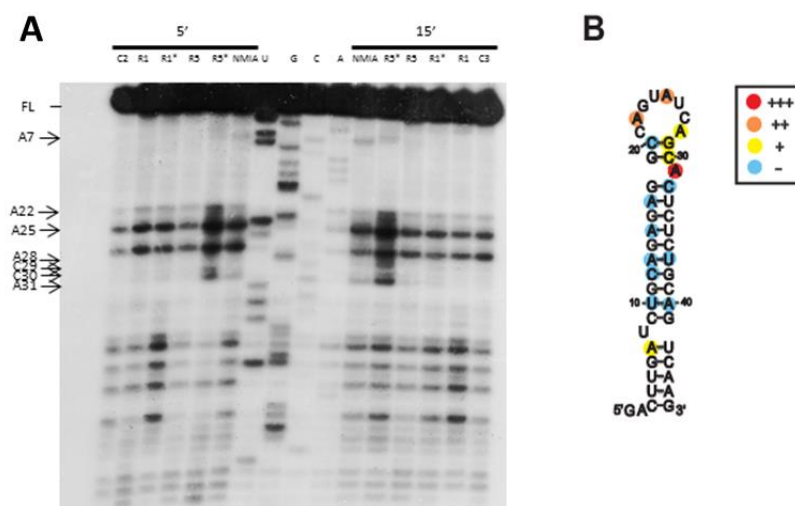


Figure 226 : Activité SHAPE de **R1** et de **R5** en l’absence (pistes notées R1 et R5) et en présence de DMAP à 6 mol% (pistes notées R1* et R5*) sur la région SL1(-) de l’ARN du VHC. (A) : Piste de contrôle C2 et C3: l’ARN (2 pmol) est incubé sans ribosondes à 37°C pendant 5 minutes (C2) ou 15 minutes (C3). L’ARN (2 pmol) est incubé avec la sonde **R1** ou **R5** (50 nmol) à 37°C pendant 5 minutes ou 15 minutes en l’absence ou en présence de DMAP (6 mol%). (B) : Superposition de la réactivité de la sonde **R5** en présence de DMAP (6 mol%) sur la structure secondaire de la région SL1(-) de l’ARN du VHC.

	A7					U8					A28					A31				
	R1		R5		NMIA	R1		R5		NMIA	R1		R5		NMIA	R1		R5		NMIA
	-	+	-	+		-	+	-	+		-	+	-	+		-	+	-	+	
5 min	1,0	0,9	0,8	1,3	1,2	1,0	1,0	0,9	1,5	1,4	1,1	1,2	1,0	3	1,4	1,1	1,3	1,0	3,1	1,5
15 min	1,0	1,0	1,1	1,3	1,3	1,1	1,2	1,3	1,6	1,5	0,8	1,2	1,2	2,8	1,6	0,9	1,3	1,3	3,0	1,7

Tableau 33 : Réactivités relatives (en u.a.) en présence de **R1** ou **R5** en l’absence (-) ou en présence (+) de DMAP (6 mol%). Une valeur inférieure ou égale à 1,0 correspond à une absence de réactivité (contrôle).

Pour les sondes **R1** et **R5**, on constate une faible influence du temps d’incubation avec des résultats semblables entre 5 et 15 minutes. Cela est cohérent avec une hydrolyse très rapide (cf. étude précédente). La réactivité du NMIA augmente très légèrement de 5 à 15 minutes, ce qui est cohérent avec son temps de demi-hydrolyse de 8 minutes.⁶⁶⁷

On observe de nouveau que la sonde **R1** est très peu réactive. Sans DMAP, aucune réactivité significative n’est observée. Avec la DMAP, les 3 nucléotides non appariés U8, A28 et A31 ne sont pas significativement réactifs. Les résultats sont bien inférieurs à ceux obtenus avec le NMIA même sans catalyseur.

De la même manière qu’avec la région R de l’ARN du VIH-1, **R5** est plus réactif et cette réactivité est fortement exacerbée en présence de DMAP. En comparaison au NMIA seul, on note même une augmentation nette de la réactivité sur les nucléotides A28 et A31 non appariés (boucle terminale et renflement).

On note que le nucléotide apparié A7 réagit légèrement avec **R5** en présence de DMAP à 6 mol% et avec le NMIA. Le NMIA et la sonde **R5** en présence de DMAP à 6 mol% ont donc des sélectivités imparfaites pour les nucléotides non appariés.

En conclusion, la sonde **R5** en présence de DMAP avec un temps d'incubation de 5 minutes permet d'obtenir de bons résultats avec une bonne réactivité et une bonne sélectivité. Ces résultats sont toutefois à nuancer car les données exploitables sont limitées.

V.2. Tests des ribosondes avec le catalyseur superDMAP

Les précédents résultats avaient montré une forte augmentation de la réactivité en présence du catalyseur superDMAP (Figure 222). Des études ont donc été effectuées avec les sondes **R1** ou **R5** en présence de superDMAP à des concentrations inférieures à 0,6 mol%, ce qui correspond à des taux catalytiques inférieurs à ceux étudiés précédemment.

Cependant, à ces concentrations, nous ne notons aucun effet du catalyseur. Des expériences supplémentaires à des concentrations de 1,2 mol% en superDMAP montrent une réactivité pour **R5** mais aucune pour **R1**. On observe donc un seuil pour le taux catalytique en superDMAP : en dessous d'un taux catalytique de 0,6 mol%, il n'y a pas d'activité, à partir de 0,6 mol%, l'activité est très importante.

Cela est confirmé par le changement de couleur des solutions (Figure 227) lorsque la concentration en superDMAP dépasse 0,6 mol%. En effet, lorsque la quantité de catalyseur augmente, on constate que les solutions deviennent jaunes, révélant la formation d'un intermédiaire (probablement celui résultant de l'addition nucléophile du catalyseur sur le carbone électrophile de la sonde chimique). On note la disparition de cette couleur après 5 minutes. La même expérience conduite en l'absence de nucléophile (2'-hydroxyle du ribonucléotide ou milieu aqueux) montre la persistance dans le temps de cette couleur. Cette observation permet d'affirmer qu'il y a bien une catalyse nucléophile et que l'effet de la DMAP, du PPy et de la superDMAP n'est pas que due à leur caractère basique.

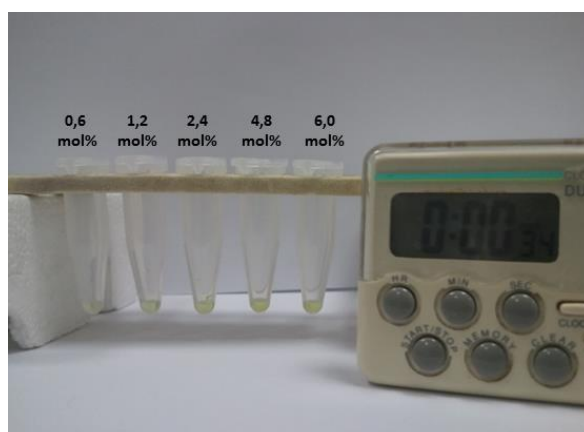


Figure 227 : Evolution de la couleur des solutions lors du sondage de l'ARN avec la sonde **R1** pour des concentrations en superDMAP allant de 0,6 mol% à 6 mol%.

Par conséquent, la présence d'un catalyseur permet bien d'augmenter la réactivité. Cependant, un contrôle rigoureux du taux de catalyseur est nécessaire pour trouver un compromis entre réactivité et sélectivité. Cette mise au point ne peut malheureusement pas être faite sur cet ARN étant donné le nombre important de pauses.

VI. ETUDE DU MECANISME SHAPE

Bien que la méthode SHAPE soit une excellente approche pour déterminer la structure secondaire d'ARN et pour étudier la dynamique d'ARN à haut débit, certains résultats obtenus peuvent être ambigus parce que les agents électrophiles sont seulement partiellement spécifiques des nucléotides non appariés.⁶⁸³ Pour améliorer la sélectivité, il nous faut d'abord mieux comprendre le mécanisme SHAPE.

VI.1. Mise en évidence des failles du mécanisme SHAPE

VI.1.a. Fondements du mécanisme SHAPE

Il est accepté dans la littérature que le mécanisme SHAPE est basé sur l'acylation en position 2' du ribose (Figure 228).⁶⁵⁸ Ce mécanisme a été postulé sur la base des travaux de Toshiaki Hiratsuka.^{701,702} Il a travaillé sur la réactivité des nucléotides monophosphates cycliques (Figure 229) et des mononucléotides triphosphates avec l'anhydride isatoïque et l'anhydride *N*-méthylisatoïque (NMIA)⁷⁰³ dans des conditions basiques (NaOH 0,1 M).

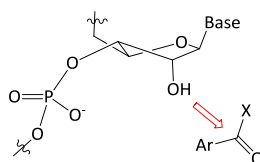


Figure 228 : Mécanisme d'acylation en position 2' du ribose sur lequel est basée la méthode SHAPE.

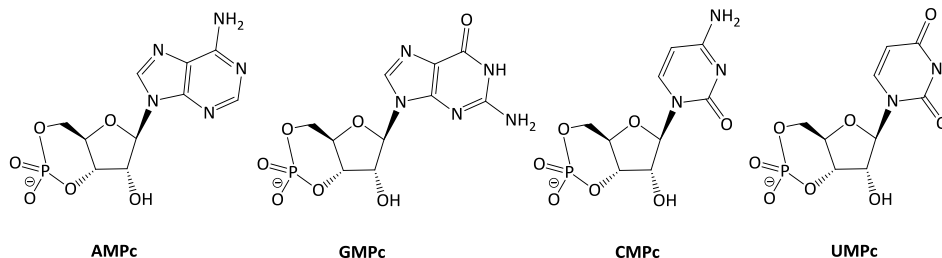


Figure 229 : Structure des nucléotides monophosphates cycliques (NMPc).

Or, ces travaux,^{701,702} ainsi que des travaux ultérieurs,⁷⁰⁴ comportent une caractérisation des produits obtenus par spectroscopie UV-visible, par spectroscopie de fluorescence, par microanalyse et par spectrométrie de masse. Il n'y a aucune étude (comme par RMN) qui permet de s'assurer de la structure exacte des composés obtenus.

VI.1.b. Sites nucléophiles de l'ARN

VI.1.b.i. Constats

Cette absence de caractérisation est d'autant plus problématique que dans un ARN, d'autres sites que les hydroxyles en position 2' sont susceptibles d'être nucléophiles. Afin d'étudier la

⁷⁰¹ T. Hiratsuka, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 13354-13358.

⁷⁰² T. Hiratsuka, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, 742, 496-508.

⁷⁰³ A. R. Moorman, R. H. Abeles, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6785-6786.

⁷⁰⁴ D. Reinecke, F. Schwede, H. G. Genieser, R. Seifert, *PLoS ONE* **2013**, 8, e54158.

réactivité nucléophile d'un ARN, intéressons-nous déjà à des composés constitutifs plus simples comme des nucléosides ou des nucléotides.

En étudiant la littérature sur les nucléosides, on constate que de nombreuses réactions font intervenir la nucléophilie de la base nucléique. Par exemple, M. Sekins s'est intéressé à la réaction d'un dérivé d'uridine avec des électrophiles comme des chlorures d'acyle, des halogénoalcanes ou des chlorures de trialkylsilane.⁷⁰⁵ On constate que la base nucléique uracile réagit préférentiellement au niveau de l'oxygène O₄ ou de l'azote N₅ mais aucun produit ayant réagi sur l'hydroxyle en 2' n'est identifié. D'autres travaux font également état d'une compétition entre l'acylation sur le 2'-hydroxyle d'un nucléoside et sur la base nucléique.⁷⁰⁶

Si on regarde la réactivité de nucléotides monophosphates cycliques (Figure 229) avec des halogénoalcanes, on constate que 3 produits différents peuvent être obtenus : le produit *O*-alkylé, le produit *N*-alkylé et le phosphotriester (Figure 230).⁷⁰⁷ Le produit majoritairement obtenu dépend fortement des conditions utilisées et des résultats très différents sont obtenus dans la littérature selon les conditions (Tableau 34).^{708,709}

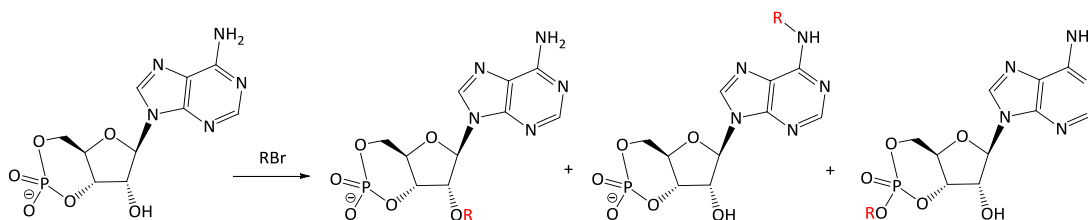


Figure 230 : Réaction de l'AMPC avec des halogénures d'alkyle.⁷⁰⁷

Conditions	Produit majoritaire
NaOH aqueux	<i>O</i> -alkylé
DBU, DMSO	<i>N</i> -alkylé
Bu ₃ N, <i>N,N</i> -diméthylacétamide	phosphotriester

Tableau 34 : Produit majoritaire obtenu lors de la réaction de l'AMPC avec des halogénures d'alkyle.⁷⁰⁷

De plus, la réactivité des ARN ou des nucléotides avec un électrophile dans les conditions proches de celles utilisées lors du sondage de l'ARN n'a, à notre connaissance, pas été étudiée.

Ces sites réactionnels additionnels pourraient, au moins partiellement, expliquer les données ambiguës obtenues lors des études SHAPE.

VI.1.b.ii. Etude théorique de la réactivité des NMPC

Un outil d'étude de la réactivité de composés est le potentiel électrostatique (ESP pour *ElectroStatic Potential*). Le potentiel électrostatique ϵ_p à un point P est défini comme l'énergie d'interaction d'une charge positive située en ce point P avec les noyaux et les électrons de la molécule. Une région où le potentiel électrostatique est négatif (représentée usuellement en rouge)

⁷⁰⁵ M. Sekine, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2321-2326.

⁷⁰⁶ T. S. Kumar, A. S. Madsen, J. Wengel, P. J. Hrdlicka, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4188-4201.

⁷⁰⁷ S. Kataoka, J. Isono, N. Yamaji, M. Kato, *Chem. Lett.* **1986**, 1221-1223.

⁷⁰⁸ S. Kataoka, J. Imai, N. Yamaji, M. Kato, T. Kawada, S. Imai, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1596-1600.

⁷⁰⁹ S. Kataoka, J. Isono, N. Yamaji, M. Kato, T. Kawada, S. Imai, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 2212-2219.

est une région sensible aux attaques d'électrophiles. A l'inverse, une région où le potentiel électrostatique est positif (représentée usuellement en bleu) est une région sensible aux attaques de nucléophiles. Très souvent, et ce afin de faciliter leur interprétation, le potentiel électrostatique est cartographié sur la densité électronique totale. La densité électronique donne la taille de la molécule tandis que le potentiel électrostatique donne des informations sur la localisation des électrons de valence.

Dans de précédents travaux sur les NMPc cycliques, des calculs de DFT ont été effectués dans la base 6-31G(d,p).⁷¹⁰ Par ailleurs, les fonctions diffuses sont particulièrement importantes pour améliorer la description de la densité électronique dans les systèmes anioniques.⁷¹¹ Nous choisissons donc de travailler en DFT/6-31G++(d,p). En outre, les calculs sont faits avec le solvant eau dans le modèle IEFPCM (*Integral Equation Formalism Polarizable Continuum Model*).

Lors du sondage de l'ARN, les liaisons phosphodiester sont déprotonées. Les résultats dans le cas de l'AMPc et de l'UMPc anioniques sont indiqués sur la Figure 231.

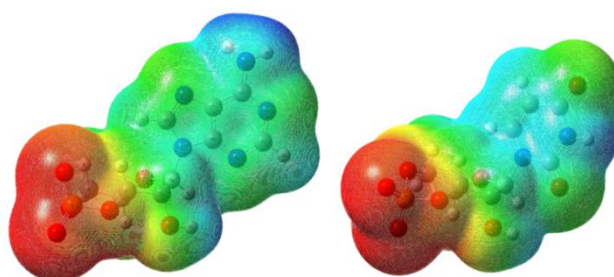


Figure 231 : Surfaces de potentiel électrostatique cartographiées sur la densité électronique totale pour l'AMPc (à gauche) et l'UMPc (à droite) anioniques. Ces résultats ont été obtenus en B3LYP/6-31G++(d,p) dans l'eau (modèle IEFPCM).

D'après ces calculs, le site le plus nucléophile est constitué par les deux oxygènes de la liaison phosphodiester. Ceci est cohérent avec le fait que, dans le milieu d'étude, la liaison phosphodiester ($pK_a(\text{ROP}(\text{O})(\text{OH})\text{R}'/\text{ROP}(\text{O})(\text{O}^-)\text{R}')$ compris entre 1 et 3) porte la charge négative. Nous avons également vu que des travaux ont révélé que la réaction des NMPc avec un électrophile peut avoir lieu sur un des oxygènes de la liaison phosphodiester.⁷⁰⁷ Des sites de moindre nucléophilicité sont localisés sur la base nucléique nucléophile et sur l'hydroxyle en position 2'.

Des calculs similaires ont été effectués sur un dimère d'adénosine ou sur le 3',5'-di-O-méthyladénosine (Figure 232). On retrouve la présence de plusieurs sites nucléophiles : 2'-hydroxyle, azotes des bases nucléiques. On notera que l'hydroxyle est légèrement plus nucléophile que ceux de la base nucléique.

⁷¹⁰ A. Zhang, K. Liu, C. Wang, S. Ma, Z. Li, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2005**, 719, 149-152.

⁷¹¹ A. A. Arabi, C. F. Matta, *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 3360-3368.

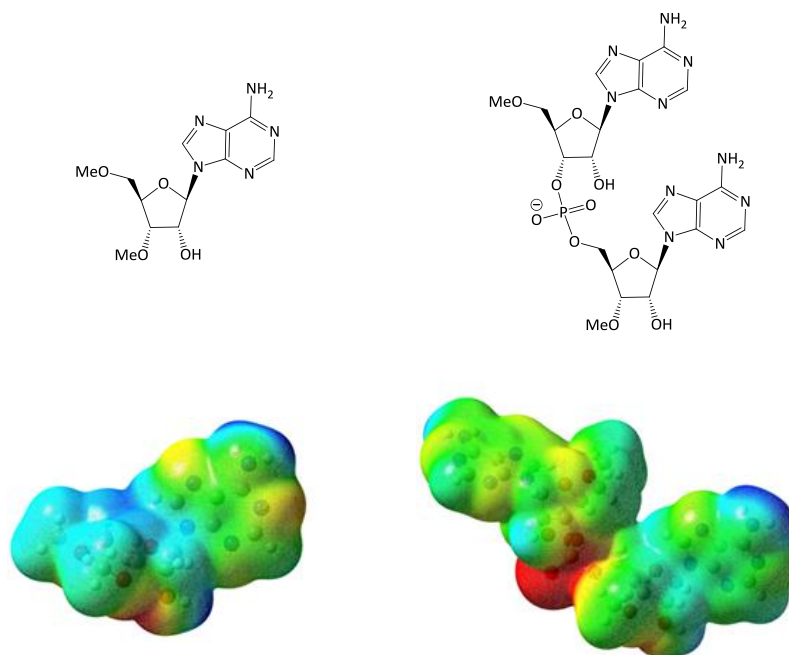


Figure 232 : En haut : Structure du 3',5'-di-*O*-méthyladénosine (à gauche) et du dinucléotide d'adénosine (à droite) étudiés. En bas : Surfaces de potentiel électrostatique cartographiées sur la densité électronique totale pour le 3',5'-di-*O*-méthyladénosine (à gauche) et le dinucléotide d'adénosine (à droite). Ces résultats ont été obtenus en B3LYP/6-31G++(d,p) dans l'eau (modèle IEFPCM).

Ces calculs confirment bien le fait que l'hydroxyle en position 2' n'est pas le seul site nucléophile de l'ARN et que la réactivité des ARN avec les sondes SHAPE peut être envisagée sur d'autres sites.

VI.2. Détermination des sites réactifs de l'ARN

VI.2.a. Stratégie d'étude

La détermination de règles simples de réactivité entre les nucléotides des ARN et les réactifs acylants est indispensable à la compréhension des mécanismes et des limitations des réactifs SHAPE existants. Il nous faut donc étudier les sites d'acylation possibles d'un ARN. Pour cela nous allons travailler sur des mononucléotides, plus simples de purification et de caractérisation que des oligonucléotides. Nous avons choisi d'étudier les mononucléotides cycliques (AMPc, GMPc, CMPc, UMPc) commerciaux, connus pour être réactifs vis à vis des composés acylants.⁶⁵⁸ Ces composés ont également l'avantage de ne présenter qu'un seul hydroxyle libre sur le ribose.

Ainsi, nous allons étudier la réactivité des différents mononucléotides cycliques avec le NMIA dans des conditions similaires à celles utilisées lors du sondage de l'ARN. Après optimisation des conditions de réactions, il faudra travailler à l'isolation des produits obtenus. Ces derniers seront entièrement caractérisés par spectroscopie RMN 1D et 2D. Toutes ces études devraient, en nous donnant des outils pour interpréter certains résultats ambigus, permettre une meilleure compréhension du mécanisme SHAPE.

Ces manipulations ont été effectuées par Clément Polese lors de son stage de licence 3. La synthèse des composés a été effectuée au PPSM tandis que leur caractérisation par RMN a été

réalisé au LBPA avec Olivier Mauffret et Loussine Zargarian sur un spectromètre RMN Bruker AVANCE 500 MHz équipé d'une sonde BBI (*broad band inverse*).

VI.2.b. Réaction entre le NMIA et les NMPc

VI.2.b.i. Mise au point des conditions opératoires de réaction du NMIA avec les NMPc

La réaction entre le NMIA et l'AMPc a été décrite par deux équipes.^{701,704} Elle se fait en milieu basifié par la soude et les produits sont purifiés sur colonne Sephadex (Schéma 156)⁷⁰¹ ou par MPLC (Schéma 157).⁷⁰⁴ Ne disposant pas de ces équipements de purification et souhaitant effectuer la réaction dans des conditions proches de celles du sondage de l'ARN, nous avons travaillé à la mise au point d'un tel protocole. Nous avons alors rencontré de nombreuses difficultés : milieu trop dilué pour obtenir suffisamment de produit, NMIA peu soluble en milieu aqueux, acidification du milieu lors de la réaction en raison de la libération de dioxyde de carbone, réaction très incomplète, purification par chromatographie sur gel de silice compliquée en raison de la polarité des composés, perte du produit lors du *scale-up*, etc.

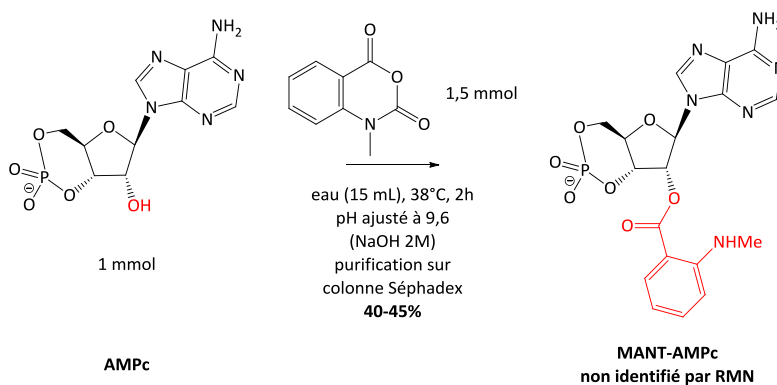


Schéma 156 : Réaction entre l'AMPc et le NMIA effectuée par T. Hiratsuka.⁷⁰¹

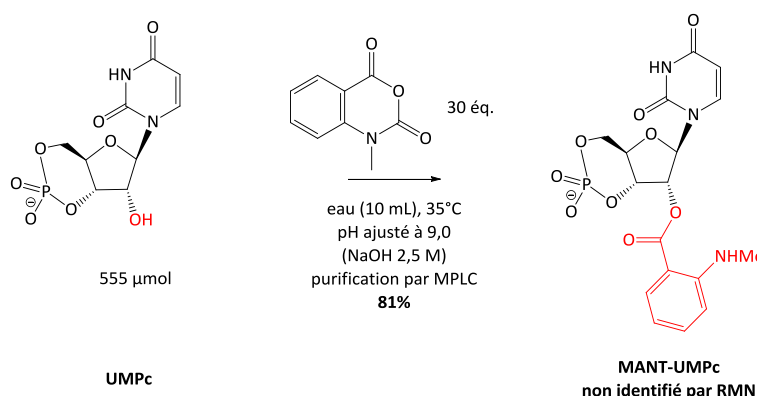


Schéma 157 : Réaction entre l'UMPc et le NMIA effectuée par l'équipe de R. Seifert.⁷⁰⁴

Face à toutes ces difficultés, le meilleur résultat a été obtenu en faisant réagir à 37°C 20 mg d'AMPc avec 5,0 éq. de NMIA dans un milieu CH₃CN/H₂O 1/4 (1 mL) avec un pH maintenu à 9 par de la soude 2 mol/L (Schéma 158). Un seul produit, fluorescent sous irradiation à 365 nm, est détecté par CCM. Le produit, purifié par chromatographie sur colonne de silice, est obtenu avec 22% de rendement. On notera que le produit obtenu a les mêmes caractérisations par spectroscopies UV-visible et de fluorescence que le produit décrit par T. Hiratsuka ou le produit commercial vendu par Jena Bioscience GmbH :⁷⁰¹ le spectre d'absorption UV-visible du composé obtenu en solution à 50

mmol/L dans le tampon Tris.HCl (pH 8,0) présente un maximum à 255 nm et un maximum à 355 nm ; le spectre d'émission de fluorescence après excitation à 350 nm présente un maxima à 445 nm.

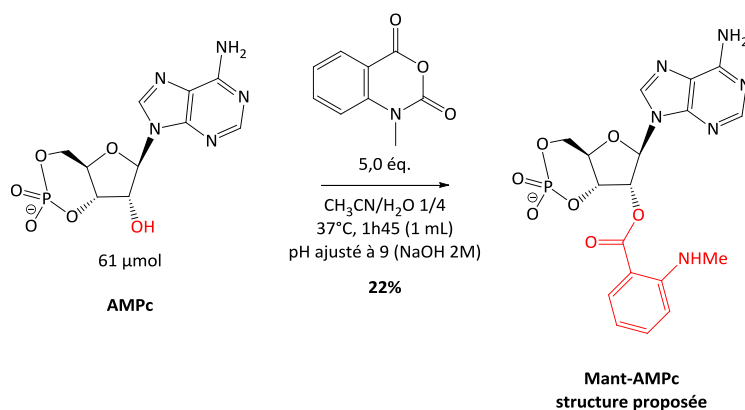


Schéma 158: Réaction entre l'AMPc et le NMIA.

Un protocole similaire a conduit au Mant-GMPc avec 16% de rendement (Schéma 159).

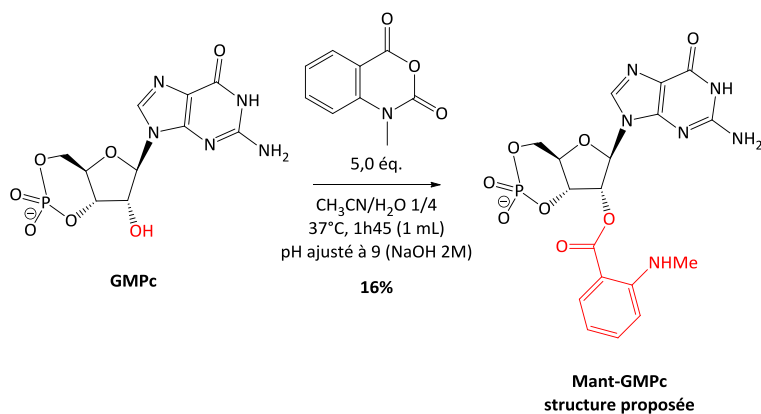


Schéma 159 : Réaction entre le GMPc et le NMIA.

Il reste maintenant à s'assurer de la structure des produits obtenus.

VI.2.b.ii. Détermination de la structure des produits par RMN

Les structures des deux composés précédents ont été étudiées par RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC) dans le DMSO-*d*₆.

Dans le cas de l'AMPc, le produit obtenu correspond au produit *O*-acylé. En effet, on note une corrélation HMBC entre le H_{2'} et le carbone C_{1''} de l'ester formé (Figure 233).

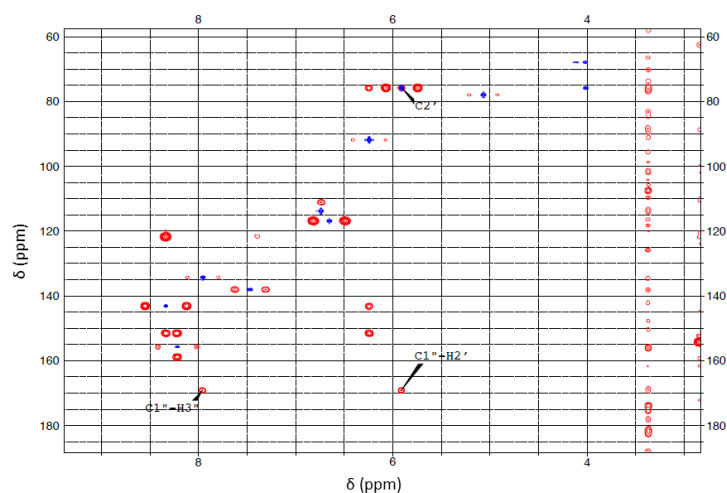


Figure 233 : Spectre HMBC (en rouge) et HSQC (en bleu) du composé Mant-AMPc obtenu.

Dans le cas du GMPC, le produit obtenu n'est pas pur. Le composé majoritaire du mélange est le composé *O*-acylé. En effet, on note une corrélation HSQC entre le H_{2'} et le carbone C_{1''} de l'ester formé (Figure 234). En revanche, la structure du produit minoritaire n'a pas pu être déterminée.

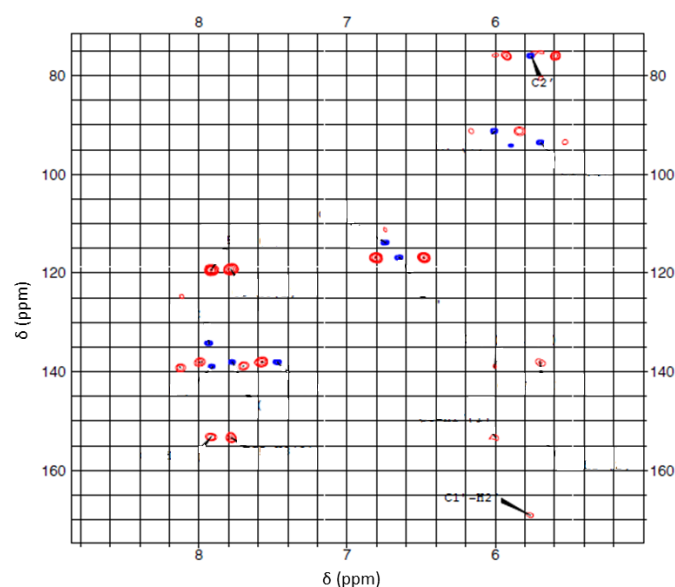


Figure 234 : Spectre HMBC (en rouge) et HSQC (en bleu) du composé Mant-GMPc obtenu.

VI.2.b.iii. Conclusion et perspectives

Dans le cas de l'AMPc et du GMPC, le produit résultant de l'*O*-acylation en position 2' a été mis en évidence. Etant donné les techniques à notre disposition au laboratoire, les bruts réactionnels obtenus ont été purifiés par chromatographie sur colonne. En milieu basique, nous avons mis en évidence par RMN l'existence d'un sous-produit, non identifié, dans le cas du GMPC. Les résultats obtenus ne nous permettent pas pour l'instant de réexaminer le mécanisme SHAPE.

Une réaction à plus grande échelle suivie d'une purification par HPLC est nécessaire mais n'a pas pu être effectuée lors de ces travaux. L'achat récent d'une HPLC préparative par notre laboratoire va permettre d'isoler plus précisément tous les composés obtenus.

VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ces travaux est de développer de nouvelles sondes chimiques ciblant le groupe 2'-hydroxyle de nucléotides non appariés et utilisables *in vivo* et *in cellulo*.

Différents agents électrophiles ont été synthétisés et testés sur deux ARN. Parmi ces composés, un seul est actif mais il est moins actif que le NMIA. 4 des composés inactifs deviennent actifs en présence de DMAP. Les adduits sont principalement formés au niveau des nucléotides non appariés et le profil de modification de l'ARN est similaire à celui induit par le NMIA. Par ailleurs, un composé faiblement actif en présence de 6% de DMAP devient aussi actif que le NMIA avec 50% de DMAP. Cette étude est la première à montrer que l'acylation du groupement 2'-hydroxyle des riboses de l'ARN peut être modulée par un catalyseur nucléophile.⁶⁶⁷ Ces résultats sont donc intéressants et ouvrent des perspectives dans la conception de nouvelles ribosondes et dans la modulation de leur réactivité par des catalyseurs.

En parallèle de ces études, nous avons étudié le mécanisme SHAPE. Les résultats préliminaires obtenus ne nous ont pas permis pour l'instant de mettre en évidence un autre produit que le produit *O*-acylé. Ces études visant à mieux comprendre le mécanisme SHAPE sont à poursuivre et devraient permettre de concevoir de nouveaux agents acylants plus efficaces et plus sélectifs.

Par ailleurs, il n'existe pas à ce jour d'agent chimique qui permette d'identifier les régions double brin d'ARN. La suite du projet consiste à concevoir et à tester des sondes ciblant les 2'-hydroxyles des riboses des nucléotides appariés. Le développement d'une telle sonde serait une avancée dans la détermination à haut débit des structures secondaires d'ARN.

Récemment, l'équipe de Weeks⁷¹² a mis au point une méthode chimique et calculatoire pour sonder et modéliser les structures tertiaires d'ARN. Cette méthode, appelée HMX (*2'-hydroxyl molecular interference*), exploite la capacité d'adduits encombrant en position 2' à détruire la structure tridimensionnelle de l'ARN. Elle permet d'identifier les nucléotides impliqués dans les interactions tertiaires qui sont responsables du repliement tridimensionnel de l'ARN.

⁷¹² P. J. Homan, A. Tandon, G. M. Rice, F. Ding, N. V. Dokholyan, K. M. Weeks, *Biochemistry* **2014**, *53*, 6825-6833.

CONCLUSION GENERALE

Les travaux de cette thèse se sont principalement concentrés sur la synthèse d'oligomères de nucléosides aminooxy acides et sur l'analyse structurale de monomères et de dimères de *N*-oxy PNA.

Le premier chapitre a insisté sur l'intérêt des oligonucléotides en tant qu'agents thérapeutiques. Les oligonucléotides peuvent cibler l'ADN (stratégie antigène), l'ARN (stratégie antisens, interférence ARN, saut d'exon, etc.), des protéines, etc. Malheureusement, les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des oligonucléotides naturels ne sont pas satisfaisantes. Pour améliorer leurs propriétés, des modifications chimiques sont envisageables.

Le deuxième chapitre a présenté les nucléosides, dinucléosides et oligonucléotides comportant une liaison oxygène-azote. Ainsi, des nucléosides isoxazolidines ou comportant des fonctions oximes, aminooxyles, acides hydroxamiques, etc. ont été développés. La liaison N-O peut également relier deux nucléosides pour former des dimères. Le lien méthylène(méthylimino) MMI a été beaucoup étudié. Par ailleurs, la liaison oxime est particulièrement intéressante dans la conjugaison d'oligonucléotides.

Le troisième chapitre a porté sur la préparation d'oligomères de nucléosides aminooxy acides à partir de la modification de l'uridine. Nous avons pu obtenir les monomères uridine aminooxy esters protégés par un groupement Boc, un groupement penténoyle ou un groupement phthaloyle. Malheureusement, d'importantes difficultés liées à la présence de la fonction aminooxyle nous ont empêchés d'aller plus loin dans la synthèse.

Dans le quatrième chapitre, la préparation de ces mêmes oligomères de nucléosides aminooxy acides à partir du D-(+)-glucose a été présentée. La synthèse de nucléosides phthalimidooxy esters avec des bases nucléiques thymine, uracile ou cytosine a été effectuée. Des difficultés de synthèse similaires à celles rencontrées dans le chapitre 3 nous ont empêchés de réussir les réactions de déprotection des monomères protégés et d'obtenir des dimères. Ce chapitre a également été l'occasion de préparer différents monomères ribofuranoides aminooxy esters protégés.

Le cinquième chapitre a présenté l'analyse structurale des monomères et dimères de *N*-oxy PNA. Ce travail a été effectué en collaboration avec Christie Aroulanda de l'ICMMO. Ainsi, nous avons montré que le monomère thymine adopte des conformations dans lesquelles la base nucléique vient se rapprocher de la fonction aminooxyle protégée. Pour ces monomères et dimères, la fonction aminooxyle protégée et la liaison *N*-oxyamide ne sont pas engagées dans des liaisons hydrogène. Par contre, d'après des calculs DFT, les liaisons *N*-oxyamides d'un dimère ou d'un trimère de ribofuranoides aminooxy acides sont susceptibles de former des liaisons hydrogène et même des cycles à 9 semblables à des N-O turns. Ces analyses structurales sont à poursuivre.

Le dernier chapitre a porté sur une méthode de détermination de la structure secondaire d'ARN : la méthode SHAPE. Cette méthode a été développée pour cibler spécifiquement les riboses des nucléotides flexibles indépendamment de leur nature purique ou pyrimidique. Afin d'améliorer la spécificité des réactifs acylants vis-à-vis des nucléotides non appariés d'un ARN, nous avons préparé et étudié des anhydrides, des fluorures d'acyle et des esters activés. Seul le fluorure de 2-bromobenzoyle a une faible réactivité. Par ailleurs, nos travaux sont les premiers à montrer que des catalyseurs nucléophiles comme la DMAP augmentent la réactivité des sondes. Ainsi, l'anhydride 2-

Conclusion générale

fluorobenzoïque en présence de DMAP à un taux catalytique de 6 mol% fait preuve d'une bonne réactivité et d'une bonne sélectivité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ¹ M. L. Stephenson, P. C. Zacmenik, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 285-288.
- ² K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, *Organic Chemistry. Structure and function*, 4th edition, publié initialement aux Etats-Unis par W. H. Freeman and Coll., New York et Basingstoke, **2003**, 1203 p.
- ³ M. Faria, C. Giovannangelo, *J. Gene Med.* **2001**, *3*, 299-310.
- ⁴ P. Yakovchuk, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 564-574.
- ⁵ E. T. Kool, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2001**, *30*, 1-22.
- ⁶ J. Sponer, J. E. Sponer, A. Mládek, P. Jurečka, P. Banáš, M. Otyepka, *Biopolymers* **2013**, *99*, 978-988.
- ⁷ J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- ⁸ J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 964-967.
- ⁹ F. H. C. Crick, J. D. Watson, *Proc. R. Soc. London, A* **1954**, *223*, 80-96.
- ¹⁰ R. H. Garrett, C. M. Grisham, *Biochimie*, De Boeck Supérieur, **2000**, 1292 p.
- ¹¹ Wikipédia, DNA. Disponible sur <http://en.wikipedia.org/wiki/DNA> (Page consultée le 03/04/2015).
- ¹² J. Marmur, P. Doty, *J. Mol. Biol.* **1962**, *5*, 109-118.
- ¹³ A. Rich, D. R. Davies, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 3548-3549.
- ¹⁴ P. Doty, H. Boedtker, J. R. Fresco, R. Haselkorn, M. Litt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1959**, *45*, 482-499.
- ¹⁵ J. H. Weil, *Biochimie générale*, Dunod, **2001**, 657 p.
- ¹⁶ G. Felsenfeld, D. R. Davies, A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2013-2014.
- ¹⁷ H. E. Moser, P. B. Dervan, *Science* **1987**, *238*, 645-650.
- ¹⁸ T. Le Doan, L. Perrouault, D. Praseuth, N. Habhoub, J. L. Decout, N. T. Thuong, J. Lhomme, C. Hélène, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 7749-7760.
- ¹⁹ C. Giovannangeli, « Cibler l'ADN : pour la compréhension du vivant » dans M. T. Dinh-Audouin, R. A. Jacquesy, D. Olivier, P. Rigny, *La chimie et la santé*, EDP Sciences **2010**, 41-48.
- ²⁰ J. S. Sun, C. Hélène, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 345-356.
- ²¹ M. D. Frank-Kamenetskii, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 65-95.
- ²² J. S. Sun, T. Garestier, C. Hélène, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1996**, *6*, 327-333.
- ²³ M. Duca, P. Vekhoff, K. Oussedik, L. Halby, P. B. Arimondo, *Nucleic Acid Res.* **2008**, *36*, 5123-5138.
- ²⁴ S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402-5415.
- ²⁵ M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1962**, *48*, 2013-2018.
- ²⁶ J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2909-2916.
- ²⁷ G. H. Nguyen, W. Tang, A. I. Robles, R. P. Beyer, L. T. Gray, J. A. Welsh, A. J. Schetter, K. Kumamoto, X. Wei Wanga, I. D. Hicksonb, N. Maizels, R. J. Monnat, C. C. Harris, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2014**, *111*, 9905-9910.
- ²⁸ M. Meselson, F. W. Stahl, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1958**, *44*, 671-682.
- ²⁹ R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, A. Weil, *Harper's illustrated biochemistry*, 28th ed., McGraw-Hill Medical, **2009**, 693 p.
- ³⁰ C. Lièvre, La réplication de la molécule d'ADN. Disponible sur http://www.ac-rennes.fr/pedagogie/svt/cartelec/cartelec_lyc/premiere_s/vegetal/adn/adn.htm (Page consultée le 07/05/2015).
- ³¹ S. Brenner, F. Jacob, M. Meselson, *Nature* **1961**, *190*, 576-581.
- ³² E. Jaspard, La synthèse des protéines. Disponible sur <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/1SyntheseProteines/1SyntheseProt.htm> (Page consultée le 01/05/2015).
- ³³ H. Ye, Q. Liu, J. Wei, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87864.
- ³⁴ J. Skolnick, M. Gao, A. Roy, B. Srinivasan, H. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1163-1170.
- ³⁵ A. Gaulton, L. J. Bellis, A. P. Bento, J. Chambers, M. Davies, A. Hersey, Y. Light, S. McGlinchey, D. Michalovich, B. Al-Lazikani, J. P. Overington, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 1100-1107.
- ³⁶ B. M. Paterson, B. E. Roberts, E. L. Kuff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1977**, *74*, 4370-4374.
- ³⁷ P. C. Zamecnik, M. L. Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1978**, *75*, 280-284.
- ³⁸ R. W. Tennant, J. G. Farrelly, J. Ihle, B. C. Pal, F. T. Kenney, A. Brown, *J. Virol.* **1973**, *12*, 1216-1225.
- ³⁹ P. S. Miller, L. T. Braiterman, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry* **1977**, *16*, 1988-1996.

- ⁴⁰ M. D. de Smet, C. Meenken, G. J. van den Horn, *Ocul. Immunol. Inflamm.* **1999**, *7*, 189-198.
- ⁴¹ R. Ardaillou, *Bull. Acad. Natle Méd.* **2001**, *185*, 1539-1560.
- ⁴² V. K. Sharma, P. Rungta, A. K. Prasad, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 16618-16631.
- ⁴³ M. Dutreix, F. Devun, *Biofutur* **2013**, 30-34.
- ⁴⁴ K. T. Shum, J. J. Rossi, *Adv. Genet.* **2015**, *89*, 153-177.
- ⁴⁵ P. M. D. Moreno, A. P. Pêgo, *FCHEM* **2014**, *2*, 1-7.
- ⁴⁶ C. Hélène, J. J. Toulmé, *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1049*, 99-125.
- ⁴⁷ A. Mukherjee, K. Vasquez, *Biochimie* **2011**, *93*, 1197-1208.
- ⁴⁸ D. Praseuth, A. L. Guieysse, C. Hélène, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 181-206.
- ⁴⁹ V. Dahmen, R. Kriehuber, *Int. J. Radiat. Biol.* **2012**, *88*, 972-979.
- ⁵⁰ R. Tonelli, A. McIntyre, C. Cameri, Z. S. Walters, K. Di Leo, J. Selfe, S. Purgato, E. Missiaglia, A. Tortori, J. Renshaw, A. Astolfi, K. R. Taylor, S. Serravalle, R. Bishop, C. Nanni, L. J. Valentijn, A. Faccini, I. Leuschner, S. Formica, J. S. Reis-Filho, V. Ambrosini, K. Thway, M. Franzoni, B. Summersgill, R. Marchelli, P. Hrelia, G. Cantelli-Forti, S. Fanti, R. Corradini, A. Pession, J. Shipley, *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 796-807.
- ⁵¹ S. Buchini, C. J. Leumann, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 717-726.
- ⁵² P. Jenjaroenpun, C. S. Chew, T. P. Yong, K. Choowongkamon, W. Thammasorn, V. A. Kuznetsov, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 110-116.
- ⁵³ I. Zalachoras, M. M. Evers, W. M. C. vanRoon-Mom, A. M. Aartsma-Rus, O. C. Meijer, *Front. Mol. Neurosci.* **2011**, *10*, 1-12.
- ⁵⁴ J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 1628-1644.
- ⁵⁵ N. Dias, C. A. Stein, *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 347-355.
- ⁵⁶ T. Yamamoto, M. Harada-Shiba, M. Nakatani, S. Wada, H. Yasuhara, K. Narukawa, K. Sasaki, M. A. Shibata, H. Torigoe, T. Yamaoka, T. Imanishi, S. Obika, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2012**, *1*, e22.
- ⁵⁷ K. B. Spurgers, C. M. Sharkey, K. L. Warfield, S. Bavari, *Antivir. Res.* **2008**, *78*, 26-36.
- ⁵⁸ P. Hnik, D. S. Boyer, L. R. Grillone, J. G. Clement, S. P. Hery, E. A. Green, *J. Diabetes Sci. Technol.* **2009**, *3*, 924-930.
- ⁵⁹ N. M. Dean, C. F. Bennett, *Oncogene* **2003**, *22*, 9087-9096.
- ⁶⁰ J. A. Saonere, *J. Med. Genet. Genomics* **2011**, *3*, 77-83.
- ⁶¹ V. K. Sharma, R. K. Sharma, S. K. Singh, *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 1454-1471.
- ⁶² Inserm, Thérapie génique. Disponible sur <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/therapie-genique> (Page consultée le 09/05/2015).
- ⁶³ M. Veltrop, A. Aartsma-Rus, *Exp. Cell Res.* **2014**, *325*, 50-55.
- ⁶⁴ P. Järver, L. O'Donovan, M. Gait, *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *24*, 37-47.
- ⁶⁵ A. Goyenvalle, A. Vulin, F. Fougousse, F. Leturcq, J. C. Kaplan, L. Garcia, O. Danos, *M. S. Méd. Sci.* **2004**, *20*, 1163-1165.
- ⁶⁶ S. D. Wilton, A. M. Fall, P. L. Harding, G. McClorey, C. Coleman, S. Fletcher, *Mol. Ther.* **2007**, *15*, 1288-1296.
- ⁶⁷ M. A. J. Wood, M. J. Gait, H. Yin, *Brain* **2010**, *133*, 957-972.
- ⁶⁸ J. Seo, M. D. Howell, N. N. Singh, R. N. Singh, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1832*, 2180-2190.
- ⁶⁹ Y. Hua, A. R. Krainer, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *867*, 307-323.
- ⁷⁰ I. Bentwich, A. Avniel, Y. Karov, R. Aharonov, S. Gilad, O. Barad, A. Barzilai, P. Einat, U. Einav, E. Meiri, E. Sharon, Y. Spector, Z. Bentwich, *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 766-770.
- ⁷¹ G. G. Jayaraj, S. Nahar, S. Maiti, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 820-831.
- ⁷² N. W. Gibson, *J. R. Coll. Physicians Edinb.* **2014**, *44*, 196-200.
- ⁷³ Z. Li, T. M. Rana, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 622-638.
- ⁷⁴ M. S. Ebert, J. R. Neilson, P. A. Sharp, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 721-726.
- ⁷⁵ E. van Rooij, S. Kauppinen, *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 851-864.
- ⁷⁶ V. Kumar, R. I. Mahato, *Pharm. Res.* **2015**, *32*, 341-361.
- ⁷⁷ R. Garzon, G. Marcucci, C. M. Croce, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 775-789.
- ⁷⁸ E. M. Small, R. J. A. Frost, E. N. Olson, *Circulation* **2010**, *121*, 1022-1033.

- ⁷⁹ E. van Rooij, A. L. Purcell, A. A. Levin, *Circ Res.* **2012**, *110*, 481-482.
- ⁸⁰ C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen, *Plant Cell*, **1990**, *2*, 279-289.
- ⁸¹ A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- ⁸² M. K. Montgomery, S. Xu, A. Fire, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 15502-15507.
- ⁸³ P. A. Sharp, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 139-141.
- ⁸⁴ A. Harel-Bellan, *M. S. Méd. Sci.* **2006**, *21*, 993-994.
- ⁸⁵ T. A. Rand, K. Ginalski, N. V. Grishin, X. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14385-14389.
- ⁸⁶ D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Koteliensky, D. W. Y. Sah, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 711-719.
- ⁸⁷ J. W. Gaynor, B. J. Campbell, R. Cosstick, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4169-4184.
- ⁸⁸ J. A. Doudna, T. R. Cech, *Nature* **2012**, *418*, 222-228.
- ⁸⁹ J. P. Perreault, *M. S. Méd. Sci.* **1989**, *5*, 703-704.
- ⁹⁰ S. W. Santoro, G. F. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 4262-4266.
- ⁹¹ J. Yi, C. Liu, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18629.
- ⁹² R. Robinson, *PLoS Biol.* **2004**, *2*, e28.
- ⁹³ M. Kashani-Sabet, *J. Invest. Dermatol.* **2002**, *7*, 76-78.
- ⁹⁴ A. Mescalchin, T. Restle, *Molecules* **2011**, *16*, 1271-1796.
- ⁹⁵ L. Beigelman, J. A. McSwiggen, K. G. Draper, C. Gonzalez, K. Jensen, A. M. Karpeisky, A. S. Modak, J. Matulic-Adamic, A. B. DiRenzo, P. Haeberli, D. Sweedler, D. Tracz, S. Grimm, F. E. Wincott, V. G. Thackray, N. Usman, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 25702-25708.
- ⁹⁶ Z. Xu, L. Yang, L. Sun, Y. Cao, *Chin. Sci. Bull.* **2012**, *57*, 3404-3408.
- ⁹⁷ M. Gebbing, T. Bergmann, E. Schulz, A. Ehrhardt, *World J. Hepatol* **2015**, *7*, 150-164.
- ⁹⁸ M. Asif-Ullah, M. Lévesque, G. Robichaud, J. P. Perreault, *Curr. Gene Ther.* **2007**, *7*, 205-216.
- ⁹⁹ D. Mueller, U. Stahl, V. Meyer, *J. Microbiol. Meth.* **2006**, *65*, 585-595.
- ¹⁰⁰ E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias, E. T. Cunningham, D. R. Guyer, A. P. Adamis, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 123-132.
- ¹⁰¹ C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505-510.
- ¹⁰² A. E. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818-822.
- ¹⁰³ T. Hermann, D. J. Patel, *Science* **2000**, *287*, 820-825.
- ¹⁰⁴ R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, *Science* **1994**, *263*, 1425-1429.
- ¹⁰⁵ C. Reinemann, B. Strehlitz, *Swiss Med. Wkly.* **2014**, *144*, w13908.
- ¹⁰⁶ R. H. Huang, D. H. Fremont, J. L. Diener, R. G. Schaub, J. E. Sadler, *Structure* **2009**, *17*, 1476-1484.
- ¹⁰⁷ M. Famulok, G. Mayer, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 1055-1058.
- ¹⁰⁸ J. J. Toulmé, S. Da Rocha, E. Dausse, L. Azéma, I. Lebars, S. Moreau, *Méd. Nucl.* **2007**, *31*, 478-484.
- ¹⁰⁹ Z. Szeitner, J. András, R. E. Gyurcsányi, T. Mészáros, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2014**, *101*, 58-65.
- ¹¹⁰ P. R. Bouchard, R. M. Hutabarat, K. M. Thompson, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 237-257.
- ¹¹¹ W. Li, K. Wang, M. Hao, X. Yang, M. Chen, X. Lan, *Thromb. Res.* **2014**, *134*, 769-773.
- ¹¹² E. M. McConnell, M. R. Holahan, M. C. DeRose, *Nucleic Acid Ther.* **2014**, *6*, 388-404.
- ¹¹³ H. Ma, J. Liu, M. M. Ali, M. A. I. Mahmood, L. Labanieh, M. Lu, S. M. Iqbal, Q. Zhang, W. Zhao, Y. Wan, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1240-1246.
- ¹¹⁴ R. Nezlin, *Immunol. Lett.* **2014**, *162*, 252-255.
- ¹¹⁵ J. J. Toulmé, R. Giégé, *M. S. Méd. Sci.* **1998**, *14*, 155-166.
- ¹¹⁶ Y. Fichou, C. Férec, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 563-570.
- ¹¹⁷ N. Nogoy, *Therapy* **2007**, *4*, 171-173.
- ¹¹⁸ R. Morishita, G. H. Gibbons, M. Horiuchi, K. E. Ellison, M. Nakajima, L. Zhang, Y. Kanedat, T. Ogihara, V. J. Dzau, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 5855-5859.
- ¹¹⁹ M. J. Mann, V. J. Dzau, *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 1071-1075.
- ¹²⁰ M. Z. Ahmad, S. Akhter, N. Mallik, M. Anwar, W. Tabassum, F. J. Ahmad, *Curr. Drug Discov. Technol.* **2013**, *10*, 71-84.
- ¹²¹ C. Deng, J. Zheng, W. Wan, S. Zhang, Z. Ding, G. Mao, S. Yang, *Mol. Med. Rep.* **2013**, *7*, 785-790.
- ¹²² H. F. Yuan, H. Huang, X. Y. Li, W. Guo, W. Xing, Z. Y. Sun, H. P. Liang, J. Yu, D. F. Chen, Z. G. Wang, J. Hao, X. Xu, *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, 1080-1087.

- ¹²³ M. Sen, S. M. Thomas, S. Kim, J. I. Yeh, R. L. Ferris, J. T. Johnson, U. Duvvuri, J. Lee, N. Sahu, S. Joyce, M. L. Freilino, H. Shi, Ch. Li, D. Ly, S. Rapireddy, J. P. Etter, P. K. Li, L. Wang, S. Chiosea, R. R. Seethala, W. E. Gooding, X. Chen, N. Kaminski, K. Pandit, D. E. Johnson, J. R. Grandis, *Cancer Discov.* **2012**, *8*, 694-705.
- ¹²⁴ V. G. Metelev, E. A. Kubareva, T. S. Oretskaya, *Biochemistry (Moscow)* **2013**, *78*, 867-878.
- ¹²⁵ D. De Stefano, *Discov. Med.* **2011**, *63*, 97-105.
- ¹²⁶ X. Xiao, Y. Gang, H. Wang, J. Wang, L. Zhao, L. Xu, Z. Liu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *457*, 221-226.
- ¹²⁷ M. Quanz, N. Berthault, C. Roulin, M. Roy, A. Herbette, C. Agrario, C. Alberti, V. Josserand, J. L. Coll, X. Sastre-Garau, J. M. Cosset, L. Larue, J. S. Sun, M. Dutreix, *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 1308-1316.
- ¹²⁸ M. Quanz, D. Chassoux, N. Berthault, C. Agrario, J. S. Sun, M. Dutreix, *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6298.
- ¹²⁹ N. Coquery, N. Pannetier, R. Farion, A. Herbette, L. Azurmendi, D. Clarencon, S. Bauge, V. Josserand, C. Rome, J. L. Coll, J. S. Sun, E. L. Barbier, M. Dutreix, C. C. Remy, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40567.
- ¹³⁰ A. Croset, F. P. Cordelières, N. Berthault, C. Buhler, J. S. Sun, M. Quanz, M. Dutreix, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 7344-7355.
- ¹³¹ C. Wilson, A. D. Keefe, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 607-614.
- ¹³² J. Scheiermann, D. M. Klinman, *Vaccine* **2014**, *32*, 6377-6389.
- ¹³³ C. Bode, G. Zhao, F. Steinhagen, T. Kinjo, D. M. Klinman, *Expert Rev. Vaccines* **2011**, *10*, 499-511.
- ¹³⁴ M. R. Weihrauch, H. Richly, M. S. von Bergwelt-Baildon, H. Jiro Becker, M. Schmidt, U. T. Hacker, A. Shimabukuro-Vornhagen, U. Holtick, B. Nokay, M. Schroff, B. Wittig, M. E. Scheulen, *Eur. J. Cancer* **2015**, *51*, 146-156.
- ¹³⁵ T. E. Witzig, G. A. Wiseman, M. J. Maurer, T. M. Habermann, I. N. M. Micallef, G. S. Nowakowski, S. M. Ansell, J. P. Colgan, D. J. Inwards, L. F. Porrata, B. K. Link, C. S. Zent, P. B. Johnston, T. D. Shanafelt, C. Allmer, Y. W. Asmann, M. Gupta, Z. K. Ballas, B. J. Smith, G. J. Weiner, *Am. J. Hematol.* **2013**, *88*, 588-593.
- ¹³⁶ J. Zhou, K. T. Shum, J. C. Burnett, J. J. Rossi, *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 85-107.
- ¹³⁷ R. Juliano, J. Bauman, H. Kang, X. Ming, *Mol. Pharm.* **2009**, *6*, 686-695.
- ¹³⁸ B. Yu, X. Zhao, L. J. Lee, R. J. Lee, *AAPS J.* **2009**, *11*, 195-203.
- ¹³⁹ C. A. Lipinski, *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* **2000**, *44*, 235-249.
- ¹⁴⁰ C. M. Greene, *MicroRNAs and Other Non-Coding RNAs in Inflammation (Progress in Inflammation Research)*, Springer, **2015**, 237 p.
- ¹⁴¹ C. Laxton, K. Brady, S. Moshos, P. Turnpenny, J. Rawal, D. C. Pryde, B. Sidders, R. Corbau, C. Pickford, E. J. Murray, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 3105-3114.
- ¹⁴² R. Shimizu, M. Kitade, T. Kobayashi, S. I. Hori, A. Watanabe, *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* **2015**, *42*, 67-77.
- ¹⁴³ R. S. Geary, E. Wancewicz, J. Matson, M. Pearce, A. Siwkowski, E. Swayze, F. Bennett, *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 284-291.
- ¹⁴⁴ R. Z. Yu, H. Zhang, R. S. Geary, M. Graham, L. Masarjian, K. Lemonidis, R. Crooke, N. M. Dean, A. A. Levin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 388-395.
- ¹⁴⁵ A. J. A. Cobb, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3260-3275.
- ¹⁴⁶ G. F. Deleavey, M. J. Damha, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 937-954.
- ¹⁴⁷ S. M. Freier, K. H. Altmann, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *25*, 4429-4443.
- ¹⁴⁸ R. S. Geary, B. F. Baker, S. T. Crooke, *Clin. Pharmacokinet.* **2015**, *54*, 133-146.
- ¹⁴⁹ S. T. Crooke, B. Lebleu, *Antisense Research and Applications*, CRC Press **1993**, 624 p.
- ¹⁵⁰ H. Nakamura, Y. Oda, S. Iway, H. Inoue, E. Ohtsuka, S. Kanaya, S. Kimura, C. Katsuda, K. Katayanagi, K. Morikawa, H. Miyashiro, M. Ikehara, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 11535-11539.
- ¹⁵¹ C. B. Reese, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8893-8920.
- ¹⁵² S. L. Beaucage, R. P. Iyer, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2223-2311.
- ¹⁵³ S. Roy, M. Caruthers, *Molecules* **2013**, *118*, 14268-14284.
- ¹⁵⁴ C. B. Reese, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 3851-3868.

- ¹⁵⁵ S. Kim, M. Matsumoto, K. Chiba, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 8615-8620.
- ¹⁵⁶ F. Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10*, 117-121.
- ¹⁵⁷ J. M. Campbell, T. A. Bacon, E. J. Wickstrom, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1990**, *20*, 259-267.
- ¹⁵⁸ F. Eckstein, *Biochimie* **2001**, *84*, 841-848.
- ¹⁵⁹ X. H. Liang, H. Sun, W. Shen, S. T. Crooke, *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 2927-2945.
- ¹⁶⁰ S. M. A. Rahman, T. Baba, T. Kodama, M. A. Islam, S. Obika, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 4098-4102.
- ¹⁶¹ T. Iannitti, J. C. Morales-Medina, B. Palmieri, *Curr. Drug Targets* **2014**, *15*, 1-11.
- ¹⁶² M. Matsukura, K. Shinozukat, G. Zon, H. Mitsuya, M. Reitz, J. S. Cohen, S. Broder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, *84*, 7706-7710.
- ¹⁶³ P. S. Miller, J. Yano, E. Yano, C. Carroll, K. Jayaraman, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry* **1979**, *8*, 5134-5143.
- ¹⁶⁴ P. S. Miller, K. B. McParland, K. Jayaraman, P. O. P. Ts'o, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1874-1880.
- ¹⁶⁵ P. S. Miller, R. A. Cassidy, T. Hamma, N. S. Kondo, *Pharmacol. Ther.* **2000**, *85*, 159-163.
- ¹⁶⁶ Y. Shoji, S. Akhtar, A. Periasamy, B. Herman, R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 5543-5550.
- ¹⁶⁷ M. A. Reynolds, R. I. Hogrefe, J. A. Jaeger, D. A. Schwartz, T. A. Riley, W. B. Marvin, W. J. Daily, M. M. Vaghefi, T. A. Beck, S. K. Knowles, R. E. Klem, L. J. Arnold, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4584-4591.
- ¹⁶⁸ Z. J. Lesnikowski, *Bioorg. Chem.* **1994**, *22*, 128-139.
- ¹⁶⁹ M. Gallo, J. M. Montserrat, A. M. Iribarren, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2003**, *36*, 143-151.
- ¹⁷⁰ S. Verma, F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 99-134.
- ¹⁷¹ V. Tereshko, S. Portmann, E. C. Tay, P. Martin, F. Natt, K. H. Altman, M. Egli, *Biochemistry* **1998**, *37*, 10626-10634.
- ¹⁷² M. Majlessi, N. C. Nelson, M. M. Becker, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2224-2229.
- ¹⁷³ B. S. Sproat, A. I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, U. Ryder, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3373-3386.
- ¹⁷⁴ K. A. Whitehead, J. E. Dahlman, R. S. Langer, D. G. Anderson, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* **2011**, *2*, 77-96.
- ¹⁷⁵ T. Nishizaki, S. Iwai, E. Ohtsuka, H. Nakamura, *Biochemistry* **1997**, *36*, 2577-2585.
- ¹⁷⁶ P. E. Burmeister, S. D. Lewis, R. F. Silva, J. R. Preiss, L. R. Horwitz, P. S. Pendergrast, T. G. McCauley, J. C. Kurz, D. M. Epstein, C. Wilson, A. D. Keefe, *Chem. Biol.* **2012**, *12*, 25-33.
- ¹⁷⁷ H. Sierakowska, M. J. Sambade, S. Agrawal, R. Kole, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 12840-12844.
- ¹⁷⁸ M. Teplova, G. Minasov, V. Tereshko, G. B. Inamati, P. D. Cook, M. Manoharan, M. Egli, *Nature Struct. Biol.* **1999**, *6*, 535-539.
- ¹⁷⁹ R. Z. Yu, T. W. Kim, A. Hong, T. A. Watanabe, H. J. Gaus, R. S. Geary, *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 460-468.
- ¹⁸⁰ B. F. Baker, S. S. Lot, T. P. Condon, S. Cheng-Flournoy, E. A. Lesnik, H. M. Sasmor, C. F. Bennett, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 11994-12000.
- ¹⁸¹ R. S. Geary, T. A. Watanabe, L. Truong, S. Freier, E. A. Lesnik, N. B. Sioufi, H. Sasmor, M. Manoharan, A. A. Levin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *296*, 890-897.
- ¹⁸² S. Henry, K. Stecker, D. Brooks, D. Monteih, B. Conklin, C. F. Bennett, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *292*, 468-479.
- ¹⁸³ S. K. Singh, J. Wengel, *Chem. Commun.* **1998**, 1247-1248.
- ¹⁸⁴ K. Fluiter, A. L. M. A. ten Asbroek, M. B. de Wissel, M. E. Jakobs, M. Wissenbach, H. Olsson, O. Olsen, H. Oerum, F. Baas, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 953-962.
- ¹⁸⁵ E. E. Swayze, A. M. Siwkowski, E. V. Wancewicz, M. T. Migawa, T. K. Wyrzykiewicz, G. Hung, B. P. Monia, C. F. Bennett, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 687-700.
- ¹⁸⁶ D. A. Braasch, Y. Liu, D. R. Corey, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 5160-5167.
- ¹⁸⁷ K. E. Lundin, T. Højland, B. R. Hansen, R. Persson, J. B. Bramsen, J. Kjems, T. Koch, J. Wengel, C. I. E. Smith, *Adv. Genet.* **2013**, *82*, 47-107.
- ¹⁸⁸ J. Barciszewski, M. Medgaard, T. Koch, J. Kurreck, V. A. Erdmann, *Methods Mol Biol.* **2009**, *535*, 165-186.

- ¹⁸⁹ M. W. Johannsen, L. Crispino, M. C. Wamberg, N. Kalra, J. Wangel, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 243-252.
- ¹⁹⁰ C. Zhou, J. Chattopadhyaya, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3808-3832.
- ¹⁹¹ N. K. Andersen, B. A. Anderson, J. Wengel, P. J. Hrdlicka, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12690-12702.
- ¹⁹² J. Summerton, D. Weller, *Antisens Nucleic Acid Drug Dev.* **1997**, *7*, 187-195.
- ¹⁹³ J. Summerton, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1489*, 141-158.
- ¹⁹⁴ L. Du, R. A. Gatti, *J. Immunol. Methods* **2011**, *365*, 1-7.
- ¹⁹⁵ A. Ray, B. Nordén, *FASEB J.* **2000**, *14*, 1041-1060.
- ¹⁹⁶ P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- ¹⁹⁷ A. Kiviniemi, M. Murtola, P. Ingman, P. Virta, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 5153-5159.
- ¹⁹⁸ V. V. Demidov, V. N. Potaman, M. D. Frank-Kamanetskii, M. Egholm, O. Buchardt, S. H. Sönnichsen, P. E. Nielsen, *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1310-1313.
- ¹⁹⁹ L. Good, P. E. Nielsen, *Current Issues Molec. Biol.* **1999**, *1*, 111-116.
- ²⁰⁰ A. Nikraves, R. Dryselius, O. R. Faridani, S. Goh, M. Sadeghizadeh, M. Behmanesh, A. Ganyu, E. J. Klock, R. Zain, L. Good, *Mol. Ther.* **2008**, *15*, 1537-1542.
- ²⁰¹ Y. Liu, D. A. Braasch, C. J. Nulf, D. R. Corey, *Biochemistry* **2004**, *43*, 1921-1927.
- ²⁰² H. Yin, Q. Lu, M. Wood, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 38-45.
- ²⁰³ M. M. Fabani, M. J. Gait, *RNA* **2008**, *14*, 336-346.
- ²⁰⁴ G. D. Ivanova, M. M. Fabani, A. A. Arzumanov, R. Abes, H. Yin, B. Lebleu, M. Wood, M. J. Gait, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 31-32.
- ²⁰⁵ B. A. Armitage, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 210-215.
- ²⁰⁶ N. Potenza, L. Moggio, G. Milano, V. Salvatore, B. Di Blasio, A. Russo, A. Messere, *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 299-315.
- ²⁰⁷ V. N. Pandey, A. Upadhyay, B. Chaubey, *Expert Opin. Biol. Ther.* **2009**, *9*, 975-989.
- ²⁰⁸ M. Robaczewska, R. Narayan, B. Seigner, O. Schorr, A. Thermet, A. J. Podhajka, C. Treppe, F. Zoulim, P. E. Nielsen, L. Cova, *J. Hepatol.* **2005**, *42*, 180-187.
- ²⁰⁹ E. Rozners, *J. Nucleic Acids* **2012**, ID 518162.
- ²¹⁰ A. Naberjee, V. A. Kumar, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4092-4101.
- ²¹¹ N. Tilani, S. De Costa, J. M. Heemstra, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2360-2363.
- ²¹² H. Kang, M. H. Fisher, D. Xu, Y. J. Miyamoto, A. Marchand, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, R. L. Juliano, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 4411-4419.
- ²¹³ K. Fluiter, M. Frieden, J. Vreijling, C. Rosenbohm, M. B. De Wissel, S. M. Christensen, T. Koch, H. Ørum, F. Baas, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1104-1109.
- ²¹⁴ R. S. Geary, D. Norris, R. Yu, F. Bennett, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *In press*.
- ²¹⁵ Integrated DNA Technologies, *Designing Antisense Oligonucleotides* **2005** and **2011**.
- ²¹⁶ V. Regnier, N. De Morre, A. Jadoul, V. Pr at, *Int. J. Pharm.* **1999**, *184*, 147-156.
- ²¹⁷ S. Chabot, J. Teissie, M. Golzio, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *81*, 161-168.
- ²¹⁸ M. Joergensen, B. Agerholm-Larsen, P. E. Nielsen, J. Gehl, *Oligonucleotides* **2011**, *21*, 29-37.
- ²¹⁹ Y. Zhang, L. C. Yu, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2008**, *19*, 506-510.
- ²²⁰ K. J. Scanlon, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2004**, *5*, 1-6.
- ²²¹ D. B. Kohn, M. Sadelain, J. C. Glorioso, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 477-487.
- ²²² L. B. Couto, K. A. High, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2010**, *10*, 534-542.
- ²²³ M. Elsbahy, A. Nazarali, M. Foldvary, *Adv. Drug Delivery* **2011**, *8*, 235-244.
- ²²⁴ R. L. Juliano, X. Ming, O. Nakagawa, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1067-1076.
- ²²⁵ J. Winkler, *Ther. Deliv.* **2013**, *4*, 791-809.
- ²²⁶ S. Raddatz, J. Mueller-Ibeler, J. Kluge, L. W a , G. Burdinski, J. R. Havens, T. J. Onofrey, D. Wang, M. Schweitzer, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4793-4802.
- ²²⁷ A. Filipovska, M. R. Eccles, R. A. J. Smith, M. P. Murphy, *FEBS Lett.* **2004**, *556*, 180-186.
- ²²⁸ R. A. Petros, J. M. DeSimone, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 615-627.
- ²²⁹ Y. Shu, F. Pi, A. Sharma, M. Rajabi, F. Haque, D. Shu, M. Leggas, B. M. Evers, P. Guo, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *66*, 74-89.

- ²³⁰ M. Hasanzadeh Kafshgari, B. Delalat, W. Y. Tong, F. J. Harding, M. Kaasalainen, J. Salonen, N. H. Voelcker, *Nano Res.* **2015**, *In press*.
- ²³¹ E. Y. Kim, R. Schulz, P. Swantek, K. Kunstman, M. H. Malim, S. M. Wolinsky, *Gene Ther.* **2011**, *18*, 1-7.
- ²³² T. Shiraishi, R. Hamzavi, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4424-4432.
- ²³³ L. Piao, M. Zhang, J. Datta, X. Xie, T. Su, H. Li, T. N. Teknos, Q. Pan, *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 1261-1269.
- ²³⁴ J. Kurreck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1378-1398.
- ²³⁵ A. R. Thierry, A. Dritschilo, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5691-5698.
- ²³⁶ M. Kashani-Sabet, Y. Liu, S. Fong, P. Y. Desprez, S. Liu, G. Tu, M. Nosrati, C. Handumrongkul, D. Liggitt, A. D. Thor, R. J. Debs, *Proc. Natl. Acad. U. S. A.* **2002**, *99*, 3878-3883.
- ²³⁷ A. Santel, M. Aleku, O. Keil, J. Endruschat, V. Esche, G. Fisch, S. Dames, K. Löffler, M. Fechtner, W. Arnold, K. Giese, A. Klippel, J. Kaufmann, *Gene Ther.* **2006**, *13*, 1222-1234.
- ²³⁸ T. Lehto, K. Ezzat, Ü. Langel, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2011**, *104*, 397-426.
- ²³⁹ S. Grijalvo, A. Aviño, R. Aritja, *Expt. Opin. Ther. Patents* **2014**, *24*, 801-819.
- ²⁴⁰ S. H. Lee, B. Castagner, J. C. Leroux, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2013**, *85*, 5-11.
- ²⁴¹ F. Marlin, P. Simon, T. Saison-Behmoaras, C. Giovannegli, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1493-1500.
- ²⁴² M. E. Martin, K. G. Rice, *AAPS J.* **2007**, *9*, Article 3.
- ²⁴³ F. Heitz, M. C. Morris, G. Divita, *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 195-206.
- ²⁴⁴ H. M. Moulton, J. D. Moulton, *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 870-875.
- ²⁴⁵ C. Cordier, F. Boutimah, M. Bourdeloux, F. Dupuy, E. Met, P. Alberti, F. Loll, G. Chassaing, F. Burlina, T. E. Saison-Bahmoaras, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104999.
- ²⁴⁶ H. M. Moulton, J. D. Moulton, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 2296-2303.
- ²⁴⁷ S. I. Wada, T. Urase, Y. Hasegawa, K. Ban, A. Sudani, Y. Kawai, J. Hayashi, H. Urata, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6776-6780.
- ²⁴⁸ O. Nakagawa, X. Ming, L. Huang, R. L. Juliano, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8848-8849.
- ²⁴⁹ T. P. Prakash, M. J. Graham, J. Yu, R. Carty, A. Low, A. Chappell, K. Schmidt, C. Zhao, M. Aghajan, H. F. Murray, S. Riney, S. L. Booten, S. F. Murray, H. Gaus, J. Crosby, W. F. Lima, S. Guo, B. P. Monia, E. E. Swayze, P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 8796-8807.
- ²⁵⁰ J. A. Reyes-Darias, F. J. Sánchez-Luque, J. C. Morales, S. Pérez-Rentero, R. Eritja, A. Berzal-Herranz, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 584-591.
- ²⁵¹ M. K. Bijsterbosch, E. T. Rump, R. L. A. De Vruh, R. Dorland, R. van Veghel, K. L. Tivel, E. A. L. Biessen, T. J. C. van Berkel, M. Manoharan, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 2717-2725.
- ²⁵² T. Nishinia, J. Numata, K. Nishina, K. Yoshida-Tanaka, K. Nitta, W. Piao, R. Iwata, S. Ito, H. Kuwahara, T. Wada, H. Mizusawa, T. Yokota, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2015**, *4*, e220.
- ²⁵³ M. Raouane, D. Desmaële, G. Urbinati, L. Massaas-Massade, P. Couvreur, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1091-1104.
- ²⁵⁴ D. M. S. Hossain, P. Duttagupta, M. Kortylewski, *Ther. Deliv.* **2015**, *6*, 1-4.
- ²⁵⁵ H. Sun, X. Zhu, P. Y. Lu, R. Rosato, W. Tan, Y. Zu, *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2014**, *3*, e182.
- ²⁵⁶ N. Normand-Sdioui, S. Akhtar, *Int. J. Pharm.* **1998**, *163*, 63-71.
- ²⁵⁷ A. Yuan, B. Laing, Y. Hu, X. Ming, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6678-6680.
- ²⁵⁸ K. T. Gagnon, J. K. Watts, H. M. Pendergraff, C. Montailier, D. Thai, P. Potier, D. R. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8404-8407.
- ²⁵⁹ S. D. Patil, D. G. Rhodes, D. J. Burgess, *AAPS J.* **2005**, *7*, Article 9.
- ²⁶⁰ G. F. Lemkine, B. A. Demeneix, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2001**, *3*, 178-182.
- ²⁶¹ C. P. Lollo, M. G. Banaszczyk, P. M. Mullen, C. C. Coffin, D. Wu, A. T. Carlo, D. L. Bassett, E. K. Gouveia, D. J. Carlo, *Methods Mol. Med.* **2002**, *69*, 1-13.
- ²⁶² G. Borchard, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *52*, 145-150.
- ²⁶³ R. J. Marano, I. Toth, N. Wimmer, M. Brankov, P. E. Rakoczy, *Gene Ther.* **2005**, *12*, 1544-1550.
- ²⁶⁴ T. Merdan, J. Kopecek, T. Kissel, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 715-758.
- ²⁶⁵ J. V. Aukunuru, S. P. Ayalasomayajula, U. B. Kompella, *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*, 1199-1206.

- ²⁶⁶ P. Couvreur, « Les nanomédicaments : une approche intelligente pour le traitement des maladies sévères » dans M. T. Dinh-Audouin, R. A. Jacquesy, D. Olivier, P. Rigny, *La chimie et la santé*, EDP Sciences **2010**, 105-125.
- ²⁶⁷ J. T. Wilson, S. Keller, M. J. Manganiello, C. Cheng, C. C. Lee, C. Opara, A. Convertine, P. S. Stayton, *ACS Nano* **2013**, 7, 3912-3925.
- ²⁶⁸ Y. Ikeda, Y. Nagasaki, *Inc. J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, 131, 40293-40295
- ²⁶⁹ N. Shokrzadeh, A. M. Winkler, M. Dirin, J. Winkler, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 5758-5761.
- ²⁷⁰ R. Romeo, C. Carnovale, S. V. Giofrè, G. Monciino, M. A. Chiacchio, C. Sanfilippo, B. Macchi, *Molecules* **2014**, 19, 14406-14416.
- ²⁷¹ I. I. Fedorov, E. M. Kazmina, G. V. Gurskaya, M. V. Jasko, V. E. Zavodnic, J. Balzarini, E. De Clercq, A. Faraj, J. P. Sommadossi, J. L. Imbach, G. Gosselin, *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 486-494.
- ²⁷² K. M. Borland, S. F. AbdulSalam, M. J. Solivio, M. P. Burke, P. R. Wolfkiel, S. M. Lawson, C. A. Stockman, J. M. Andersen, S. Smith, J. N. Tolstolutskaia, P. N. Gurjar, A. P. Bercz, E. J. Merino, V. A. Litosh, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 1869-1881.
- ²⁷³ B. Gadakh, G. Vondenhoff, E. Lescrinier, J. Rozenski, M. Froeyen, A. Van Aerschot, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 2875-2886.
- ²⁷⁴ A. Danhel, V. Raindlova, L. Havrana, H. Pivonkova, M. Hocek, M. Fojta, *Electrochim. Acta* **2014**, 126, 122-131.
- ²⁷⁵ A. Samanta, M. Thunemann, R. Feil, T. Stafforst, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 7120-7123.
- ²⁷⁶ K. A. Kumar, P. Jayaropa, *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.* **2013**, 3, 294-304.
- ²⁷⁷ J. M. J. Tronchet, M. Iznaden, F. Barbalat-Rey, H. Dhimane, A. Ricca, J. Balzarini, E. De Clercq, *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, 27, 555-560.
- ²⁷⁸ Y. Xiang, J. Chen, R. F. Schinazi, K. Zhao, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 7193-7196.
- ²⁷⁹ P. Merino, S. Franco, F. L. Merchan, T. Tejero, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6411-6414.
- ²⁸⁰ A. Leggio, A. Liguori, A. Procopio, C. Siciliano, G. Sindona, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1277-1280.
- ²⁸¹ A. Leggio, A. Liguori, A. Procopio, C. Siciliano, G. Sindona, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, 16, 1515-1518.
- ²⁸² E. Colacino, A. Converso, A. Liguori, A. Napoli, C. Siciliano, G. Sindona, *Tetrahedron* **2001**, 57, 8551-8557.
- ²⁸³ R. Dalpozzo, A. De Nino, L. Maiuolo, A. Procopio, G. De Munno, G. Sindona, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4035-4038.
- ²⁸⁴ U. Chiacchio, A. Rescifina, A. Corsaro, V. Pistarà, G. Romeo, R. Romeo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 2045-2048.
- ²⁸⁵ U. Chiacchio, A. Corsaro, D. Iannazzo, A. Piperno, V. Pistarà, A. Rescifina, R. Romeo, V. Valveri, A. Mastino, G. Romeo, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 3696-3702.
- ²⁸⁶ U. Chiacchio, F. Genovese, D. Iannazzo, A. Piperno, P. Quadrelli, C. Antonino, R. Romeo, V. Valveri, A. Mastino, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 3903-3909.
- ²⁸⁷ U. Chiacchio, E. Balestrieri, B. Macchi, D. Iannazzo, A. Piperno, A. Rescifina, R. Romeo, M. Saglimbeni, M. T. Sciortino, V. Valveri, A. Mastino, G. Romeo, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 1389-1394.
- ²⁸⁸ U. Chiacchio, D. Iannazzo, A. Piperno, R. Romeo, G. Romeo, A. Rescifina, M. Saglimbeni, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 955-959.
- ²⁸⁹ U. Chiacchio, A. Rescifina, D. Iannazzo, A. Piperno, R. Romeo, L. Borrello, M. T. Sciortino, E. Balestrieri, B. Macchi, A. Mastino, G. Romeo, *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 3747-3750.
- ²⁹⁰ A. Piperno, S. V. Giofrè, D. Iannazzo, R. Romeo, G. Romeo, U. Chiacchio, A. Rescifina, D. G. Piotrowska, *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 2798-2805.
- ²⁹¹ R. Romeo, C. Carnovale, S. V. Giofrè, G. Romeo, B. Macchi, C. Frezza, F. Marino-Merlo, V. Pistarà, U. Chiacchio, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 3652-3657.
- ²⁹² O. Bortolini, A. De Nino, T. Eliseo, R. Gavioli, L. Maiuolo, B. Russo, F. Sforza, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 6970-6976.
- ²⁹³ M. G. Saita, U. Chiacchio, D. Iannazzo, P. Merino, A. Piperno, T. Previtiera, A. Rescifina, G. Romeo, R. Romeo, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2003**, 22, 739-742.

- ²⁹⁴ U. Chiacchio, A. Corsaro, D. Iannazzo, A. Piperno, A. Rescifina, R. Romeo, G. Romeo, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1777-1780.
- ²⁹⁵ D. Iannazzo, A. Piperno, V. Pistarà, A. Rescifina, R. Romeo, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 581-587.
- ²⁹⁶ U. Chiacchio, L. Borrello, D. Iannazzo, P. Merino, A. Piperno, A. Rescifina, B. Richichi, G. Romeo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2419-2425.
- ²⁹⁷ P. Camps, T. Gómez, D. Muñoz-Torrero, J. Rull, L. Sánchez, F. Boschi, M. Comes-Franchini, A. Ricci, T. Calvet, M. Font-Bardia, E. De Clercq, L. Naesens, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6657-6665.
- ²⁹⁸ A. Piperno, A. Rescifina, A. Corsaro, M. A. Chiacchio, A. Procopio, R. Romeo, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 1517-1521.
- ²⁹⁹ P. Merino, T. Tejero, F. J. Unzurrunzaga, S. Franco, U. Chiacchio, M. G. Saita, D. Iannazzo, A. Piperno, G. Romeo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3865-3876.
- ³⁰⁰ R. Romeo, S. V. Giofrè, A. Garozzo, B. Bisignano, A. Corsaro, M. A. Chiacchio, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 5688-5693.
- ³⁰¹ H. Ohrui, S. Kohgo, K. Kitano, S. Sakata, E. Kodama, K. Yoshimura, M. Matsuoka, S. Shigeta, H. Mitsuya, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4516-4525.
- ³⁰² F. Seela, V. R. Sirivolu, P. Chittepu, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 211-224.
- ³⁰³ Y. S. Lee, S. M. Park, H. M. Kim, S. K. Park, K. Lee, C. W. Lee, B. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4688-4691.
- ³⁰⁴ R. Romeo, S. V. Giofrè, D. Iaria, M. T. Sciortino, S. Ronsisvalle, M. A. Chiacchio, A. Scala, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 5690-5695.
- ³⁰⁵ D. G. Piotrowska, J. Balzarini, I. E. Glowacka, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *47*, 501-509.
- ³⁰⁶ R. Romeo, S. V. Giofrè, C. Carnovale, A. Campisi, R. Parenti, L. Bandini, M. A. Chiacchio, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7929-7937.
- ³⁰⁷ S. V. Giofrè, R. Romeo, C. Carnovale, R. Mancuso, S. Cirmi, M. Navarra, A. Garozzo, M. A. Chiacchio, *Molecules* **2015**, *20*, 5260-5275.
- ³⁰⁸ R. Romeo, S. V. Giofrè, C. Carnovale, M. A. Chiacchio, A. Campisi, R. Mancuso, S. Cirmi, M. Navarra, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 5442-5447.
- ³⁰⁹ R. Romeo, C. Carnovale, S. V. Giofrè, M. A. Chiacchio, A. Garozzo, E. Amata, G. Romeo, U. Chiacchio, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 328-334.
- ³¹⁰ K. Kokosza, J. Balzarini, D. G. Piotrowska, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1097-1108.
- ³¹¹ M. Lysakowska, J. Balzarini, D. G. Piotrowska, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2014**, *347*, 341-353.
- ³¹² U. Chiacchio, F. Genovese, D. Iannazzo, V. Librando, P. Merino, A. Rescifina, R. Romeo, A. Propopio, G. Romeo, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 441-448.
- ³¹³ Y. S. Lee, B. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1395-1397.
- ³¹⁴ Y. Xiang, J. Chen, R. F. Schinazi, K. Zhao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1051-1054.
- ³¹⁵ P. Merino, T. Tejero, J. Mate's, U. Chiacchio, A. Corsaro, G. Romeo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1517-1520.
- ³¹⁶ R. Romeo, S. V. Giofrè, B. Macchi, E. Balestrieri, A. Mastino, P. Merino, C. Carnovale, G. Romeo, U. Chiacchio, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 565-569.
- ³¹⁷ J. Gotkowska, J. Balzarini, D. G. Piotrowska, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 7097-7100.
- ³¹⁸ U. Chiacchio, A. Corsaro, J. Mates, P. Merino, A. Piperno, A. Rescifina, G. Romeo, R. Romeo, T. Tejero, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4733-4738.
- ³¹⁹ Y. Xiang, Y. Gong, K. Zhao, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4877-4880.
- ³²⁰ Y. Xiang, H. J. Gi, D. Niu, R. F. Schinazi, K. Zhao, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7430-7434.
- ³²¹ U. Chiacchio, G. Gumina, A. Rescifina, R. Romeo, N. Uccella, F. Casuscelli, A. Piperno, G. Romeo, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8889-8898.
- ³²² U. Chiacchio, A. Corsaro, D. Iannazzo, A. Piperno, A. Procopio, A. Rescifina, G. Romeo, R. Romeo, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 1893-1898.
- ³²³ U. Chiacchio, A. Corsaro, D. Iannazzo, A. Piperno, V. Pistarà, A. Rescifina, R. Romeo, G. Sindona, G. Romeo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2717-2723.
- ³²⁴ E. Hýrošová, L. Fišera, M. Medvecký, H. U. Reissig, A. Al-Harrasi, M. Koóš, *ARKIVOC* **2009**, *9*, 122-142.

- ³²⁵ P. Quadrelli, M. Mella, S. Carosso, B. Bovio, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 516-526.
- ³²⁶ P. Quadrelli, M. Mella, S. Carosso, B. Bovio, *Synthesis* **2013**, *45*, 1414-1420.
- ³²⁷ P. Merino, S. Franco, N. Garces, F. L. Merchan, T. Tejero, *Chem. Commun.* **1998**, 493-494.
- ³²⁸ P. Liu, A. Sharon, C. K. Chu, *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 743-766.
- ³²⁹ A. Khalil, C. Mathé, C. Périgaud, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3172-3179.
- ³³⁰ K. A. Winans, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 113-129.
- ³³¹ J. B. Shi, S. Xu, Y. P. Wang, J. J. Li, Q. Z. Yao, *Chinese Chem. Lett.* **2011**, *22*, 899-902.
- ³³² J. N. Kim, E. K. Ryu, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1088-1092.
- ³³³ D. Bärwolff, P. Langen, *Nucleic Acids Res.* **1978**, *1*, s227-s230.
- ³³⁴ J. M. J. Tronchet, R. Benhamza, N. Dolatshahi, M. Geoffroy, H. Türler, *Nucleosides Nucleotides* **1988**, *7*, 249-269.
- ³³⁵ J. M. J. Tronchet, K. Mekhael, J. Graf-Poncet, R. Benhamza, *Helv. Chim. Acta* **1985**, *68*, 1893-1896.
- ³³⁶ J. M. J. Tronchet, M. Zsély, K. Capek, F. de Villedon de Naide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1723-1728.
- ³³⁷ J. M. J. Tronchet, M. Zsely, K. Capek, I. Komaromi, M. Geoffroy, E. De Clerq, *Nucleosides Nucleotides* **1994**, *13*, 1871-1889.
- ³³⁸ J. M. J. Tronchet, R. Benhamza, G. Bernardinelli, M. Geoffroy, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 531-534.
- ³³⁹ H. Li, M. J. Miller, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9289-9293.
- ³⁴⁰ A. Ogawa, S. Shuto, O. Inanami, M. Kuwabara, M. Tanaka, T. Sasaki, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1913-1918.
- ³⁴¹ A. Ogawa, M. Tanaka, T. Sasaki, A. Matsuda, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5094-5107.
- ³⁴² M. J. Mulvihill, M. J. Miller, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 6605-6626.
- ³⁴³ T. S. Zatsepin, Y. M. Ivanova, T. S. Oretskaya, *Chem. Biodivers.* **2004**, *1*, 1537-1545.
- ³⁴⁴ J. M. J. Tronchet, G. Zosimo-Landolfo, M. Balkadjan, A. Ricca, M. Zsély, F. Barbalat-Rey, D. Cabrini, P. Lichtle, M. Geoffroy, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4129-4132.
- ³⁴⁵ P. Brear, G. R. Freeman, M. C. Shankey, M. Trmčić, D. R. W. Hodgson, *Chem. Commun.* **2009**, 4980-4981.
- ³⁴⁶ D. P. Sebersta, S. S. O'Rourke, R. L. Martinez, W. A. Pieken, D. P. C. McGee, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 14385-14402.
- ³⁴⁷ S. Pan, J. Wang, K. Zhao, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4-5.
- ³⁴⁸ S. Wang, J. Chang, S. Pan, K. Zhao, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 327-339.
- ³⁴⁹ T. Kuroda, K. Hisamura, I. Matsukuma, H. Nishikawa, M. Morimoto, T. Ashizawa, N. Nakamizo, *J. Heterocyclic Chem.* **1992**, *29*, 1133-1142.
- ³⁵⁰ T. P. Prakash, A. M. Kawasaki, A. S. Fraser, G. Vasquez, M. Manoharan, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 357-369.
- ³⁵¹ T. P. Prakash, A. M. Kawasaki, J. F. Johnston, M. J. Graham, T. P. Condon, M. Manoharan, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 829-832.
- ³⁵² T. P. Prakash, J. F. Johnston, M. J. Graham, T. P. Condon, M. Manoharan, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 828-833.
- ³⁵³ T. P. Prakash, M. Manoharan, A. M. Kawasaki, E. A. Lesnik, S. R. Owens, G. Vasquez, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3995-3998.
- ³⁵⁴ D. Hutter, M. J. Kim, N. Karalkar, N. A. Leal, F. Chen, E. Guggenheim, V. Visalakshi, J. Olejnik, S. Gordon, S. A. Benner, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2010**, *29*, 879-895.
- ³⁵⁵ Y. Ge, X. Wu, D. Zhang, L. Hu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 941-944.
- ³⁵⁶ M. Perbost, T. Hoshiko, F. Morvan, E. Swayze, R. H. Griffey, Y. S. Sanghvi, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5150-5156.
- ³⁵⁷ A. Karpeisky, C. Gonzalez, A. B. Burgin, L. Beigelman, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1131-1134.
- ³⁵⁸ L. C. Davies, *Nucleosides Nucleotides* **1985**, *4*, 395-400.
- ³⁵⁹ K. Kondo, T. Ogiku, I. Inoue, *Nucleic Acids Res. (Symposium Series No.16)* **1985**, 93-96.
- ³⁶⁰ M. A. Khomutov, S. Mandal, J. Weisell, N. Saxena, A. R. Simonian, J. Vepsalainen, R. Madhubala, S. N. Kochetkov, *Amino Acids* **2010**, *38*, 509-517.

- ³⁶¹ S. Dimock, B. Bhat, D. Peoc'h, Y. S. Sanghvi, E. E. Swayze, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 1629-1632.
- ³⁶² E. E. Swayze, Y. S. Sanghvi, *Synlett* **1997**, 859-861.
- ³⁶³ Y. Xiang, R. F. Schinazi, K. Zhao, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1475-1478.
- ³⁶⁴ A. Papchikhin, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 5279-5286.
- ³⁶⁵ K. Versteeg, D. Willing, H. Wang, K. M. Church, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8145-8150.
- ³⁶⁶ M. Yamaguchi, A. Matsuda, S. Ichikawa, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1187-1197.
- ³⁶⁷ Y. Moggio, L. Legnani, B. Bovio, M. G. Memeo, P. Quadrelli, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 1384-1392.
- ³⁶⁸ P. Quadrelli, M. Mella, L. Legnani, D. Al-Saad, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4655-4665.
- ³⁶⁹ M. G. Memeo, F. Lapolla, G. Maga, P. Quadrelli, *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1986-1990.
- ³⁷⁰ Y. S. Lee, S. M. Park, B. H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 1126-1128.
- ³⁷¹ I. Creuven, C. Evrard, A. Olivier, G. Evrard, A. Van Aerschot, P. Wigerinck, P. Herdewijn, F. Durant, *Antiviral Res.* **1996**, *30*, 63-74.
- ³⁷² G. G. Rajulu, H. S. B. Naik, A. Viswanadhan, J. Thiruvengadam, K. Rajesh, S. Ganesh, H. Jagadheshan, P. K. Kesavan, *Chem. Pharm. Bull.* **2014**, *62*, 168-175.
- ³⁷³ J. F. Zhang, M. Li, J. Y. Miao, B. X. Zhao, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *83*, 516-525.
- ³⁷⁴ B. Kurzak, H. Kozłowski, E. Farkas, *Coord. Chem. Rev.* **1992**, *114*, 169-200.
- ³⁷⁵ R. Codd, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 1387-1408.
- ³⁷⁶ C. J. Marmion, D. Griffith, K. B. Nolan, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 3003-3016.
- ³⁷⁷ H. L. Elford, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *33*, 129-135.
- ³⁷⁸ R. A. Farr, P. Bey, P. S. Sunkara, B. J. Lippert, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1879-1885.
- ³⁷⁹ V. Vrčec, V. Caplar, S. Uršic, *Croat. Chem. Acta* **1998**, *71*, 119-124.
- ³⁸⁰ P. Currid, R. H. Wightman, *Nucleosides Nucleotides* **1997**, *16*, 115-128.
- ³⁸¹ S. I. Khan, M. W. Grinstaff, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8031-8034.
- ³⁸² S. Uršic, B. Nigović, V. Vrčec, V. Pilepić, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 9547-9550.
- ³⁸³ K. Das, M. Pink, S. Rajca, A. Rajca, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5334-5335.
- ³⁸⁴ F. Debart, J. J. Vasseur, Y. S. Sanghvi, P. D. Cook, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2645-2648.
- ³⁸⁵ J. J. Vasseur, F. Debart, Y. S. Sanghvi, P. D. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4006-4007.
- ³⁸⁶ R. S. Varma, *Synlett* **1993**, 621-637.
- ³⁸⁷ V. Mohan, R. H. Griffey, D. R. Davis, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6855-6868.
- ³⁸⁸ Y. S. Sanghvi, L. Bellon, F. Morvan, T. Hoshiko, E. Swayze, L. Cummins, S. Freier, N. Dean, B. Monia, R. H. Griffey, P. D. Cook, *Nucleosides Nucleotides* **1995**, *14*, 1087-1090.
- ³⁸⁹ B. Bhat, E. E. Swayze, P. Wheeler, S. Dimock, M. Perbost, Y. S. Sanghvi, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8186-8199.
- ³⁹⁰ X. Yang, X. Han, C. Cross, S. Bare, Y. Sanghvi, X. Gao, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12586-12596.
- ³⁹¹ D. Peoc'h, E. E. Swayze, B. Bhat, Y. S. Sanghvi, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 411-438.
- ³⁹² M. Prhavic, G. Just, B. Bhat, P. D. Cook, M. Manoharan, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9967-9971.
- ³⁹³ E. E. Swayze, B. Bhat, D. Peoc'h, Y. S. Sanghvi, *Nucleotides Nucleosides* **1997**, *16*, 971-972.
- ³⁹⁴ F. Morvan, Y. S. Sanghvi, M. Perbost, J. J. Vasseur, L. Bellon, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 255-256.
- ³⁹⁵ F. Debart, J. J. Vasseur, Y. S. Sanghvi, P. D. Cook, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1479-1482.
- ³⁹⁶ S. Peyrat, J. Xie, *Synthesis* **2012**, *44*, 1718-1724.
- ³⁹⁷ D. Yang, J. Qu, B. Li, F. F. Ng, X. C. Wang, K. K. Cheung, D. P. Wang, Y. D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 589-590.
- ³⁹⁸ K. Burgess, R. A. Gibbs, M. L. Metzker, R. Raghavachari, *Chem. Commun.* **1994**, 915-916.
- ³⁹⁹ Y. Gong, S. Peyrat, H. Sun, J. Xie, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7114-7120.
- ⁴⁰⁰ M. Gosh, L. J. Lambert, P. W. Huber, M. J. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2337-2340.
- ⁴⁰¹ S. Hashimoto, Y. Nakamura, *Chem. Commun.* **1995**, 1413-1414.
- ⁴⁰² K. S. Ramasamy, L. He, V. Stoisavljevic, B. Harpham, W. Seifert, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4317-4321.
- ⁴⁰³ K. S. Ramasamy, V. Stoisavljevic, J. Y. N. Lau, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2001**, *20*, 1173-1176.

- ⁴⁰⁴ H. Li, M. J. Miller, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 4323-4327.
- ⁴⁰⁵ M. J. Miller, H. Li, C. A. Foss, *Biometals* **2009**, *22*, 491-510.
- ⁴⁰⁶ J. K. Gallos, C. C. Dellios, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5679-5681.
- ⁴⁰⁷ S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, S. Haitani, K. Miyashita, T. Imanishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4306-4309.
- ⁴⁰⁸ K. Miyashita, S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, T. Imanishi, *Chem. Commun.* **2007**, 3765-3767.
- ⁴⁰⁹ S. M. A. Rahman, S. Seki, S. Obika, H. Yoshikawa, K. Miyashita, T. Imanishi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4886-4896.
- ⁴¹⁰ T. Yamamoto, H. Yasuhara, F. Wada, M. Harada-Shiba, T. Imanishi, S. Obika, *J. Nucleic Acids* **2012**, Article ID 707323.
- ⁴¹¹ T. P. Prakash, A. Siwkowski, C. R. Allerson, M. T. Migawa, S. Lee, H. J. Gaus, C. Black, P. P. Seth, E. E. Swayze, B. Bhat, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1636-1650.
- ⁴¹² A. R. Shrestha, Y. Hari, A. Yahara, T. Osawa, S. Obika, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 9891-9899.
- ⁴¹³ T. Kodama, C. Matsuo, H. Ori, T. Miyoshi, S. Obika, K. Miyashita, T. Imanishi, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2116-2123.
- ⁴¹⁴ T. Kodama, K. Sugaya, T. Baba, T. Imanishi, S. Obika, *Heterocycles* **2009**, *79*, 873-882.
- ⁴¹⁵ E. T. Kool, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1996**, *25*, 1-28.
- ⁴¹⁶ R. Micura, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2077-2082.
- ⁴¹⁷ T. Li, D. Liu, J. Chen, A. H. F. Lee, J. Qi, A. S. C. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12901-12902.
- ⁴¹⁸ D. Liu, J. Chen, A. H. F. Lee, L. M. C. Chow, A. S. C. Chan, T. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 797-799.
- ⁴¹⁹ A. Sanchez, E. Pedroso, A. Grandas, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 309-311.
- ⁴²⁰ J. Lietard, A. Meyer, J. J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 191-200.
- ⁴²¹ E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 502-510.
- ⁴²² D. A. Di Giusto, S. M. Knox, Y. Lai, G. D. Tyrelle, M. T. Aung, G. C. King, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 535-544.
- ⁴²³ N. Abe, H. Abe, T. Ohshiro, Y. Nakashima, M. Maeda, Y. Ito, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2125-2127.
- ⁴²⁴ O. P. Edupuganti, E. Defrancq, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8708-8710.
- ⁴²⁵ L. Büttner, J. Seikowski, K. Wawrzyniak, A. Ochmann, C. Höbartner, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6171-6180.
- ⁴²⁶ A. Hakam, I. E. Thomas, A. M. Bobst, *Int. J. Biol. Macromol.* **1980**, *2*, 49-51.
- ⁴²⁷ D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 219-227.
- ⁴²⁸ N. Barhate, P. Cekan, A. P. Massey, S. T. Sigurdsson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2655-2658.
- ⁴²⁹ C. Höbartner, G. Sicoli, F. Wachowius, D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7749-7754.
- ⁴³⁰ P. H. Nguyen, A. M. Popova, K. Hideg, P. Z. Qin, *BMC Biophysics* **2015**, *8*, 1-6.
- ⁴³¹ D. B. Gophane, S. T. Sigurdsson, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 999-1001.
- ⁴³² D. B. Gophane, B. Endeward, T. F. Prisner, S. T. Sigurdsson, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 15913-15919.
- ⁴³³ Y. Singh, N. Spinelli, E. Defrancq, *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 263-290.
- ⁴³⁴ B. Draghici, F. K. Hansen, A. M. Buciumas, B. El-Dien, M. El-Gendy, E. Todadze, A. R. Katritzky, *RSC Adv.* **2011**, *1*, 602-606.
- ⁴³⁵ T. S. Zatsepin, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 471-489.
- ⁴³⁶ N. Ollivier, C. Olivier, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, H. Gras-Masse, O. Melnyk, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 997-999.
- ⁴³⁷ Y. Singh, O. P. Edupuganti, M. Villien, E. Defrancq, P. Dumy, *C. R. Chimie* **2005**, *8*, 789-796.
- ⁴³⁸ S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 34-41.
- ⁴³⁹ N. Venkatesan, B. Hyeon Kim, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3712-3761.
- ⁴⁴⁰ K. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.
- ⁴⁴¹ K. Rose, W. Zeng, P. O. Regamey, I. V. Chernushevich, K. G. Standing, H. F. Gaertner, *Bioconjugate Chem.* **1996**, *7*, 552-556.
- ⁴⁴² A. Dirksen, P. E. Dawson, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2543-2548.
- ⁴⁴³ P. Crisalli, A. R. Hernandez, E. T. Kool, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1969-1980.

- ⁴⁴⁴ J. Cieslak, A. Grajkowski, C. Ausin, A. Gapeev, S. L. Beaucage, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 2312-2329.
- ⁴⁴⁵ M. Villien, S. Deroo, E. Gicquel, E. Defrancq, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, P. Dumy, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11299-11306.
- ⁴⁴⁶ N. Spinelli, Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 883-887.
- ⁴⁴⁷ S. Dey, T. L. Sheppard, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 3983-3986.
- ⁴⁴⁸ T. Hamma, P. S. Miller, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 320-330.
- ⁴⁴⁹ D. Forget, O. Renaudet, D. Boturyn, E. Defrancq, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 9171-9174.
- ⁴⁵⁰ M. Villien, E. Defrancq, P. Dumy, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2004**, *23*, 1657-1666.
- ⁴⁵¹ E. Defrancq, J. Lhomme, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 931-933.
- ⁴⁵² Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8544-8546.
- ⁴⁵³ E. M. Zubin, D. A. Stetsenko, T. S. Zatsepin, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4912-4920.
- ⁴⁵⁴ T. S. Zatsepin, Y. M. Ivanova, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7327-7330.
- ⁴⁵⁵ E. Trévisiol, A. Renard, E. Defrancq, J. Lhomme, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 8687-8690.
- ⁴⁵⁶ K. Lu, Q. P. Duan, L. Ma, D. X. Zhao, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 187-202.
- ⁴⁵⁷ T. S. Zatsepin, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 3191-3195.
- ⁴⁵⁸ N. Spinelli, O. P. Edupuganti, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 219-222.
- ⁴⁵⁹ H. Salo, P. Virta, H. Hakala, T. P. Prakash, A. M. Kawasaki, M. Manoharan, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 815-823.
- ⁴⁶⁰ P. Murat, N. Spinelli, P. Dumy, E. Defrancq, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6534-6537.
- ⁴⁶¹ F. Abendroth, O. Seitz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10504-10509.
- ⁴⁶² O. P. Edupuganti, Y. Singh, E. Defrancq, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5988-5995.
- ⁴⁶³ O. P. Edupuganti, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2839-2842.
- ⁴⁶⁴ A. Meyer, N. Spinelli, P. Dumy, J. J. Vasseur, F. Morvan, E. Defrancq, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3927-3930.
- ⁴⁶⁵ Y. Singh, N. Spinelli, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1413-1419.
- ⁴⁶⁶ G. Viault, S. Dautrey, N. Maindron, J. Hardouin, P. Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2693-2705.
- ⁴⁶⁷ E. Garanger, D. Boturyn, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2402-2410.
- ⁴⁶⁸ Y. Singh, P. Murat, E. Defrancq, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2054-2070.
- ⁴⁶⁹ E. Trévisiol, E. Defrancq, J. Lhomme, A. Laayoun, P. Cros, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 6501-6510.
- ⁴⁷⁰ N. Dendane, A. Hoang, L. Guillard, E. Defrancq, F. Vinet, P. Dumy, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 671-676.
- ⁴⁷¹ N. Dendane, A. Hoang, O. Renaudet, F. Vinet, P. Dumy, E. Defrancq, *Lab Chip* **2008**, *8*, 2161-2163.
- ⁴⁷² G. Clavé, H. Boutal, A. Hoang, F. Perraut, H. Volland, P. Y. Renard, A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3065-3078.
- ⁴⁷³ J. Moreau, N. Dendane, B. Schöllhorn, N. Spinelli, C. Fave, E. Defrancq, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 955-958.
- ⁴⁷⁴ S. Deroo, E. Defrancq, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8379-8382.
- ⁴⁷⁵ E. Trévisiol, A. Renard, E. Defrancq, J. Lhomme, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2000**, *19*, 1427-1439.
- ⁴⁷⁶ E. Trévisiol, E. Defrancq, J. Lhomme, A. Laayoun, A. Hoang, F. Besème, P. Cros, *Nucleosides Nucleotides* **1999**, *18*, 979-980.
- ⁴⁷⁷ D. Forget, D. Boturyn, E. Defrancq, J. Lhomme, P. Dumy, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 3976-3984.
- ⁴⁷⁸ S. Ghosh, E. Defrancq, J. H. Lhomme, P. Dumy, S. Bhattacharya, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 520-529.

- ⁴⁷⁹ T. S. Zatsepin, D. A. Stetsenko, A. A. Arzumanov, E. A. Romanova, M. J. Gait, T. S. Oretskaya, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 822-830.
- ⁴⁸⁰ P. Neuner, P. Gallo, L. Orsatti, L. Fontana, P. Monaci, *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 276-281.
- ⁴⁸¹ D. Forget, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7829-7832.
- ⁴⁸² Y. Singh, O. Renaudet, E. Defrancq, P. Dumy, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 1359-1362.
- ⁴⁸³ M. Karskela, M. Helkearo, P. Virta, H. Lönnberg, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 748-755.
- ⁴⁸⁴ S. Le Gac, S. Rickling, P. Gerbaux, E. Defrancq, C. Moucheron, A. Kirsch-De Mesmaeker, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1122-1125.
- ⁴⁸⁵ D. Yang, B. Li, F. F. Ng, Y. L. Yan, J. Qu, Y. D. Wu, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 7303-7312.
- ⁴⁸⁶ D. Yang, X. W. Chang, D. W. Zhang, Z. F. Jiang, K. S. Song, Y. H. Zhang, N. Y. Zhu, L. H. Weng, M. Q. Chen, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4796-4805.
- ⁴⁸⁷ C. Agami, F. Couty, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2701-2724.
- ⁴⁸⁸ F. Liu, J. Thomas, J. Burke, *Synthesis* **2008**, *15*, 2432-2438.
- ⁴⁸⁹ A. M. Bondia, N. Larcher, L. Garrelly, J. C. Rossi, R. Pascal, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3330-3333.
- ⁴⁹⁰ M. Chemama, *Synthèse d'analogues d'aminoacyl-ARN_t pour l'étude et l'inhibition d'une transférase de type Fem*, Paris : Université Pierre et Marie Curie, **2009**, 320 p.
- ⁴⁹¹ J. Razkin, H. Nilsson, L. Baltzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14752-14758.
- ⁴⁹² P. L. Anelli, C. Biffi, F. Montanari, S. Quici, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2559-2562.
- ⁴⁹³ F. Hansske, D. Madej, M. J. Robins, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 125-135.
- ⁴⁹⁴ R. W. Lang, H. J. Hansen, *Org. Synth.* **1990**, *7*, 232-236.
- ⁴⁹⁵ F. X. Felpin, E. Fouquet, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 12440-12445.
- ⁴⁹⁶ J. P. H. Verheyden, J. G. Moffatt, *J. Org. Chem.* **1972**, *87*, 2289-2299.
- ⁴⁹⁷ M. A. Peterson, B. L. Nilsson, S. Sarker, B. Doboszewski, W. Zhang, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8183-8192.
- ⁴⁹⁸ M. J. Robins, S. Sarker, M. Xie, W. Zhang, M. A. Peterson, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3921-3924.
- ⁴⁹⁹ S. Hanessian, M. M. Ponpipom, P. Lavallee, *Carbohydr. Res.* **1972**, *24*, 45-56.
- ⁵⁰⁰ N. C. Srivastav, N. Shakya, M. Mak, B. Agrawal, D. L. Tyrrell, R. Kumar, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7156-7166.
- ⁵⁰¹ L. S. Lin, T. Lanza Jr, S. E. de Laszlo, Q. Truong, T. Kamenecka, W. K. Hagmann, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 7013-7016.
- ⁵⁰² R. M. Williams, J. Cao, H. Tsujishima, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2540-2544.
- ⁵⁰³ S. Cantel, S. Desgranges, J. Martinez, J. A. Fehrentz, *J. Peptide Sci.* **2004**, *10*, 326-328.
- ⁵⁰⁴ Y. Otani, T. Hori, M. Kawahata, K. Yamaguchi, T. Ohwada, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 4418-4428.
- ⁵⁰⁵ T. Kamiya, M. Hashimoto, O. Nakaguchi, T. Oku, *Tetrahedron* **1979**, *35*, 323-328.
- ⁵⁰⁶ V. Theodorou, K. Skobridis, A. G. Tzakos, V. Ragoussis, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8230-8233.
- ⁵⁰⁷ E. D. Laganis, B. L. Chenard, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5831-5834.
- ⁵⁰⁸ E. Minta, C. Boutonnet, N. Boutard, J. Martinez, V. Rolland, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1795-1797.
- ⁵⁰⁹ M. Kiankarimi, R. Lowe, J. R. McCarthy, J. P. Whitten, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4497-4500.
- ⁵¹⁰ J. D'Onofrio, L. De Napoli, G. Di Fabio, D. Montesarchio, *Synlett* **2006**, 845-848.
- ⁵¹¹ F. Ito, S. Ando, M. Iuchi, T. Ukari, M. Takasaki, K. Yamaguchi, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8009-8013.
- ⁵¹² D. Dhanak, C. B. Reese, S. Romana, G. Zappia, *Chem. Commun.* **1986**, 903-904.
- ⁵¹³ P. A. Levene, L. W. Bass, *J. Biol. Chem.* **1926**, *71*, 167-172.
- ⁵¹⁴ D. H. Hayes, F. Hayes-Baron, *J. Chem. Soc.* **1967**, 1528-1532.
- ⁵¹⁵ K. Hirota, Y. Kitade, K. Shimada, S. Senda, Y. Maki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1983**, 1293-1297.
- ⁵¹⁶ M. Lovrić, I. Cepanec, M. Litvić, A. Bartolinčić, V. Vinković, *Croat. Chem. Acta* **2007**, *1*, 109-115.
- ⁵¹⁷ A. J. Lawrence, J. B. J. Pavey, M. Y. Chan, R. A. Fairhurst, S. P. Collingwood, J. Fisher, R. Cosstick, I. A. O'Neil, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1997**, 2761-2767.
- ⁵¹⁸ P. D. G. Dean, *J. Chem. Soc.* **1965**, 6655-6655.
- ⁵¹⁹ M. Lodder, S. Golovine, A. L. Laikhter, V. A. Karginov, S. M. Hecht, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 794-803.
- ⁵²⁰ M. Lodder, S. Golovine, S. M. Hecht, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 778-779.
- ⁵²¹ J. E. Hudak, H. H. Yu, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16127-16135.
- ⁵²² R. Madsen, C. Roberts, B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 7920-7926.

- ⁵²³ J. Lawrence, L. Cointeaux, P. Maire, Y. Vallee, V. Blandin, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3125-3141.
- ⁵²⁴ A. K. Pathak, V. Pathak, L. E. Seitz, K. N. Tiwari, M. S. Akhtar, R. C. Reynolds, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7755-7757.
- ⁵²⁵ Y. Gong, H. Sun, J. Xie, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6027-6033.
- ⁵²⁶ H. C. Brown, *Tetrahedron* **1961**, *12*, 117-138.
- ⁵²⁷ A. Winqvist, R. Strömberg, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4305-4311.
- ⁵²⁸ N. S. Li, J. A. Piccirilli, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 1198-1210.
- ⁵²⁹ A. S. Hansen, A. Thalhammer, A. H. El-Sagheer, T. Brown, C. J. Schofield, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1181-1184.
- ⁵³⁰ C. Bleasdale, S. B. Ellwood, B. T. Golding, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1990**, 803-805.
- ⁵³¹ M. K. Lakshman, B. Zajc, *Nucleosides Nucleotides* **1996**, *15*, 1029-1039.
- ⁵³² P. Zhang, A. Wang, L. Cui, C. C. Ling, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1612-1615.
- ⁵³³ C. O. Kappe, B. Pieber, D. Dallinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1088-1094.
- ⁵³⁴ J. Sengupta, A. Bhattacharjya, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 6860-6863.
- ⁵³⁵ H. Kunz, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1984**, *23*, 71-72.
- ⁵³⁶ S. Makino, Y. Ueno, M. Ishikawa, Y. Kayakawa, T. Hata, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 2775-2778.
- ⁵³⁷ S. G. Deshpande, T. Pathak, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2255-2258.
- ⁵³⁸ S. Hanessian, O. M. Saavedra, F. Xie, N. Amboldi, C. Battistini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 439-442.
- ⁵³⁹ S. Quant, R. W. Wechselberger, M. A. Wolter, K. H. Wörner, P. Schell, J. W. Engels, C. Griesinger, H. Schwalbe, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6649-6652.
- ⁵⁴⁰ A. K. Banerjee, W. Vera, H. Mora, M. S. Laya, L. Bedoya, E. V. Cabrera, *J. Sci. Ind. Res.* **2006**, *65*, 299-308.
- ⁵⁴¹ K. P. R. Kartha, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3415-3416.
- ⁵⁴² A. M. Ona, T. Shiina, A. Ono, M. Kainosho, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2793-2796.
- ⁵⁴³ B. Doboszewski, P. Herdewijn, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5551-5562.
- ⁵⁴⁴ M. Ellermann, R. Paulini, R. Jakob-Roetne, C. Lerner, E. Borroni, D. Roth, A. Ehler, W. B. Schweizer, D. Schlatter, M. G. Rudolph, F. Diederich, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6369-6381.
- ⁵⁴⁵ V. V. Filichev, M. Brandt, E. B. Pedersen, *Carbohydr. Res.* **2001**, *333*, 115-122.
- ⁵⁴⁶ S. Torii, T. Inokuchi, S. Matsumoto, T. Saeki, T. Oki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, *62*, 2108-2110.
- ⁵⁴⁷ K. N. Slessor, A. S. Tracey, *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 3989-3995.
- ⁵⁴⁸ M. Turks, V. Rodins, E. Rolava, P. Ostrovskis, S. Belyakov, *Carbohydr. Res.* **2013**, *375*, 5-15.
- ⁵⁴⁹ T. R. Hoyer, J. Jeon, L. C. Kopel, T. D. Ryba, M. A. Tennakoon, Y. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6151-6155.
- ⁵⁵⁰ F. Castañeda, C. Aliaga, C. Acuña, P. Silva, C. A. Bunton, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2008**, *5*, 1188-1208.
- ⁵⁵¹ F. Debaene, J. A. Da Silva, Z. Pianowski, F. J. Duran, N. Winssinger, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 6577-6586.
- ⁵⁵² C. A. Brown, H. C. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 1003-1005.
- ⁵⁵³ A. Dondoni, D. Perrone, M. T. Semola, *J. Org. Chem.* **1996**, *60*, 7927-7933.
- ⁵⁵⁴ J. Xie, A. Molina, S. Czernecki, *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 481-498.
- ⁵⁵⁵ N. M. Xavier, A. P. Rauter, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3339-3341.
- ⁵⁵⁶ M. Himmelbauer, J. B. Farcet, J. Gagnepain, J. Mulzer, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 8214-8244.
- ⁵⁵⁷ L. Liu, M. H. D. Postema, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8602-8603.
- ⁵⁵⁸ M. H. D. Postema, J. L. Piper, L. Liu, J. Shen, M. Faust, P. Andreana, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4748-4754.
- ⁵⁵⁹ M. S. Stanley, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6421-6430.
- ⁵⁶⁰ G. Guillerm, M. Muzard, C. Glapski, S. Pilard, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5803-5807.
- ⁵⁶¹ H. B. Merayala, R. R. Gadikota, *Tetrahedron Asymmetry* **2000**, *11*, 743-751.
- ⁵⁶² M. Xie, D. A. Berges, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5178-5179.
- ⁵⁶³ K. Lee, D. F. Wiemer, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7808-7812.
- ⁵⁶⁴ N. Iranpoor, H. Firouzabadi, D. Khalili, S. Motevalli, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4882-4887.

- ⁵⁶⁵ N. Iranpoor, H. Firouzabadi, D. Khalili, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 6913-6915.
- ⁵⁶⁶ R. Dembinski, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2763-2772.
- ⁵⁶⁷ T. Y. S. But, P. H. Toy, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9636-9637.
- ⁵⁶⁸ D. Hirose, T. Taniguchi, H. Ishibashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4613-4617.
- ⁵⁶⁹ D. P. Furkert, B. Breitenbach, L. Juen, I. Sroka, M. Pantin, M. A. Brimble, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 7806-7809.
- ⁵⁷⁰ K. Hagiya, N. Muramoto, T. Misaki, T. Sugimura, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6109-6114.
- ⁵⁷¹ R. L. Hinman, D. Ulton, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1895-1900.
- ⁵⁷² W. J. Theuer, J. A. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *29*, 3734-3735.
- ⁵⁷³ F. E. Condon, *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3608-3615.
- ⁵⁷⁴ S. M. Johnson, H. M. Petrassi, S. K. Palaninathan, N. N. Mohamedmohaideen, H. E. Purkey, C. Nichols, K. P. Chiang, T. Walkup, J. C. Sacchettini, K. B. Sharpless, J. W. Kelly, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1576-1587.
- ⁵⁷⁵ J. H. Rigby, T. L. Moore, S. Rege, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2400-2402.
- ⁵⁷⁶ Y. Maruyama, T. Sezaki, M. Tekawa, T. Sakamoto, I. Shimizu, A. Yamamoto, *J. Organomet. Chem.* **1994**, *473*, 257-264.
- ⁵⁷⁷ G. Vincent, C. Kouklovsky, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2972-2980.
- ⁵⁷⁸ K. Hayashi, Y. Hamada, T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5075-5076.
- ⁵⁷⁹ A. Malapelle, R. Ramozzi, J. Xie, *Synthesis* **2009**, 888-890.
- ⁵⁸⁰ Y. Xu, H. Jin, Z. Yang, L. Zhang, L. Zhang, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5228-5239.
- ⁵⁸¹ J. B. Epp, T. S. Widlanski, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 293-295.
- ⁵⁸² B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, *17*, 522-524.
- ⁵⁸³ M. J. Robins, B. Doboszewski, V. A. Timoshchuk, M. A. Peterson, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2939-2945.
- ⁵⁸⁴ H. Vorbrüggen, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 509-520.
- ⁵⁸⁵ G. E. Hilbert, T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, *52*, 4489-4494.
- ⁵⁸⁶ V. Caplar, M. Zinić, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4455-4458.
- ⁵⁸⁷ S. Hanessian, J. Waggoner, B. L. Merner, R. D. Giacometti, M. E. Østergaard, E. E. Swayze, P. P. Seth, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9064-9075.
- ⁵⁸⁸ M. Sekiguchi, S. Obika, Y. Harada, T. Osaki, R. Somjing, Y. Mitsuoka, N. Shibata, M. Masaki, T. Imanishi, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 1306-1316.
- ⁵⁸⁹ P. J. Hrdlicka, J. S. Jepsen, C. Nielsen, J. Wengel, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1249-1260.
- ⁵⁹⁰ R. Zou, M. J. Robbins, *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 1436-1437.
- ⁵⁹¹ W. Zhu, G. Gumina, R. F. Schinazi, C. K. Chu, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 6423-6431.
- ⁵⁹² M. Aljarah, S. Couturier, G. Gosselin, C. Math, C. Périgaud, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1125-1128.
- ⁵⁹³ E. Rozners, Y. Liu, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9841-9848.
- ⁵⁹⁴ N. V. Nikolaus, J. Božilović, J. W. Engels, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 889-892.
- ⁵⁹⁵ M. Gobbin, S. Armaroli, L. Banfi, A. Benicchio, G. Carzana, G. Fedrizzi, P. Ferrari, G. Giacalone, M. Giubileo, G. Marazzi, R. Micheletti, B. Moro, M. Pozzi, P. E. Scotti, M. Torri, A. Cerri, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4601-4608.
- ⁵⁹⁶ V. Duléry, O. Renaudet, C. Philouze, P. Dumy, *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 894-900.
- ⁵⁹⁷ T. Ohshima, Y. Hayashi, K. Agura, Y. Fujii, A. Yoshiyama, K. Mashim, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 5434-5436.
- ⁵⁹⁸ S. Peyrat, K. Cheng, J. Xie, *Synthesis* **2013**, *45*, 2737-2744.
- ⁵⁹⁹ N. Chen, J. Xie, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 10716-10721.
- ⁶⁰⁰ S. Wolfe, M. C. Wilson, M. H. Cheng, G. V. Shustov, C. I. Akuche, *Can. J. Chem.* **2003**, *81*, 937-960.
- ⁶⁰¹ D. Yang, F. F. Ng, Z. J. Li, Y. D. Wu, K. W. K. Chan, D. P. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9794-9795.
- ⁶⁰² I. Shin, M. Lee, J. Lee, M. Jung, W. Lee, J. Yoon, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7667-7675.
- ⁶⁰³ F. Chen, K. S. Song, Y. D. Wu, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 743-755.
- ⁶⁰⁴ X. Li, Y. D. Wu, D. Yang, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1428-1438.

- ⁶⁰⁵ X. Li, D. Yang, *Chem. Commun.* **2006**, 3367-3379.
- ⁶⁰⁶ D. Yang, D. W. Zhang, Y. Hao, Y. D. Wu, S. W. Luo, N. Y. Zhu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6719-6722.
- ⁶⁰⁷ G. Mezö, I. Szabó, I. Kertész, R. Hegedüs, E. Orbán, U. Leurs, S. Bösze, G. Halmos, M. Manea, *J. Pept. Sci.* **2011**, *17*, 39-46.
- ⁶⁰⁸ C. Jiménez-Castells, B. G. de la Torre, R. Gutiérrez Gallego, D. Andreu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5155-5158.
- ⁶⁰⁹ N. Zhang, R. Yang, D. Zhang-Negrerie, Y. Du, K. Zhao, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 8705-8711.
- ⁶¹⁰ I. P. Decostaire, D. Lelièvre, H. Zhang, A. F. Delmas, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7057-7060.
- ⁶¹¹ V. Duléry, O. Renaudet, P. Dumy, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11952-11958.
- ⁶¹² S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.
- ⁶¹³ O. Noel, J. Xie, *Synthesis* **2013**, *45*, 134-140.
- ⁶¹⁴ M. Bria, P. Watkin, *L'Act. Chim.* **1997**, *2*, 14-35.
- ⁶¹⁵ Z. G. Jiao, X. W. Chang, W. Ding, G. J. Liu, K. S. Song, N. Y. Zhu, D. W. Zhang, D. Yang, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 1791-1799.
- ⁶¹⁶ F. Chen, K. S. Song, Y. D. Wu, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 742-755.
- ⁶¹⁷ Y. H. Zhang, K. Song, N. Y. Zhu, D. Yang, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 577-587.
- ⁶¹⁸ A. De Mesmaeker, A. Waldner, J. Lebreton, P. Hoffmann, V. Fritsch, R. M. Wolf, S. M. Freier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 226-229.
- ⁶¹⁹ A. De Mesmaeker, C. Lesueur, M. O. Bévière, A. Waldner, V. Fritsch, R. M. Wolf, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 2790-2794.
- ⁶²⁰ R. P. Chang, S. H. Gellman, W. F. D. Grado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219-3232.
- ⁶²¹ Y. D. Wu, D. P. Wang, K. W. K. Chan, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11189-11196.
- ⁶²² D. Yang, J. Qu, W. Li, D. P. Wang, Y. Ren, Y. D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14452-14457.
- ⁶²³ J. Wei, X. Shao, M. Gong, B. Zhu, Y. Cui, Y. Gao, R. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2986-2989.
- ⁶²⁴ D. Yang, W. Li, J. Qu, S. W. Luo, Y. D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13018-13019.
- ⁶²⁵ D. Yang, Y. H. Zhang, N. Y. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9966-9967.
- ⁶²⁶ D. Yang, Y. H. Zhang, B. Li, D. W. Zhang, J. C. Y. Chan, N. Y. Zhu, S. W. Luo, Y. D. Wu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6956-6966.
- ⁶²⁷ F. Chen, N. Y. Zhu, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15980-15981.
- ⁶²⁸ S. Chandrasekhar, N. Kiranmai, M. U. Kiran, A. S. Devi, G. P. K. Reddy, M. Idris, B. Jagadeesh, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6962-6964.
- ⁶²⁹ K. R. Gore, S. Harikrishina, P. I. Pradeepkumar, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 9956-9962.
- ⁶³⁰ S. Chandrasekhar, C. L. Rao, M. S. Reddy, G. D. Sharma, M. U. Kiran, P. Naresh, G. K. Chaitanya, K. Bhanuprakash, B. Jagadeesh, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 9443-9446.
- ⁶³¹ C. Xie, J. Yuan, H. Li, M. Li, G. Zhao, D. Bu, W. Zhu, W. Wu, R. Chen, Y. Zhao, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D98-D103.
- ⁶³² T. Derrien, R. Johnson, G. Bussotti, A. Tanzer, S. Djebali, H. Tilgner, G. Guernec, D. Martin, A. Merkel, D. G. Knowles, J. Lagarde, L. Veeravalli, X. Ruan, Y. Ruan, T. Lassmann, P. Carninci, J. B. Brown, L. Lipovich, J. M. Gonzalez, M. Thomas, C. A. Davis, R. Shiekhattar, T. R. Gingeras, T. J. Hubbard, C. Notredame, J. Harrow, R. Guigo, *Genome Res.* **2012**, *22*, 1775-1789.
- ⁶³³ I. V. Novikova, S. P. Hennelly, C. S. Tung, K. Y. Sanbonmatsu, *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 3731-3746.
- ⁶³⁴ M. P. Robertson, H. Igel, R. Baertsch, D. Haussler, M. Ares, W. G. Scott, *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e5.
- ⁶³⁵ L. Salmon, S. Yang, H. M. Al-Hashimi, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2014**, *65*, 293-316.
- ⁶³⁶ B. Felden, *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10*, 286-291.
- ⁶³⁷ Z. Gong, C. D. Schwieters, C. Tang, *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120445.
- ⁶³⁸ K. Lu, Y. Miyazaki, M. F. Summers, *J. Biomol. NMR* **2010**, *46*, 113-125.
- ⁶³⁹ A. Marchanka, B. Simon, G. Althoff-Ospelt, T. Carlomagno, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, Article number 7024.

- ⁶⁴⁰ C. Dominguez, M. Schubert, O. Duss, S. Ravindranathan, F. H. T. Allain, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *58*, 1-61.
- ⁶⁴¹ Y. L. Ahmed, R. Ficner, *RNA Biol.* **2014**, *11*, 427-432.
- ⁶⁴² B. H. M. Mooers, *Methods* **2009**, *47*, 168-176.
- ⁶⁴³ L. Jenner, S. Melnikov, N. Garreau de Loubresse, A. Ben-Shem, M. Iskakova, A. Urzhumtsev, A. Meskauskas, J. Dinman, G. Yusupova, M. Yusupov, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 759-767.
- ⁶⁴⁴ A. V. Kazantsev, A. A. Krivenko, D. J. Harrington, S. R. Holbrook, P. D. Adams, N. R. Pace, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 13392-13397.
- ⁶⁴⁵ D. H. Mathews, D. H. Turner, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 270-278.
- ⁶⁴⁶ S. S. Ray, S. K. Pal, *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinf.* **2013**, *10*, 2-17.
- ⁶⁴⁷ W. N. Moss, *Methods Enzymol.* **2013**, *530*, 3-65.
- ⁶⁴⁸ S. Ya-Zhou, W. Yuan-Yan, W. Feng-Hua, T. Zhi-Jie, *Chin. Phys. B* **2014**, *23*, 078701.
- ⁶⁴⁹ S. R. Eddy, *Annu. Rev. Biophys.* **2014**, *43*, 433-456.
- ⁶⁵⁰ M. Magnus, D. Matelska, G. Łach, G. Chojnowski, M. J. Boniecki, E. Purta, W. Dawson, S. Dunin-Horkawicz, J. M. Bujnicki, *RNA Biol.* **2014**, *11*, 522-536.
- ⁶⁵¹ C. Ehresmann, F. Baudin, M. Mougel, P. Romby, J. P. Ebel, B. Ehresmann, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 9109-9128.
- ⁶⁵² P. Cordero, W. Kladwand, C. C. VanLang, R. Das, *Biochemistry* **2012**, *51*, 7031-7039.
- ⁶⁵³ S. A. White, D. E. Draper, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 4049-4064.
- ⁶⁵⁴ S. A. White, D. E. Draper, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1892-1897.
- ⁶⁵⁵ D. H. Mathews, M. D. Disney, J. L. Childs, S. J. Schroeder, M. Zuker, D. H. Turner, *PNAS* **2004**, *101*, 7287-7292.
- ⁶⁵⁶ J. D. Beaudoin, R. Jodoin, J. P. Perreault, *Methods* **2013**, *64*, 79-87.
- ⁶⁵⁷ G. A. Soukup, R. R. Breaker, *RNA* **1999**, *5*, 1308-1325.
- ⁶⁵⁸ E. J. Merino, K. A. Wilkinson, J. L. Coughlan, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4223-4231.
- ⁶⁵⁹ S. I. Chamberlin, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 216-224.
- ⁶⁶⁰ S. I. Chamberlin, E. J. Merino, K. M. Weeks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 14688-14693.
- ⁶⁶¹ J. L. McGinnis, J. A. Dunkle, J. H. D. Cate, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6617-6624.
- ⁶⁶² K. A. Wilkinson, S. M. Vasa, K. E. Deigan, S. A. Mortimer, M. C. Giddings, K. M. Weeks, *RNA* **2009**, *15*, 1314-1321.
- ⁶⁶³ S. A. Mortimer, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4144-4145.
- ⁶⁶⁴ M. F. Soulière, A. Haller, R. Rieder, R. Micura, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16161-16167.
- ⁶⁶⁵ S. A. Mortimer, K. M. Weeks, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1413-1421.
- ⁶⁶⁶ R. C. Spitale, P. Crisalli, R. Flynn, E. A. Torre, E. T. Kool, H. Y. Chan, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 18-22.
- ⁶⁶⁷ L. Nodin, O. Noël, F. Chaminade, O. Maskri, V. Barbier, O. David, P. Fossé, J. Xie, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 566-570.
- ⁶⁶⁸ K. M. Weeks, D. M. Mauger, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1280-1291.
- ⁶⁶⁹ K. A. Steen, G. M. Rice, K. M. Weeks, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13160-13163.
- ⁶⁷⁰ K. M. Weeks, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 295-304.
- ⁶⁷¹ S. Ramachandran, F. Ding, K. M. Weeks, N. V. Dokhloyan, *Biochemistry* **2013**, *52*, 595-599.
- ⁶⁷² Z. Ouyang, M. P. Snyder, H. Y. Chang, *Genome Res.* **2013**, *23*, 377-387.
- ⁶⁷³ Z. Sükösd, M. S. Swenson, J. Kjems, C. E. Heitsch, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 2807-2816.
- ⁶⁷⁴ S. M. Vasa, N. Guex, K. A. Wilkinson, K. M. Weeks, M. C. Giddings, *RNA* **2008**, *14*, 1979-1990.
- ⁶⁷⁵ S. Kirmizialtin, S. P. Hennesly, A. Schug, J. N. Onuchic, K. Y. Sanbonmatsu, *Methods Enzymol.* **2015**, *553*, 215-234.
- ⁶⁷⁶ D. Loughrey, K. E. Watters, A. H. Settle, J. B. Lucks, *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, e165.
- ⁶⁷⁷ G. C. Todd, N. G. Walter, *RNA* **2013**, *19*, 685-700.
- ⁶⁷⁸ S. Lusvarghi, J. Sztuba-Solinska, K. J. Purzycka, G. T. Pauly, J. W. Rausch, S. F. J. Le Grice, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6637-6649.
- ⁶⁷⁹ I. V. Novikova, S. P. Hennesly, K. Y. Sanbonmatsu, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 5034-5051.
- ⁶⁸⁰ T. Giguère, C. R. Adkar-Purushothama, J. P. Perreault, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98655.
- ⁶⁸¹ J. Kenyon, L. Prestwood, A. Lever, *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 1251-1255.

- ⁶⁸² J. K. Grohman, R. J. Gorelick, C. R. Lickwar, J. D. Lieb, B. D. Bower, B. M. Znosko, K. M. Weeks, *Science* **2013**, *340*, 190-195.
- ⁶⁸³ W. Kladwang, C. C. VanLang, P. Cordero, R. Das, *Biochemistry* **2011**, *50*, 8049-8056.
- ⁶⁸⁴ C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
- ⁶⁸⁵ N. De Rycke, F. Couty, O. R. P. David, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12852-12871.
- ⁶⁸⁶ A. C. Spivey, S. Arseniyadis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5436-5441.
- ⁶⁸⁷ A. Hassner, L. R. Krepski, V. Alexanian, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 2069-2076.
- ⁶⁸⁸ M. R. Heinrich, H. S. Klisa, H. Mayr, W. Steglich, H. Zipse, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4826-4828.
- ⁶⁸⁹ N. De Rycke, G. Berionni, F. Couty, H. Mayr, R. Goumont, O. R. P. David, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 530-533.
- ⁶⁹⁰ Y. Kita, S. Akai, M. Yoshigi, Y. Nakajima, H. Yasuda, Y. Tamura, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 6027-6030.
- ⁶⁹¹ P. Setzer, G. Forcher, F. Boeda, M. S. M. Pearson-Long, P. Bertus, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 171-180.
- ⁶⁹² A. Schulze, A. Giannis, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 252-256.
- ⁶⁹³ J. A. Birrel, J. N. Desrosiers, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13872-13875.
- ⁶⁹⁴ G. O. Alah, J. Welch, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5396-5402.
- ⁶⁹⁵ Y. Li, D. Xue, C. Wang, Z. T. Liu, J. Xiao, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1320-1322.
- ⁶⁹⁶ G. Wang, Q. Y. Yu, J. Wang, S. Wang, S. Y. Chen, X. Q. Yu, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 21306-21310.
- ⁶⁹⁷ L. Horner, P. Kaiser, *Justus Liebigs Anal. Chem.* **1959**, *626*, 19-25.
- ⁶⁹⁸ I. Kanevsky, F. Chaminade, D. Ficheux, A. Moumen, R. Gorelick, M. Negroni, J. L. Darlix, P. Fossé, *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 1059-1077.
- ⁶⁹⁹ K. A. Wilkinson, E. J. Merino, K. M. Weeks, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1610-1616.
- ⁷⁰⁰ R. Ivanyi-Nagy, I. Kanevsky, C. Gabus, J. P. Lavergne, D. Ficheux, F. Penin, P. Fosse, J. L. Darlix, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2618-2633.
- ⁷⁰¹ T. Hiratsuka, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 13354-13358.
- ⁷⁰² T. Hiratsuka, *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *742*, 496-508.
- ⁷⁰³ A. R. Moorman, R. H. Abeles, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6785-6786.
- ⁷⁰⁴ D. Reinecke, F. Schwede, H. G. Genieser, R. Seifert, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54158.
- ⁷⁰⁵ M. Sekine, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 2321-2326.
- ⁷⁰⁶ T. S. Kumar, A. S. Madsen, J. Wengel, P. J. Hrdlicka, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 4188-4201.
- ⁷⁰⁷ S. Kataoka, J. Isono, N. Yamaji, M. Kato, *Chem. Lett.* **1986**, 1221-1223.
- ⁷⁰⁸ S. Kataoka, J. Imai, N. Yamaji, M. Kato, T. Kawada, S. Imai, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 1596-1600.
- ⁷⁰⁹ S. Kataoka, J. Isono, N. Yamaji, M. Kato, T. Kawada, S. Imai, *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 2212-2219.
- ⁷¹⁰ A. Zhang, K. Liu, C. Wang, S. Ma, Z. Li, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2005**, *719*, 149-152.
- ⁷¹¹ A. A. Arabi, C. F. Matta, *J. Phys. Chem. A* **2009**, *113*, 3360-3368.
- ⁷¹² P. J. Homan, A. Tandon, G. M. Rice, F. Ding, N. V. Dokholyan, K. M. Weeks, *Biochemistry* **2014**, *53*, 6825-6833.
- ⁷¹³ G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, *29*, 2176-2179.

PARTIE EXPERIMENTALE

GENERALITES ET APPAREILLAGE

Réactifs et solvants :

Sauf mention contraire, les solvants et réactifs commerciaux sont utilisés sans purification. Les réactions conduites en milieu anhydre sont réalisées sous atmosphère d'argon dans de la verrerie préalablement séchée à l'étuve. Le méthanol est préalablement séché sur tamis moléculaire de 3Å. Le tétrahydrofurane (THF), le diméthylformamide (DMF), le dichlorométhane, l'acétonitrile et le toluène sont préalablement séchés par passage sur cartouche d'alumine à l'aide d'un purificateur à solvants MBRAUN SPS-800. Les solvants utilisés sont des solvants de qualité spectroscopique.

Chromatographie :

Les analyses chromatographiques sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de silice sur aluminium F₂₅₄ (Merck ou MACHEREY-NAGEL). Les CCM sont ensuite visualisées sous la lampe UV à 254 nm et à 365 nm. Elles peuvent ensuite être trempées dans un révélateur chimique puis révélées par décomposition des substances à l'aide d'un décapeur thermique ($T_{\max} = 600^{\circ}\text{C}$).

Révélateur 1 : EtOH + 10% H₂SO₄.

Révélateur 2 : EtOH + 0,3% ninhydrine.

Les purifications par chromatographie sur colonne ont été effectuées avec de la silice de granulométrie 40-63 µm ou 70-200 µm (Carlo-Erba SDS ou MACHEREY-NAGEL).

Les purifications par chromatographie sur couche mince de type préparative ont été réalisées sur des plaques de silice sur verre SDS 20 x 20 cm d'épaisseur 0,2 cm. Les produits sont solubilisés dans un minimum de CH₂Cl₂ et sont déposés à l'aide d'un pinceau (pipette PASTEUR + laine de roche) ou à l'aide d'une seringue HAMILTON 100 µL.

Spectroscopie RMN :

Les spectres RMN ont été enregistrés sur le spectromètre JEOL ECS 400 (ENSC) avec une sonde large bande. Les fréquences d'irradiation du ¹H, du ¹³C, du ¹⁹F et du ³¹P sont respectivement de 399,78 MHz, 100,53 MHz, 376,142 MHz et 161,858 MHz.

Le déplacement chimique, noté δ , est exprimé en partie par million (ppm). Le TMS (0,00 ppm) est pris comme référence interne pour les spectres ¹H. Pour les spectres ¹³C, le pic résiduel du solvant est pris comme référence. Les constantes de couplage scalaire (J) sont données en Hertz (Hz).

L'attribution des signaux ¹H et ¹³C a été effectuée à l'aide des séquences 2D du type COSY, HMQC, HMBC et HetCor.

Les abréviations utilisées sont les suivantes : (s) singulet, (d) doublet, (dd) doublet dédoublé, (t) triplet, (q) quadruplet, (m) multiplet, (b) large.

Les pics résiduels de solvants trouvés sont déterminés en accord avec la table de Fulmer *et al.*⁷¹³

Spectroscopie MS et HRMS :

L'enregistrement des spectres de masse basse (MS) et haute résolution (HRMS) a été sous-traité dans d'autres laboratoires et a de ce fait été réalisé sur différents spectromètres dans différents services :

- Service de Spectrométrie de Masse de l'Université Pierre et Marie Curie : spectromètre Thermo LTQ-Orbitrap.

- East China University of Science and Technology : spectromètre MALDI Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer 72020, source ESI, ionisation positive.

- Institut de Chimie Organique et Analytique : spectromètre Bruker MALDI Q-TOF maXis, source ESI, ionisation positive.

- East China Normal University : spectromètre Bruker micrOTOF-Q II, source ESI, ionisation positive, traitement sous Bruker Compass DataAnalysis 4.0.

Les masses exactes ont été déterminées en accord avec les valeurs ci-dessous :

Élément	Masse exacte (g.mol ⁻¹)
¹² C	12,0000
¹ H	1,0078
¹⁴ N	14,0031
¹⁶ O	15,9949
³² S	31,9721
²³ Na	22,9898
³⁹ K	38,9637
⁷⁹ Br	78,9183
⁸¹ Br	80,9163

Les masses trouvées sont jugées acceptables lorsque l'écart par rapport aux masses calculées est inférieur à 5 ppm (valeur admise par les revues internationales à comité de lecture).

Polarimétrie

La détermination des pouvoirs rotatoires $[\alpha]_D^T$ a été effectuée sur un polarimètre JASCO P-2000 à la longueur d'onde de la raie D du sodium et à température ambiante. Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont obtenus grâce à la loi de Biot et Savart :

$$\alpha = [\alpha]_D^T \cdot l \cdot c, \text{ où } [\alpha]_\Delta \equiv A \cdot (\lambda'')^{-1}$$

Équation 1 : Loi de BIOT et SAVART. La température de travail est la température ambiante et la longueur d'onde de travail est celle de la raie D du sodium.

Avec :

- α , pouvoir rotatoire de la solution (°, degré) ;
- $[\alpha]_D$, pouvoir rotatoire spécifique de la substance dissoute à la longueur d'onde de la raie D du sodium (°.dm⁻¹.g⁻¹.cm³) et à la température T ;
- l, longueur du trajet dans la cellule de mesure (dm) ;

⁷¹³ G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics* **2010**, 29, 2176-2179.

- c , concentration massique de la solution ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) ;
- λ , longueur d'onde de la raie D du sodium (589 nm) ;
- A , coefficient de dispersion rotatoire.

Le pouvoir rotatoire spécifique est donné avec une concentration c exprimée en g/100 mL (unité admise par les revues internationales à comité de lecture). Ils ont été mesurés à la température ambiante (cuve non thermostatée).

Température de fusion

Les températures de fusion sont déterminées à l'aide d'un banc Kofler préalablement étalonné avec les références suivantes :

Références	T_f (°C)
Azobenzole	68,0
Benzile	95,0
Acétanilide	114,5
Phénacétine	134,5
Benzanilide	163,0
Salophène	191,0
Saccharine	228,0

La température de fusion des composés est déterminée soit sur un produit cristallisé soit sur un produit non cristallisé. L'état physique du composé est précisé dans les procédures détaillées.

Spectroscopie d'absorption UV-Visible et d'émission de fluorescence

Les spectres d'absorption UV-Visible ont été enregistrés sur un spectromètre Uvikon-940 KONTRON. Les spectres d'émission de fluorescence ont été enregistrés sur un spectromètre JOBIN-YVON Fluoromax 4. Les données sont traitées à l'aide des logiciels IGOR[®] Pro 5 et Microsoft Excel[®].

Spectroscopie IR

Les spectres infrarouge (IR) ont été réalisés sur un spectromètre à transformée de Fourier de marque « Thermo Electron Corporation » et de modèle « Nexus » équipé d'un réfractomètre ATR (*Attenuated Total Reflectance*) avec germanium. Les enregistrements ont été réalisés avec le logiciel OMNIC et les nombres d'ondes sont exprimés en cm^{-1} . Les signaux situés dans l'empreinte digitale (sous 1400 cm^{-1}) n'ont pas été indiqués.

Modélisation

Les modélisations de mécanique moléculaire ont été effectuées avec le logiciel Hyperchem 8.0 sur un ordinateur Intel Core i3. Le champ de force AMBER a été utilisé avec le jeu de paramètres Amber2 et les options suivantes :

Force field options

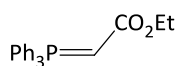
Dielectric (Epsilon)	Distance dependant Scale factor : 1
1,4 Scale factors	Electrostatic : 0,5 Van der Waals : 0,5
Cutoffs	none

Les modélisations quantiques des molécules ont été effectuées avec le logiciel Gaussian (Gaussian 09, Revision D.01) au Meso-centre de l'ENS de Cachan (calculateur équipé de 24 processeurs Intel Xeon E5-4617 2,90 GHz). Les résultats ont été visualisés avec le logiciel Gaussview (version 5.0). Les géométries ont été optimisées avec les méthodes de la densité de la fonctionnelle hybride B3LYP dans différentes bases. La plupart des modélisations a été effectuée dans le vide sauf mention contraire, auquel cas le modèle IEFPCM a été utilisé. Les représentations des orbitales et les énergies associées ont été extraites de ces calculs. Au sein d'une même famille, les orbitales moléculaires sont représentées avec la même valeur d'isodensité.

A chaque fois, des calculs de fréquence ont été réalisés pour confirmer l'obtention d'une géométrie correspondant à un minimum d'énergie.

Synthesis of reagents

Ethyl 2-(triphenylphosphoranylidene)acetate I1



Formula: C₂₂H₂₁O₂P

MW: 348 g/mol

To a solution of PPh₃ (3.14 g, 0.0120 mmol, 1.0 eq.) in toluene (8.0 mL) was added dropwise ethylbromoacetate (1.33 mL, 0.0120 mol, 1.0 eq.) at RT. After stirring for 2 hours at RT, the precipitate was filtered, washed with cold toluene and cyclohexane and finally dissolved in water (40 mL). The aqueous solution was washed with Et₂O (40 mL). A 2 M NaOH solution was slowly added at 0°C until pH 9. The precipitate was filtered to give 2.94 g of the titled compound as a white solid (yield = **70%**).

R_f: 0.35 (EA/PE 2/8).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.14 (s (b), 3H, CH₃), 2.88 (s (b), 1H, CH), 3.87 (s (b), 2H, CH₂), 7.13-7.70 (m, 15H, H^{Ph}).

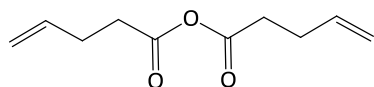
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 14.9 (CH₃), 30.9 (CH), 57.9 (CH₂), 129.5, 129.6, 132.8, 133.7, 133.8 (C_q^{Ph} + CH^{Ph}).

RMN ³¹P (CDCl₃, 162 MHz): δ 18.4.

MP: 124°C (*lit*: 124-126°C).

IR (ATR): 2979, 2901, 1691, 1606, 1599, 1518, 1483, 1437 cm⁻¹.

Reference: R. W. Lang, H. J. Hansen, *Org. Synth.* **1984**, 62, 202.

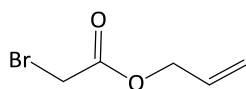
Pent-4-enoic anhydride 12**Formula:** C₁₀H₁₄O₃**MW:** 182 g/mol

To a solution of pent-4-enoic acid (1 mL, 9.80 mmol, 2.0 eq.) in CH₂Cl₂ (20 mL) was added DCC (1.01 g, 4.90 mmol, 1.0 eq.). The resulting mixture was stirred for 48 hours at RT. The white precipitate was removed by filtration and the filtrate was concentrated under reduced pressure to give the corresponding anhydride (980 mg, **quant.**) as a colorless oil.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.36-2.46 (m, 4H, CH₂), 2.55 (t, 4H, *J* = 7.5 Hz, CH₂CO), 4.98-5.10 (m, 4H, CH₂=), 5.76-5.87 (m, 2H, CH=).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 28.2 (CH₂), 34.6 (CH₂), 116.3 (CH₂=), 135.8 (CH=), 168.8 (CO).

Reference: U. Ellervik, G. Magnusson, *Acta Chem. Scand.* **1993**, 47, 826-828.

Allyl 2-bromoacetate I3**Formula:** C₅H₇BrO₂**MW:** 179 g/mol

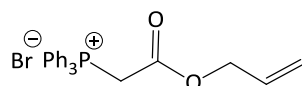
Bromoacetyl bromide (6.0 mL, 68.8 mmol, 1.0 eq.) was dissolved in CH₂Cl₂ (60 mL) and cooled to 0°C. Pyridine (5.80 mL, 71.8 mmol, 1.04 eq.) and allyl alcohol (4.89 mL, 71.9 mmol, 1.05 eq.) were successively added to the reaction mixture. After 16 hours, aqueous NaHCO₃ solution was added and the mixture was extracted with EA (3 X 50 mL). The combined organic layers were washed with brine (70 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to afford allyl 2-bromoacetate (11.6 g, yield = **95%**) as a light yellowish oil.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 3.83 (s, 2H, CH₂Br), 4.64 (dt, 2H, *J* = 6.0 Hz, 1.4 Hz, OCH₂), 5.24-5.36 (m, 2H, CH₂), 5.84-5.90 (m, 1H, CH=).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.8 (CH₂Br), 66.8 (OCH₂), 119.2 (CH₂=), 131.3 (CH=), 166.9 (CO^{ester}).

IR (ATR): 2985, 2901, 1740, 1644, 1494, 1453, 1409 cm⁻¹.

Reference: T. Hoye, J. Jeon, L. Kopel, T. Ryba, M. Tennakoon, Y. Wang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *35*, 6151-6155.

2-(Allyloxy)-2-oxoethyltriphenylphosphonium bromide 14**Formula:** C₂₃H₂₂BrO₂P**MW:** 441 g/mol

A mixture of triphenylphosphine (17.0 g, 64.8 mmol, 1.0 eq.) and allyl 2-bromoacetate (11.6 g, 64.8 mmol, 1.0 eq.) dissolved in the minimum amount of dry toluene, was stirred at RT for 4 hours to produce a beige solid which was removed by suction filtration and washed with toluene (27.04 g, yield = **95%**).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.44-4.47 (m, 2H, OCH₂), 5.10-5.17 (m, 2H, CH₂=), 5.57-5.66 (m, 3H, CH= + CH₂P⁺), 7.62-7.91 (m, 15H, H^{Ph}).

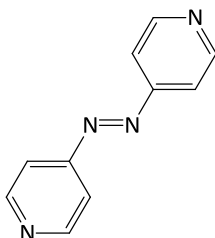
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 33.5 (d, J = 229 Hz, CH₂P⁺), 67.4 (OCH₂), 119.9 (CH₂=), 130.3, 130.4, 130.6, 134.1, 134.2, 135.2 (CH^{Ph} + C_q^{Ph} + CH=), 164.5 (CO^{ester}).

RMN ³¹P (CDCl₃, 100 MHz): δ 21.6.

MP: 136°C.

IR (ATR): 3010, 2907, 2825, 2758, 1721, 1683, 1650, 1621, 1586 cm⁻¹.

Reference: F. Castañeda, C. Aliaga, C. Acuña, P. Silva, C. A. Bunton, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2008**, *5*, 1188-1208.

4,4'-Azopyridine I5**Formula:** C₁₀H₈N₄**MW:** 184 g/mol

A cold solution of 4-aminopyridine (2.5 g, 26.6 mmol, 1.0 eq.) in cold water (100 mL) was added dropwise to 200 mL of a 9.6% NaOCl solution (271 mmol, 5.1 eq.). The mixture was stirred at 0°C for 10 minutes as an orange precipitate formed. The precipitate was filtered and purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 7/3) to give the corresponding azopyridine as a red orange powder (837 mg, yield = **34%**).

R_f: 0.32 (EA/PE 7/3).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.71-7.73 (m, 4H, H^{Ar}), 8.83-8.85 (m, 4H, H^{Ar}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 116.4 (CH^{Ar}), 151.7 (CH^{Ar}), 156.7 (C_q^{Ar}).

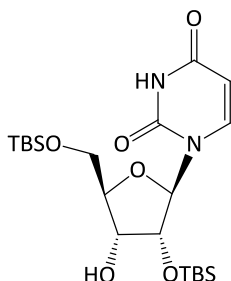
MP: 107 °C (*lit.*: 107-108°C).

IR (ATR): 2972, 2902, 1619, 1588, 1565, 1490, 1413 cm⁻¹.

Reference: N. Iranpoor, H. Firouzabadi, D. Khalili, S. Motevalli, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4882-4887.

Synthesis starting from uridine

2',5'-Di-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U1



Formula: C₂₁H₄₀N₂O₆Si₂

MW: 472 g/mol

To a solution of silver nitrate (6.27 g, 0.0369 mol, 3.0 eq.) in anhydrous pyridine (15 mL) was added under argon a solution of uridine (3.00 g, 0.0123 mol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (70 mL). The reaction mixture was stirred for 10 minutes and TBSCl (5.59 g, 0.0371 mol, 3.0 eq.) was added. The reaction mixture was stirred for 1 hour at RT and then passed through celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (silica gel, PE/EA 85/15) to give 4.66 g of the titled compound **U1** as colorless gum (yield = **81%**), 3',5'-di-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine **U2** (254 mg, 5%) as a white gum and 2',3',5'-tri-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine **U3** (608 mg, 9%) as a yellow oil.

R_f: 0.71 (EA/PE 5/5, revelation 1).

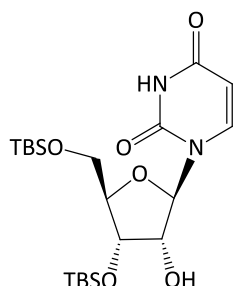
[α]_D: + 21.8 (c = 1.0, CHCl₃).

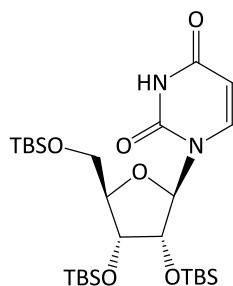
RMN ¹H (acetone-d₆, 400 MHz): δ 0.11 (s, 6H, CH₃^{TBS}), 0.16 (s, 6H, CH₃^{TBS}), 0.91 (s, 9H, tBu^{TBS}), 0.96 (s, 9H, tBu^{TBS}), 3.83 (d, 1H, J = 5.0 Hz, OH), 3.90 (dd, 1H, J = 11.7, 2.0 Hz, H_{5'a}), 4.00 (dd, 1H, J = 11.7, 2.0 Hz, H_{5'b}), 4.08 (m, 1H, H_{4'}), 4.18 (dd, 1H, J = 5.0, 4.5 Hz, H_{3'}), 4.30 (t, 1H, J = 4.5 Hz, H_{2'}), 5.60 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₅), 5.94 (d, 1H, J = 4.5 Hz, H_{1'}), 7.95 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₆), 10.08 (s (b), 1H, NH).

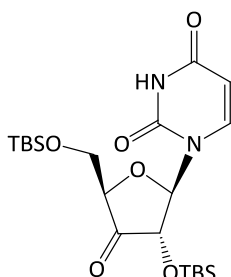
RMN ¹³C (acetone-d₆, 100 MHz): δ - 5.3 (CH₃^{TBS}), - 4.6 (CH₃^{TBS}), 18.8 (C_q^{TBS}), 19.1 (C_q^{TBS}), 26.2 (tBu^{TBS}), 26.5 (tBu^{TBS}), 63.7 (C_{5'}), 71.2 (C_{4'}), 77.4 (C_{2'}), 85.6 (C_{3'}), 89.4 (C_{1'}), 102.6 (C₅), 140.8 (C₆), 151.5 (C₂), 163.6 (C₄).

IR (ATR): 3661, 2957, 2929, 2901, 1691, 1462 cm⁻¹.

Reference: F. Hansske, D. Madej, M. J. Robins, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 125-135.

3',5'-Di-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U2**Formula:** C₂₁H₄₀N₂O₆Si₂**MW:** 472 g/mol**R_f:** 0.54 (EA/PE 5/5, revelation 1).**[α]_D:** + 0.600 (c = 1.0, CHCl₃).**RMN ¹H** (*acetone-d₆*, 400 MHz): δ 0.11 (s, 6H, CH₃^{TBS}), 0.12 (s, 6H, CH₃^{TBS}), 0.89 (s, 9H, tBu^{TBS}), 0.91 (s, 9H, tBu^{TBS}), 3.82 (dd, 1H, J = 11.5, 2.3 Hz, H_{5'a}), 3.94 (dd, 1H, J = 11.5, 3.3 Hz, H_{5'b}), 4.01 (m, 1H, H_{4'}), 4.13 (d, 1H, J = 5.9 Hz, OH), 4.19 (m, 1H, H_{2'}), 4.32 (m, 1H, H_{3'}), 5.53 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H₅), 5.90 (d, 1H, J = 4.6 Hz, H_{1'}), 7.79 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H₆), 10.06 (s (b), 1H, NH).**RMN ¹³C** (*acetone-d₆*, 400 MHz): δ - 5.2 (CH₃^{TBS}), - 4.6 (CH₃^{TBS}), - 4.3 (CH₃^{TBS}), 18.9 (C_q^{TBS}), 19.1 (C_q^{TBS}), 26.3 (tBu^{TBS}), 26.4 (tBu^{TBS}), 63.3 (C_{5'}), 72.5 (C_{3'}), 75.5 (C_{2'}), 85.8 (C_{4'}), 89.6 (C_{1'}), 102.6 (C₅), 141.0 (C₆), 151.6 (C₂), 163.6 (C₄).**IR (ATR):** 3661, 2954, 2928, 2857, 1699, 1462 cm⁻¹.**Reference:** F. Hansske, D. Madej, M. J. Robins, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 125-135.

2',3',5'-Tri-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U3**Formula:** C₂₇H₅₄N₂O₆Si₃**MW:** 586 g/mol**R_f:** 0.89 (EA/PE 5/5, revelation 1).**[α]_D:** + 21.9 (c = 1.0, CHCl₃).**RMN ¹H** (acetone-d₆, 400 MHz): δ 0.08 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.09 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.12 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.13 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.14 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.16 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.85 (s, 9H, tBu^{TBS}), 0.91 (s, 9H, tBu^{TBS}), 0.95 (s, 9H, tBu^{TBS}), 3.86 (m, 1H, H_{5'a}), 4.00 (m, 2H, H_{5'b} + H_{3'} or H_{4'}), 4.26 (m, 2H, H_{2'} + H_{3'} or H_{4'}), 5.57 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H₅), 5.92 (d, 1H, J = 5.1 Hz, H_{1'}), 7.90 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H₆), 10.03 (s (b), 1H, NH).**RMN ¹³C** (acetone-d₆, 400 MHz): δ - 5.2 (CH₃^{TBS}), - 5.1 (CH₃^{TBS}), - 4.4 (CH₃^{TBS}), - 4.3 (CH₃^{TBS}), - 4.0 (CH₃^{TBS}), - 3.1 (CH₃^{TBS}), 18.7 (C_q^{TBS}), 18.8 (C_q^{TBS}), 19.2 (C_q^{TBS}), 26.3 (tBu^{TBS}), 26.4 (tBu^{TBS}), 26.5 (tBu^{TBS}), 63.5 (C_{5'}), 72.8, 77.6, 86.0 (C_{2'} + C_{3'} + C_{4'}), 90.0 (C_{1'}), 102.7 (C₅), 140.9 (C₆), 151.5 (C₂), 163.5 (C₄).**IR (ATR):** 3661, 2955, 2929, 2858, 1699, 1462 cm⁻¹.**Reference:** F. Hansske, D. Madej, M. J. Robins, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 125-135.

3'-Oxo-2',5'-di-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U4**Formula:** C₂₁H₃₈N₂O₆Si₂**MW:** 470 g/mol

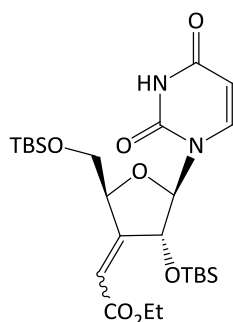
To a solution of 2',5'-di-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine **U1** (850 mg, 1,80 mmol, 1.0 eq.) in dichloromethane (15 mL) at 0°C were added KBr (21 mg, 0.176 mmol, 0.10 eq.), 6.7 mL of a 5% NaHCO₃ aqueous solution, TEMPO (281 mg, 1.80 mmol, 1.0 eq.). 1.7 mL of bleach (NaOCl 9.6% w/w) was added slowly enough to note a dark brown color. The reaction mixture was stirred for 1 hour at 0°C and then 0.75 mL of bleach (NaOCl 9.6% w/w) was slowly added at 0°C. The reaction mixture was stirred for 30 minutes at 0°C and for 30 minutes at RT. After separation, the organic layer was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 1/9 and then 2/8) to give 778 mg of the expected ketone **U4** as a white solid (yield = **92%**).

R_f: 0.35 (EA/PE 2/8, revelation 1).**[α]_D:** + 122 (c = 1.0, CHCl₃).

RMN ¹H (acetone-*d*₆, 400 MHz): δ 0.04 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.10 (s, 6H, CH₃^{TBS}), 0.13 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.87 (s, 9H, *t*Bu^{TBS}), 0.92 (s, 9H, *t*Bu^{TBS}), 3.92-4.00 (m, 2H, H_{5'}), 4.30 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{2'}), 4.42-4.44 (m, 1H, H_{4'}), 5.80 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₅), 6.26 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H_{1'}), 7.85 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₆), 10.25 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (acetone-*d*₆, 100 MHz): δ - 5.4 (CH₃^{TBS}), - 5.3 (CH₃^{TBS}), - 5.0 (CH₃^{TBS}), - 4.4 (CH₃^{TBS}), 18.9 (C_q^{TBS}), 19.0 (C_q^{TBS}), 25.9 (*t*Bu^{TBS}), 26.4 (*t*Bu^{TBS}), 63.9 (C_{5'}), 78.1 (C_{2'}), 83.0 (C_{4'}), 85.7 (C_{1'}), 104.2 (C₅), 139.9 (C₆), 151.2 (C₂), 163.1 (C₄), 209.3 (C_{3'}).

MP: 160 °C.**IR (ATR):** 3675, 2988, 2901, 1767, 1701, 1688, 1460, 1407 cm⁻¹.**Reference:** F. Hansske, D. Madej, M. J. Robins, *Tetrahedron* **1984**, *40*, 125-135.

3'-Deoxy-3'-(ethoxycarbonylmethylene)-2',5'-di-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U5**Formula:** C₂₅H₄₄N₂O₇Si₂**MW:** 540 g/mol

To a solution of 3'-oxo-2',5'-di-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine **U4** (2.00 g, 4.25 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (50 mL) was added at RT Ph₃PCHCO₂Et (2.20 g, 6.32 mmol, 1.5 eq.). After stirring for 36 hours at RT, the reaction mixture was concentrated and the residue was dissolved in EA (50 mL). The organic phase was washed with sat. NaHCO₃ solution (50 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 15/85) to give 1.78 g of the corresponding α,β-insaturated ester **U5** as a white solid (yield = **77%**).

R_f: 0.27 (EA/PE 2/8, revelation 1).

[α]_D: + 39.5 (c = 1.1, acetone).

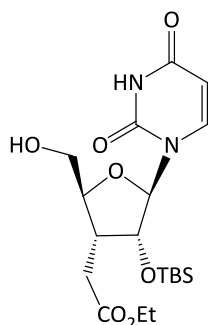
RMN ¹H (acetone-*d*₆, 400 MHz): δ -0.01 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.10 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.11 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.12 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.92 (s, 9H, tBu^{TBS}), 0.93 (s, 9H, tBu^{TBS}), 1.28 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₃^{ester}), 3.99 (d, 1H, J = 11.1 Hz, H_{5'a}), 4.19-4.25 (m, 3H, CH₂^{ester} + H_{5'b}), 4.78 (d, 1H, J = 7.8 Hz, H_{2'}), 5.36 (s, 1H, H_{4'}), 5.77 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H₅), 5.92-5.95 (m, 2H, H_{1'} + =CH), 7.96 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H₆), 10.23 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (acetone-*d*₆, 100 MHz): δ - 5.3 (CH₃^{TBS}), - 5.2 (CH₃^{TBS}), - 4.6 (CH₃^{TBS}), - 4.4 (CH₃^{TBS}), 14.7 (CH₃^{ester}), 18.6 (C_q^{TBS}), 19.1 (C_q^{TBS}), 26.1 (tBu^{TBS}), 26.6 (tBu^{TBS}), 60.7 (CH₂^{ester}), 61.3 (C_{5'}), 77.7 (C_{2'}), 80.9 (C_{4'}), 86.4 (C_{1'}), 104.0 (C₅), 114.6 (=CH), 140.2 (C₆), 151.6 (C₂), 160.4 (C_{3'}), 163.3 (C₄), 165.7 (CO^{ester}).

MP: 147°C.

IR (ATR): 3676, 2964, 2927, 1707, 1689, 1453 cm⁻¹.

Reference: M. A. Peterson, B. L. Nilsson, S. Sarker, B. Doboszewski, W. Zhan, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8183-8192.

3'-Deoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U6**Formula:** C₁₉H₃₂N₂O₇Si**MW:** 429 g/mol

To a solution of the α,β -unsaturated ester **U5** (1.80 g, 3.33 mmol, 1.0 eq.) in a 1% (v/v) methanolic solution of acetic acid was added Pd/C (10% w/w) (178 mg, 0.167 mmol, 0.050 eq.). H₂ was bubbled in the reaction mixture for 12 h. The reaction mixture was passed through celite and the filtrate was concentrated. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 3/7 and then 65/35) to give 1.12 g of the alcohol **U6** as white crystals (yield = **79%**).

R_f: 0.30 (EA/PE 7/3, revelation 1).

[α]_D: + 51.5 (c = 1.4, acetone).

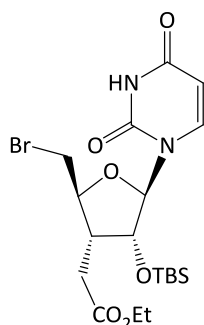
RMN ¹H (acetone-*d*₆, 400 MHz): δ 0.04 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.20 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.86 (s, 9H, tBu^{TBS}), 1.16 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃^{ester}), 2.40 (d, 1H, *J* = 12.4 Hz, CH_{2a}CO), 2.53 (d, 1H, *J* = 12.4 Hz, CH_{2b}CO), 2.56-2.59 (m, 1H, H_{3'}), 3.75 (m, 1H, H_{4'}), 3.94-3.99 (m, 2H, H_{5'}), 4.04 (q, 2H, *J* = 7.1 Hz, CH₂^{ester}), 4.35 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz, OH), 4.46 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz, H_{2'}), 5.49 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 5.63 (s, 1H, H_{1'}), 8.28 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₆), 10.06 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (acetone-*d*₆, 100 MHz): δ - 5.4 (CH₃^{TBS}), - 4.1 (CH₃^{TBS}), 14.6 (CH₃^{ester}), 18.7 (C_q^{TBS}), 26.3 (tBu^{TBS}), 29.9 (CH₂CO), 38.1 (C_{3'}), 60.8, 61.1 (CH₂^{ester} + C_{5'}), 79.0 (C_{2'}), 85.7 (C_{4'}), 92.3 (C_{1'}), 101.5 (C₅), 141.2 (C₆), 151.5 (C₂), 164.0 (C₄), 172.6 (CO^{ester}).

MP: 149°C.

IR (ATR): 3676, 2987, 2901, 1678, 1471 cm⁻¹.

Reference: M. A. Peterson, B. L. Nilsson, S. Sarker, B. Doboszewski, W. Zhan, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8183-8192.

5'-Bromo-3',5'-dideoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U7

Formula: C₁₉H₃₁BrN₂O₆Si

MW: 490 g/mol

To a solution of the alcohol **U6** (320 mg, 0.746 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DMF (25 mL) were added at 0°C PPh₃ (686 mg, 2.62 mmol, 3.5 eq.) and NBS (333 mg, 1.87 mmol, 2.5 eq.). The yellow reaction mixture was heated at 50°C overnight. After concentration under reduced pressure, the residue was dissolved in sat. NaHCO₃ solution (20 mL). The aqueous phase was extracted with EA (3 X 20 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 1/9 followed by 35/65) to give the bromo derivative **U7** as a colorless oil (148 mg, yield = **40%**).

R_f: 0.61 (EA/PE 6/4, revelation 1).

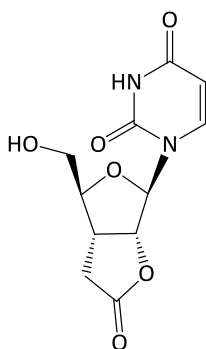
[α]_D: + 38.1 (c = 0.8, acetone).

RMN ¹H (acetone-*d*₆, 400 MHz): δ 0.08 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.19 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.91 (s, 9H, *t*Bu^{TBS}), 1.21 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃^{ester}), 2.49-2.71 (m, 3H, H_{3'} + CH₂CO), 3.82 (dd, 1H, *J* = 11.5, 5.9 Hz, H_{5'a}), 3.96 (dd, 1H, *J* = 11.5, 2.9 Hz, H_{5'b}), 4.11 (q, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂^{ester}), 4.22-4.26 (m, 1H, H_{4'}), 4.63 (dd, 1H, *J* = 5.0, 1.8 Hz, H_{2'}), 5.66 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 5.77 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H_{1'}), 7.80 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₆), 10.12 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (acetone-*d*₆, 100 MHz): δ - 5.3 (CH₃^{TBS}), - 4.1 (CH₃^{TBS}), 14.7 (CH₃^{ester}), 18.7 (C_q^{TBS}), 26.4 (*t*Bu^{TBS}), 30.4 (CH₂CO), 34.9 (C_{5'}), 42.1 (C_{3'}), 61.2 (CH₂^{ester}), 78.4 (C_{2'}), 83.1 (C_{4'}), 92.5 (C_{1'}), 101.4 (C₅), 140.8 (C₆), 151.5 (C₂), 164.0 (C₄), 172.6 (CO^{ester}).

IR (ATR): 3371, 2963, 1691, 1679, 1658, 1642, 1607, 1510, 1469 cm⁻¹.

MS (ESI-HRMS): *m/z* calculated for C₁₉H₃₁BrN₂O₆Si [M+Na]⁺: 513.1027, found: 513.1121 (⁷⁹Br) and 515.1007, found 515.1106 (⁸¹Br).

3'-(Carboxymethyl)-3'-deoxyuridine-2',3'-lactone U8**Formula:** C₁₁H₁₂N₂O₆**MW:** 268 g/mol

To a solution of 3'-deoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-2'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)uridine **U6** (50 mg, 0.117 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DMF (1.0 mL) were added at RT PPh₃ (62 mg, 0.236 mmol, 2.0 eq.) and CBr₄ (78 mg, 0.235 mmol, 2.0 eq.). The yellow reaction mixture was stirred at RT for 36 hours and then heated at 90°C for 6 hours. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (silica gel, pure EA) to give 27 mg of the lactone **U8** as a white solid (yield = 86%).

R_f: 0.23 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1, revelation 1).

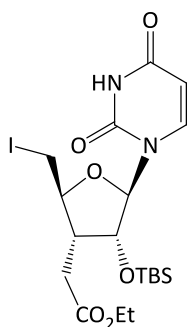
[α]_D: - 39.0 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (*acetone-d*₆, 400 MHz): δ 2.48 (d, 1H, *J* = 18.3 Hz, CH_{2a}CO), 2.86 (dd, 1H, *J* = 18.3, 8.6 Hz, CH_{2b}CO), 3.37 (m, 1H, H_{3'}), 3.78-3.84 (m, 1H, H_{5'a}), 3.90-3.95 (m, 1H, H_{5'b}), 3.99-4.08 (m, 1H, H_{4'}), 4.24 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz, OH), 5.19 (dd, 1H, *J* = 6.8, 0.9 Hz, H_{2'}), 5.59 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H₅), 5.96 (d, 1H, *J* = 0.9 Hz, H_{1'}), 7.81 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, H₆), 10.12 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (*acetone-d*₆, 100 MHz): δ 32.5 (CH₂CO), 40.0 (C_{3'}), 62.1 (C_{5'}), 87.4 (C_{4'}), 88.7 (C_{2'}), 91.9 (C_{1'}), 102.0 (C₅), 142.3 (C₆), 151.2 (C₂), 163.3 (C₄), 175.6 (CO^{lactone}).

IR (ATR): 2988, 2959, 2924, 2856, 1774, 1726, 1690, 1464 cm⁻¹.

Reference: M. A. Peterson, B. L. Nilsson, S. Sarker, B. Doboszewski, W. Zhan, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8183-8192.

3',5'-Dideoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-5'-iodo-2'-O-(tert-butyl dimethylsilyl)uridine U10**Formula:** C₁₉H₃₁IN₂O₆Si**MW:** 538 g/mol

To a solution of 3'-deoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-2'-O-(tert-butyl dimethylsilyl)uridine **U6** (100 mg, 0.233 mmol, 1.0 eq.) in DMF (1.0 mL) were added at 0°C PPh₃ (215 mg, 0.819 mmol, 3.5 eq.) and NIS (131 mg, 0.582 mmol, 2.5 eq.). The yellow reaction mixture was heated at 50°C overnight and then concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in EA (5 mL) and washed with sat. NaHCO₃ solution (5 mL). After separation, the aqueous phase was extracted with EA (5 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated. The mixture was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 1/9 and then 35/65) to give the iodo derivative **U10** as a yellow oil (92 mg, yield = **73%**).

R_f: 0.65 (EA/PE 6/4, revelation 1).

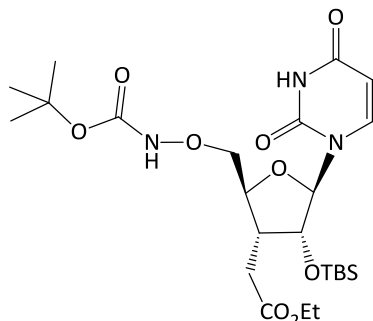
[α]_D: + 79.2 (c = 1.0, acetone).

RMN ¹H (acetone-*d*₆, 400 MHz): δ 0.07 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.18 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.91 (s, 9H, tBu^{TBS}), 1.22 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃^{ester}), 2.38-2.44 (m, 1H, H_{3'}), 2.53-2.70 (m, 2H, CH₂CO), 3.57 (dd, 1H, *J* = 12.5, 7.3 Hz, H_{5'a}), 3.75 (dd, 1H, *J* = 12.5, 2.9 Hz, H_{5'b}), 3.96-4.00 (m, 1H, H_{4'}), 4.10 (q, 2H, *J* = 7.3 Hz, CH₂^{ester}), 4.64 (dd, 1H, *J* = 5.5, 1.8 Hz, H_{2'}), 5.66 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 5.78 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, H_{1'}), 7.76 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₆), 10.17 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (acetone-*d*₆, 100 MHz): δ - 5.5 (CH₃^{TBS}), - 4.4 (CH₃^{TBS}), 7.6 (C_{5'}), 14.4 (CH₃^{ester}), 18.5 (C_q^{TBS}), 26.1 (tBu^{TBS}), 30.2 (CH₂CO), 44.8 (C_{3'}), 61.0 (CH₂^{ester}), 78.5 (C_{2'}), 82.9 (C_{4'}), 91.2 (C_{1'}), 102.5 (C₅), 140.9 (C₆), 151.2 (C₂), 163.3 (C₄), 172.2 (CO^{ester}).

IR (ATR): 2958, 1721, 1710, 1691, 1679, 1461 cm⁻¹.

Reference: M. A. Peterson, B. L. Nilsson, S. Sarker, B. Doboszewski, W. Zhan, M. J. Robins, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 8183-8192.

3'-Deoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-5'-O-(N-tert-butoxycarbonyl)amino-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)-uridine U9Formula: C₂₄H₄₁N₃O₉Si

MW: 543 g/mol

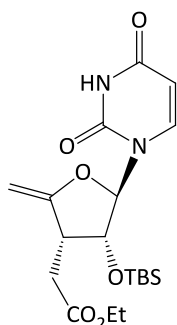
To a solution of 3',5'-dideoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-5'-iodo-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine **U10** (71 mg, 0.132 mmol, 1.0 eq.) and BocNH₂OH (44 mg, 0.331 mmol, 2.5 eq.) in CH₂Cl₂ (10 mL) was slowly added at 0°C DBU (99 μL, 0.662 mmol, 5 eq.). After stirring overnight at RT, the reaction mixture was concentrated and the residue was dissolved in EA (15 mL), washed with water (10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated. The mixture was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 4/6) to give 37 mg of the titled compound **U9** as colorless oil (yield = **51%**). The side product **U11** (9 mg, 17%) resulting from the elimination was also obtained as a colorless oil.

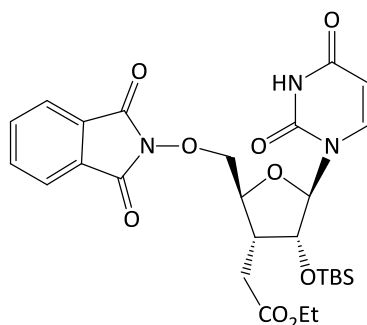
R_f: 0.56 (EA/PE 5/5, revelation 1).[α]_D: + 56.5 (c = 1.1, acetone).

RMN ¹H (acetone-*d*₆, 400 MHz): δ 0.09 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.23 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.91 (s, 9H, tBu^{TBS}), 1.20 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz, CH₃^{ester}), 1.45 (s, 9H, tBu^{Boc}), 2.59-2.64 (m, 3H, CH₂ + H_{3'}), 4.08-4.15 (m, 3H, CH₂^{ester} + H_{5'a}), 4.18-4.22 (m, 1H, H_{4'}), 4.27 (dd, 1H, *J* = 11.0, 1.8 Hz, H_{5'b}), 4.56 (dd, 1H, *J* = 3.2 Hz, H_{2'}), 5.56 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 5.66 (m, 1H, H_{1'}), 8.15 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₆), 9.23 (s (b), 1H, NH^{Boc}), 10.08 (s (b), 1H, NH^U).

RMN ¹³C (acetone-*d*₆, 100 MHz): δ - 5.4 (CH₃^{TBS}), - 4.0 (CH₃^{TBS}), 14.6 (CH₃^{ester}), 18.7 (C_q^{TBS}), 26.3 (tBu^{TBS}), 28.5 (tBu^{Boc}), 29.9 (CH₂CO), 38.9 (C_{3'}), 61.1 (CH₂^{ester}), 75.2 (C_{5'}), 78.4 (C_{2'}), 81.4 (C_q^{Boc}), 82.9 (C_{4'}), 92.7 (C_{1'}), 101.8 (C₅), 141.3 (C₆), 151.5 (C₂), 157.6 (CO^{Boc}), 163.9 (C₄), 172.3 (CO^{ester}).

IR (ATR): 3657, 3204, 2987, 2901, 1684, 1462 cm⁻¹.**MS (ESI-HRMS):** m/z calculated for C₂₄H₄₁N₃O₉Si [M+Na]⁺: 566.2504, found: 566.2565.

3',5'-Dideoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-5'-methylene-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U11**Formula:** C₁₉H₃₀N₂O₆Si**MW:** 411 g/mol**R_f:** 0.63 (EA/PE 5/5, revelation 1).**[α]_D:** + 66.0 (c = 0.5, CHCl₃).**RMN ¹H** (*acetone-d*₆, 400 MHz): δ 0.10 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.23 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.89 (s, 9H, tBu^{TBS}), 1.22 (t, 3H, J = 7.3 Hz, CH₃^{ester}), 2.69 (m, 2H, CH₂CO), 3.18 (m, 1H, H_{3'}), 4.08-4.16 (m, 3H, CH₂^{ester} + H_{5'a}), 4.54 (dd, 1H, J = 11.0, 2.3 Hz, H_{5'b}), 4.65 (d, 1H, J = 5.0 Hz, H_{2'}), 5.67 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H₅), 5.89 (s, 1H, H_{1'}), 7.37 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H₆), 10.21 (s (b), 1H, NH).**RMN ¹³C** (*acetone-d*₆, 100 MHz): δ - 5.5 (CH₃^{TBS}), - 4.3 (CH₃^{TBS}), 14.5 (CH₃^{ester}), 18.5 (C_q^{TBS}), 26.1 (tBu^{TBS}), 31.5 (CH₂CO), 40.2 (C_{3'}), 61.1 (CH₂^{ester}), 76.0 (C_{2'}), 84.1 (C_{5'}), 92.6 (C_{1'}), 102.8 (C₅), 139.4 (C₆), 151.1 (C₂), 163.5, 163.9 (C_{4'} + C₄), 172.1 (CO^{ester}).**IR (ATR):** 3192, 2960, 2930, 2858, 1722, 1711, 1679, 1636, 1462, 1552 cm⁻¹.**MS (ESI-HRMS):** m/z calculated for C₁₉H₃₀N₂O₆Si [M+H]⁺: 411.1946, found: 411.1945.

3'-Deoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-5'-O-phthalimido-2'-O-(tert-butyl dimethylsilyl)uridine U14Formula: C₂₇H₃₅N₃O₉Si

MW: 574 g/mol

To a solution of the iodo derivative **U10** (1.63 g, 3.03 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DMF (20 mL) was added PhthNOH (1.04 g, 6.37 mmol, 2.1 eq.) and Et₃N (820 μL, 6.07 mmol, 2.0 eq.) at 0°C. The red reaction mixture was stirred for 5 days at RT. After addition of water and filtration, the titled compound **U14** was obtained as a white solid (1.09 g, yield = **63%**).

R_f: 0.56 (EA/PE 5/5, revelation 1).

[α]_D: + 168 (c = 0.5, CHCl₃).

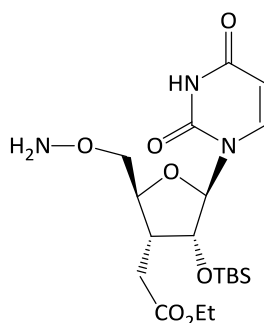
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.09 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.23 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.91 (s, 9H, tBu^{TBS}), 1.27 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₃^{ester}), 2.54 (m, 1H, CH_{2a}CO), 2.70 (m, 2H, CH_{2b}CO + H_{3'}), 4.16 (q, 2H, J = 7.1 Hz, CH₂^{ester}), 4.30 (m, 1H, H_{2'}), 4.48-4.51 (dd, 1H, J = 10.5, 3.2 Hz, H_{5'a}), 4.56-4.58 (m, 2H, H_{4'} + H_{5'b}), 5.70 (s, 1H, H_{1'}), 5.76 (dd, 1H, J = 8.2, 2.3 Hz, H₅), 7.77-7.80 (m, 2H, H^{Phth}), 7.84-7.87 (m, 2H, H^{Phth}), 8.16 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₆), 8.27 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ - 5.6 (CH₃^{TBS}), - 4.4 (CH₃^{TBS}), 14.2 (CH₃^{ester}), 18.8 (C_q^{TBS}), 25.9 (tBu^{TBS}), 29.2 (CH₂CO), 36.9 (C_{3'}), 60.7 (CH₂^{ester}), 76.2 (C_{5'}), 77.4 (C_{4'}), 81.9 (C_{2'}), 92.0 (C_{1'}), 101.2 (C₅), 123.8 (CH^{Phth}), 128.8 (C_q^{Phth}), 134.9 (CH^{Phth}), 140.0 (C₆), 150.0 (C₂), 161.4 (C₄ + CO^{Phth}), 171.9 (CO^{ester}).

MP: 210°C.

IR (ATR): 3665, 2988, 2971, 2901, 1774, 1736, 1679, 1460, 1451, 1402 cm⁻¹.

MS (ESI-HRMS): m/z calculated for C₂₇H₃₆N₃O₉Si [M+H]⁺: 574.2216, found: 574.2215.

5'-O-Amino-3'-deoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U12Formula: C₁₉H₃₃N₃O₇Si

MW: 444 g/mol

To a solution of 3'-deoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-5'-O-phthalimido-2'-O-(*tert* butyldimethylsilyl)uridine **U14** (500 mg, 0.871 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂/MeOH 1/1 (7 mL) was added methylhydrazine (59 μL, 1.12 mmol, 1.3 eq.). The reaction mixture was stirred for 2 hours at RT. CH₂Cl₂ (10 mL) was added and the organic layer was washed with sat. NaHCO₃ solution (10 mL), brine (10 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated to dryness to give the oxyamine **U12** as a white solid (395 mg, **quant.**).

R_f: 0.52 (EA/PE 5/5, revelation 1 and 2).

[α]_D: + 41.6 (c = 0.5, CHCl₃).

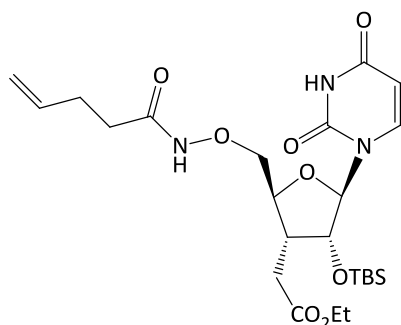
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.06 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.23 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.88 (s, 9H, tBu^{TBS}), 1.25 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₃^{ester}), 2.41 (m, 2H, CH_{2a}CO + H_{3'}), 2.61 (m, 1H, CH_{2b}CO), 3.82 (dd, 1H, J = 11.9 Hz, 3.2 Hz, H_{5'a}), 4.09-4.18 (m, 4H, CH₂^{ester} + H_{4'} + H_{5'b}), 4.43 (dd, 1H, J = 6.0 Hz, 3.4 Hz, H_{2'}), 5.62-5.67 (m, 2H, H_{1'}, H₅), 7.86 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₆), 9.50 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ - 5.7 (CH₃^{TBS}), - 4.3 (CH₃^{TBS}), 14.3 (CH₃^{ester}), 18.2 (C_q^{TBS}), 25.9 (tBu^{TBS}), 29.6 (CH₂CO), 38.2 (C_{3'}), 61.0 (CH₂^{ester}), 74.3 (C_{5'}), 77.6 (C_{4'}), 83.0 (C_{2'}), 92.2 (C_{1'}), 101.5 (C₅), 140.0 (C₆), 150.3 (C₂), 163.0 (C₄), 172.2 (CO^{ester}).

MP: 67 °C.

IR (ATR): 2929, 2859, 1710, 1679, 1462 cm⁻¹.

MS (TOF MS ES+): m/z calculated for C₁₉H₃₃N₃O₇Si [M+H]⁺: 444.2, found: 444.3.

3'-Deoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-5'-O-(pent-4-enamido)-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U17Formula: C₂₄H₃₉N₃O₈Si

MW: 526 g/mol

To a solution of the oxyamine **U12** (60 mg, 0.135 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (2 mL) was added pent-4-enoic acid (15 μL, 0.149 mmol, 1.1 eq.), HOBt (20 mg, 0.148 mmol, 1.1 eq.) and DCC (31 mg, 0.149 mmol, 1.1 eq.). The resulting mixture was stirred overnight at RT. The white precipitate was removed by filtration and the filtrate was washed with sat. NaHCO₃ (2 X 5 mL) and brine (5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 1/9 to 7/3) to give the titled compound **U17** as a colorless oil (22 mg, yield = **31%**).

R_f: 0.43 (EA/PE 7/3, revelation 1).

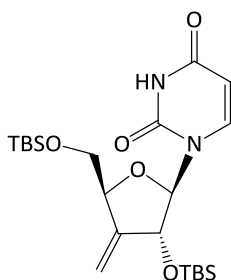
[α]_D: + 72.6 (c = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.09 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.24 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.90 (s, 9H, tBu^{TBS}), 1.26 (t, 3H, J = 7.1 Hz, CH₃^{ester}), 2.20 (m, 2H, CH₂^{Pen}), 2.40 (m, 3H, CH_{2a}CO + CH₂^{Pen}), 2.69 (m, 2H, CH_{2b}CO+H_{3'}), 4.05 (m, 1H, H_{5'a}), 4.09-4.21 (m, 3H, CH₂^{ester}+ H_{2'}), 4.52 (m, 2H, H_{4'}+H_{5'b}), 4.98-5.12 (m, 2H, CH₂=), 5.56-5.61 (m, 2H, H_{1'}+ H₅), 5.79 (m, 1H, CH=), 8.05 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₆), 9.64 (s, 1H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ - 5.8 (CH₃^{TBS}), - 4.2 (CH₃^{TBS}), 14.2 (CH₃^{ester}), 18.2 (C_q^{TBS}), 25.9 (tBu^{TBS}), 28.9, 29.3, 32.3 (CH₂^{Pen} + CH₂CO), 37.3 (C_{3'}), 61.5 (CH₂^{ester}), 74.2 (C_{5'}), 77.5 (C_{4'}), 83.2 (C_{2'}), 92.6 (C_{1'}), 101.2 (C₅), 116.1 (CH₂=), 136.6 (CH=), 140.8 (C₆), 149.9 (C₂), 164.2 (C₄), 173.0 (CO^{ester}).

IR (ATR): 3683, 3665, 2988, 2971, 2900, 1407 cm⁻¹.

MS (TOF MS ES⁺): m/z calculated for C₂₄H₃₉N₃O₈Si [M+Na]⁺: 548.2, found: 548.3.

3'-Deoxy-3'-methylene-2',5'-di-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U22**Formula:** C₂₂H₄₀N₂O₅Si₂**MW:** 468 g/mol

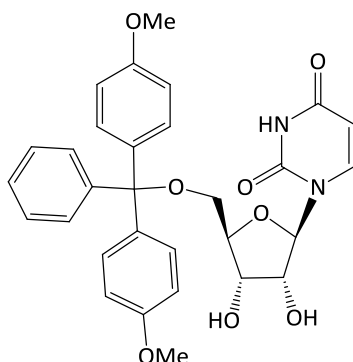
To a solution of PPh₃P⁺CH₃, Br⁻ (1.48 g, 4.14 mmol, 2.6 eq.) in anhydrous THF (6.3 mL) was added, under an argon atmosphere and at 0°C, a solution of tBuOK (466 mg, 4.15 mmol, 2.6 eq.) in anhydrous THF (1.8 mL). The reaction mixture was stirred for 30 minutes at RT. A solution of 3'-oxo-2',5'-di-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine **U4** (750 mg, 1.60 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (3.0 mL) was added at 0°C. The reaction mixture was stirred for 2h20 at RT. 20 mL of water were added. After extraction with EA (3 X 20 mL), the combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 15/85) to give the expected alkene **U22** (523 mg, yield = **70%**) as a yellow oil.

R_f: 0.30 (EA/PE 2/8, revelation 1).**[α]_D:** + 64.7 (c = 1.4, acetone).

RMN ¹H (acetone-*d*₆, 400 MHz): δ - 0.06 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.04 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.06 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.08 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.85 (s, 9H, tBu^{TBS}), 0.89 (s, 9H, tBu^{TBS}), 3.79 (dd, 1H, *J* = 11.0, 2.3 Hz, H_{5'a}), 3.92 (dd, 1H, *J* = 11.0, 2.7 Hz, H_{5'b}), 4.63-4.68 (m, 2H, H_{2'} + H_{4'}), 5.19-5.22 (m, 2H, =CH₂), 5.66 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₅), 5.87 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz, H_{1'}), 7.89 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₆), 10.19 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (acetone-*d*₆, 100 MHz): δ - 5.2 (CH₃^{TBS}), - 4.7 (CH₃^{TBS}), - 4.5 (CH₃^{TBS}), 18.6 (C_q^{TBS}), 19.1 (C_q^{TBS}), 26.1 (tBu^{TBS}), 26.4 (tBu^{TBS}), 67.2 (C_{5'}), 77.2, 81.9 (C_{2'} + C_{4'}), 88.1 (C_{1'}), 103.5 (C₅), 108.8 (=CH₂), 140.8 (C₆), 148.7 (C_{3'}), 151.6 (C₂), 163.5 (C₄).

IR (ATR): 3676, 2955, 2929, 2858, 1689, 1462 cm⁻¹.**Reference:** A. Winqvist, R. Strömberg, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4305-4311.

5'-O-(Dimethoxytrityl)uridine U25**Formula:** C₃₀H₃₀N₂O₆Si₂**MW:** 546 g/mol

To a solution of uridine (500 mg, 2.05 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (60 mL) were added pyridine (827 μ L, 10.2 mmol, 5.0 eq.), AgNO₃ (348 mg, 2.05 mmol, 1.0 eq.) and DMTCl (694 mg, 2.05 mmol, 1.0 eq.). The reaction mixture was stirred for 1 hour at RT and then was passed through celite. Sat. NaHCO₃ solution was added to the filtrate (30 mL). The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 X 50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, washed and concentrated. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE/Et₃N 80/20/1 and then EA/MeOH/Et₃N 98/2/1) to give 714 mg of the titled compound **U25** as a white solid (yield = **64%**).

R_f: 0.83 (CH₂Cl₂/MeOH 8/2, revelation 1).

[α]_D: + 2.00 (*c* = 1.0, CHCl₃).

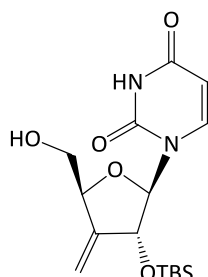
RMN ¹H (*acetone-d*₆, 400 MHz): δ 3.41-3.49 (m, 2H, H_{5'}), 3.78 (s, 6H, OCH₃^{DMT}), 4.04 (m, 1H, H_{4'}), 4.32 (t, 1H, *J* = 4.0 Hz, H_{2'}), 4.34 (s, 1H, OH), 4.43 (t, 1H, *J* = 4.0 Hz, H_{3'}), 4.75 (s, 1H, OH), 5.28 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₅), 5.90 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, H_{1'}), 7.84 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₆), 6.89-6.93 (m, 9H, H^{DMT}), 7.24-7.49 (m, 9H, H^{DMT}), 10.00 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (*acetone-d*₆, 100 MHz): δ 55.6 (OCH₃^{DMT}), 63.9 (C_{5'}), 71.1 (C_{3'}), 75.4 (C_{2'}), 84.2 (C_{4'}), 87.6 (C_q^{DMT}), 90.5 (C_{1'}), 102.5 (C₅), 114.2 (CH^{DMT}), 127.9 (CH^{DMT}), 128.8 (CH^{DMT}), 129.2 (CH^{DMT}), 131.2 (CH^{DMT}), 136.5 (C_q^{DMT}), 136.7 (C_q^{DMT}), 141.3 (C₆), 146.0 (C_q^{DMT}), 151.4 (C₂), 159.8 (C_q^{DMT}), 163.5 (C₄).

MP: 120°C.

IR (ATR): 3405, 3058, 1686, 1608, 1509, 1463 cm⁻¹.

Reference: G. H. Hakimelahi, Z. A. Proba, K. K. Ogilvie, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 1106-1113.

3'-Deoxy-3'-methylene-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U27**Formula:** C₁₆H₂₆N₂O₅Si**MW:** 354 g/mol

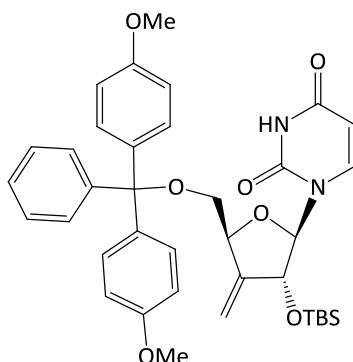
To a solution of 3'-deoxy-3'-methylene-2',5'-di-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine **U22** (2.67 g, 5.71 mmol, 1.0 eq.) in THF (50 mL) was added at 0°C a mixture of TFA/water (1/1, 50 mL). The reaction mixture was stirred at 0°C and the reaction was monitored by TLC. Before deprotection of the 2'-alcohol and even if it remained some starting material (*i.e.* 2 h), the reaction was quenched by addition of sat. NaHCO₃ solution (400 mL). The mixture was diluted by addition of EA (300 mL). After separation, the aqueous phase was extracted with EA (2 X 200 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The mixture was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 25/75) to give the remaining starting material (405 mg, 15%). By eluting with EA/PE (6/4), the corresponding alcohol **U27** was obtained as a white solid (1.32 g, yield = **65%**).

R_f: 0.20 (EA/PE 6/4, revelation 1).**[α]_D:** + 37.7 (*c* = 0.9, acetone).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.00 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.10 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.90 (s, 9H, tBu^{TBS}), 2.64 (s, 1H, OH), 3.74 (dd, 1H, *J* = 11.8, 3.0 Hz, H_{5'a}), 3.97 (dd, 1H, *J* = 11.8, 2.7 Hz, H_{5'b}), 4.72-4.73 (m, 1H, H_{4'}), 4.91-4.93 (m, 1H, H_{2'}), 5.21-5.32 (m, 2H, =CH₂), 5.52 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 5.79 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz, H_{1'}), 7.52 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₆), 8.41 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ - 4.8 (CH₃^{TBS}), - 4.6 (CH₃^{TBS}), 18.0 (C_q^{TBS}), 25.7 (tBu^{TBS}), 65.2 (C_{5'}), 74.7 (C_{2'}), 81.5 (C_{4'}), 92.4 (C_{1'}), 103.1 (C₅), 109.6 (=CH₂), 142.1 (C₆), 146.6 (C_{3'}), 150.3 (C₂), 162.6 (C₄).

MP: 107°C.**IR (ATR):** 3658, 3214, 2988, 2901, 1708, 1691, 1678, 1665, 1468, 1461, 1408 cm⁻¹.**MS (ESI-HRMS):** *m/z* calculated for C₁₆H₂₆N₂NaO₅Si [M+Na]⁺: 377.1503, found: 377.1585.

3'-Deoxy-5'-O-(dimethoxytrityl)-3'-methylene-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U28Formula: C₃₇H₄₄N₂O₇Si

MW: 656 g/mol

The corresponding alcohol **U27** (300 mg, 0.847 mmol, 1.0 eq.) and Li₂CO₃ (313 mg, 4.24 mmol, 5.0 eq.) were dried together overnight under vacuum (<3 mBar) before being dissolved in anhydrous THF (3.0 mL). The mixture was heated at 80°C for 30 minutes. The reaction mixture was allowed to cool at RT and DIPEA (420 μL, 2.54 mmol, 3.0 eq.) was added. Dimethoxytrityl tetrafluoroborate (664 mg, 1.70 mmol, 2.0 eq.) was added in portions in 30 minutes intervals over a period of 4 h. The reaction mixture was stirred overnight at RT. 0.5 eq. of dimethoxytrityl tetrafluoroborate was added in two times. The reaction mixture was stirred for 24 hours at RT before dilution in CH₂Cl₂ (10 mL). The organic layer was washed with sat. NaHCO₃ solution (10 mL), water (10 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, and filtered. Solvents were removed *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 2/8 and then 3/7) to give the titled compound **U28** as a white solid (461 mg, yield = **83%**).

R_f: 0.47 (EA/PE 4/6, revelation 1).

[α]_D: + 61.4 (c = 1.1, acetone).

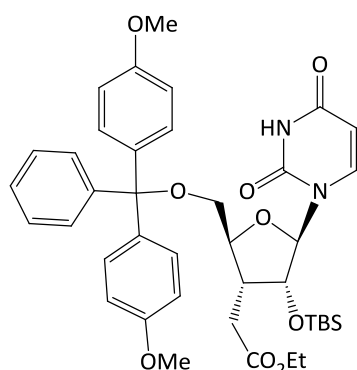
RMN ¹H (acetone-*d*₆, 400 MHz): δ 0.07 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.18 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.93 (s, 9H, tBu^{TBS}), 3.31 (dd, 1H, *J* = 10.5, 2.7 Hz, H_{5'a}), 3.51 (dd, 1H, *J* = 10.5, 2.9 Hz, H_{5'b}), 3.79 (s, 6H, OCH₃^{DMT}), 4.80-4.82 (m, 1H, H_{4'}), 4.96-4.99 (m, 1H, H_{2'}), 5.27-5.38 (m, 3H, =CH₂ + H₅), 5.88 (d, 1H, *J* = 6.9 Hz, H_{1'}), 6.90-6.92 (m, 4H, H^{DMT}), 7.24-7.35 (m, 7H, H^{DMT}), 7.46-7.48 (m, 2H, H^{DMT}), 7.84 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz, H₆), 10.09 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (acetone-*d*₆, 100 MHz): δ - 4.7 (CH₃^{TBS}), - 4.5 (CH₃^{TBS}), 18.7 (C_q^{TBS}), 26.1 (tBu^{TBS}), 55.6 (OCH₃^{DMT}), 67.2 (C_{5'}), 76.9 (C_{2'}), 80.3 (C_{4'}), 87.6 (C_q^{DMT}), 88.2 (C_{1'}), 103.3 (C₅), 109.4 (=CH₂), 114.1 (CH^{DMT}), 127.9 (CH^{DMT}), 128.8 (CH^{DMT}), 129.0 (CH^{DMT}), 131.0 (CH^{DMT}), 131.1 (CH^{DMT}), 136.2 (C_q^{DMT}), 136.3 (C_q^{DMT}), 141.0 (C₆), 146.0 (C_q^{DMT}), 148.7 (C_{3'}), 151.6 (C₂), 159.8 (C_q^{DMT}), 163.2 (C₄).

MP: 86°C.

IR (ATR): 3677, 2970, 2901, 1693, 1608, 1509, 1461, 1408 cm⁻¹.

MS (ESI-HRMS): *m/z* calculated for C₃₇H₄₄N₂O₇Si [M+Na]⁺: 679.2810, found: 679.2899.

3'-Deoxy-5'-O-(dimethoxytrityl)-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine U29Formula: C₄₀H₅₀N₂O₉Si

MW: 730 g/mol

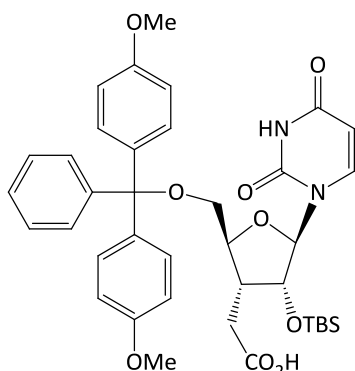
3'-Deoxy-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-2'-O-(tert-butyldimethylsilyl)uridine **U6** (300 mg, 0.704 mmol, 1.0 eq.) and Li₂CO₃ (260 mg, 3.52 mmol, 5.0 eq.) were dried together overnight under vacuum (< 3 mBar). Anhydrous THF (3.0 mL) was added. The mixture was heated for 30 minutes at 80°C and then cooled to RT. DIPEA (420 μL, 2.54 mmol, 3.0 eq.) was then added. 2.0 eq. of dimethoxytrityl tetrafluoroborate was added in portions (552 mg, 1.40 mmol, 0.25 eq.) in 30 minutes intervals over a period of 4 hours. The reaction was stirred overnight at RT. 1.0 eq. of dimethoxytrityl tetrafluoroborate was added in two portions (1.10 g, 2.80 mmol, 0.5 eq.) in 30 minutes intervals. The reaction was stirred for another 24 h, diluted with CH₂Cl₂ (10 mL), washed with sat. NaHCO₃ (10 mL), H₂O (10 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and filtered. Solvents were removed *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE/Et₃N 20/80/0.5 and then 30/70/0.5) to afford the expected compound **U29** (396 mg, yield = 77%) as colorless oil.

R_f: 0.33 (EA/PE 4/6, revelateur 1).[α]_D: + 24.5 (c = 0.9, acetone).

RMN ¹H (acetone-*d*₆, 400 MHz): δ 0.10 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.24 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.90 (s, 9H, tBu^{TBS}), 1.20 (t, 3H, *J* = 7.1 Hz, CH₃^{ester}), 2.50-2.57 (m, 1H, CH_{2a}CO), 2.67-2.71 (m, 2H, CH_{2b}CO + H_{3'}), 3.42 (dd, 1H, *J* = 11.3, 3.2 Hz, H_{5'a}), 3.70 (dd, 1H, *J* = 11.3, 2.3 Hz, H_{5'b}), 3.78 (s, 6H, OCH₃^{DMT}), 4.02-4.09 (m, 3H, H_{4'} + CH₂^{ester}), 4.53 (d, 1H, *J* = 4.1 Hz, H_{2'}), 5.19 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₅), 5.72 (m, 1H, H_{1'}), 6.90-6.92 (m, 4H, H^{DMT}), 7.34-7.37 (m, 9H, H^{DMT}), 8.14 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, H₆), 10.03 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (acetone-*d*₆, 100 MHz): δ - 5.8 (CH₃^{TBS}), - 4.4 (CH₃^{TBS}), 14.2 (CH₃^{ester}), 18.4 (C_q^{TBS}), 20.5 (tBu^{TBS}), 25.9 (CH₂), 38.9 (C_{3'}), 55.2 (OCH₃^{DMT}), 60.2 (CH₂^{ester}), 60.8 (C_{5'}), 78.4 (C_{2'}), 83.7 (C_{4'}), 87.5 (C_q^{DMT}), 92.1 (C_{1'}), 101.5 (C₅), 113.7 (CH^{DMT}), 127.5 (CH^{DMT}), 128.5 (CH^{DMT}), 128.8 (CH^{DMT}), 130.8 (CH^{DMT}), 136.0 (C_q^{DMT}), 140.5 (C₆), 145.5 (C_q^{DMT}), 151.0 (C₂), 159.5 (C_q^{DMT}), 163.2 (C₄), 171.9 (CO^{ester}).

IR (ATR): 2933, 1736, 1708, 1688, 1608, 1509, 1463 cm⁻¹.MS (ESI-HRMS): *m/z* calculated for C₄₀H₅₀N₂O₉Si [M+Na]⁺: 753.3178, found: 753.3199.

3'-(Carboxymethyl)-3'-deoxy-5'-O-(dimethoxytrityl)-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)uridine U32Formula: C₃₈H₄₆N₂O₉Si

MW: 702 g/mol

To a solution of 3'-deoxy-5'-O-(dimethoxytrityl)-3'-(ethoxycarbonylmethyl)-2'-O-(tert-butylidimethylsilyl)uridine **U29** (100 mg, 0.137 mmol, 1.0 eq.) in MeOH/H₂O 4/1 (2.5 mL) was added LiOH (10 mg, 0.411 mmol, 3.0 eq.). The reaction mixture was stirred for two days at RT. Sat. NH₄Cl solution (3 mL) was added and the aqueous phase was extracted with EA (2 X 10 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated to dryness to give the corresponding carboxylic acid **U32** as a white solid (94 mg, **quant.**).

R_f: 0.47 (EA/PE 6/4, revelation 1).

[α]_D: + 14.3 (c = 1.0, acetone).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.04 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.23 (s, 3H, CH₃^{TBS}), 0.90 (s, 9H, tBu^{TBS}), 1.94-2.00 (m, 1H, CH_{2a}CO), 2.48-2.54 (m, 2H, CH_{2a}CO + H_{3'}), 3.28-3.30 (dd, 1H, J = 9.6, 2.2 Hz, H_{5'a}), 3.77-3.80 (m, 7H, H_{5'b} + OCH₃^{DMT}), 3.80 (d, 1H, J = 9.6 Hz, H_{4'}), 4.56 (d, 1H, J = 2.3 Hz, H_{2'}), 5.35 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₅), 5.72 (s, 1H, H_{1'}), 6.83 (m, 4H, H^{DMT}), 7.26-7.30 (m, 9H, H^{DMT}), 8.14 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H₆).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ - 5.6 (CH₃^{TBS}), - 4.3 (CH₃^{TBS}), 18.2 (C_q^{TBS}), 25.9 (tBu^{TBS}), 28.8 (CH₂CO), 37.9 (C_{3'}), 55.4 (OCH₃^{DMT}), 61.0 (C_{5'}), 77.6 (C_{2'}), 83.4 (C_{4'}), 87.3 (C_q^{DMT}), 92.0 (C_{1'}), 101.6 (C₅), 113.5 (CH^{DMT}), 127.3 (CH^{DMT}), 128.2 (CH^{DMT}), 130.2 (CH^{DMT}), 135.2 (C_q^{DMT}), 140.9 (C₆), 144.4 (C_q^{DMT}), 150.5 (C₂), 158.8 (C_q^{DMT}), 164.4 (C₄), 176.5 (CO^{acide}).

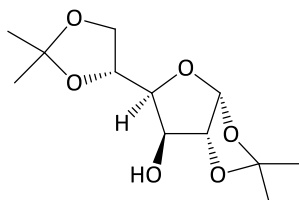
MP: 84°C.

IR (ATR): 2929, 1703, 1608, 1509, 1463, 1413 cm⁻¹.

MS (TOF MS ES⁺): m/z calculated for C₃₈H₄₆N₂O₉Si [M+Na]⁺: 725.3, found: 725.4.

Synthesis starting from glucose

1,2:5,6-Di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose G1



Formula: C₁₂H₂₀O₆

MW: 260 g/mol

Iodine (1.5 g, 5.91 mmol, 0.21 eq.) was dissolved in acetone (250 mL) and finely powdered glucose (5.0 g, 28.1 mmol, 1.0 eq.) was added. The resulting solution was heated to reflux for three hours. Iodine was destroyed by addition of sat. Na₂S₂O₃ solution until decoloration. The isopropylidene derivative was extracted with CH₂Cl₂ (3 X 250 mL) and the combined organic layers were washed with water (500 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to give the expected compound **G1** as white crystals (6.01 g, yield = **83%**).

[α]_D: - 7,80 (*c* = 0.5, CHCl₃).

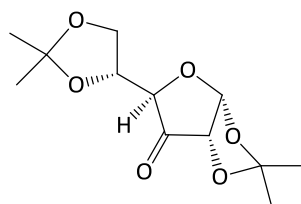
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.32 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.36 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.44 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.50 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 2.69 (s, 1H, OH), 3.97-3.99 (m, 1H, H_{6a}), 4.05-4.07 (m, 1H, H₄), 4.14-4.18 (m, 1H, H_{6b}), 4.32-4.34 (m, 2H, H₃ + H₅), 4.52-4.54 (m, 1H, H₂), 5.94 (m, 1H, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.2 (CH₃^{iPr}), 26.3 (CH₃^{iPr}), 26.9 (CH₃^{iPr}), 27.0 (CH₃^{iPr}), 67.8 (C₆), 73.6, 75.3 (C₃ + C₅), 81.2 (C₄), 85.2 (C₂), 105.4 (C₁), 109.8, 112.0 (C_q^{iPr}).

MP: 108°C (*lit*: 110°C).

IR (ATR): 3428, 2986, 2901 cm⁻¹.

Reference: K. P. R. Kartha, *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 3415-3416.

1,2:5,6-Di-O-isopropylidene-3-oxo- α -D-glucofuranose G2**Formula:** C₁₂H₁₈O₆**MW:** 258 g/mol

To a solution of 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-D-glucose **G1** (2.78 g, 10.7 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (42 mL), pyridinium dichromate (2.88 g, 7.66 mmol, 0.71 eq.) and acetic anhydride (4.23 mL, 44.7 mmol, 4.18 eq.) were added. The mixture was refluxed for 30 minutes and stirred overnight at RT. The reaction mixture was concentrated and the residue was dissolved in Et₂O and filtered through SiO₂. The filtrate was concentrated to give the corresponding ketone **G2** (1.96 g, yield = **71%**) as a yellow oil.

R_f: 0.45 (EA/PE 3/7, revelation 1).

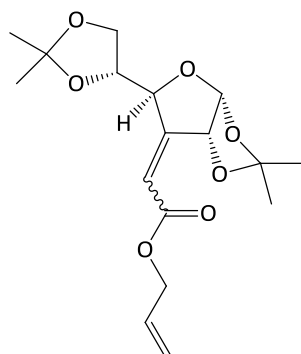
[α]_D: + 86,8 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.31 (s, 6H, CH₃^{iPr}), 1.41 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.43 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 3.99-4.01 (m, 2H, H₆), 4.33-4.37 (m, 3H, H₂ + H₄ + H₅), 6.14 (d, 1H, *J* = 4.6 Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.2 (CH₃^{iPr}), 25.9 (CH₃^{iPr}), 27.0 (CH₃^{iPr}), 27.5 (CH₃^{iPr}), 64.2 (C₆), 76.3, 76.7, 78.9 (C₂ + C₄ + C₅), 103.0 (C₁), 110.3 (C_q^{iPr}), 114.2 (C_q^{iPr}), 208.8 (C₃).

IR (ATR): 2988, 2901, 1775, 1769, 1475, 1459 cm⁻¹.

Reference: M. Ellermann, R. Paulini, R. Jakob-Roetne, C. Lerner, E. Borroni, D. Roth, A. Ehler, W. B. Schweizer, D. Schlatter, M. G. Rudolph, F. Diederich, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 6369-6381.

3-(Allyloxycarbonylmethylene)-3-deoxy-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose G4Formula: C₁₇H₂₄O₇

MW: 340 g/mol

To a solution of the ketone **G2** (500 mg, 1.94 mmol, 1.0 eq.) in toluene (7 mL) was added the phosphonium bromide **I4** (1.36 g, 3.10 mmol, 1.6 eq.). The resulting mixture was heated at 80°C and DIPEA (448 μ L, 2.57 mmol, 1.3 eq.) was added. The reaction mixture was heated at 80°C for 1 hour and then dissolved in EA (15 mL). The organic layer was washed with sat. NH₄Cl solution (15 mL), sat. NaHCO₃ solution (15 mL) and brine (15 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 1/9) to give 32 mg of the diastereoisomer a as a yellow oil, 274 mg of the diastereoisomer b as a yellow oil and 118 mg of a mixture of a and b (424 mg, yield = 64%).

Diastereoisomer a:**R_f**: 0.72 (EA/PE 2/8, revelation 1).**[α]_D**: - 78.8 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.31 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.32 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.38 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.44 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 3.56 (t, 1H, *J* = 8.6 Hz, H_{6a}), 3.96 (dd, 1H, *J* = 8.6, 6.5 Hz, H_{6b}), 4.32-4.37 (m, 1H, H₅), 4.62-4.68 (m, 2H, OCH₂), 5.10-5.13 (m, 1H, H₂), 5.26-5.36 (m, 2H, CH₂=), 5.75 (m, 1H, H₄), 5.90-5.98 (m, 2H, CH^{All} = + =CHCO), 6.26 (m, 1H, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.7 (CH₃^{iPr}), 26.2 (CH₃^{iPr}), 28.0 (CH₃^{iPr}), 65.4, 65.5 (C₆ + OCH₂), 79.1 (C₅), 80.1 (C₄), 82.3 (C₂), 103.9 (CH^{All} =), 109.2 (C_q^{iPr}), 113.8 (C_q^{iPr}), 117.8 (C₁), 118.8 (CH₂=), 131.8 (=CHCO), 158.7 (C₃), 165.3 (CO^{ester}).

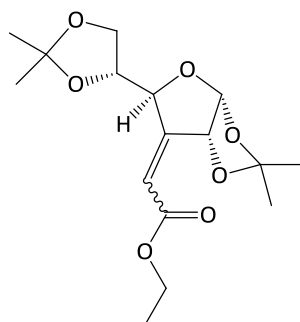
IR (ATR): 2988, 2938, 2901, 1723, 1682, 1651, 1474, 1458, 1419 cm⁻¹.**Diastereoisomer b:****R_f**: 0.63 (EA/PE 2/8, revelation 1).**[α]_D**: + 64.5 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.36 (s, 3H, CH_3^{iPr}), 1.41 (s, 3H, CH_3^{iPr}), 1.44 (s, 3H, CH_3^{iPr}), 1.50 (s, 3H, CH_3^{iPr}), 3.99-4.03 (m, 2H, $\text{H}_5 + \text{H}_{6a}$), 4.08-4.12 (m, 1H, H_{6b}), 4.67-4.70 (m, 3H, $\text{H}_4 + \text{OCH}_2$), 5.25-5.40 (m, 2H, $\text{CH}_2=$), 5.73-5.75 (m, 1H, H_2), 5.83-5.84 (m, 1H, =CHCO), 5.93-6.00 (m, 1H, $\text{CH}^{\text{Al}}=$), 6.37 (m, 1H, H_1).

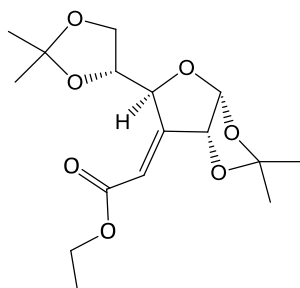
RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 25.5 (CH_3^{iPr}), 26.9 (CH_3^{iPr}), 27.2 (CH_3^{iPr}), 27.5 (CH_3^{iPr}), 65.6 (OCH_2), 67.5 (C_6), 77.4 (C_5), 78.5 (C_2), 80.0 (C_4), 105.0 ($\text{CH}=\text{}$), 110.3 (C_q^{iPr}), 113.0 (C_q^{iPr}), 117.7 (C_1), 118.9 ($\text{CH}_2=$), 132.0 (=CHCO), 156.4 (C_3), 165.0 (CO^{ester}).

IR (ATR): 2988, 2971, 2901, 1451, 1407 cm^{-1} .

MS (TOF MS ES+): m/z calculated for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 363.1, found: 363.2.

3-Deoxy-3-(ethoxycarbonylmethylene)-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose G6**Formula:** C₁₆H₂₄O₇**MW:** 328 g/mol

To a solution of the ketone **G2** (250 mg, 0.969 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (8 mL) was added ethyl-2-(triphenylphosphoranylidene)acetate (424 mg, 1.22 mmol, 1.26 eq.). The reaction mixture was refluxed for 3 hours. After concentration, the residue was purified by column chromatography (silica gel, PE/Et₂O 10/1) to give 30 mg of the diastereoisomer a, 66 mg of the diastereoisomer b and 150 mg of a mixture of a and b (246 mg, yield = **77%**) as white solids.

Diastereoisomer a:**R_f:** 0.67 (EA/PE 2/8, revelation 1).**[α]_D:** + 191 (c = 0.5, CHCl₃).

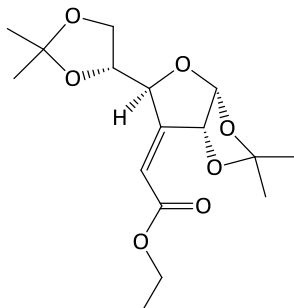
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.30 (t, 3H, J = 7.3 Hz, CH₃^{ester}), 1.31 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.32 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.38 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.43 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 3.56 (t, 1H, J = 8.7 Hz, H_{6a}), 3.97 (dd, 1H, J = 8.7, 6.4 Hz, H_{6b}), 4.14-4.24 (m, 2H, CH₂^{ester}), 4.32-4.37 (m, 1H, H₅), 5.10-5.11 (m, 1H, H₂), 5.75-5.76 (m, 1H, H₄), 5.93 (d, 1H, J = 4.6 Hz, H₁), 6.22 (t, 1H, J = 1.8 Hz, CH=).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 14.3 (CH₃^{ester}), 25.8 (CH₃^{iPr}), 26.2 (CH₃^{iPr}), 28.0 (CH₃^{iPr}), 60.9 (CH₂^{ester}), 65.5 (C₆), 79.1 (C₅), 80.1 (C₄), 82.3 (C₂), 103.9 (C₁), 109.2 (C_q^{iPr}), 113.8 (C_q^{iPr}), 118.2 (CH=), 158.1 (C₃), 165.7 (CO^{ester}).

MP: 56°C (*lit*: 56-57°C).**IR (ATR):** 2987, 2901, 1713, 1683, 1653, 1458 cm⁻¹.

Reference: N. M. Xavier, A. P. Rauter, *Org. Lett.* **2007**, *17*, 3339-3341.

Diastereoisomer b:



R_f: 0.60 (EA/PE 2/8, revelation 1).

[α]_D: + 112 (*c* = 0.5, CHCl₃).

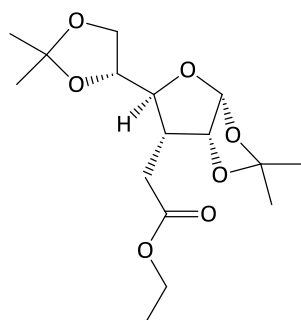
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.31 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, CH₃^{ester}), 1.35 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.40 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.43 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.49 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 3.97-4.03 (m, 2H, H₅ + H_{6a}), 4.06-4.10 (m, 1H, H_{6b}), 4.23 (q, 2H, *J* = 7.2 Hz, CH₂^{ester}), 4.65-4.68 (m, 1H, H₄), 5.72-5.75 (m, 1H, H₂), 5.83 (d, 1H, *J* = 4.1 Hz, H₁), 6.33 (t, 1H, *J* = 4.0 Hz, CH=).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 14.3 (CH₃^{ester}), 25.5 (CH₃^{iPr}), 26.8 (CH₃^{iPr}), 27.2 (CH₃^{iPr}), 27.4 (CH₃^{iPr}), 60.8 (CH₂^{ester}), 67.4 (C₆), 76.9 (C₅), 78.5 (C₂), 80.0 (C₄), 105.0 (C₁), 110.3 (C_q^{iPr}), 113.0 (C_q^{iPr}), 118.0 (CH=), 155.8 (C₃), 165.3 (CO^{ester}).

MP: 68°C (*lit.*: 69-70°C).

IR (ATR): 2988, 2901, 1722, 1460, 1457, 1407 cm⁻¹.

Reference: N. M. Xavier, A. P. Rauter, *Org. Lett.* **2007**, *17*, 3339-3341.

3-Deoxy-3-(ethoxycarbonylmethyl)-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose G7**Formula:** C₁₆H₂₆O₇**MW:** 330 g/mol

To a solution of the α,β -unsaturated ester **G6** (500 mg, 1.52 mmol, 1.0 eq.) in MeOH (10 mL) was added at 0°C and by portions NaBH₄ (460 mg, 12.2 mmol, 8.0 eq.). The reaction mixture was stirred at RT for three days. After acidification until pH = 2 with AcOH, the mixture was concentrated. The residue was dissolved in EA (10 mL) and the white precipitate was filtered. The filtrate was concentrated to give the corresponding ester **G7** as a colorless gum (495 mg, **quant.**) which was used in the next step without further purifications.

R_f: 0.61 (EA/PE 3/7, revelation 1).

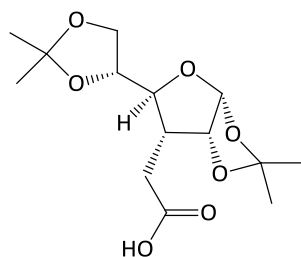
[α]_D: + 66.0 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.27 (m, 3H, CH₃^{ester}), 1.30 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.32 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.40 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.49 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 2.30-2.35 (m, 1H, H₃), 2.62-2.70 (m, 1H, CH_{2a}CO), 2.79-2.85 (m, 1H, CH_{2b}CO), 3.66 (m, 1H, H₄), 3.92-3.99 (m, 2H, H₅ + H_{6a}), 4.09-4.15 (m, 3H, H_{6b} + CH₂^{ester}), 4.81 (t, *J* = 3.9 Hz, 1H, H₂), 5.78 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 14.3 (CH₃^{ester}), 25.3 (CH₃^{iPr}), 26.4 (CH₃^{iPr}), 26.7 (CH₃^{iPr}), 27.8 (CH₃^{iPr}), 30.0 (CH₂CO), 44.6 (C₃), 60.6 (CH₂^{ester}), 67.9 (C₆), 77.9 (C₅), 81.0 (C₄), 81.6 (C₂), 105.0 (C₁), 109.8 (C_q^{iPr}), 111.9 (C_q^{iPr}), 172.4 (CO^{ester}).

IR (ATR): 2986, 2941, 2898, 1734, 1473, 1458 cm⁻¹.

Reference: M. Himmelbauer, J. B. Farcet, J. Gagnepain, J. Mulzer, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 8214-8244.

3-(Carboxymethyl)-3-deoxy-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose **G8****Formula:** C₁₄H₂₂O₇**MW:** 302 g/mol

To a solution of the crude corresponding ethyl ester **G7** (1.0 g, 3.05 mmol, 1.0 eq.) in THF/water (1/1, 60 mL) was added LiOH (1.59 g, 66.3 mmol, 21.7 eq.). The mixture was stirred overnight at RT before acidification with HCl 4 M until pH = 2. The aqueous layer was extracted with EA (3 X 50 mL). The combined organic layers were dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography (silica gel, pure EA) to give the titled carboxylic acid **G8** as a yellow oil (712 mg, yield = **78%**).

R_f: 0.59 (EA, revelation 1).

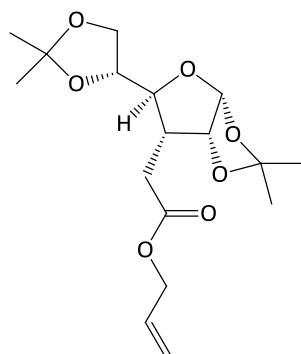
[α]_D: + 58.8 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.30 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.31 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.40 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.49 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 2.27-2.34 (m, 1H, H₃), 2.71 (dd, 1H, *J* = 17.9, 10.5 Hz, CH_{2a}CO), 2.91 (dd, 1H, *J* = 17.9, 4.1 Hz, CH_{2b}CO), 3.67 (dd, 1H, *J* = 9.8, 7.3 Hz, H₄), 3.91-3.99 (m, 2H, H₅ + H_{6a}), 4.08-4.12 (m, 1H, H_{6b}), 4.80 (t, *J* = 3.9 Hz, 1H, H₂), 5.77 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.2 (CH₃^{iPr}), 26.3 (CH₃^{iPr}), 26.6 (CH₃^{iPr}), 26.7 (CH₃^{iPr}), 30.0 (CH₂CO), 44.3 (C₃), 68.0 (C₆), 77.9, 80.9 (C₄ + C₅), 81.3 (C₂), 105.2 (C₁), 109.9 (C_q^{iPr}), 112.1 (C_q^{iPr}), 178.2 (CO^{acid}).

IR (ATR): 3428 (b), 2986, 2935, 2901, 1726, 1710, 1457 cm⁻¹.

Reference: M. H. D. Postema, J. L. Piper, L. Liu, J. Shen, M. Faust, P. Andreana, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4748-4754.

3-(Allyloxycarbonylmethyl)-3-deoxy-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose **G5****Formula:** C₁₇H₂₆O₇**MW:** 342 g/mol

To a solution of the carboxylic acid **G8** (57 mg, 0.189 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DMF (1 mL) was added NaHCO₃ (40 mg, 0.476 mmol, 2.5 eq.) and allyl bromide (98 μ L, 1.13 mmol, 6.0 eq.). The reaction mixture was stirred for three days at 60°C before concentration. The residue was dissolved in EA (5 mL), washed with brine (5 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 1/1) to give the corresponding ester **G5** as a light yellow oil (45 mg, yield = **70%**).

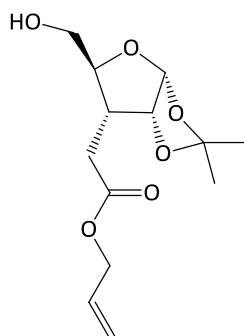
R_f: 0.65 (EA/PE 2/8, revelation 1).

[\alpha]_D: + 63.8 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.30 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.32 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.40 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.50 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 2.32-2.37 (m, 1H, H₃), 2.69-2.88 (m, 2H, CH₂CO), 3.66-3.71 (m, 1H, H₄), 3.92-4.02 (m, 2H, H₅ + H_{6a}), 4.08-4.12 (m, 1H, H_{6b}), 4.60-4.62 (m, 2H, OCH₂), 4.81 (t, *J* = 3.8 Hz, 1H, H₂), 5.23-5.36 (m, 2H, CH₂=), 5.77 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz, H₁), 5.90-5.98 (m, 1H, CH=).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.3 (CH₃^{iPr}), 26.5 (CH₃^{iPr}), 26.8 (CH₃^{iPr}), 26.9 (CH₃^{iPr}), 30.1 (CH₂CO), 44.7 (C₃), 65.4 (OCH₂), 68.0 (C₆), 78.0 (C₅), 81.1 (C₄), 81.6 (C₂), 105.1 (CH=), 109.8 (C_q^{iPr}), 112.0 (C_q^{iPr}), 118.3 (CH₂=), 132.3 (C₁), 172.1 (CO^{ester}).

IR (ATR): 2986, 2988, 2898, 1737, 1658 cm⁻¹.

3-(Allyloxycarbonylmethyl)-3-deoxy-1,2-O-isopropylidene- α -D-ribofuranose **G9****Formula:** C₁₃H₂₀O₆**MW:** 272 g/mol

A solution of the di-*O*-isopropylidene compound **G5** (2.84 g, 8.35 mmol, 1.0 eq.) and H₅IO₆ (2.28 g, 10.0 mmol, 1.2 eq.) in dried EA (80 mL) was stirred at RT for 2 hours. The reaction mixture was filtered and the filtrate was evaporated. The residue was dissolved in absolute EtOH (125 mL) at 0°C and NaBH₄ (947 mg, 25.0 mmol, 3.0 eq.) was added in small portions with vigorous stirring. Stirring was continued for 30 minutes and excess AcOH was added. Volatiles were evaporated. The residue was dissolved in EA (100 mL) and the solution was washed with water (100 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 4/6) to give the corresponding alcohol **G9** as a yellow oil (1.42 g, yield = **63%**).

R_f: 0.45 (EA/PE 6/4, revelation 1).

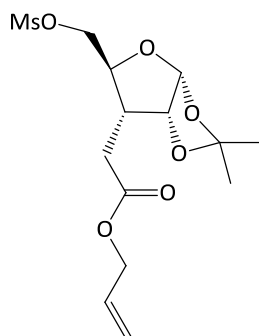
[α]_D: + 64.2 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.31 (s, 3H, CH₃^{*i*Pr}), 1.48 (s, 3H, CH₃^{*i*Pr}), 2.23 (s (b), 1H, OH), 2.38-2.47 (m, 2H, H₃ + CH_{2a}CO), 2.72-2.74 (m, 1H, CH_{2b}CO), 3.53-3.57 (m, 1H, H_{5a}), 3.84-3.89 (m, 2H, H₄ + H_{5b}), 4.58-4.61 (m, 2H, OCH₂), 4.78 (t, 1H, *J* = 3.7 Hz, H₂), 5.23-5.35 (m, 2H, CH₂=), 5.82 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz, H₁), 5.86-5.96 (m, 1H, CH=).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 26.4 (CH₃^{*i*Pr}), 26.8 (CH₃^{*i*Pr}), 29.8 (CH₂CO), 39.7 (C₃), 61.4 (C₅), 65.6 (OCH₂), 81.4 (C₄), 81.6 (C₂), 104.8 (C₁), 111.9 (C_q^{*i*Pr}), 118.6 (CH₂=), 132.0 (=CH), 172.1 (CO^{ester}).

IR (ATR): 3430 (b), 2988, 2901, 1734, 1453, 1409 cm⁻¹.

MS (ESI-HRMS): *m/z* calculated for C₁₃H₂₀O₆ [M+Na]⁺: 295.1153, found: 295.1151.

3-(Allyloxycarbonylmethyl)-3-deoxy-1,2-O-isopropylidene-5-methanesulfonate- α -D-ribofuranose G11Formula: C₁₄H₂₂O₈S

MW: 350 g/mol

To a solution of the alcohol **G9** (300 mg, 1.10 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (8 mL) at 0°C was added Et₃N (164 μ L, 1.18 mmol, 1.1 eq.) and mesityl chloride (102 μ L, 1.32 mmol, 1.2 eq.). The reaction mixture was stirred for 1 hour at RT. The organic layer was washed with water (10 mL) and brine (10 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 25/75) to give the titled compound **G11** (270 mg, yield = 70%) as a colorless oil.

R_f: 0.47 (EA/PE 4/6).

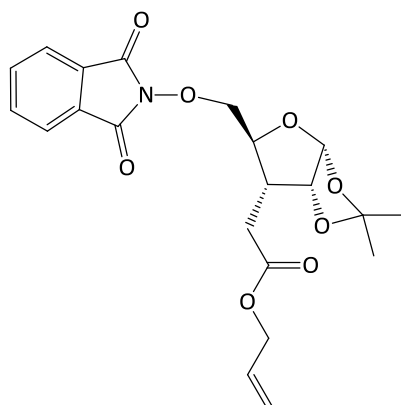
[α]_D: + 55.0 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.31 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.49 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 2.39-2.47 (m, 2H, H₃ + CH_{2a}CO), 2.71-2.79 (m, 1H, CH_{2b}CO), 3.06 (s, 3H, CH₃^{Ms}), 4.03-4.07 (m, 1H, H₄), 4.24 (dd, 1H, *J* = 11.6, 4.3 Hz, H_{5a}), 4.43 (dd, 1H, *J* = 11.6, 2.3 Hz, H_{5b}), 4.59-4.62 (m, 2H, OCH₂), 4.80 (t, 1H, *J* = 3.6 Hz, H₂), 5.24-5.35 (m, 2H, CH₂=), 5.82 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz, H₁), 5.86-5.98 (m, 1H, CH=).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 26.4 (CH₃^{iPr}), 26.8 (CH₃^{iPr}), 29.7 (CH₂CO), 37.8 (CH₃^{Ms}), 40.9 (C₃), 65.7 (OCH₂), 68.4 (C₅), 78.5 (C₄), 81.1 (C₂), 104.9 (C₁), 112.2 (C_q^{iPr}), 118.7 (CH₂=), 132.0 (CH=), 171.3 (CO^{ester}).

IR (ATR): 2986, 2904, 1730, 1455 cm⁻¹.

MS (TOF MS ES+): *m/z* calculated for C₁₄H₂₂O₈S [M+Na]⁺: 373.1, found: 373.1.

3-(Allyloxycarbonylmethyl)-3-deoxy-1,2-O-isopropylidene-5-O-phthalimido- α -D-ribofuranose G10Formula: C₂₁H₂₃NO₈

MW: 417 g/mol

To a solution of the mesityl compound **G11** (776 mg, 2.22 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous DMF (15 mL) was added *N*-hydroxyphthalimide (1.45 g, 8.89 mmol, 4.0 eq.) and DBU (995 μ L, 6.66 mmol, 3.0 eq.). The resulting dark red mixture was stirred for 3h30 at 70°C. EA (30 mL) was added and the organic layer was washed with sat. NaHCO₃ solution (2 X 20 mL). The aqueous phase was extracted with EA (2 X 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography (EA/PE 2/8) to give the expected compound **G10** (574 mg, yield = **62%**) as a white solid.

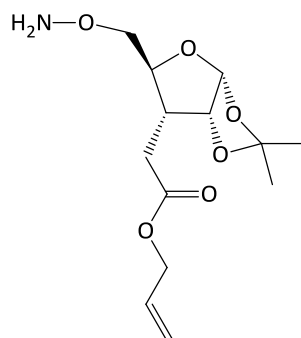
R_f: 0.53 (EA/PE 4/6).[α]_D: + 52.8 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.31 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.50 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 2.59 (dd, *J* = 15.8, 3.3 Hz, 1H, CH_{2a}CO), 2.71-2.83 (m, 2H, H₃ + CH_{2b}CO), 4.14-4.19 (m, 1H, H₄), 4.30 (dd, *J* = 11.5, 4.3 Hz, 1H, H_{5a}), 4.40 (dd, *J* = 11.5, 2.5 Hz, 1H, H_{5b}), 4.62-4.64 (m, 2H, OCH₂), 4.84 (t, 1H, *J* = 3.9 Hz, H₂), 5.23-5.37 (m, 2H, CH₂=), 5.77 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H₁), 5.92-5.96 (m, 1H, CH=), 7.74-7.82 (m, 4H, H^{Phth}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 26.6 (CH₃^{iPr}), 26.9 (CH₃^{iPr}), 29.9 (CH₂CO), 41.2 (C₃), 65.6 (OCH₂), 77.3 (C₅), 79.3 (C₄), 81.2 (C₂), 105.2 (C₁), 112.0 (C_q^{iPr}), 118.5 (CH₂=), 123.7 (CH^{Phth}), 129.0 (C_q^{Phth}), 132.1 (=CH), 134.6 (CH^{Phth}), 163.3 (CO^{Phth}), 171.7 (CO^{ester}).

MP: 84°C.

IR (ATR): 2986, 2902, 1722, 1455 cm⁻¹.MS (MALDI-TOF): *m/z* calculated for C₂₁H₂₃NO₈ [M+K]⁺: 456.1056, found: 456.1052.

3-(Allyloxycarbonylmethyl)-5-O-amino-3-deoxy-1,2-O-isopropylidene- α -D-ribofuranose G12Formula: C₁₃H₃₁NO₆

MW: 287 g/mol

The phthalimidooxy ester **G10** (30 mg, 71.9 μ mol, 1.0 eq.) was added at 0°C to a solution of N₂H₄·H₂O (3.83 μ L, 79.0 μ mol, 1.1 eq.) in MeOH (2.0 mL). The reaction mixture was stirred for 20 minutes at 0°C. Et₂O was added and the organic phase was washed with sat. NaHCO₃ (5 mL) and brine (5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* without heating to give the aminoxy compound **G12** (20 mg, **quant.**) as a colorless oil which was directly used without waiting.

R_f: 0.20 (EA/PE 1/1, revelation 1 and 2).

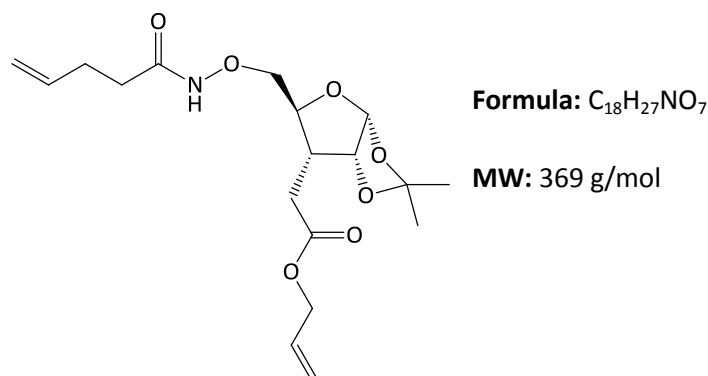
[α]_D: + 77.4 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.31 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.49 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 2.30-2.35 (m, 1H, H₃), 2.44 (dd, *J* = 17.0, 4.1 Hz, 1H, CH_{2a}CO), 2.73 (dd, *J* = 17.0, 9.6 Hz, 1H, CH_{2b}CO), 3.79 (dd, *J* = 11.7, 5.2 Hz, 1H, H_{5a}), 3.86 (s (b), 2H, ONH₂), 3.92 (dd, *J* = 11.7, 2.5 Hz, 1H, H_{5b}), 3.98-4.03 (m, 1H, H₄), 4.61 (m, 2H, OCH₂), 4.78 (t, 1H, *J* = 4.2 Hz, H₂), 5.23-5.37 (m, 2H, CH₂=), 5.85 (d, 1H, *J* = 4.2 Hz, H₁), 5.88-5.97 (m, 1H, CH=).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 26.5 (CH₃^{iPr}), 26.8 (CH₃^{iPr}), 29.9 (CH₂CO), 41.5 (C₃), 65.5 (OCH₂), 75.5 (C₅), 79.2 (C₄), 81.0 (C₂), 105.1 (C₁), 111.8 (C_q^{iPr}), 118.5 (CH₂=), 132.1 (=CH), 171.8 (CO^{ester}).

IR (ATR): 3287, 3252, 2982, 2936, 2878, 1736, 1691, 1528, 1458 cm⁻¹.

3-(Allyloxycarbonylmethyl)-3-deoxy-5-O-(pent-4-enamido)-1,2-O-isopropylidene- α -D-ribofuranose
G15



To a solution of the aminoxy compound **G12** (150 mg, 0.523 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂/MeOH 4/1 (3 mL) at 0°C was added pent-4-enoic anhydride (150 mg, 0.824 mmol, 1.6 eq.). The reaction mixture was stirred for 45 minutes at 0°C. CH₂Cl₂ (5 mL) was added and the organic phase was washed with sat. NaHCO₃ (2 X 3 mL) and brine (3 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 3/7) to give the expected compound **G15** (58 mg, yield = **30%**) as a colorless oil.

R_f: 0.48 (EA/PE 6/4).

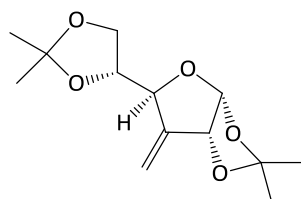
[α]_D: + 61.4 (*c* = 0.5, MeOH).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.32 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.49 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.90-1.95 (m, 2H, CH₂^{Pen}), 2.33-2.45 (m, 4H, CH_{2a}CO + H₃ + CH₂^{Pen}), 2.70-2.78 (m, 1H, CH_{2b}CO), 3.91-3.98 (m, 1H, H_{5a}), 4.02-4.14 (m, 2H, H₄ + H_{5b}), 4.59-4.61 (m, 2H, OCH₂), 4.80 (t, 1H, *J* = 4.0 Hz, H₂), 5.00-5.10 (m, 2H, CH₂^{Pen}), 5.23-5.35 (m, 2H, CH₂^{All}), 5.76-5.83 (m, 1H, CH^{Pen}), 5.84 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, H₁), 5.87-5.94 (m, 1H, CH^{All}), 8.65 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 26.4 (CH₃^{iPr}), 26.7 (CH₃^{iPr}), 29.2 (CH₂^{Pen}), 29.7 (CH₂CO), 33.9 (CH₂^{Pen}), 41.3 (C₃), 65.6 (OCH₂), 75.7 (C₅), 79.5 (C₄), 81.0 (C₂), 105.0 (C₁), 112.1 (C_q^{iPr}), 116.1 (CH₂^{Pen}), 118.6 (CH₂^{All}), 132.0 (=CH^{All}), 136.7 (=CH^{Pen}), 171.8 (CO).

IR (ATR): 3191 (b), 2988, 2901, 1734, 1661, 1558, 1507, 1454, 1412 cm⁻¹.

MS(ESI-HRMS): *m/z* calculated for C₁₈H₂₇NO₇ [M+Na]⁺: 392.1680, found: 392.1679.

3-Deoxy-1,2:5,6-di-O-isopropylidene-3-methylene- α -D-glucofuranose G17**Formula:** C₁₃H₂₀O₅**MW:** 256 g/mol

To a mixture of methyltriphenylphosphonium bromide (6.31 g, 17.6 mmol, 2.6 eq.) in anhydrous THF (27 mL), was added *t*BuOK (1.98 g, 17.6 mmol, 2.6 eq.) in anhydrous THF (8 mL) under nitrogen at 0°C. The yellow mixture was warmed to RT, stirred for 30 minutes and then heated to reflux for 2 hours. After the mixture was cooled to 0°C, the solution of ketone **G2** (1.75 g, 6.78 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous THF (8 mL) was added and the mixture stirred at RT for 2 hours. The reaction mixture was poured into water and extracted with EA (2 X 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 X 20 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give a yellow crude product, which was purified by column chromatography (EA/PE 1/15, 10/1 and then 8/1) to afford the corresponding alkene **G17** as a colorless syrup (1.29 g, yield = **74%**).

R_f: 0.71 (EA/PE 3/7, revelation 1).

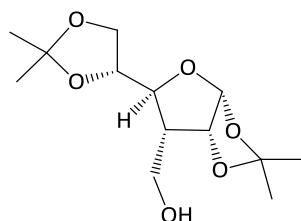
[α]_D: + 96.8 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.36 (s, 3H, CH₃^{*i*Pr}), 1.37 (s, 3H, CH₃^{*i*Pr}), 1.43 (s, 3H, CH₃^{*i*Pr}), 1.52 (s, 3H, CH₃^{*i*Pr}), 3.91-3.96 (m, 1H, H_{6a}), 4.03-4.08 (m, 2H, H₅ + H_{6b}), 4.64-4.66 (m, 1H, H₄), 4.87-4.89 (m, 1H, H₂), 5.44-5.49 (m, 2H, CH₂=), 5.81 (d, 1H, *J* = 4.1 Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.6 (CH₃^{*i*Pr}), 26.8 (CH₃^{*i*Pr}), 27.2 (CH₃^{*i*Pr}), 27.5 (CH₃^{*i*Pr}), 66.9 (C₆), 77.4 (C₅), 79.4 (C₄), 82.3 (C₂), 104.7 (C₁), 110.0 (C_q^{*i*Pr}), 112.8 (C_q^{*i*Pr}), 113.6 (CH₂=), 146.9 (C₃).

IR (ATR): 2994, 2929, 1680, 1450 cm⁻¹.

Reference: K.I. Sato, S. Akai, H. Shoji, N. Sugita, S. Yoshida, Y. Nagai, K. Suzuki, Y. Nakamura, Y. Kajihara, M. Funabashi, J. Yoshimura, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1234-1242.

3-Deoxy-3-(hydroxymethyl)-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose G18**Formula:** C₁₃H₂₂O₆**MW:** 274 g/mol

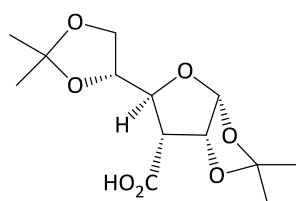
To the borane/THF complex solution (1 M, 2.81 mL, 2.81 mmol, 2.4 eq.) at 0 °C under argon was added the alkene **G17** (300 mg, 1.17 mmol, 1.0 eq.) in THF (2.5 mL). The solution was stirred at RT for 2 hours. After the mixture was cooled to 0 °C, THF/H₂O (1/1, 1.84 mL), aqueous NaOH (2 M, 2.2 mL) and aqueous H₂O₂ (30% w/w, 1.84 mL) were added. The mixture was stirred at RT for 2 hours and then diluted with H₂O (20 mL) and brine (20 mL) and extracted with EA (2 X 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 X 40 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to yield 280 mg of crude product, which was purified by column chromatography (CH₂Cl₂/EA, 20/1) to afford the corresponding alcohol **G18** as a colorless syrup (207 mg, yield = 65 %).

R_f: 0.18 (EA/PE 3/7, revelation 1).**[α]_D:** + 30.5 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.31 (s, 3H, CH₃^{*i*Pr}), 1.36 (s, 3H, CH₃^{*i*Pr}), 1.45 (s, 3H, CH₃^{*i*Pr}), 1.51 (s, 3H, CH₃^{*i*Pr}), 2.08-2.13 (m, 1H, H₃), 3.23 (dd, 1H, *J* = 9.6, 2.8 Hz, OH), 3.84-3.93 (m, 3H, CH₂OH + H₄), 3.96-4.03 (m, 2H, H₅ + H_{6a}), 4.13-4.17 (m, 1H, H_{6b}), 4.74 (t, 1H, *J* = 4.0 Hz, H₂), 5.76 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.3 (CH₃^{*i*Pr}), 26.3 (CH₃^{*i*Pr}), 26.6 (CH₃^{*i*Pr}), 26.8 (CH₃^{*i*Pr}), 51.5 (C₃), 59.7 (CH₂OH), 68.1 (C₆), 77.3 (C₅), 81.8 (C₄), 82.6 (C₂), 105.0 (C₁), 110.1 (C_q^{*i*Pr}), 112.4 (C_q^{*i*Pr}).

IR (ATR): 3479 (b), 2986, 2935, 2886, 1457 cm⁻¹.**Reference:** Y. Gong, H. Sun, J. Xie, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 6027-6033.

3-Carboxy-3-deoxy-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose G19**Formula:** C₁₃H₂₀O₇**MW:** 288 g/mol

A solution of the alcohol **G18** (721 mg, 2.63 mmol, 1.0 eq.), BAIB (1.70 g, 5.28 mmol, 2.0 eq.) and TEMPO (83 mg, 0.531 mmol, 0.20 eq.) in MeCN/H₂O (1/1, 4 mL) was stirred at RT for 3 hours. The reaction mixture was concentrated and the residue was dissolved in Et₂O (10 mL). The precipitate was filtered to give the corresponding carboxylic acid **G19** as a white solid (450 mg, yield = **59%**).

R_f: 0.45 (EA, revelation 1).

[α]_D: + 79.2 (*c* = 0.5, CHCl₃).

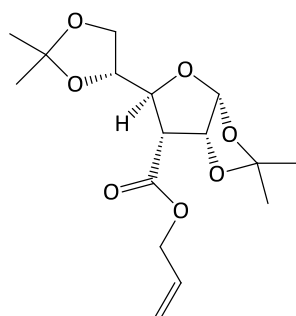
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.34 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.35 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.44 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.54 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 3.07 (dd, 1H, *J* = 9.7, 5.9 Hz, H₃), 3.98-4.02 (m, 1H, H_{6a}), 4.07-4.13 (m, 1H, H_{6b}), 4.26 (q, 1H, *J* = 5.2 Hz, H₅), 4.53 (dd, 1H, *J* = 9.7, 5.2 Hz, H₄), 4.98 (dd, 1H, *J* = 5.9, 3.8 Hz, H₂), 5.90 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.1 (CH₃^{iPr}), 26.1 (CH₃^{iPr}), 26.8 (CH₃^{iPr}), 26.9 (CH₃^{iPr}), 50.8 (C₃), 66.2 (C₆), 76.2 (C₅), 78.9 (C₄), 81.7 (C₂), 105.2 (C₁), 110.1 (C_q^{iPr}), 112.9 (C_q^{iPr}), 172.6 (CO^{acid}).

MP: 174°C.

IR (ATR): 3150 (b), 2988, 2972, 1743, 1735, 1450, 1423, 1407 cm⁻¹.

MS (TOF MS ES⁺): *m/z* calculated for C₁₃H₂₀O₇ [M+Na]⁺: 311.1 found: 311.1.

3-Deoxy-3-(ethoxycarbonyl)-1,2:5,6-di-O-isopropylidene- α -D-glucofuranose G20**Formula:** C₁₆H₂₄O₇**MW:** 328 g/mol

To a solution of the carboxylic acid **G19** (100 mg, 0.347 mmol, 1.0 eq.) in DMF (1 mL) was added NaHCO₃ (44 mg, 0.524 mmol, 1.5 eq.) and allyl bromide (60 μ L, 0.693 mmol, 2.0 eq.). The reaction mixture was stirred overnight at 50°C. NaHCO₃ (29 mg, 0.347 mmol, 1.0 eq.) and allyl bromide (45 μ L, 0.520 mmol, 1.5 eq.) were added. The reaction mixture was stirred for 3 days at RT and then concentrated. The residue was dissolved in EA (5 mL), filtered, washed with brine (2 X 5 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to give the expected ester **G20** as a colorless oil (108 mg, yield = 95%).

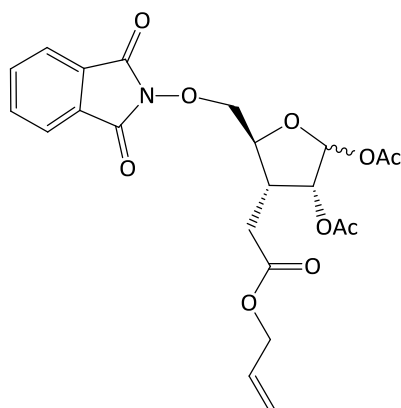
R_f: 0.48 (EA/PE 2/8, revelation 1).

[α]_D: + 72.0 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.30 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.32 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.40 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 1.50 (s, 3H, CH₃^{iPr}), 3.04 (dd, 1H, *J* = 9.8, 5.9 Hz, H₃), 3.92 (dd, 1H, *J* = 8.8, 5.5 Hz, H_{6a}), 4.04 (dd, 1H, *J* = 8.8, 6.9 Hz, H_{6b}), 4.26-4.27 (m, 1H, H₅), 4.56-4.61 (m, 2H, H₄ + OCH_{2a}), 4.68-4.73 (m, 1H, OCH_{2b}), 4.92 (dd, *J* = 5.9, 3.9 Hz, 1H, H₂), 5.21-5.36 (m, 2H, CH₂=), 5.87 (d, 1H, *J* = 3.9 Hz, H₁), 5.88-5.95 (m, 1H, CH=).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.1 (CH₃^{iPr}), 26.2 (CH₃^{iPr}), 26.7 (CH₃^{iPr}), 26.9 (CH₃^{iPr}), 50.5 (C₃), 65.7, 66.0 (C₆ + OCH₂), 76.1 (C₅), 79.1 (C₄), 81.7 (C₂), 105.2 (C₁), 109.9 (C_q^{iPr}), 112.6 (C_q^{iPr}), 118.3 (CH₂=), 132.0 (CH=), 167.9 (CO^{ester}).

IR (ATR): 2986, 2901, 1741, 1457 cm⁻¹.

1,2-Di-O-acetyl-3-(allyloxycarbonylmethyl)-3-deoxy-5-O-phthalimido- α -D-ribofuranose G25Formula: C₂₂H₂₃NO₁₀

MW: 461 g/mol

To a solution of the acetal compound **G20** (100 mg, 0.240 mmol, 1.0 eq.) in AcOH (1.37 mL) was added Ac₂O (137 μ L, 1.87 mmol, 7.8 eq.) and 97% H₂SO₄ aqueous solution (75 μ L, 1.41 mmol, 5.9 eq.). The reaction mixture was stirred overnight at RT. Water (5 mL) was added and the aqueous layer was extracted with EA (3 X 10 mL). The combined organic layers were washed with sat. NaHCO₃ solution (15 mL), brine (15 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography to give an anomeric mixture (\approx 9/1) of **G25** as a white solid (45 mg, yield = **41%**).

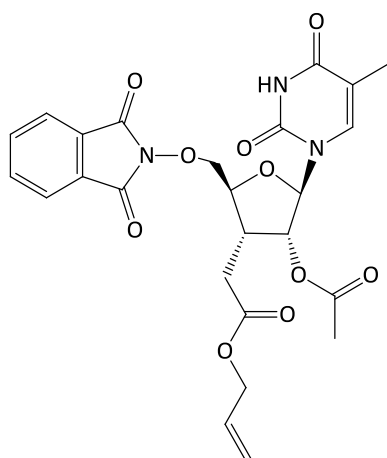
R_f: 0.50 (EA/PE 4/6).[α]_D: - 31.8 (c = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (major anomer) (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.06 (s, 3H, CH₃^{OAc}), 2.09 (s, 3H, CH₃^{OAc}), 2.65-2.68 (m, 2H, CH₂CO), 2.85-2.90 (m, 1H, H₃), 4.26-4.32 (m, 1H, H_{5a}), 4.39-4.43 (m, 2H, H₄ + H_{5b}), 4.59-4.61 (m, 2H, OCH₂), 5.24-5.35 (m, 3H, H₂ + CH₂=), 5.87-5.96 (m, 1H, CH=), 6.02 (m, 1H, H₁), 7.74-7.83 (m, 4H, H^{Phth}).

RMN ¹³C (major anomer) (CDCl₃, 100 MHz): δ 20.8 (CH₃^{OAc}), 21.3 (CH₃^{OAc}), 30.9 (CH₂CO), 38.9 (C₃), 65.9 (OCH₂), 77.4 (C₂), 79.4 (C₅), 82.5 (C₄), 99.0 (C₁), 119.1 (CH₂=), 123.7 (CH^{Phth}), 129.0 (C_q^{Phth}), 131.9 (=CH), 134.6 (CH^{Phth}), 163.5 (CO^{Phth}), 169.2 (CO^{OAc}), 169.9, 171.0 (CO^{OAc} + CO^{ester}).

MP: 92°C.

IR (ATR): 2964, 2931, 1796, 1770, 1739, 1724, 1700, 1649, 1457, 1435 cm⁻¹.MS (MALDI-TOF): m/z calculated for C₂₂H₂₃NO₁₀ [M+K]⁺: 500.0954, found: 500.0951.

2'-O-Acetyl-3'-(allyloxycarbonylmethyl)-3'-deoxy-5'-O-phthalimidothymidine G26Formula: C₂₅H₂₅N₃O₁₀

MW: 527 g/mol

To a solution of the compound **G25** (173 mg, 0.375 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous MeCN (7 mL) was added under argon the nucleic base thymine (71 mg, 0.563 mmol, 1.5 eq.) and *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (413 μ L, 1.69 mmol, 4.5 eq.). The trouble mixture was refluxed for 30 minutes until the solution was clear. After cooling to RT, TMSOTf (103 μ L, 0,593 mmol, 1.5 eq.) was added. The mixture was refluxed again for 2 hours and then cooled to RT. The solution was evaporated to dryness; the residue was dissolved in CH₂Cl₂ (15 mL) and washed with 1 M HCl (15 mL), brine (15 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered, evaporated and purified by column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH 99/1 to 97.5/2.5) to give 99 mg of the expected compound **G26** as a light yellow gum (yield = 50%).

R_f: 0.47 (CH₂Cl₂/MeOH 95/5, revelation 1).

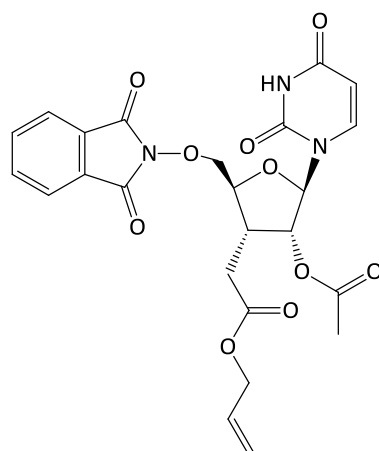
[α]_D: + 91.8 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 1.94 (d, 3H, *J* = 1.1 Hz, CH₃^T), 2.10 (s, 3H, CH₃^{OAc}), 2.63-2.66 (m, 2H, CH₂CO), 3.23-3.27 (m, 1H, H_{3'}), 4.27-4.29 (m, 1H, H_{4'}), 4.46-4.55 (m, 2H, H_{5'}), 4.59-4.61 (dt, 2H, *J* = 6.0, 1.4 Hz, OCH₂), 5.23-5.34 (m, 2H, CH₂=), 5.52 (dd, 1H, *J* = 6.9, 3.4 Hz, H_{2'}), 5.86 (d, 1H, *J* = 3.4 Hz, H_{1'}), 5.88-5.94 (m, 1H, CH=), 7.52 (d, 2H, *J* = 1.1 Hz, H₆), 7.74-7.86 (m, 4H, H^{Phth}), 8.58 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 12.5 (CH₃^T), 20.7 (CH₃^{OAc}), 31.1 (CH₂CO), 37.6 (C_{3'}), 65.9 (OCH₂), 76.5 (C_{2'}), 77.5 (C_{5'}), 81.5 (C_{4'}), 89.8 (C_{1'}), 111.6 (C₅), 119.1 (CH₂=), 123.9 (CH^{Phth}), 128.9 (C_q^{Phth}), 131.9 (CH=), 134.9 (CH^{Phth}), 136.0 (C₆), 150.2 (C₂), 163.2, 163.7 (C₄ + CO^{Phth}), 169.7, 170.8 (CO^{OAc} + CO^{ester}).

IR (ATR): 2930, 1790, 1730, 1650, 1468, 1453 cm⁻¹.

MS (TOF MS ES+): *m/z* calculated for C₂₅H₂₅N₃O₁₀ [M+Na]⁺: 550.1, found: 550.2.

2'-O-Acetyl-3'-(allyloxycarbonylmethyl)-3'-deoxy-5'-O-phthalimidouridine G27Formula: C₂₄H₂₃N₃O₁₀

MW: 513 g/mol

To a solution of the compound **G25** (50 mg, 0.108 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous MeCN (2 mL) was added under argon the nucleic base uracil (18 mg, 0.160 mmol, 1.5 eq.) and *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (119 μ L, 0.487 mmol, 4.5 eq.). The trouble mixture was refluxed for 30 minutes until the solution was clear. After cooling to RT, TMSOTf (29 μ L, 0.160 mmol, 1.5 eq.) was added. The mixture was refluxed again for 2h30 and then cooled to RT. The solution was evaporated to dryness; the residue was dissolved in EA (10 mL) and washed with 1 M HCl (10 mL), brine (10 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered, evaporated and purified by column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH 98/2) to give 29 mg of the expected compound **G27** as a light yellow gum (yield = 52%).

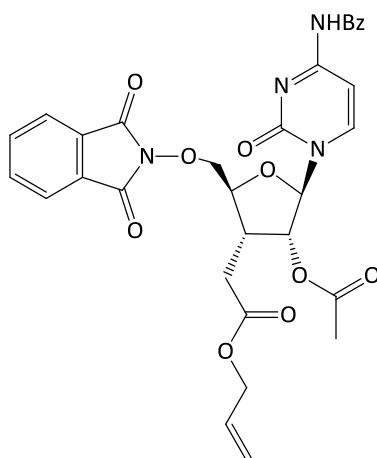
R_f: 0.37 (CH₂Cl₂/MeOH 9/1, revelation 1).

[α]_D: + 87.4 (*c* = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.11 (s, 3H, CH₃^{OAc}), 2.60-2.65 (m, 2H, CH₂CO), 3.18-3.23 (m, 1H, H_{3'}), 4.28-4.31 (dt, 1H, *J* = 8.2, 2.8 Hz, H_{4'}), 4.49-4.52 (m, 2H, H_{5'}), 4.58-4.61 (m, 2H, OCH₂), 5.23-5.34 (m, 2H, CH₂=), 5.23 (dd, 1H, *J* = 6.6, 3.1 Hz, H_{2'}), 5.78 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, H₅), 5.84 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz, H_{1'}), 5.86-5.93 (m, 1H, CH=), 7.74-7.85 (m, 5H, H₆ + H^{Phth}), 9.00 (s (b), 1H, NH).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 20.7 (CH₃^{OAc}), 30.9 (CH₂CO), 37.5 (C_{3'}), 65.9 (OCH₂), 76.7 (C_{2'}), 77.2 (C_{5'}), 81.7 (C_{4'}), 90.1 (C_{1'}), 102.9 (C₅), 119.1 (CH₂=), 123.9 (CH^{Phth}), 128.8 (C_q^{Phth}), 131.8 (CH=), 134.9 (CH^{Phth}), 140.5 (C₆), 150.2 (C₂), 163.2 (C₄ + CO^{Phth}), 169.6, 170.7 (CO^{OAc} + CO^{ester}).

IR (ATR): 2927, 2855, 1790, 1729, 1690, 1655, 1636, 1456 cm⁻¹.

2'-O-Acetyl-3'-(allyloxycarbonylmethyl)-N⁴-benzoyl-3'-deoxy-5'-O-phthalimidocytidine G28Formula: C₃₁H₂₈N₄O₁₀

MW: 617 g/mol

To a solution of the crude compound **G25** (160 mg, 0.347 mmol, 1.0 eq.) in anhydrous MeCN (7 mL) was added under argon the nucleic base *N*⁴-cytosine (112 mg, 0.520 mmol, 1.5 eq.) and *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (382 μL, 1.56 mmol, 4.5 eq.). The trouble mixture was refluxed for 30 minutes until the solution was clear. After cooling to RT, TMSOTf (94 μL, 0.344 mmol, 1.5 eq.) was added. The mixture was refluxed again for 2h30 and then cooled to RT. The solution was evaporated to dryness; the residue was dissolved in EA (20 mL) and washed with a 1 M HCl (20 mL) solution saturated with NaCl, brine (20 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered, evaporated and purified by column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH 99.5/0.5 to 98/2) to give 125 mg of the expected compound **G28** as a white solid (yield = 58%).

R_f: 0.39 (CH₂Cl₂/MeOH 97/3).[α]_D: + 166 (c = 0.5, CHCl₃).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.14 (s, 3H, CH₃^{OAc}), 2.57-2.62 (m, 2H, CH₂CO), 3.11-3.18 (m, 1H, H_{3'}), 4.28-4.31 (dt, 1H, *J* = 9.2, 2.8 Hz, H_{4'}), 4.57-4.62 (m, 4H, H_{5'} + OCH₂), 5.23-5.34 (m, 2H, CH₂=), 5.68 (dd, 1H, *J* = 6.0, 2.0 Hz, H_{2'}), 5.86-5.93 (m, 1H, CH=), 5.84 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, H_{1'}), 7.50-7.91 (m, 10H, H₅ + H^{Phth} + H^{Bz}), 8.53 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, H₆), 9.00 (s (b), 1H, NH).

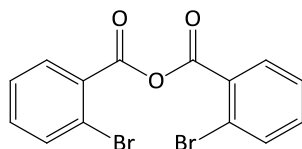
RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 20.8 (CH₃^{OAc}), 30.6 (CH₂CO), 37.1 (C_{3'}), 66.0 (OCH₂), 76.7 (C_{5'}), 77.3 (C_{2'}), 82.2 (C_{4'}), 91.2 (C_{1'}), 96.8 (C₅), 119.0 (CH₂=), 123.9 (CH^{Phth}), 127.7 (CH^{Bz}), 128.9 (C_q^{Phth}), 129.2 (CH^{Bz}), 131.9 (CH=), 133.1 (C_q^{Bz}), 133.3 (CH^{Bz}), 134.9 (CH^{Phth}), 145.5 (C₆), 154.8 (C₂), 162.5 (C₄), 163.2 (CO^{Phth}), 166.4, 169.3, 170.6 (CO^{Bz} + CO^{OAc} + CO^{ester}).

MP: 171°C.

IR (ATR): 2944, 1789, 1729, 1667, 1622, 1556, 1482 cm⁻¹.

Synthesis of chemical probes

2-Bromobenzoic anhydride R1



Formula: C₁₄H₈Br₂O₃

MW: 384 g/mol

To a solution of 2-bromobenzoic acid (300 mg, 1.49 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (6 mL) was added DCC (154 mg, 0.748 mmol, 0.5 eq.). The reaction mixture was stirred for one week at RT and the precipitate was filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure. EA/PE 9/1 (10 mL) was added. A white precipitate appeared and was filtered to give the corresponding anhydride **R1** (234 mg, yield = **78%**) as a white solid.

R_f: 0.48 (EA/PE 2/8).

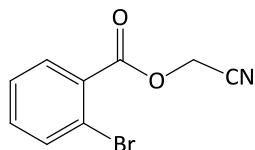
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.42-7.47 (m, 4H, H^{Ph}), 7.73-7.76 (m, 2H, H^{Ph}), 8.00-8.03 (m, 2H, H^{Ph}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 123.2 (C_q^{Ph}), 127.6 (CH^{Ph}), 130.0 (C_q^{Ph}), 132.8 (CH^{Ph}), 134.3 (CH^{Ph}), 135.2 (CH^{Ph}), 161.0 (CO^{anhydride}).

MP: 75°C (*lit.* 76-77°C).

IR (ATR): 2980, 2882, 1790, 1719, 1692, 1647, 1586, 1467, 1439, 1409 cm⁻¹.

Reference: Y. Kita, S. Akai, M. Yoshigi, Y. Nakajima, H. Yasuda, Y. Tamura, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 6027-6030.

Cyanomethyl 2-bromobenzoate R2**Formula:** C₉H₆BrNO₂**MW:** 240 g/mol

To a solution of 2-bromobenzoic acid (200 mg, 1.00 mmol, 1.0 eq.) in THF (5 mL) were added Et₃N (126 μL, 2.00 mmol, 2.0 eq.) and 2-chloroacetonitrile (280 μL, 2.00 mmol, 2.0 eq.) at RT. After 24 hours of stirring, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The minimum of EA was added and the precipitate was filtered. The filtrate was washed with brine (3 x 10 mL). The organic layer was dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated to give **R2** as a colorless oil (190 mg, yield = **79%**).

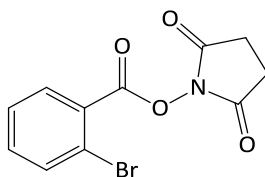
R_f: 0.71 (EA/PE 5/5).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 4.97 (s, 2H, CH₂), 7.36-7.39 (m, 2H, H^{Ph}), 7.66-7.69 (m, 1H, H^{Ph}), 7.83-7.86 (m, 1H, H^{Ph}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 49.1 (OCH₂), 114.3 (CN), 122.5 (C_q^{Ph}), 127.5 (CH^{Ph}), 129.4 (C_q^{Ph}), 132.0 (CH^{Ph}), 133.9 (CH^{Ph}), 134.9 (CH^{Ph}), 164.2 (CO^{ester}).

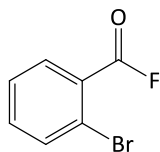
IR (ATR): 2970, 2885, 2253, 1743, 1593, 1470, 1429 cm⁻¹.

Reference: P. Setzer, G. Forcher, F. Boeda, M. S. M. Pearson-Long, P. Bertus, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 171-180.

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 2-bromobenzoate R3**Formula:** C₁₁H₈BrNO₄**MW:** 298 g/mol

To a solution of 2-bromobenzoic acid (300 mg, 1.49 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (5 mL) were added *N*-hydroxysuccinimide (171 mg, 1.49 mmol, 1.0 eq.) and DCC (338 mg, 1.64 mmol, 1.1 eq.) at RT. A yellow white solid was formed and the mixture was stirred overnight. The precipitate was filtered and the filtrate was concentrated. The residue was dissolved in the minimum of EA and by adding PE, a white precipitate was formed. The precipitate was filtered to give **R3** as a white solid (138 mg, yield = **31%**).

R_f: 0.50 (EA/PE 5/5).**RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.92 (s, 4H, CH₂), 7.42-7.48 (m, 2H, H^{Ph}), 7.74-7.76 (m, 1H, H^{Ph}), 8.08-8.10 (m, 1H, H^{Ph}).**RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.9 (CH₂), 123.7 (C_q^{Ph}), 126.6 (C_q^{Ph}), 127.5 (CH^{Ph}), 132.7 (CH^{Ph}), 134.8 (CH^{Ph}), 135.2 (CH^{Ph}), 160.2, 169.1 (CO^{ester} + CO^{succinimide}).**MP:** 185°C.**IR (ATR):** 3001, 2991, 1777, 1746, 1726, 1579, 1456, 1432 cm⁻¹.**Reference:** A. Schulze, A. Giannis, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, 346, 252-256.

2-Bromobenzoyl fluoride R4**Formula:** C₇H₄BrFO**MW:** 203 g/mol

To a solution of 2-bromobenzoic acid (296 mg, 1.47 mmol, 1.0 eq.) in CH₃CN (2.5 mL) were added pyridine (119 μL, 1.47 mmol, 1.0 eq.) and a solution of cyanuric fluoride (57 μL, 0.66 mmol, 0.45 eq.) in CH₃CN (1.5 mL) at RT. The reaction mixture was stirred overnight before being poored into iced water (5 mL). Et₂O (5 mL) was added. After separation, the organic phase was washed with water (2 x 4 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated. The residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 5/95) to give **R4** (298 mg). Because of its volatility, the compound was isolated with solvents.

R_f: 0.64 (EA/PE 2/8).

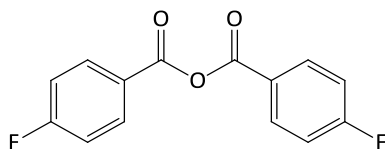
RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.44-7.50 (m, 2H, H^{Ph}), 7.76-7.78 (m, 1H, H^{Ph}), 8.01 (dd, *J* = 2.3, 7.3 Hz, 1H, H^{Ph}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 124.9 (C_q^{Ph}), 127.7 (CH^{Ph}), 133.8 (CH^{Ph}), 135.4 (CH^{Ph}), 135.6 (CH^{Ph}), 153.2 (C_q^{Ph}), 156.6 (C_q^{Ph}).

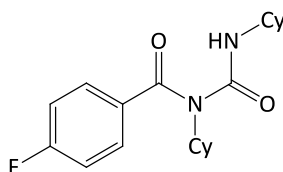
RMN ¹⁹F (CDCl₃, 160 MHz): δ 31.6.

IR (ATR): 2980, 2905, 1798, 1610, 1551, 1456, 1406 cm⁻¹.

Reference: G. O. Alah, J. Welch, *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5396-5402.

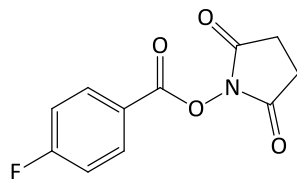
4-Fluorobenzoic anhydride R5**Formula:** C₁₄H₈F₂O₃**MW:** 262 g/mol

To a solution of 4-fluorobenzoic acid (288 mg, 2.06 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (6 mL) was added DCC (213 mg, 1.03 mmol, 0.5 eq.). The reaction mixture was stirred for one week at RT and the precipitate was filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 5/95) to give the anhydride **R5** (180 mg, yield = **63%**) as a white solid. The compound **R9** was also obtained as a white solid in lower yield (18%).

R_f: 0.89 (EA/PE 2/8).**RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.23-7.19 (m, 4H, H^{Ph}), 8.19-8.16 (m, 4H, H^{Ph}).**RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz): δ 116.4 (d, J_{C-F} = 22.9 Hz, CH^{Ph}), 125.1 (d, J_{C-F} = 2.8 Hz, C_q^{Ph}), 133.3 (d, J_{C-F} = 9.5 Hz, CH^{Ph}), 161.3, 168.1, 168.5 (C_q^{Ph} + CO^{anhydride}).**MP:** 124°C.**IR (ATR):** 2987, 2905, 1784, 1729, 1606, 1504, 1405 cm⁻¹.**Reference:** Y. Li, Yang, D. Xue, C. Wang, Z. T. Liu, J. Xiao, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 1320-1322.**N-Cyclohexyl-N-(cyclohexylcarbamoyl)-4-fluorobenzamide R9****Formula:** C₂₀H₂₇FN₂O₂**MW:** 346 g/mol**R_f:** 0.25 (EA/PE 2/8).**RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.84-0.93 (m, 2H, H^{Cy}), 1.06-1.37 (m, 6H, H^{Cy}), 1.51-1.63 (m, 4H, H^{Cy}), 1.69-1.73 (m, 2H, H^{Cy}), 1.78-1.82 (m, 4H, H^{Cy}), 1.92-2.04 (m, 2H, H^{Cy}), 3.44-3.54 (m, 1H, H^{Cy}), 4.08-4.14 (m, 1H, H^{Cy}), 5.92 (d, J = 7.3 Hz, 1H, NH), 7.07-7.11 (m, 2H, CH^{Ph}), 7.56-7.60 (m, 2H, CH^{Ph}).**RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz): δ 24.6 (CH₂^{Cy}), 24.8 (CH₂^{Cy}), 24.9 (CH₂^{Cy}), 25.3 (CH₂^{Cy}), 25.4 (CH₂^{Cy}), 25.5 (CH₂^{Cy}), 26.3 (CH₂^{Cy}), 30.9 (CH₂^{Cy}), 32.4 (CH₂^{Cy}), 33.7 (CH₂^{Cy}), 49.8 (CH^{Cy}), 57.4 (CH^{Cy}), 115.7 (d, J_{C-F} = 21.9 Hz, CH^{Ph}), 127.7 (d, J_{C-F} = 3.1 Hz, C_q^{Ph}), 129.2 (d, J_{C-F} = 8.6 Hz, CH^{Ph}), 133.2 (C_q^{Ph}), 154.3, 170.1 (CO).

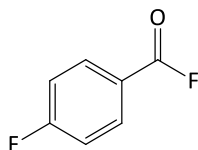
MP: 184°C.

IR (ATR): 3311, 2977, 2932, 2851, 1729, 1698, 1661, 1654, 1620, 1600, 1538, 1494, 1439, 1409 cm^{-1} .

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl 4-fluorobenzoate R6**Formula:** C₁₁H₈FNO₄**MW:** 237 g/mol

To a solution of 4-fluorobenzoic acid (288 mg, 2.06 mmol, 1.0 eq.) in CH₂Cl₂ (6 mL) was added DCC (467 mg, 2.27 mmol, 1.1 eq.) and *N*-hydroxysuccinimide (261 mg, 2.27 mmol, 1.1 eq.) at RT. The reaction mixture was stirred overnight and the precipitate was filtered. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (silica gel, EA/PE 2/8) to give **R6** as a white solid (364 mg, yield = **75%**).

R_f: 0.66 (EA/PE 5/5).**RMN ¹H** (CDCl₃, 400 MHz): δ 2.92 (s, 4H, CH₂), 7.22-7.18 (m, 2H, H^{Ph}), 8.19-8.16 (m, 2H, H^{Ph}).**RMN ¹³C** (CDCl₃, 100 MHz): δ 25.8 (CH₂), 116.4 (d, *J*_{C-F} = 21.9 Hz, CH^{Ph}), 121.5 (d, *J*_{C-F} = 2.9 Hz, C_q^{Ph}), 133.4 (d, *J*_{C-F} = 9.5 Hz, CH^{Ph}), 161.0, 165.7, 168.2, 169.3 (C_q^{Ph} + CO^{ester} + CO^{succinimide}).**MP:** 122°C.**IR (ATR):** 2990, 2912, 1777, 1732, 1603, 1511, 1419 cm⁻¹.**Reference:** G. Wang, Q. Y. Yu, J. Wang, S. Wang, S. Y. Chen, X. Q. Yu, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 21306-21310.

4-Fluorobenzoyl fluoride R7**Formula:** C₇H₄F₂O**MW:** 142 g/mol

To a solution of 4-fluorobenzoic acid (298 mg, 2.12 mmol, 1.0 eq.) in CH₃CN (2.65 mL) was added pyridine (171 μL, 2.12 mmol, 1.0 eq.) at RT. CH₃CN (0.5 mL) was added to obtain a homogeneous mixture. A solution of cyanuric fluoride (82 μL, 0.95 mmol, 0.45 eq.) in CH₃CN (1.0 mL) was added at RT. The reaction mixture was stirred overnight before being poured into iced water (6 mL). The mixture was diluted by adding Et₂O (6 mL). After separation, the organic phase was washed with water (2 x 4 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated. The residue was filtered over silica gel to give **R7** as colorless oil. Because of its volatility, the compound was isolated with solvents.

R_f: 0.70 (EA/PE 5/95).

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 7.23-7.19 (m, 2H, H^{Ph}), 8.10-8.07 (m, 2H, H^{Ph}).

RMN ¹³C (CDCl₃, 100 MHz): δ 116.6 (d, J_{C-F} = 22.9 Hz, CH^{Ph}), 134.3 (dd, J_{C-F} = 8.6, 5.7 Hz, CH^{Ph}). No peaks for quaternary carbons.

RMN ¹⁹F (CDCl₃, 160 MHz): δ - 104.1 (C^{Ph}F), 18.1 (COF).

IR (ATR): 2990, 2907, 1795, 1655, 1601, 1498, 1408 cm⁻¹.

Reference: J. A. Birrel, J. N. Desrosiers, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13872-13875.

Sequencing (Sanger method)

HCV SL1(-) region synthesis and purification:

DNA templates for *in vitro* transcription of minus strand HCV RNA were generated by digestion of the appropriate plasmid pX(-) with FokI (New England Biolabs). RNA was prepared by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase, as previously described.⁷⁰⁰

HIV-1 synthesis and purification:

DNA templates for *in vitro* transcription of RNA 1-415wt were generated by digestion of the appropriate plasmid pYC5' with HaeIII (New England Biolabs). RNA was prepared by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase, as previously described.⁶⁹⁸

Labeling with ³²P of P117H oligodeoxyribonucleotide:

The P117H oligodeoxyribonucleotide (50 pmol, 1.0 μL) was labeled at the 5' position with ³²P by using T4 kinase polynucleotide (1.5 μL, 10 U/μL, New England Biolabs), kinase 10X buffer (1 μL, New England Biolabs), double-distilled water (1.5 μL) and [γ-³²P]ATP (50 μCi).⁶⁹⁸ The mixture was incubated at 37°C for 45 minutes and 30 μL of double-distilled water was added before purification with TE10 column (Clontech).

Labeling with ³²P of PF6 oligodeoxyribonucleotide:

The PF6 oligodeoxyribonucleotide (50 pmol, 1.0 μL) was labeled at the 5' position with ³²P by using T4 kinase polynucleotide (1.5 μL, 10 U/μL, New England Biolabs), kinase 10X buffer (1 μL, New England Biolabs), double-distilled water (1.5 μL) and [γ-³²P]ATP (50 μCi).⁷⁰⁰ The mixture was incubated at 37°C for 45 minutes and 30 μL of double-distilled water was added before purification with TE10 column (Clontech).

Mixture MS for one sequencing:

To 4.0 pmol of the studied RNA was added 4.10⁵ cpm of the labeled oligodeoxyribonucleotide. Double-distilled water was added until the total volume reached 32 μL. The solution was heated at 90°C for 2 minutes and then cooled in liquid N₂ for 15 secondes and allowed to defrost at RT.

Dilution of the AMV reverse transcriptase:

A solution of the AMV reverse transcriptase (2 U/μL) was freshly prepared by dilution of the AMV reverse transcriptase (15 U/μL, Invitrogen) in cold RTB 0.5X buffer.

Sequencing:

4 Mixtures called A, C, G and T (corresponding after transcription to U, G, C and A) were prepared according to the following compositions:

	A	C	G	T
MS	7.5 µL	7.5 µL	7.5 µL	7.5 µL
MA	6.5 µL	0 µL	0 µL	0 µL
MC	0 µL	6.5 µL	0 µL	0 µL
MG	0 µL	0 µL	6.5 µL	0 µL
MT	0 µL	0 µL	0 µL	6.5 µL
AMV RT (2 U/µL)	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL

The reactions were incubated at 37°C for 30 minutes. Reactions were then stopped by addition of 10 µL of 0.3 M NaOH-50 mM EDTA and incubation at 90°C for 10 minutes. 75 µL of AcONa (0.4 M, pH 5.2) was added and the complementary DNA was recovered by ethanol, washed with 70% ethanol, dried. The samples were resuspended in 7.0 µL of loading buffer (98% deionized formamide, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol). 3.5 µL of the previous sample were heated at 90°C for 2 minutes. Electrophoresis (2000 V, 60 mA, 65 W) on a denaturing gel (8% polyacrylamide, 7.2 M urea; 0.4 mm x 28.5 cm x 23 cm) in TBE 1X (89 mM Tris-base, 89 mM borate, 2.0 mM EDTA) was used for 90-120 minutes to separate the generated complementary DNA fragments.

Appendix: composition of solutions

Reverse Transcription Buffer 5X (RTB 5X)	250 mM Tris-HCl pH 8.5
	40 mM MgCl ₂
	150 mM KCl
	5 mM DTT

A10	0.25 mM dATP
	1.0 mM dCTP
	1.0 mM dGTP
	1.0 mM dTTP

C10	1.0 mM dATP
	0.25 mM dCTP
	1.0 mM dGTP
	1.0 mM dTTP

G10	1.0 mM dATP
	1.0 mM dCTP
	0.25 mM dGTP
	1.0 mM dTTP

T10	1.0 mM dATP
	1.0 mM dCTP
	1.0 mM dGTP
	0.25 mM dTTP

ΣdNTP (20 mM)	20 mM dATP
	20 mM dCTP
	20 mM dGTP
	20 mM dTTP

MA (65 µL)	15 µL A10
	7.5 µL ddATP (100 µM)
	30 µL RTB 5X
	12.5 µL H ₂ O
MC (65 µL)	15 µL C10
	7.5 µL ddCTP (100 µM)
	30 µL RTB 5X
	12.5 µL H ₂ O
MG (65 µL)	15 µL G10
	5 µL ddGTP (100 µM)
	30 µL RTB 5X
	15 µL H ₂ O
MT (65 µL)	15 µL T10
	7.5 µL ddTTP (100 µM)
	30 µL RTB 5X
	12.5 µL H ₂ O

Probing

RNA folding:

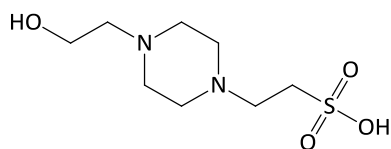
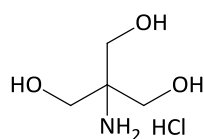
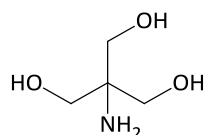
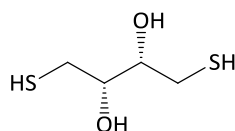
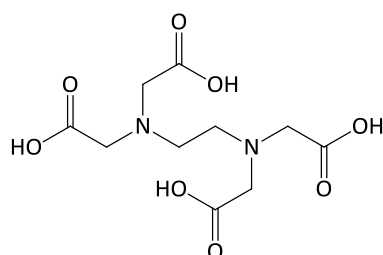
RNA (2.0 pmol) in 7.8 μL of double-distilled water was heated at 90°C for 2 minutes and chilled on ice. Then, 2 μL of renaturation buffer (final concentrations: 50 mM HEPES-KOH (pH 8), 200 mM AcOK and 5 mM MgCl_2) was added and the sample was incubated for 30 minutes at 37°C before to be chilled on ice for 5 minutes. At the end of this renaturation step, 0.20 μL of a tRNA mixture (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) from *E. coli* MRE 600 (Roche Molecular Biochemicals) was added to the sample before the addition of the acylating reagent.

SHAPE modification:

RNA modification was carried out in a final volume of 12 μL . 1.5 μL of renaturation buffer was added to the renatured RNA (2 pmol in 10 μL) before incubation at 37°C for 1, 5 or 15 minutes in the presence of 0.5 μL of neat DMSO (control) or in the presence of 0.5 μL of acylating reagent (100 mM in DMSO). One microliter of renaturation buffer was added to the renatured RNA (10 μL) when the reaction was performed at 37°C for 1, 5 or 15 minutes in the presence of 0.5 μL of acylating reagent (100 mM in DMSO) and 0.5 μL of DMAP or PPY (6 mM in DMSO) or 0.5 μL of superDMAP (0.6 mM in DMSO). In the case of RNA modification with 0.5 μL of compound **R5** (100 mM in DMSO), 0.5 μL of Et_3N (100 mM in DMSO) was added to the reaction mixture in the absence or in the presence of a catalyst. At the end of incubation, RNA was recovered by ethanol precipitation and the dried pellet was resuspended in 6.5 μL of double-distilled water.

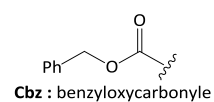
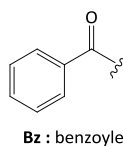
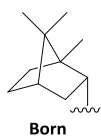
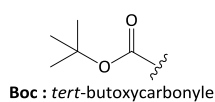
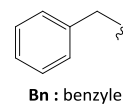
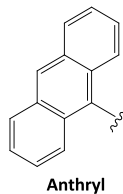
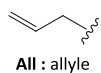
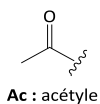
Primer extension and data analysis:

Oligodeoxyribonucleotides complementary to nucleotides 132-117 of 5'-RNA, and 99-83 of the wild-type X(-) RNA were used as primers and were 5'-end-labeled using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and [γ - ^{32}P] ATP (Perkin Elmer). The acylated nucleotides were identified by primer extension with avian myeloblastosis reverse transcriptase (RT) (Invitrogen) as described below. One microliter of the 5'-end-labeled primer (10⁵ cpm/ μL) was added to the resuspended RNA and the mixture was heated at 90°C for 2 minutes, chilled for 15 secondes in liquid nitrogen and defrosted at RT. Then, 7.5 μL of the reverse transcription mixture (final concentrations: 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 8 mM MgCl_2 , 30 mM KCl, 1 mM DTT, 250 mM dNTP, 0.13 U/ μL of RT) was added and the reaction mixture was incubated at 37°C for 30 minutes. At this end of incubation, the RNA template was degraded by addition of 10 μL of 0.3 M NaOH-0.05 M EDTA and heating at 90°C for 10 minutes. DNA was recovered by ethanol precipitation and the dried pellet was resuspended in 7 μL of loading buffer (98% (v/v) deionized formamide, 10 mM EDTA, 0.025% (w/v) bromophenol blue and 0.025% (w/v) xylene cyanol). Primer extension of controls that were not treated with an acylating reagent was run in parallel. The samples were analysed by electrophoresis on an 8% denaturing polyacrylamide gel.

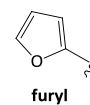
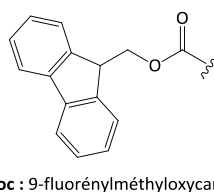
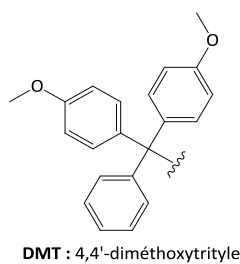
Appendix: Structure of compound**HEPES:** 2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethanesulfonic acid**Tris-HCl:** 2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol hydrochloride**Tris-base:** 2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol**DTT:** (2S,3S)-1,4-dimercaptobutane-2,3-diol**EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid

ANNEXE : Structure des groupements utilisés

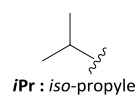
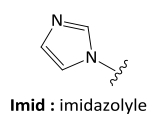
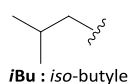
A, B, C



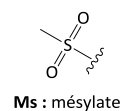
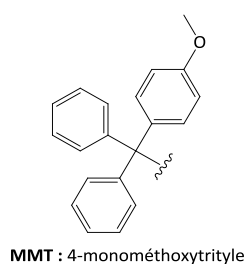
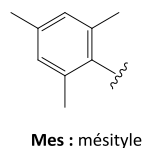
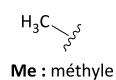
D, E, F

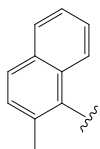


G, H, I, J



K, L, M, N, O, P

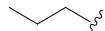




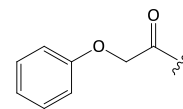
Nap : 2-(méthyl)-
naphthalényle



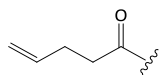
nBu : *n*-butyle



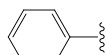
nPr : *n*-propyle



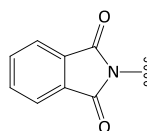
Pac : phénoxyacétyle



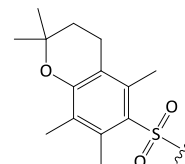
Pen : pent-4-énoyle



Ph : phényle

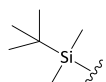


Phth : phthaloyle

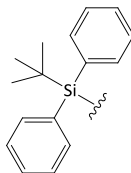


Pmc : 2,2,5,7,8-pentaméthyl-chromane-6-sulfonyle

Q, R, S, T



TBS ou TBDMS :
tert-butyldiméthylsilyle



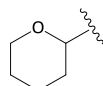
TBDPS :
tert-butyldiphénylsilyle



tBu : *tert*-butyle



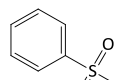
Tf : triflate



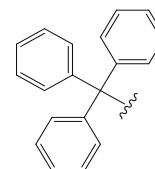
THP : tétrahydropyranyle



TMS : triméthylsilyle

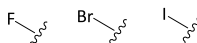


Ts : tosylo



Tr : trityle

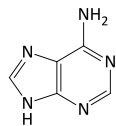
U, V, W, X, Y, Z



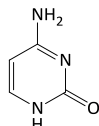
X : fluoro, bromo ou iodo

ANNEXE : Acides aminés

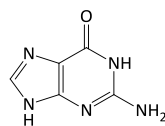
Code international	Abréviation	Acide aminé
A	Ala	alanine
C	Cys	cystéine
D	Asp	acide aspartique
E	Glu	acide glutamique
F	Phe	phénylalanine
G	Gly	glycine
H	His	histidine
I	Ile	isoleucine
K	Lys	lysine
L	Leu	leucine
M	Met	méthionine
N	Asn	asparagine
O	Pyl	pyrrolysine
P	Pro	proline
Q	Gln	glutamine
R	Arg	arginine
S	Ser	sérine
T	Thr	thréonine
U	Sec	sélénocystéine
V	Val	valine
W	Trp	tryptophane
Y	Tyr	tyrosine

ANNEXE : Bases nucléiques**Bases nucléiques**

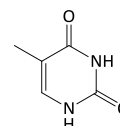
A : adénine



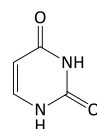
C : cytosine



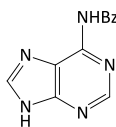
G : guanine



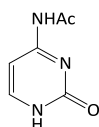
T : thymine



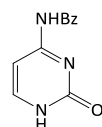
U : uracile

Bases nucléiques protégées ou substituées

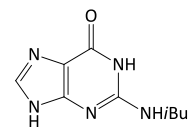
A(Bz)



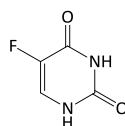
C(Ac)



C(Bz)



G(iBu)

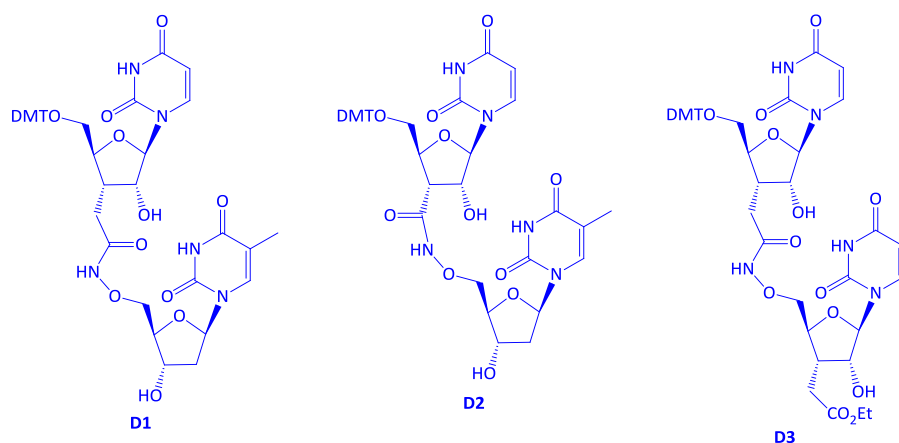
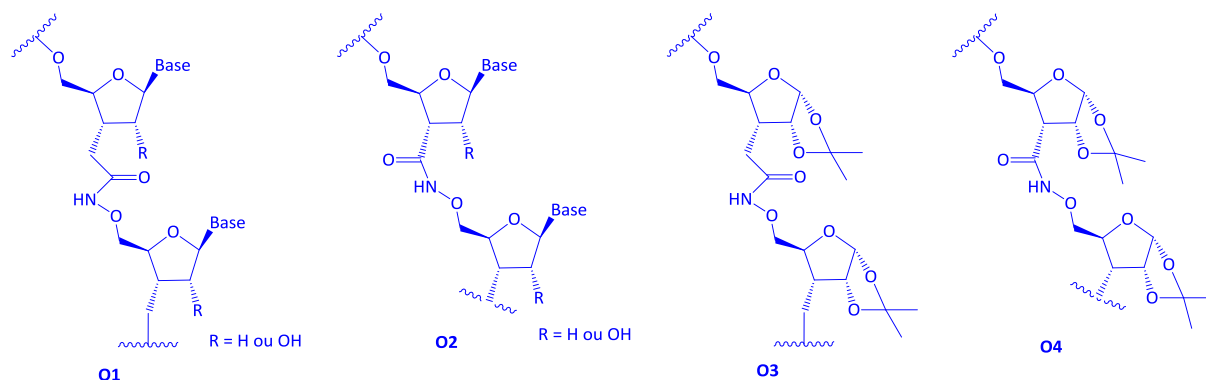


5-F-U

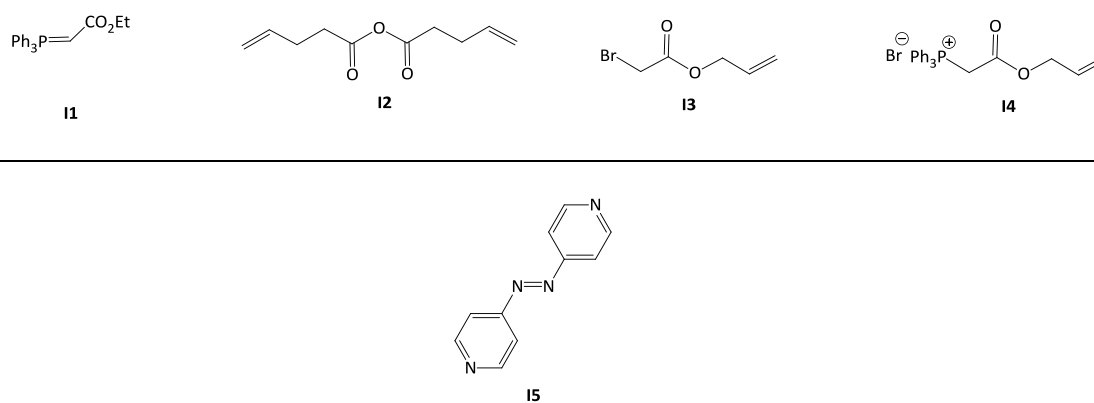
ANNEXE : Index des composés

Cette annexe répertorie les différents composés sur lesquels porte cette thèse. Les composés en rouge ont été préparés par d'anciens doctorants du laboratoire (Sandrine Peyrat et Olivier Noel). Les composés en bleu n'ont pas pu être obtenus.

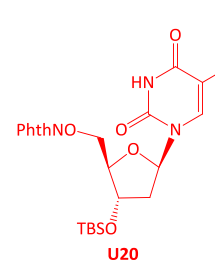
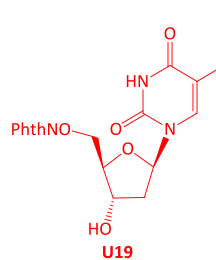
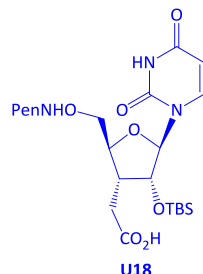
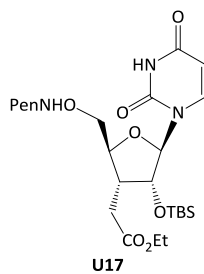
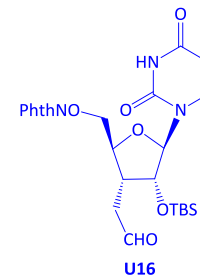
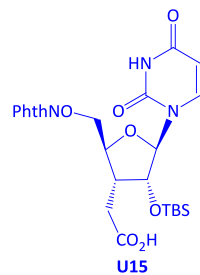
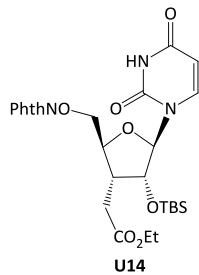
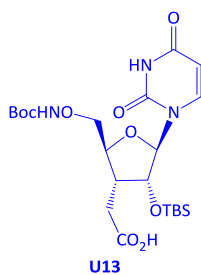
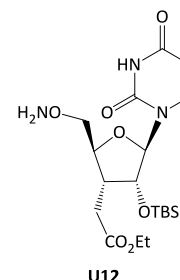
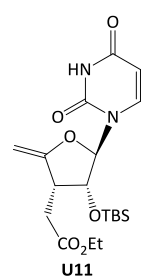
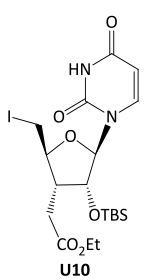
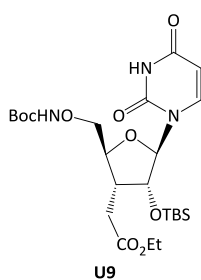
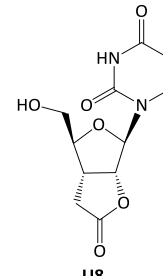
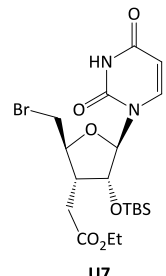
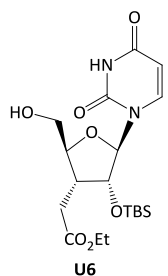
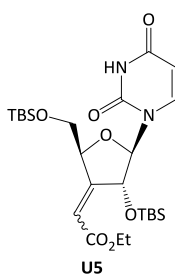
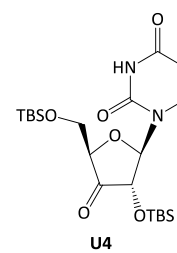
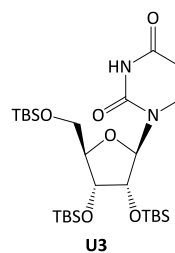
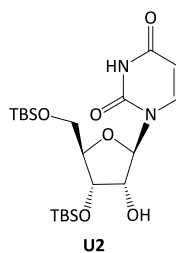
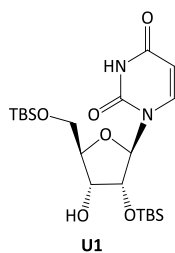
I. Composés cibles

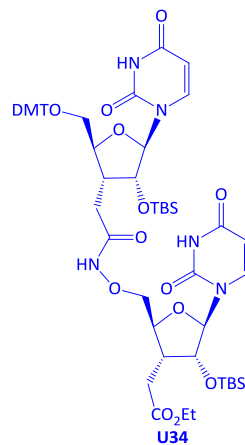
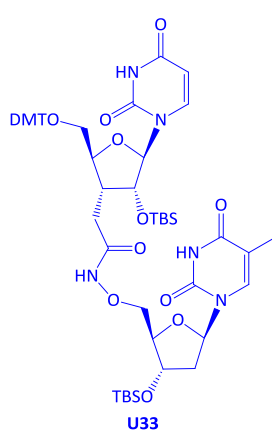
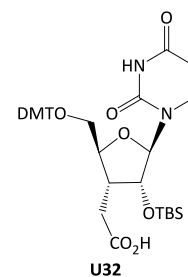
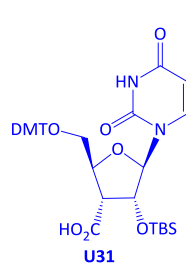
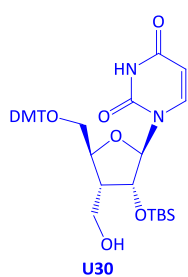
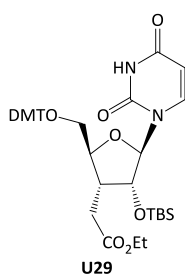
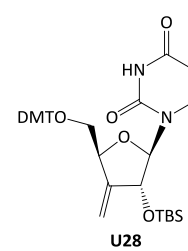
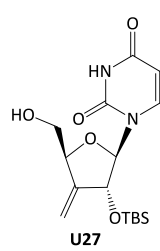
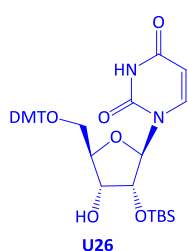
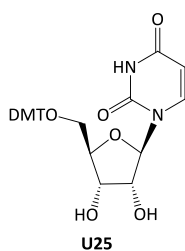
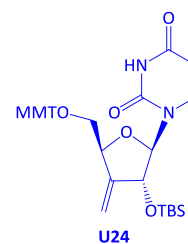
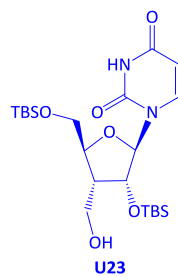
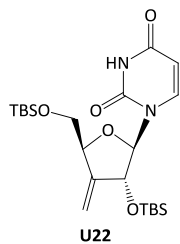
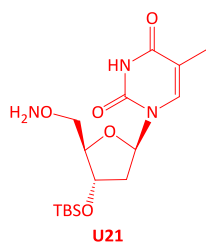


II. Réactifs

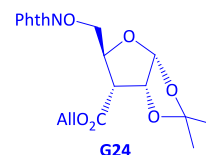
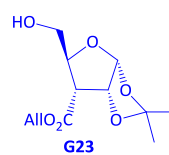
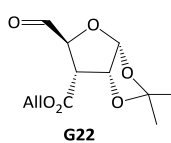
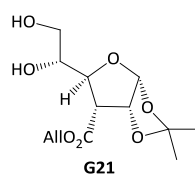
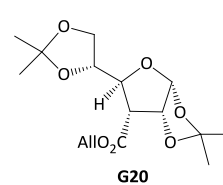
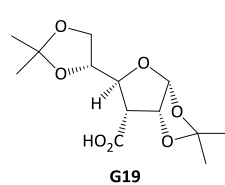
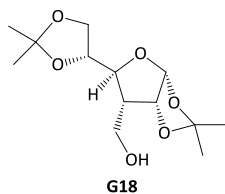
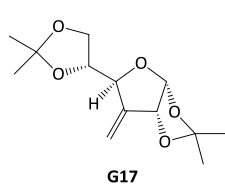
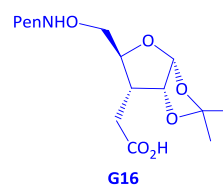
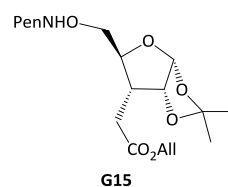
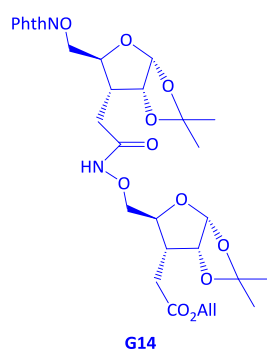
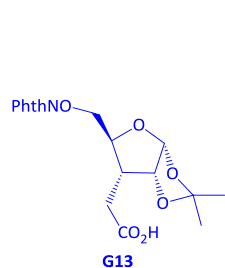
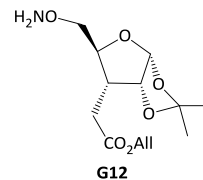
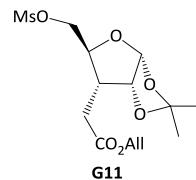
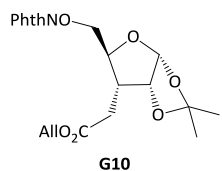
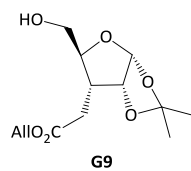
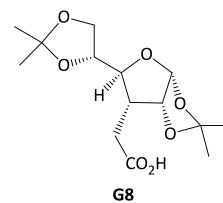
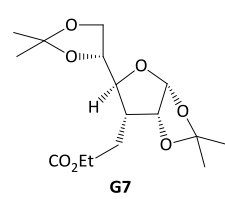
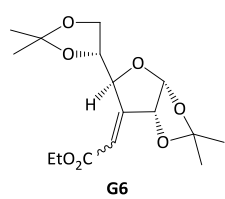
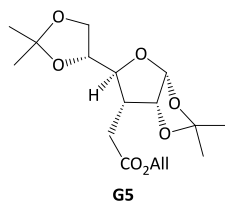
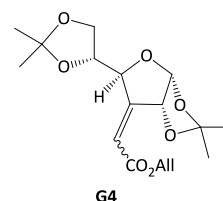
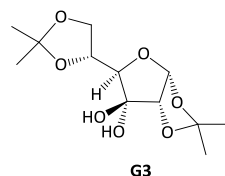
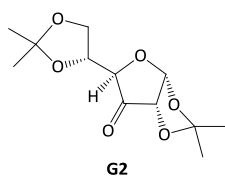
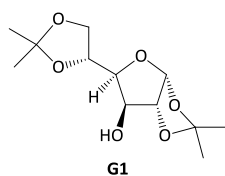


III. Synthèse à partir de l'uridine

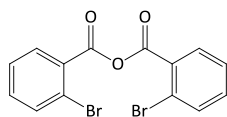




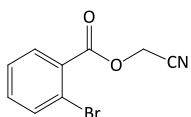
IV. Synthèse à partir du glucose



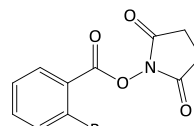
VI. Sondes SHAPE



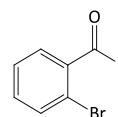
R1



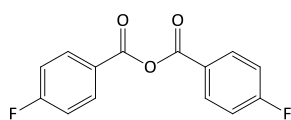
R2



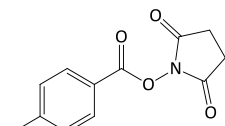
R3



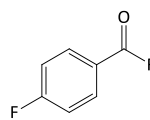
R4



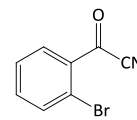
R5



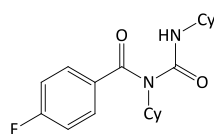
R6



R7



R8



R9

ANNEXE : Publications

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 25 (2015) 566–570



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

RNA SHAPE chemistry with aromatic acylating reagents



Laura Nodin^a, Olivier Noël^a, Françoise Chaminade^b, Ouerdia Maskri^b, Vincent Barbier^c, Olivier David^c, Philippe Fossé^{b,*}, Juan Xie^{a,*}

^a PPSM, CNRS, Institut d'Alembert, ENS de Cachan, 61 Avenue du P^e Wilson, F-94235 Cachan, France

^b LBPA, CNRS, Institut d'Alembert, ENS de Cachan, 61 Avenue du P^e Wilson, F-94235 Cachan, France

^c Institut Lavoisier, CNRS, Université de Versailles St. Quentin-en-Yvelines, 45 avenue des Etats-Unis, 78035 Versailles, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 October 2014

Revised 4 December 2014

Accepted 8 December 2014

Available online 15 December 2014

Keywords:

Active ester

Acyl fluoride

Acylating reagent

RNA

SHAPE chemistry

Symmetric anhydride

ABSTRACT

As chemical methods for RNA secondary structure determination, SHAPE chemistry (selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension) has been developed to specifically target flexible nucleotides (often unpaired nucleotides) independently to their purine or pyrimidine nature. In order to improve the specificity of acylating reagents towards unpaired nucleotides, we have explored the reactivity of symmetric anhydrides, acyl fluorides, active esters like succinimidyl ester and cyanomethyl esters for 2'-O-acylation reaction. Among the tested compounds, only the acyl fluoride **4** showed a low reactivity (compared to NMIA). However, this study is the first to show that nucleophilic catalysts like DMAP greatly improved the selective 2'-hydroxyl acylation by symmetric anhydrides, acyl fluorides and succinimidyl ester, with the 2-fluorobenzoic anhydride **5** being the most reactive.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

RNA is an essential macromolecule with diverse functions that mainly depend on its ability to fold into higher order structures. RNA serves as the genome for many pathogenic viruses. In addition to its role as messenger between DNA and the ribosome in bacteria and eukaryotes, RNA is involved in numerous fundamental cellular processes such as gene regulation and host defense. Note that many RNA functions are still unknown. This point can be illustrated by the recent discovery of thousands of long non-coding RNAs (lncRNAs, from 200 to 10,000 nucleotides in general) in mammalian species.¹ A study estimates approximately 15,000 lncRNAs in humans.² Most lncRNAs play key roles in development, epigenetics, cancer, brain function and hereditary diseases³ but fundamental questions regarding the functions of lncRNAs remain unanswered.

RNAs show a hierarchical organization in which the primary sequence determines the secondary structure (the pattern of base pairing) that governs the tertiary folding. RNA functions may imply sequence, secondary and tertiary structures, or a combination of these features. However, secondary structures, usually more stable than tertiary interactions, are usually considered as the key point for RNA functions. An extensive understanding of the functions

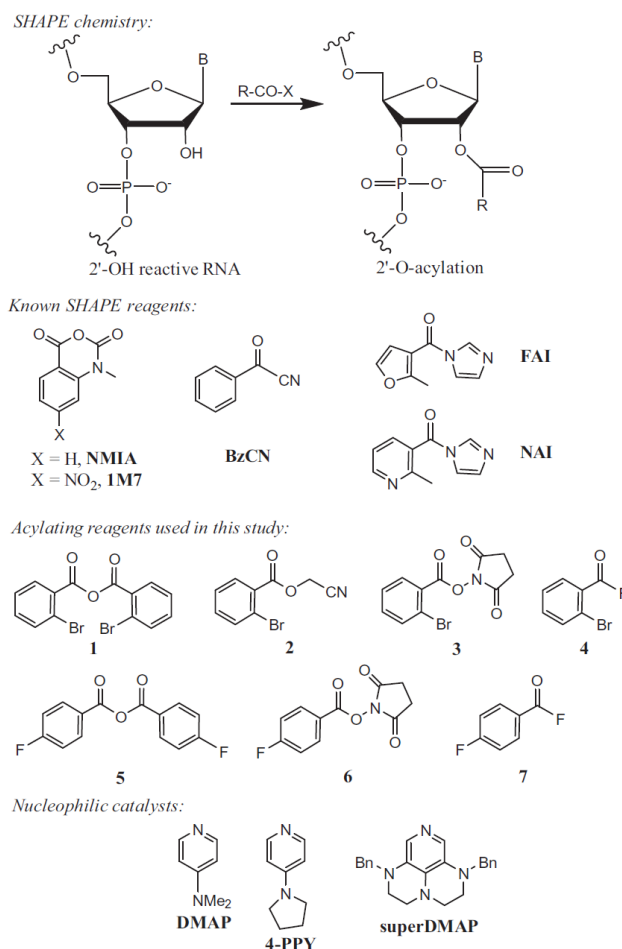
of RNAs in general and lncRNAs in particular requires an important effort to improve our knowledge of their structures, folding and dynamics, especially concerning their secondary structure. The crystallographic and NMR approaches have led to determine the three-dimensional structures of several functional RNAs but the high-throughput or applicability of these methods is limited, especially for long RNAs. An exciting way to map RNA secondary structures is the use of base-selective chemical reagents, an approach that has the potential to overcome the shortcomings associated to X-ray crystallography or NMR. Ideally, high-throughput determination of RNA secondary structure should rely on one chemical reagent able to interrogate all nucleotides simultaneously, in a single experiment. However, during the last thirty years, multiple reagents need to be used in separate experiments to obtain accurate results. Since 2005, selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension (SHAPE) chemistry has been developed to specifically target flexible nucleotides (often unpaired nucleotides) independently to their purine or pyrimidine nature. This approach uses acylating reagents such as NMIA (*N*-methylisatoic anhydride),⁴ 1M7 (1-methyl-7-nitroisatoic anhydride)⁵ or BzCN (benzoyl cyanide)⁶ (Scheme 1). Recently, two other electrophilic reagents, FAI (2-methyl-3-furoic acid imidazolide) and NAI (2-methylnicotinic acid imidazolide) were developed to unravel RNA secondary structure inside living cells.⁷ The SHAPE chemistry is based on the acylation of the ribose 2'-hydroxyl group and its molecular mechanisms are only partially understood.^{4,8,9}

* Corresponding authors. Tel.: +33 1 47405999; fax: +33 1 47407671 (P.F.), tel.: +33 1 47405586; fax: +33 1 47402454 (J.X.).

E-mail addresses: philippe.fosse@ens-cachan.fr (P. Fossé), joanne.xie@ens-cachan.fr (J. Xie).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.12.020>

0960-894X/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Scheme 1. Scheme and reagents for SHAPE chemistry.

Although SHAPE is potentially a powerful approach for determining secondary structure and dynamics of long RNAs at high-throughput, the results obtained by this approach remain ambiguous because the electrophilic reagents used are in fact only partially specific for unpaired nucleotides.¹⁰ Recent studies were performed by associating an acylating reagent to other chemical or enzymatic probes to improve the information content of experimental data.^{11–13} This latter approach is more accurate but much more time-consuming and therefore not compatible with high-throughput determination of RNA secondary structures in a single experiment.

For the acylation of hydroxyl group, the carboxyl components can be activated as acyl halides, acyl azides, acylimidazoles (as for FAI and NAI), anhydrides (like NMIA and 1M7), esters, etc., allowing the modulation of the carbonyl electrophilicity. Therefore, there is still plenty of room to find new efficient reagents. However, to date, only thirteen compounds have been studied for the 2'-hydroxyl acylation and only five (NMIA, 1M7, BzCN, FAI and NAI) can be used in RNA SHAPE analysis.^{4–7} Note that these latter reagents exhibit similar RNA 2'-hydroxyl acylation patterns.^{5,7}

Among the reported SHAPE reagents (Scheme 1), BzCN and 1M7 showed higher reactivity than NMIA, NAI and FAI, in accordance with their hydrolysis rate, with a half-life of 0.25 s, 14 s, 8 min, 33 min and 73 min, respectively. Since these reagents are partially specific for unpaired nucleotides, we therefore examined other acylating reagents to contribute to: (i) a better understanding of the SHAPE mechanisms; (ii) the design of a new acylating reagent more specific for unpaired nucleotides.

Considering the moderate acylating activity of NMIA, we have synthesized seven reagents (Scheme 1) that might exhibit a better acylating activity than NMIA. Symmetric anhydrides **1**¹⁴ and **5**¹⁵ bearing electron withdrawing halogen atom on *ortho* or *para* position, succinimidyl ester **3**,¹⁶ **6**¹⁷ as well as the cyanomethyl ester **2**¹⁸ have been prepared. Acyl fluorides, less reactive than acyl chlorides, have shown promising reactivity in coupling reaction.¹⁹ Acyl fluorides **4**²⁰ and **7**²¹ were also synthesized according to the reported procedure. However, due to the volatile nature, compound **7** was obtained as a solution in petroleum ether. It is therefore difficult to determine its concentration. Moreover, this compound is not stable and transforms slowly into the anhydride **5**.

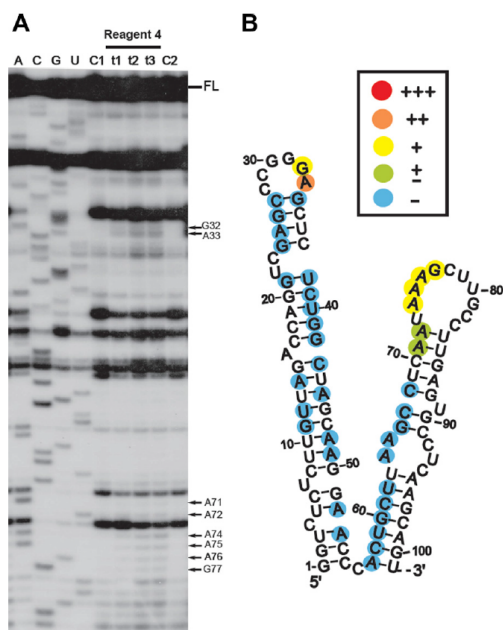


Figure 1. SHAPE analysis of the HIV-1 R region using reagent **4**. (A) SHAPE experiments were performed and analyzed by electrophoresis on a denaturing 8% polyacrylamide gel as described.²⁵ Control lanes C1 and C2: 5' RNA (2 pmol) was incubated without reagent at 37 °C for 1 min and 5 min, respectively. 5' RNA (2 pmol) was incubated with reagent **4** (50 nmol) at 37 °C for 1 min (lane t1), 5 min (lane t2) or 15 min (lane t3). A, C, G and U are sequencing reactions performed using dideoxy terminating nucleotides. Note that reverse transcriptase stops dNTP incorporation at the nucleotide preceding the site of acylation, that is, exactly 1 nucleotide shorter than the corresponding sequencing lane. FL indicates the full-length product of primer extension. Arrows indicate the acylated nucleotides. (B) Superposition of reagent **4** reactivity on the secondary structure of the R region. The colour code used for the reactivity is indicated in the inset. The absence of colour indicates nucleotides that are not analyzable because they are close to the 5' end or primer binding site or because of nicks and pauses in the RNA template during reverse transcription.

RNA stem-loop structures are good models to test the acylating activity of reagents because they contain paired and unpaired nucleotides. Since the secondary structure of the R region of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) forms two stem-loop structures,²² the acylating activity of compounds was tested with the 5' RNA containing this region.^{22,23} Sites of 2'-O-adduct formation have been identified using primer extension approach²⁴ and electrophoresis on a denaturing polyacrylamide gel.²⁵ No reactivity information is obtained at the level of: (i) nucleotides that bind the primer; (ii) 20–50 nucleotides that are located upstream of the primer binding site; (iii) nucleotides that are close to the 5'-end.⁵ Representative examples of SHAPE experiments are shown in Figures 1–5 and the results of a series of independent experiments are summarized in Table 1. 5' RNA was incubated with acylating reagents for 1, 5 and 15 min. Longer incubation (30, 60 or 120 min) did not lead to further acylation compared to 15 min reaction, due to their fast hydrolysis.

Among the synthesized acylating reagents, only the acyl fluoride **4** was able to modify the 5' RNA. Further experiment has been realized with compound **4** (Fig. 1A). However, the reagent **4** was less efficient than NMIA (Table 1). Interestingly, the modification pattern was consistent with the secondary structure of the R region

(Fig. 1B). Indeed, almost all paired bases were unreactive, whereas unpaired nucleotides, especially purine nucleotides, in the two apical loops were reactive. Consistent with the observation that nucleotides adjacent to a single-stranded, bulged or mismatched nucleotide can exhibit low reactivity towards SHAPE reagents,²⁴ A71 and A72 were very weakly reactive to **4**.

Employing nucleophilic catalysts like DMAP for the esterification of alcohols by acid anhydrides is a well-known procedure.²⁶ Activity of compounds **1–6** was therefore studied in the presence of 6% DMAP (Fig. 2 and Table 1). As shown for reagent **5** (Fig. 2A), RNA modification with reagents **1**, **3**, **5** and **6** occurred only in the presence of the catalyst (Table 1), while the compound **2** remained inactive which might be explained by the lower electrophilicity of the cyanomethyl ester. The activation order (**5** > **1**, **4** > **3**, **6**) by DMAP could be explained by the electrophilicity of the carbonyl to facilitate the nucleophilic addition of DMAP to the acyl donor (**1**, **4**, **5** > **3**, **6**) and the basicity of the leaving groups to deprotonate the alcohol nucleophile in the rate-determining transition state²⁶ (**5** > **1**, **4**, with $pK_a = 4.14$, 3.2 and 2.85 for 4-F-C₆H₄CO₂⁻/4-F-C₆H₄CO₂H, 2-Br-C₆H₄CO₂⁻/2-Br-C₆H₄CO₂H and F⁻/HF, respectively). Interestingly, the very low acylating activity of compound **6** was greatly increased in the presence of 50% DMAP (Fig. 3), with similar activity as NMIA.

Structurally constrained derivatives 4-PPY²⁷ and superDMAP²⁸ (Scheme 1) have been shown to be more efficient nucleophilic catalysts than DMAP. Activity of reagent **5** was therefore studied in the presence of these catalysts (Fig. 2A). RNA modification with reagent **5** was slightly less efficient in the presence of 6% 4-PPY than in the presence of 6% DMAP. In the presence of 0.6% superDMAP, the amount of full-length product was strongly decreased, indicating an excessive modification of RNA. The superDMAP proved therefore to be a powerful catalyst. Unfortunately, assays by decreasing the quantity of superDMAP failed to improve the selectivity.

Next, we compared the modification pattern of NMIA with those of reagents **1**, **4** and **5** (Fig. 4) that are our most active compounds. The patterns were similar, supporting the notion that the mechanism of action of our compounds is close to that of NMIA, that is, selective 2'-hydroxyl acylation. However, NMIA was more efficient than reagents **1**, **4** and **5** and it does not require the presence of 6% DMAP (Table 1). To confirm that reagent **5** was the most efficient synthesized compound whatever the RNA substrate, we performed SHAPE analysis of the HCV SL1(-) region using reagents **1** and **5** (Fig. 5). As expected, reagent **5** was more efficient than reagent **1** and it modified unpaired nucleotides in the apical loop and one bulge.

In summary, we have synthesized symmetric anhydrides, acyl fluorides, active esters like succinimidyl ester and cyanomethyl esters as aromatic acylating reagents to evaluate their reactivity towards RNA SHAPE chemistry. Only the acyl fluoride reagent **4** was able to modify the unpaired nucleotides, with a lower reactivity than NMIA. However, we have shown that nucleophilic catalyst like DMAP (6%) greatly improved the reactivity of acylating reagents, with the 2-fluorobenzoic anhydride **5** more reactive than 2-bromobenzoic anhydride **1** and 2-bromobenzoyl fluoride **4** which are more reactive than the succinimidyl esters **3** and **6**. It should be emphasized that the acylating activity of inactive compound **6** in the presence of 50% DMAP is similar to that of NMIA (compare Fig. 3 and Fig 4). The order of DMAP activation could be explained by the electrophilicity of the carbonyl group as well as the basicity of the leaving group of the acylating reagents to deprotonate the alcohol nucleophile of RNA in the rate-limiting step. This result is interesting, opening the perspective to the future design of SHAPE reagents and to modulate its reactivity by nucleophilic catalysis.

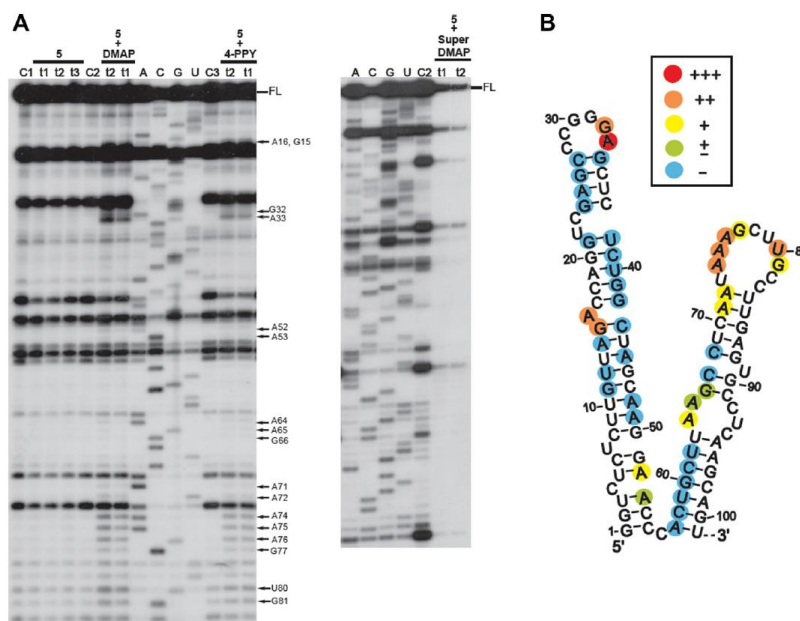


Figure 2. Nucleophilic catalysts are required for the acylation activity of compound **5**. (A) Control lanes C1, C2 and C3: 5' RNA (2 pmol) was incubated without reagent at 37 °C for 1 min, 5 min and 15 min, respectively. 5' RNA (2 pmol) was incubated with compound **5** (50 nmol) at 37 °C for 1 min (lane 1), 5 min (lane 2) or 15 min (t3) in the absence or presence of 6% DMAP, 6% 4-PPY or 0.6% superDMAP. A, C, G and U are sequencing reactions performed using dideoxy terminating nucleotides. A16 and G15 were well characterized by long migration times on a denaturing 8% polyacrylamide gel (data not shown). (B) Superposition of reagent **5** reactivity in the presence of 6% DMAP on the secondary structure of the R region.

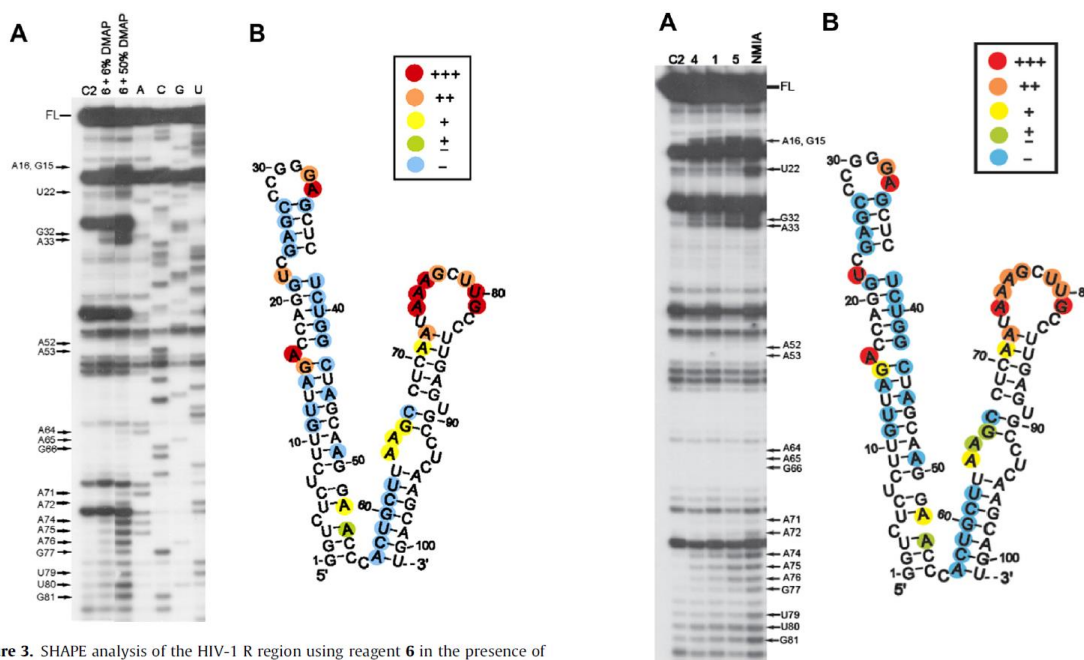


Figure 3. SHAPE analysis of the HIV-1 R region using reagent **6** in the presence of 6% or 50% DMAP. (A) Control lane C2: 5' RNA (2 pmol) was incubated without reagent at 37 °C for 5 min. 5' RNA (2 pmol) was incubated with compound **6** (50 nmol) at 37 °C for 5 min in the presence of 6% or 50% DMAP. (B) Superposition of reagent **6** reactivity in the presence of 50% DMAP on the secondary structure of the R region.

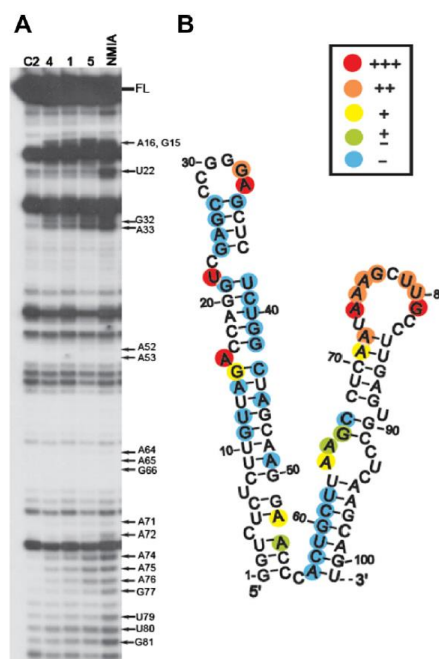


Figure 4. Comparison of SHAPE experiments performed using NMIA or reagents **1**, **4** and **5**. (A) Control lane C2: 5' RNA (2 pmol) was incubated without reagent at 37 °C for 5 min. 5' RNA (2 pmol) was incubated at 37 °C for 5 min in the presence of 6% DMAP and with NMIA (50 nmol) or compounds **1**, **4** and **5** (50 nmol). (B) Superposition of NMIA reactivity on the secondary structure of the R region.

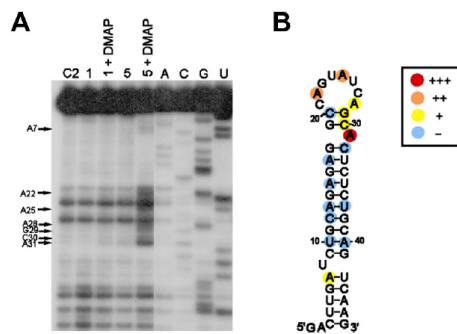


Figure 5. SHAPE analysis of the HCV SL1(-) region using reagents **1** and **5**. (A) Control lane C2: X(-) RNA (2 pmol) was incubated without reagent at 37 °C for 5 min. X(-) RNA (2 pmol) was incubated with compounds **1** or **5** (50 nmol) at 37 °C for 5 min in the absence or presence of 6% DMAP. A, C, G and U are sequencing reactions performed using dideoxy terminating nucleotides. (B) Superposition of reagent **5** reactivity on the secondary structure of the SL1(-) region.

Table 1

RNA modification activity of compounds **1–6** (50 nmol) in the absence or presence of 6% DMAP

Compound	1	2	3	4	5	6	NMIA
-DMAP	–	–	–	+	–	–	++++
+DMAP	++	–	+	++	+++	+	++++

References and notes

- Xie, C.; Yuan, J.; Li, H.; Li, M.; Zhao, G.; Bu, D.; Zhu, W.; Wu, W.; Chen, R.; Zhao, Y. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D98.
- Derrien, T.; Johnson, R.; Bussotti, G.; Tanzer, A.; Djebali, S.; Tilgner, H.; Guernec, G.; Martin, D.; Merkel, A.; Knowles, D. G.; Lagarde, J.; Veeravalli, L.; Ruan, X.; Ruan, Y.; Lassmann, T.; Carninci, P.; Brown, J. B.; Lipovich, L.; Gonzalez, J. M.; Thomas, M.; Davis, C. A.; Shiekhattar, R.; Gingeras, T. R.; Hubbard, T. J.; Notredame, C.; Harrow, J.; Guigó, R. *Genome Res.* **2012**, *9*, 1775.
- Novikova, I. V.; Hennelly, S. P.; Tung, C. S.; Sanbonmatsu, K. Y. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 3731.
- Merino, E. J.; Wilkinson, K. A.; Coughlan, J. L.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4223.
- Mortimer, S. A.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4144.
- Mortimer, S. A.; Weeks, K. M. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 1413.
- Spitale, R. C.; Crisalli, P.; Flynn, R. A.; Torre, E. A.; Kool, E. T.; Chang, H. Y. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 18.
- McGinnis, J. L.; Dunkle, J. A.; Cate, J. H.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6617.
- Hiratsuka, H. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 13354.
- Kladwang, W.; VanLang, C. C.; Cordero, P.; Das, R. *Biochemistry* **2011**, *50*, 804.
- Novikova, I. V.; Hennelly, S. P.; Sanbonmatsu, K. Y. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 5034.
- Lusvarghi, S.; Sztuba-Solinska, J.; Purzycka, K. J.; Pauly, G. T.; Rausch, J. W.; Grice, S. F. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 6637.
- Todd, G. C.; Walter, N. G. *RNA* **2013**, *19*, 685.
- Kita, Y.; Akai, S.; Yogishi, M.; Nakajima, Y.; Yasuda, H.; Tamura, Y. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 6027.
- Li, Y.; Xue, D.; Wang, C.; Liu, Z. T.; Xiao, J. *Chem. Commun.* **2012**, 1320.
- Schulze, A.; Giannis, A. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 252.
- Wang, G.; Yu, Q. Y.; Wang, J.; Wang, S.; Chan, S. Y.; Yu, X. Q. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 21306.
- Setzer, P.; Forcher, G.; Boeda, F.; Pearson-Long, M. S. M.; Bertus, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 171.
- Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827.
- Olah, G. A.; Welch, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5396.
- Birell, J. A.; Desrosiers, J. N.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13872.
- Kanevsky, I.; Chaminade, F.; Ficheux, D.; Moumen, A.; Gorelick, R.; Negroni, M.; Darlix, J. L.; Fossé, P. *J. Mol. Biol.* **2005**, *348*, 1059.
- In vitro RNA synthesis, purification and renaturation: The 5' RNA and the wild-type X(-) RNA were synthesized and purified as previously described (Ref. 22 and Ivanyi-Nagy, R.; Kanevsky, I.; Gabus, C.; Lavergne, J. P.; Ficheux, D.; Penin, F.; Fossé, P.; Darlix, J.-L. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2618.). RNA (2.0 pmol) in 7.8 μ L of double-distilled water was heated at 90 °C for 2 min and chilled on ice. Then, 2 μ L of renaturation buffer (final concentrations: 50 mM HEPES-KOH (pH 8), 200 mM AcOK and 5 mM MgCl₂), was added and the sample was incubated for 30 min at 37 °C before to be chilled on ice for 5 min. At the end of this renaturation step, 0.20 μ L of a tRNA mixture (5 μ g/ μ L) from *E. coli* MRE 600 (Roche Molecular Biochemicals) was added to the sample before the acylation reagent.
- Wilkinson, K. A.; Merino, E. J.; Weeks, K. M. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1610.
- SHAPE analysis: Anhydrous DMSO, NMIA and Et₃N were purchased from Sigma-Aldrich. All solutions were freshly prepared. RNA modification was carried out in a final volume of 12 μ L. 1.5 μ L of renaturation buffer was added to the renatured RNA (2 pmol in 10 μ L) before incubation at 37 °C for 1, 5 or 15 min in the presence of 0.5 μ L of neat DMSO (control) or in the presence of 0.5 μ L of acylating reagent (100 mM in DMSO). One microliter of renaturation buffer was added to the renatured RNA (10 μ L) when the reaction was performed at 37 °C for 1 or 5 min in the presence of 0.5 μ L of acylating reagent (100 mM in DMSO) and 0.5 μ L of DMAP or 4-PPY (6 mM in DMSO) or 0.5 μ L of superDMAP (0.6 mM in DMSO). In the case of RNA modification with 0.5 μ L of compound **5** (100 mM in DMSO), 0.5 μ L of Et₃N (100 mM in DMSO) was added to the reaction mixture in the absence or in the presence of a catalyst. At the end of incubation, RNA was recovered by ethanol precipitation and the dried pellet was resuspended in 6.5 μ L of double-distilled water. Oligodeoxyribonucleotides complementary to nucleotides 132–117 of 5' RNA, and 99–83 of the wild-type X(-) RNA were used as primers and were 5'-end-labeled using T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and [γ -³²P] ATP (Perkin Elmer). The acylated nucleotides were identified by primer extension with avian myeloblastosis reverse transcriptase (RT) (Invitrogen) as described below. One microliter of the 5'-end-labeled primer (10⁵ cpm/ μ L) was added to the resuspended RNA and the mixture was heated at 90 °C for 2 min, chilled for 15 s in liquid nitrogen and defrosted at room temperature. Then, 7.5 μ L of the reverse transcription mixture (final concentrations: 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 8 mM MgCl₂, 30 mM KCl, 1 mM DTT, 250 mM dNTP, 0.13 U/ μ L of RT) was added and the reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min. At this end of incubation, the RNA template was degraded by addition of 10 μ L of 0.3 M NaOH–0.05 M EDTA and heating at 90 °C for 10 min. DNA was recovered by ethanol precipitation and the dried pellet was resuspended in 7 μ L of loading buffer (98% (v/v) deionized formamide, 10 mM EDTA, 0.025% (w/v) bromophenol blue and 0.025% (w/v) xylene cyanol). Primer extension of controls that were not treated with an acylating reagent was run in parallel. The samples were analysed by electrophoresis on an 8% denaturing polyacrylamide gel.
- Spivey, A. C.; Arseniyadis, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 5436.
- Hassner, A.; Krepski, L. R.; Alexanian, V. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 2069.
- De Rycke, N.; Couty, F.; David, O. R. P. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12852.

RESUME

Un très grand nombre de travaux de recherche fait état de l'intérêt des oligonucléotides en tant qu'agents thérapeutiques. Les modes d'actions envisageables sont très variés (thérapie antisens, antigène, interférence ARN, etc.). Cependant, les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des oligonucléotides naturels ne permettent pas leurs utilisations *in vivo*. Leurs propriétés peuvent être améliorées par des modifications chimiques. Notre travail consiste à synthétiser une nouvelle génération d'oligoribonucléotides modifiés : les oligomères de nucléosides aminoxy acides. Dans ces oligomères, la liaison phosphodiester de l'ARN est remplacée par une liaison *N*-oxyamide -CONHO-. Cette liaison est stable vis-à-vis des hydrolyses chimiques et enzymatiques et est facilement engagée dans des liaisons hydrogène. La préparation de différents nucléosides aminoxy esters protégés à partir de l'uridine ou du D-(+)-glucose est présentée. Par ailleurs, les *N*-oxy PNA constituent une autre famille d'oligonucléotides modifiés présentant une liaison *N*-oxyamide. L'analyse structurale des monomères et des dimères de *N*-oxy PNA est détaillée.

De plus, un projet en collaboration avec le LBPA s'intéresse à une méthode de détermination de la structure secondaire des ARN. Dans ce but, nous avons conçu, synthétisé et étudié des sondes chimiques ciblant le ribose des nucléotides non appariés d'ARN. L'emploi de catalyseurs nucléophiles comme la DMAP permet d'augmenter la réactivité des sondes.

SUMMARY

A large number of researches report the interest of oligonucleotides as therapeutic agents. The modes of actions are very varied (antisense therapy, antigen therapy, RNA interference, etc.). However, the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of natural oligonucleotides do not allow their *in vivo* uses. Their properties can be improved by chemical modifications. Our work consists to synthesize a new generation of modified oligoribonucleotides: the oligomers of aminoxy acids nucleosides. In such oligomers, the phosphodiester bond of the RNA is replaced with a *N*-oxyamide bond -CONHO-. This linkage is stable to chemical and enzymatic hydrolysis and is easily engaged in hydrogen bondings. The preparation of different protected aminoxy esters nucleosides starting from uridine or D-(+)-glucose is presented. Furthermore, *N*-oxy PNA constitute another family of modified oligonucleotides having a *N*-oxyamide bond. Structural analysis of the monomers and the dimers of *N*-oxy PNA is detailed.

In addition, a project in collaboration with the LBPA focuses on a method for determining the secondary structure of RNA. To this end, we designed, synthesized and studied chemical probes targeting ribose of unpaired nucleotides. The use of nucleophilic catalysts such as DMAP increases the reactivity of the probes.