



**HAL**  
open science

# Synthèse et caractérisation de nucléotides et oligonucléotides modifiés pour l'obtention de structures capables de mimer l'activité enzymatique des protéases à sérine

Maria Claudia Addamiano

► **To cite this version:**

Maria Claudia Addamiano. Synthèse et caractérisation de nucléotides et oligonucléotides modifiés pour l'obtention de structures capables de mimer l'activité enzymatique des protéases à sérine. Chimie organique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30199 . tel-01538818

**HAL Id: tel-01538818**

**<https://theses.hal.science/tel-01538818>**

Submitted on 14 Jun 2017

**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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THESE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

Spécialité : Chimie-Biologie-Santé

---

Présentée et soutenue par:

Maria Claudia Addamiano

Le 25 octobre 2016

Synthèse et caractérisation de nucléotides et oligonucléotides  
modifiés pour l'obtention de structures capables de mimer  
l'activité enzymatique des protéases à sérine

---

### JURY

<i>M. Eric Defrancq</i>	<i>Professeur, Université Grenoble-Alpes</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>M. François Morvan</i>	<i>Directeur de recherche, Université Montpellier 2</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Mme Nadia Chouini-Lalanne</i>	<i>Professeur, UPS, Toulouse III</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme Béatrice Gerland</i>	<i>Chargée de recherche, UPS, Toulouse III</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M. Marcel Hollenstein</i>	<i>Institut Pasteur, Paris</i>	<i>Examineur</i>
<i>M. Jean-Marc Escudier</i>	<i>Directeur de recherche, UPS, Toulouse III</i>	<i>Directeur de thèse</i>

---

Ecole doctorale : Sciences de la Matière, UPS, Toulouse III - CO 042

Unité de Recherche : Laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique  
118, route de Narbonne 31062 Toulouse cedex

Directeur(s) de Thèse : M. Jean Marc Escudier et Mme Corinne Payrastré



*A Maria Gerardina Ciarcia*



## Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécule d'intérêt Biologique actuellement dirigé par le Dr. Yves Génisson et précédemment par le Dr. Michel Baltas que je remercie pour m'avoir accueillie au sein de l'unité pour ces trois ans de thèse sous la supervision de Jean Marc Escudier et Corinne Payrastre.

Je tiens à remercier sincèrement mes encadrants qui ont suivi avec passion, constance, enthousiasme et patience mon travail qui n'aurait pu aboutir à cela sans leurs apports. Merci Jean Marc et Corinne pour tout ce que vous m'avez appris sur la chimie mais pas que et pour les pauses au coin café à l'enseigne de la bonne humeur. Merci Béa pour avoir contribué à mon encadrement depuis ton post-doc ici, pour avoir contribué activement aux corrections de mon manuscrit, et pour les bons moments partagés en dehors du labo.

Je remercie Eric Defrancq et François Morvan d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant que rapporteurs, ainsi que les autres membres du Jury, Nadia Chouini-Lalanne, Béatrice Gerland et Marcel Hollenstein.

Je remercie tous les membres du laboratoire SPCMIB, toutes les personnes avec qui j'ai partagé mes journées plus ou moins égayées par la joie de la recherche. Merci en particulier à Muriel pour tes bonjours du matin toujours aussi souriants et pleins de bonne humeur. Merci aux jeunes du labo Romain, Gaëtan, Jin-Hui pour les repas partagés à l'enseigne des fous rires, merci de m'avoir soutenue surtout dans cette dernière période de rédaction.

Un remerciement spécial va à mon équipe de running CIEL, Isa, Eric, Lucie, merci pour tout, pour les sorties sous le soleil, la pluie, le vent, le froid glacial, merci pour m'avoir encouragée à continuer. Merci Isa pour tous tes bons conseils de « maman » sans oublier ton aide précieuse en HPLC et MALDI! Merci ma Lulu pour ta bonne humeur

contagieuse à tout moment ! Eric, que dire, je ne trouve pas les mots pour te remercier pour ta gentillesse, ta disponibilité... merci d'avoir été là, tout simplement.

Merci à ma Lison, que je n'ai vu que très peu ici au labo mais qui est aujourd'hui, pour moi, une des vraies amies que l'on peut compter sur les doigts d'une main. Merci ma Cécile pour avoir partagé une grosse partie de mes journées ici et merci à toi, Lison et Béa pour nos sorties filles !

*Last but not least*, je remercie de tout mon cœur ma famille, mes parents, qui ont fait de moi ce que je suis, Andrea, Fella, ma petite Leila, pour m'avoir accompagnée et soutenue en tout, et pour avoir toujours cru en moi. Et en particulier je remercie les deux personnes qui occupent une place privilégiée dans mon cœur, Sadek et mon chéri d'amour Lélío, merci d'être là, merci de remplir mon quotidien de bonheur.

Enfin, je remercie toutes les personnes que je ne peux lister ici qui m'ont accompagnée tout au long de ce parcours qui a été source inestimable d'enrichissement professionnel et personnel et qui aura marqué ma vie à jamais.







**TABLE DES MATIERES**

<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre I : Les acides nucléiques modifiés : structures et propriétés.....</b>	<b>6</b>
<b>I) Généralités sur les acides nucléiques.....</b>	<b>7</b>
I.1) Structure primaire.....	8
I.2) Structure secondaire.....	8
I.2.a) Doubles hélices.....	12
I.2.b) Bulges.....	14
I.2.c) G-Quadruplex.....	15
<b>II) Les stratégies géniques : ADN antisens, extinction de gène, interférence par ARN (ARNi) 16</b>	<b>16</b>
II.1) La stratégie antisens.....	17
II.2) La stratégie antigène.....	18
II.3) La stratégie interférence par ARN.....	18
<b>III) Les oligonucléotides de synthèse.....</b>	<b>19</b>
III.1) Les méthodes de synthèse en solution.....	19
III.2) La synthèse sur support solide.....	21
III.3) L'approche enzymatique.....	23
<b>IV) Les modifications.....</b>	<b>25</b>
IV.1) Les modifications stabilisantes.....	26
IV.1.a) Les modifications du lien phosphodiester.....	26
IV.1.b) Les modifications du sucre.....	28
IV.1.c) Les modifications des nucléobases.....	31
IV.2) Les modifications fonctionnalisantes.....	32
IV.2.a) Les triphosphates et les phosphoramidites fonctionnalisés.....	34
IV.2.b) Les unités convertibles et le concept de conjugaison.....	37
<b>V) Les propriétés des acides nucléiques.....</b>	<b>42</b>
V.1) La propriété de reconnaissance.....	44
V.2) La propriété de catalyse.....	47
V.3) Vers une activité similaire à celle des protéases à sérine ?.....	50
V.3.a) Les mimes non nucléiques.....	52
V.3.b) Les mimes nucléiques.....	55
V.3.b.1) L'approche enzymatique.....	55
V.3.b.2) L'approche synthétique.....	57
<b>VI) Notre approche.....</b>	<b>58</b>
<b>VII) Références bibliographiques du Chapitre I.....</b>	<b>62</b>
<b>Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés.....</b>	<b>81</b>
<b>I) Synthèse de la thymidine aldéhyde.....</b>	<b>87</b>
<b>II) La synthèse des nucléotides convertibles.....</b>	<b>88</b>
II.1) Synthèse du phosphoramidite ester.....	90
II.2) Synthèse du phosphoramidite alcyne.....	93
II.3) Synthèse du phosphoramidite linéaire bromé.....	96
<b>III) Synthèse des nucléotides fonctionnalisés.....</b>	<b>99</b>
III.1) Synthèse des phosphoramidites fonctionnalisés amides à partir du dérivé 5'C-ester de méthyle.....	100
III.1.a) Condensation des amines sur l'ester avec AlMe <sub>3</sub> .....	101

## Table des matières

III.1.a.1) Condensation du pivalate de 2-aminoéthyle sur l'ester .....	102
III.1.a.2) Condensation de l'acide 4-aminobutyrique sur l'ester.....	105
III.1.a.3) Condensation de l'histamine sur l'ester.....	108
III.1.b) Protections des fonctions chimiques introduites.....	111
III.1.b.1) Protection de la fonction acide carboxylique du composé amide-Asp.....	111
III.1.b.2) Protection du N-H de l'imidazole du composé amide-His .....	112
III.1.c) Synthèse des phosphoramidites fonctionnalisés amides.....	114
III.2) Synthèse des phosphoramidites fonctionnalisés triazoles à partir du dérivé alcyne .....	116
III.2.a) Synthèse des azotures .....	117
III.2.a.1) Synthèse des azotures 2-azidoéthyl-pivalate et 3-azidopropanoate de méthyle (respectivement azoture de la sérine et de l'acide aspartique) .....	117
III.2.a.2) Synthèse de l'azoture (5-(2-azidoéthyl)-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)méthyl pivalate (azoture de l'histamine) .....	118
III.2.b) Réactions de cycloaddition azoture-alcyne catalysées par du Cu(I) .....	121
III.2.c) Synthèse des phosphoramidites triazoles .....	123
<b>IV) Conclusion.....</b>	<b>124</b>
<b>V) Références bibliographiques du Chapitre II .....</b>	<b>127</b>
<b>Chapitre III : Synthèse des oligonucléotides .....</b>	<b>130</b>
<b>I) Synthèse et caractérisation de la jonction trois voies .....</b>	<b>134</b>
I.1) Synthèse des brins porteurs de la fonction alcyne ( <sup>alc</sup> S <sub>i</sub> ) .....	136
I.2) Conjugaison avec les fonctions mimes des chaînes latérales des acides aminés histidine, serine et acide aspartique ( <sup>Asp</sup> S <sub>1</sub> , <sup>His</sup> S <sub>2</sub> , <sup>Ser</sup> S <sub>3</sub> ).....	137
I.3) Formation des jonctions trois voies.....	143
I.4) Etudes physico-chimiques des structures obtenues .....	145
I.4.a) Electrophorèse sur gel de Polyacrylamide (PAGE).....	145
I.4.b) Détermination des T <sub>m</sub> .....	146
I.4.c) Dichroïsme circulaire (CD) .....	151
<b>II) Conclusion .....</b>	<b>152</b>
<b>III) Références bibliographiques du Chapitre III.....</b>	<b>153</b>
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>155</b>
<b>Chapitre IV : Partie expérimentale.....</b>	<b>159</b>
<b>I) Les nucléotides convertibles .....</b>	<b>161</b>
I.1) Protocole général de protection de l'hydroxyle en position 5' avec le chlorure de DMTr (Etape 1), et déprotection de l'hydroxyle en position 3' (Etape 2) : .....	175
I.2) Protocole général de formation des phosphoramidites : .....	180
<b>II) Les nucléotides fonctionnalisés .....</b>	<b>184</b>
II.1) Les nucléotides fonctionnalisés amides .....	184
II.1.a) Protocole général d'addition nucléophile catalysée par l'AlMe <sub>3</sub> .....	184
II.1.b) Protocole général de protection de l'hydroxyle en position 5' avec le chlorure de DMTr (Etape 1) et déprotection de l'hydroxyle en position 3' (Etape 2) .....	189
II.1.c) Protocole général de formation des phosphoramidites .....	198
II.2) Les nucléotides fonctionnalisés triazoles .....	200
II.2.a) Protocole général de cyclo-addition de Huisgen catalysée par du cuivre I (CuAAC) .....	204
II.2.b) Protocole général de protection de l'hydroxyle en position 5' avec le chlorure de DMTr (Etape 1) et déprotection de l'hydroxyle en position 3' (Etape 2) .....	207
II.2.c) Protocole général de formation des phosphoramidites .....	214
<b>III) Oligonucléotides .....</b>	<b>216</b>
III.1) Synthèse .....	216
III.2) Analyse par HPLC en phase inverse.....	216
III.3) Purification par HPLC préparative en phase inverse .....	217

## Table des matières

III.4) Caractérisation par spectrométrie de masse en MALDI-TOF .....	217
III.5) Dosage par spectrophotométrie UV .....	217
III.6) Détermination des $T_m$ .....	218
III.7) Dichroïsme circulaire .....	218
III.8) Gel natif d'acrylamide (PAGE) .....	219
III.9) Procédure de cycloaddition de Huisgen sur les oligonucléotides .....	220



## Liste des abréviations

3WJ : Jonction trois voies

A : Adénine ou Adénosine

ADN : Acide 2'-désoxyribonucléique

AMA : Mélange 50 : 50 hydroxyde d'ammonium / méthylamine

APCI : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique

APTS : Acide *para*-toluènesulfonique

ARN : Acide ribonucléique

ARNi : ARN interférent

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

Asc.Na : Ascorbate de sodium

Asp : Acide aspartique

B : Base azotée

C : Cytidine ou Cytosine

CCM : Chromatographie sur couche mince

COSY : Correlated spectroscopy

CPG : Controlled Pore Glass

CuAAC : Cycloaddition de Huisgen catalysée par du cuivre I

DCC : Dicyclocarbodiimide

DCI : Désorption/Ionisation Chimique

DIPA : Diisopropylamine

DMF : Diméthylformamide

DMS : Diméthylsulfure

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DMTr : 4,4'-diméthoxytrityle

ESI : Ionisation par électronébuliseur

G : Guanine ou Guanosine

His : Histidine

HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation

## Liste des abréviations

HPA : Acide 3-hydroxypicolinique

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence

IBX : Acide 2-iodoxybenzoïque

*i*PrOH : *isopropanol*

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Detection Ionization – Time Of Flight

Me : Méthyle

PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrilamide

PCR : Polymerase Chain Reaction

Ph : Phényle

Piv : Pivaloyle

PivOM : Pivaloyloxyméthyle

RCA : Rolling Cycle Amplification

R<sub>f</sub> : Rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RNase H : Ribonucléase H

RNase P : Ribonucléase P

SELEX : Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment

Ser : Sérine

SM : Spectrométrie de masse

SPS : Synthèse sur support solide

T : Thymine ou Thymidine

TBAF : Fluorure de tétrabutylammonium

TBDMS : *tert*-butyldiméthylsilyle

TBDPS : *tert*-butyldiphénylsilyle

TBTA-Cu : Tris(benzyltriazolylméthyl)amine-cuivre II

TEAA : Acétate de triéthylammonium

THAP : 2',4',6'-trihydroxyacétophénone

T<sub>m</sub> : Température de fusion

TMEDA : Triméthyléthylènediamine

U : Uracile

Wt : Wild type (non modifié)

Introduction

## **Introduction**





## Introduction

Au delà de leur rôle de stockage et transmission de l'information génétique, les acides nucléiques sont à ce jour reconnus pour leur potentiel en tant qu'alternatives aux anticorps pour le traitement de pathologies liées à la dégénérescence de gènes. Les avancées de la recherche sur ce type de composés ont entre autre permis de mettre en avant deux propriétés très importantes des acides nucléiques : la capacité de reconnaissance, par le biais de structures de type aptamère, et de catalyse, grâce à la découverte des ribozymes. Ainsi, depuis les années 80, l'hypothèse d'un « monde ARN » sur les origines de la vie a acquis de plus en plus de reconnaissance dans le milieu scientifique.

Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la propriété de catalyse des acides nucléiques, et en particulier à leur potentiel de mimer des protéases à sérines, enzymes capables de protéolyse *in vivo*. L'objectif du projet présenté dans ce manuscrit est d'obtenir des structures à bases d'ADN décorées par des résidus mimant les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans le mécanisme de catalyse enzymatique des protéases à sérine, l'acide aspartique (Asp), la sérine (Ser) et l'histidine (His). Pour cela des phosphoramidites fonctionnalisés et convertibles ont été synthétisés permettant d'introduire les fonctions chimiques réactives de la triade au sein des séquences. Avec ces composés hybrides ADN-« protéine » en main, une structuration adéquate du système est nécessaire afin de recréer un centre catalytique dans lequel les groupements chimique réactifs peuvent interagir afin de mimer la réactivité souhaitée. Nous nous intéressons en particulier à des structures de type bulge, épingle à cheveux ou jonction trois voies.

Le premier chapitre de ce manuscrit est une étude bibliographique qui présente des généralités sur les acides nucléiques et leurs structures secondaires ainsi que les méthodes de synthèses développées. Certaines des modifications structurantes et/ou fonctionnalisantes des acides nucléiques sont décrites avec les différentes applications possibles. Enfin, les propriétés de catalyse et de reconnaissance sont abordées, suivies de la présentation de l'approche envisagée pour notre projet de recherche.

## Introduction

Dans le deuxième chapitre, la synthèse des nucléotides modifiés synthétisés est détaillée en différenciant les nucléotides convertibles (ester, alcyne et linéaire bromé) et les nucléotides fonctionnalisés avec une fonction alcool pour la Ser, un acide carboxylique pour l'Asp et un noyau imidazole pour l'His. En effet les premiers, porteurs d'un groupement chimique réactif, permettent une conjugaison post-synthèse automatisée sur support solide des oligonucléotides, les deuxièmes apporteront directement à l'oligonucléotide dans lequel ils seront introduits le groupement chimique mimant un des acides aminés de la triade.

Le troisième chapitre présente la synthèse des brins oligonucléotidiques avec l'incorporation d'un des phosphoramidite convertibles qui sera transformé *via* une réaction de CuAAC pour introduire les fonctions hydroxyle, acide carboxylique et imidazole. Les séquences ont été choisies de manière à pouvoir s'assembler en jonction trois voies dont les propriétés physico-chimiques ont été étudiées et reportées.

L'ensemble des travaux est ensuite résumé ainsi que des perspectives proposées. Enfin, les protocoles expérimentaux sont présentés au quatrième chapitre.

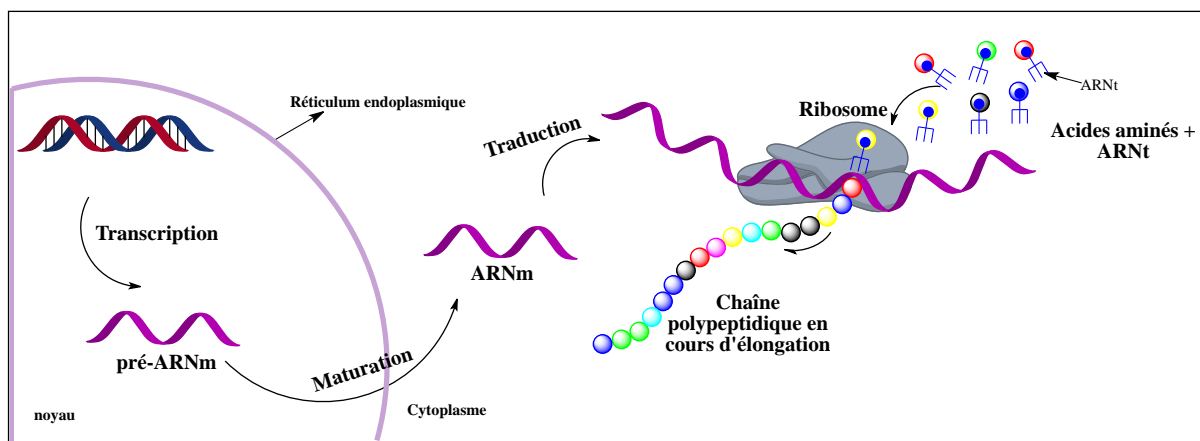
**Chapitre I : Les acides nucléiques modifiés : structures et propriétés**



## I) Généralités sur les acides nucléiques

Les premières études sur les acides nucléiques remontent à la moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle lorsque J.F. Miescher<sup>1</sup>, un biologiste suisse, a isolé pour la première fois en 1869 une substance riche en phosphate nommée à l'époque nucléine. La nature biochimique du matériel biologique sera mise en évidence bien plus tard notamment grâce aux travaux d'Oswald Avery dans les années 40<sup>2</sup>, sans aucune notion à l'époque de la structure de ces composés. En effet, la structure ne sera élucidée qu'en 1953 par Watson et Crick<sup>3</sup> grâce à un précieux cliché aux rayons X effectué auparavant par Rosalind Franklin<sup>4</sup>.

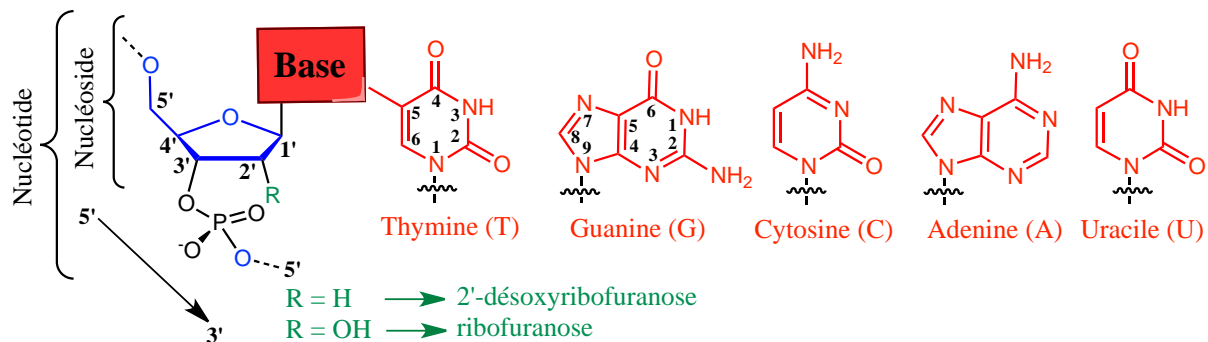
L'ADN (acide désoxyribonucléique) et l'ARN (acide ribonucléique) sont les deux acides nucléiques naturels présents chez les eucaryotes et les procaryotes. Leurs rôles biologiques majeurs sont la détention et la transmission du matériel génétique propre à chaque individu. L'ADN est le support de toutes les informations génétiques contenues dans le génome. L'ARN messenger (ARNm) est, quant à lui, un support temporaire synthétisé *in vivo* à partir des gènes de l'ADN *via* le processus de transcription qui a lieu dans le noyau de la cellule. Après maturation, ou épissage, les ARNm traversent la membrane nucléaire afin d'atteindre le cytoplasme où a lieu la transcription grâce au ribosome, complexe macromoléculaire constitué de protéines et d'ARN ribosomique (ARNr), et aux ARN de transfert (ARNt) qui transportent les acides aminés permettant la synthèse protéique (Figure 1).



**Figure 1** : Processus de synthèse *in vivo* de polypeptides.

### I.1) Structure primaire

Les acides nucléiques sont des macro-biomolécules polyanioniques de poids moléculaire élevé constituées d'un enchainement de nucléosides reliés entre eux par un lien phosphodiester réunissant la position 3' à la position 5' de l'unité suivante (Figure 2). Chaque nucléoside est constitué d'un sucre, le désoxyribofuranose dans l'ADN et le ribofuranose dans l'ARN relié à une base azotée en position 1' *via* une liaison  $\beta$ -N-glycosidique. Les deux sucres se différencient par la présence d'une fonction OH en position 2' dans le cas de l'ARN. Il existe deux types de bases azotées, les purines adénine et guanine, communes aux deux acides nucléiques, et les pyrimidines, cytosine et thymine dans l'ADN, et cytosine et uracile dans l'ARN. Les chaînes sont lues par convention dans le sens 5' vers 3'.



**Figure 2 :** Nucléosides et nucléotides naturels.

### I.2) Structure secondaire

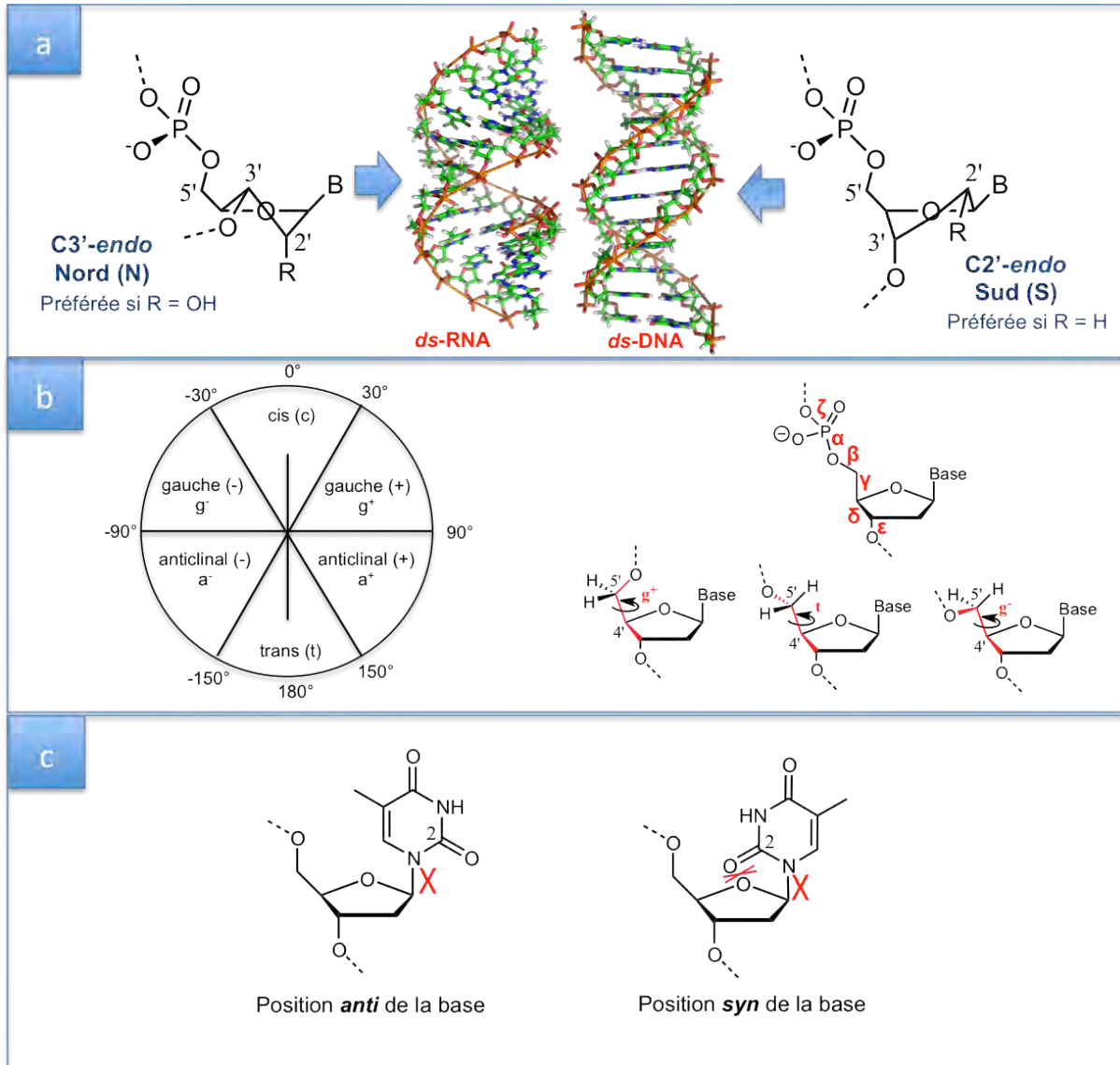
Le milieu cellulaire étant un milieu aqueux, ces composés doivent s'agencer dans l'espace de manière à être stable dans ces conditions. Bien que d'autres agencements soient possibles à cause du caractère hautement polymorphique de l'ADN, *in vivo* ce dernier se structure principalement sous forme de doubles brins appariés alors que la forme monocaténaire repliée sur elle-même est favorisée pour l'ARN<sup>5</sup>. Les facteurs qui influencent la forme et la stabilité de ces structures secondaires sont la conformation adoptée par le sucre<sup>6</sup>, le squelette et les angles de torsion du groupement phosphodiester<sup>7</sup>, la liaison  $\beta$ -N-glycosidique, l'appariement et le stacking des bases<sup>8</sup> et l'effet du solvant (Figures 3 et 4).

Malgré sa flexibilité le cycle (2'-désoxy) furanosique, en particulier lors des formations de duplex, n'adopte que certaines conformations, à savoir C3'-*endo* (Nord) pour le ribose dans l'ARN, en raison de la présence du 2'-OH, ou C2'-*endo* (Sud) pour le désoxyribose dans l'ADN. Cette conformation détermine le type de double hélice obtenue (Figure 3\_a).

Tout le long du squelette sucre-phosphate se trouve un enchainement de six liaisons auxquelles correspondent des angles de torsion identifiés par les lettres grecques  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , et  $\zeta$ . L'angle  $\gamma$  (liaison C4'-C5') donne la position relative du groupement phosphate par rapport au sucre. Les unités portant une base pyrimidique adoptent plutôt une conformation synclinale ou *gauche (+)*, celles portant une base purique peuvent adopter la conformation *gauche (+)* ou antipériplanaire (*trans*) (Figure 3\_b).

La liaison reliant la base azotée au sucre en position 1' est une liaison  $\beta$ -N-glycosidique définie par l'angle de torsion  $\chi$ . Seules deux conformations sont possibles, *syn* si le groupement carbonyle en position 2 des bases pyrimidiques ou l'atome d'azote en position 3 des bases puriques se trouvent au dessus du sucre, ou *anti* si les bases sont orientées dans la direction opposée. L'agencement *syn* est généralement défavorisé à cause des contraintes stériques présentes (Figure 3\_c).





**Figure 3** : Facteurs influençant la forme et la stabilité des structures secondaires : a) Conformation du sucre ; b) Squelette et angles de torsion du lien phosphodiester ; c) La liaison  $\beta$ -N-glycosidique.

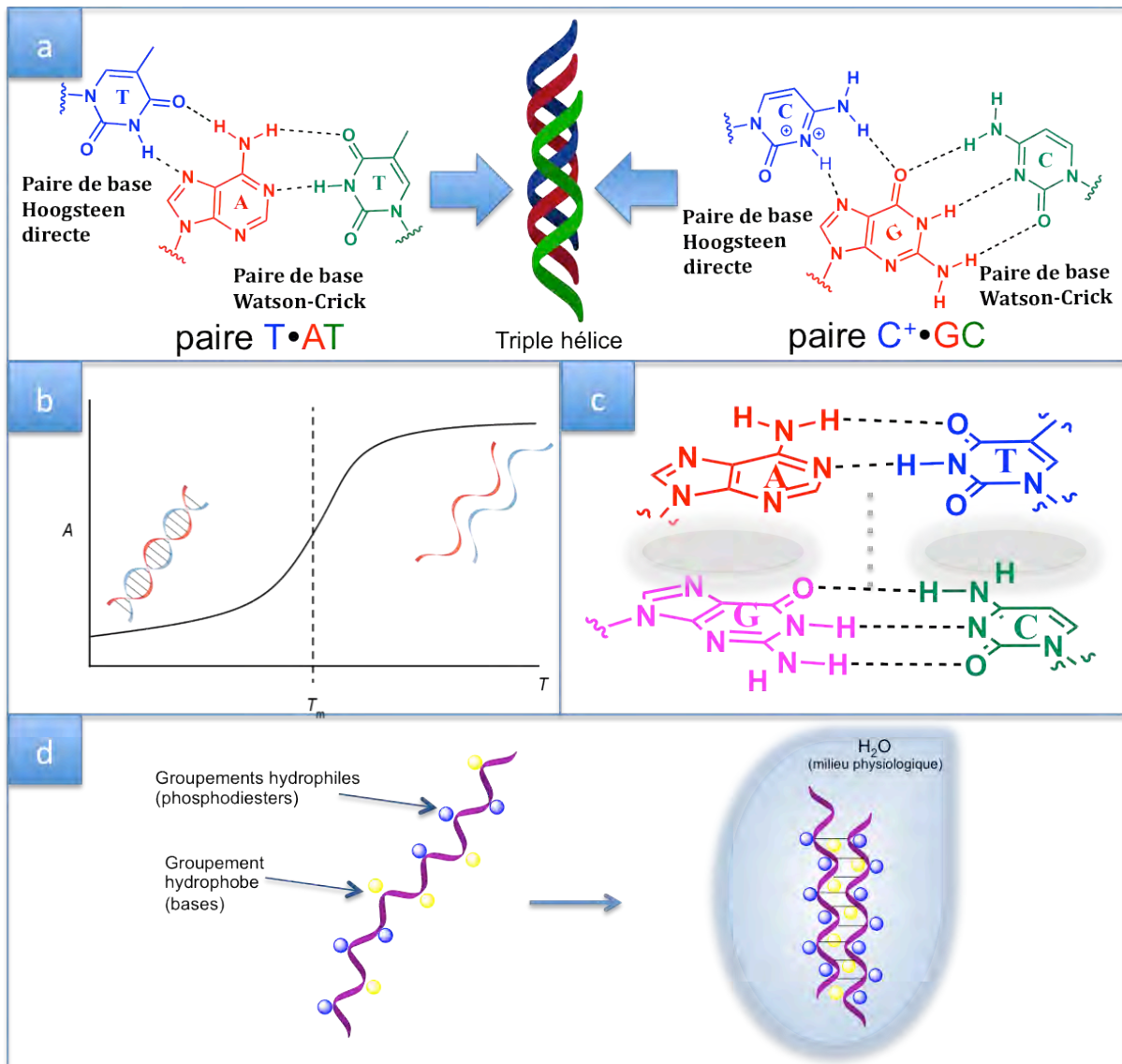
La formation de structures secondaires est possible grâce à l'appariement des bases azotées *via* des liaisons hydrogène inter-brins. La mise en évidence de ces liaisons a contribué remarquablement à l'élucidation de la structure des acides nucléiques par Watson et Crick. A l'époque, ils avaient identifié seulement deux combinaisons possibles d'appariement, A-T (deux liaisons hydrogène) et G-C (trois liaisons hydrogène), décrites comme « paires canoniques ». Quelques années plus tard, K. Hoogsteen proposa un autre type d'appariement où les groupements donneurs et accepteurs de liaison hydrogène impliqués ne sont pas les mêmes. L'appariement est direct si les deux sucres sont du même côté de l'axe de la paire de base, et est inverse si les sucres se trouvent de part et d'autre de l'axe. Ce type d'appariement peut aussi se mettre en place entre deux bases

puriques (comme dans le cas des G-quadruplex Figure 7) et est observé pour la formation de triples hélices (Figure 4\_a).

Lorsque une macromolécule d'ADN est soumise à un processus de dénaturation, par effet d'un agent chimique, d'une hausse de température, ou de pH par exemple, les brins complémentaires formant une structure secondaire se retrouvent désormais libres. Le processus thermique est réversible pour les acides nucléiques, et la température à laquelle 50% des brins sont non appariés, la température de fusion ( $T_m$  pour « melting Temperature ») est utilisée pour déterminer la stabilité de la structure secondaire (Figure 4\_b). La  $T_m$  est déterminée par spectroscopie UV qui montre une exaltation de l'absorbance, à 260 nm pour le double brin, lorsque l'appariement et le stacking des bases sont rompus.

Uniquement dans le cas de séquences contenant des paires de bases appariées, le stacking entre les bases est un facteur primordial pour la stabilité de la structure. La géométrie et l'énergie associée à ce phénomène sont définies par les forces de Van der Waals, les interactions électrostatiques entre les dipôles induits par les atomes et l'effet du solvant. De plus les bases étant aromatiques et donc hydrophobes, leur empilement minimise l'exposition au solvant aqueux (Figure 4\_c).

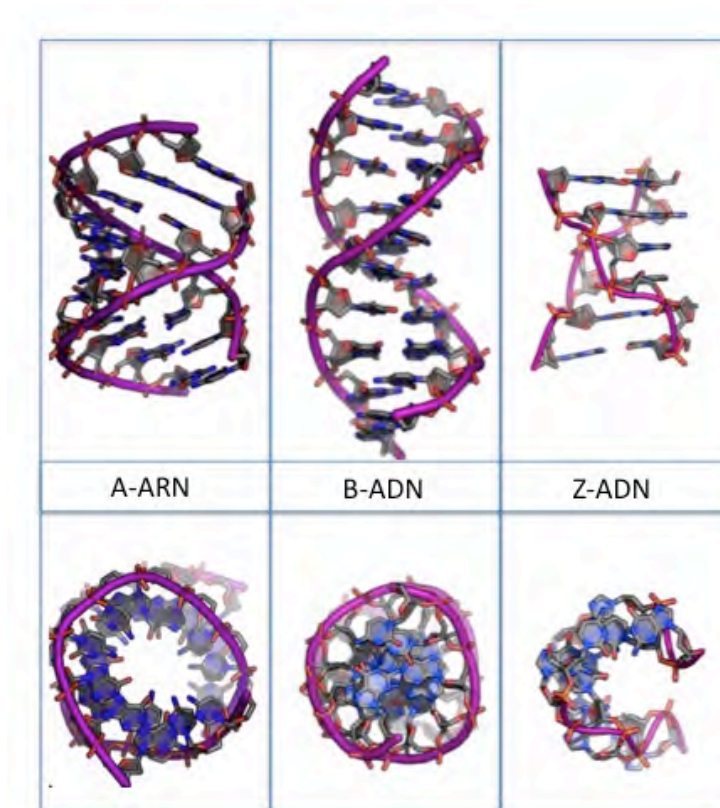
Comme pour toute molécule biologique, les interactions avec le solvant influencent la structure de l'ADN et sa fonction. De manière générale l'appariement des bases et le stacking sont favorisés par l'effet hydrophobe. L'eau solvate la surface des sillons où se trouvent les charges négatives des liens phosphodiester avec un réseau de liaisons hydrogène qui forment des liens supplémentaires inter-brins (Figure 4\_d). Le taux d'hydratation tout comme tous les facteurs décrits jusqu'à présent influencent la structure secondaire adoptée par les acides nucléiques.



**Figure 4** : Facteurs influençant la forme et la stabilité des structures secondaires : a) Appariement des bases ; b) Détermination des T<sub>m</sub> ; c) Stacking des bases ; d) Effet du solvant.

### 1.2.a) Doubles hélices

Parmi les structures secondaires, les doubles hélices sont les plus connues et peuvent exister sous plusieurs formes (Figure 5).



**Figure 5** : Types de doubles hélices.

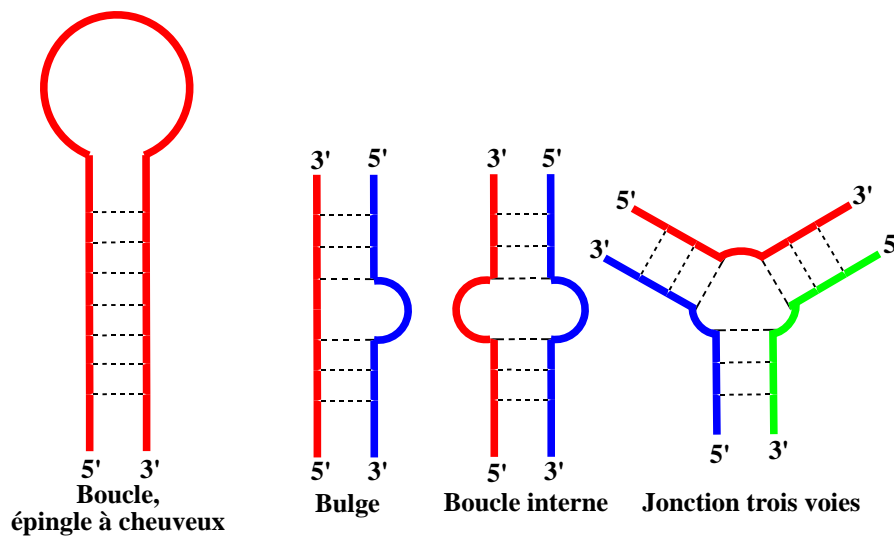
L'hélice B est une hélice droite présentant une conformation du sucre de type *C2'-endo*. Petit et grand sillon ont la même profondeur, et les paires de bases appariées sont essentiellement perpendiculaires à l'axe de la double hélice, ce qui conduit à une structure plus homogène. C'est la forme d'hélice adoptée essentiellement par l'ADN, la plus courante *in vivo* et qualifiée de « double hélice canonique ». L'hélice de type A, plus compacte, est une hélice droite qui est obtenue lorsque le sucre se trouve en conformation *C3'-endo*. L'ARN se trouve exclusivement sous ce type d'hélice, l'ADN peut l'adopter aussi lorsque son taux d'hydratation est moins important par rapport à la forme B. Dans les deux cas nous retrouvons une orientation *anti* des liaisons glycosidiques. La différence de conformation adoptée par le sucre provoque des différences au niveau de la taille du petit et du grand sillon, ainsi que de la disposition des paires de bases appariées.

L'ADN Z présente une hélice gauche, plus fine et allongée, qui ne présente pas d'homogénéité pour la conformation du sucre. Les conformations *anti* et *syn* des bases azotées alternées confèrent une forme en zigzag à l'hélice. Initialement ce type d'hélice avait été obtenue uniquement dans des conditions non compatibles *in vivo* comme dans

des solutions riches en sels (NaCl 3M)<sup>9</sup>. Cependant, en 2003, Rich et Zhang<sup>10</sup> ont démontré que la méthylation de la cytosine et la présence d'autres cations ou de molécules organiques comme la spermidine à des concentrations milli molaires stabilisent la forme Z de l'ADN *in vivo*.

### 1.2.b) Bulges

En présence d'une ou plusieurs base(s) non appariées dans une double hélice, il est possible d'obtenir des structures de type bulge ou épingle à cheveux par exemple (Figure 6). Ces agencements peuvent se former entre deux brins complémentaires (bulge, boucle interne) ou au sein d'une seule séquence auto-complémentaire ayant en son centre une zone de non-appariement (épingle à cheveux). Dans le même esprit, des jonctions trois voies par exemple peuvent être obtenues par le biais de séquences projetées de manière à être semi-complémentaires entre elles avec ou sans bases non appariées au cœur de la jonction.



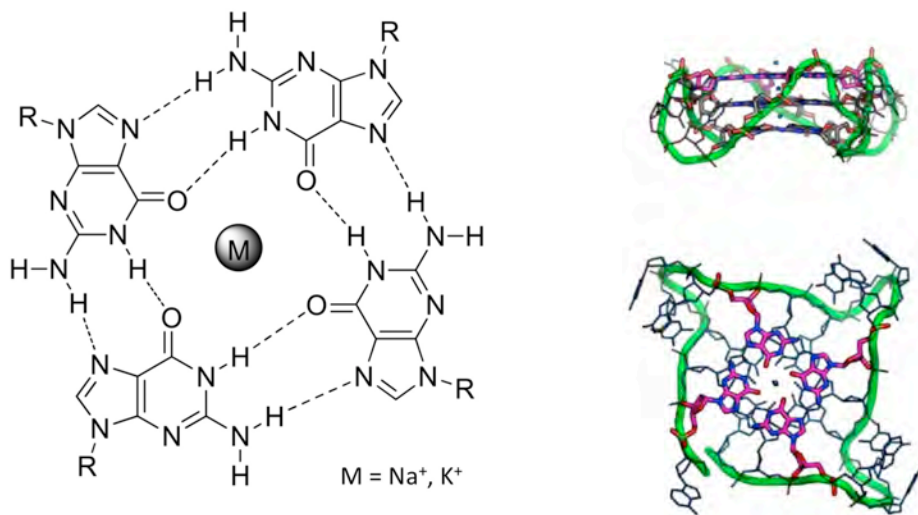
**Figure 6** : Exemples de structures comportant une ou plusieurs bases désappariées.

La présence de bulges au sein de séquences d'ADN peut provoquer des mutations géniques car l'absence d'un ou plusieurs appariements induit des erreurs de transcription et donc de réplication du gène même. Au contraire dans le cas des séquences d'ARN, des structures bulge ont été identifiées dans des régions importantes

pour la reconnaissance protéine-ARN ou pour l'activité catalytique de structures à base d'ARN de type ribozymes par exemple<sup>11</sup>.

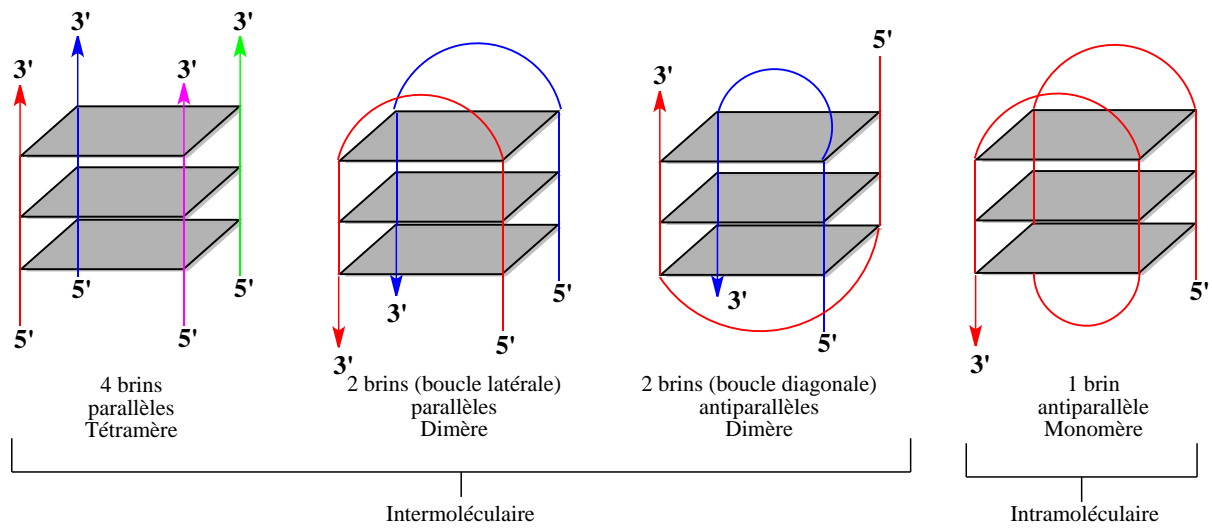
### 1.2.c) G-Quadruplex

Les G-Quadruplex (G-Quad) sont des structures constituées de plateaux de quatre guanines (une tétrade) qui s'auto-organisent par le biais de liaisons de type Hoogsteen et stabilisées par la présence d'un cation monovalent ( $K^+$  ou  $Na^+$ ) (Figure 7).



**Figure 7 :** Tétrade de guanine (à gauche) et G-Quadruplex (à droite).

Les G-Quad peuvent avoir une topologie différente selon le nombre de brins riches en guanine qui les constituent (de un à quatre) ainsi que de leur façon, parallèle ou antiparallèle, de s'associer (Figure 8).



**Figure 8 : Topologies de G-Quadruplex**

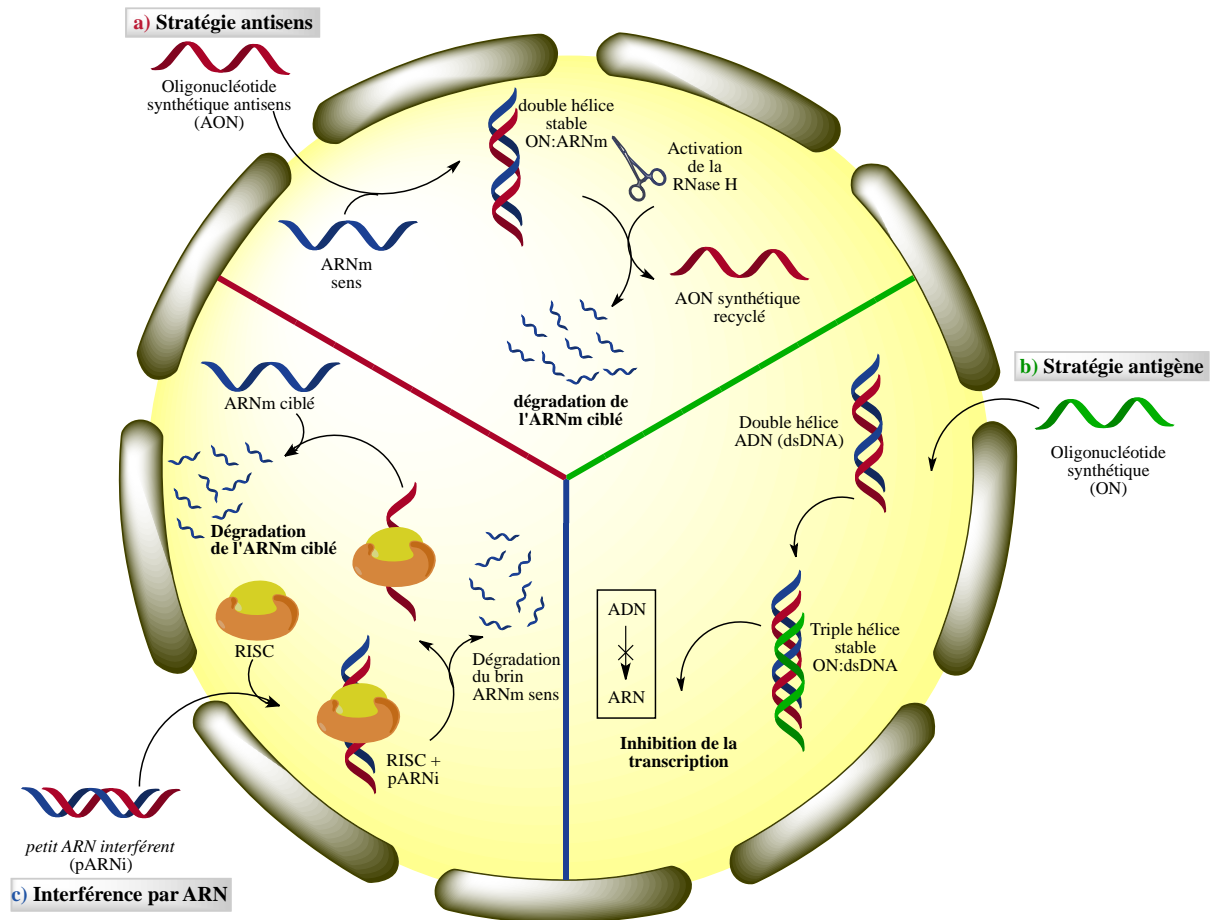
Ce type d'agencement a été identifié comme élément structural essentiel des télomères<sup>12</sup> situés à la fin des chromosomes et impliqués dans le phénomène d'apoptose.

En tant que porteurs de l'information génétique, les acides nucléiques peuvent être la cause de maladies du fait d'un possible dérèglement des informations transmises lors du processus de réplication. Au vu des propriétés décrites ces composés peuvent eux même être des candidats intéressants pour des applications dans le domaine du biomédical. Des stratégies thérapeutiques géniques ont ainsi été développées en particulier l'ADN antisens, l'extinction de gène et l'interférence par ARN détaillées ci-après.

## II) Les stratégies géniques : ADN antisens, extinction de gène, interférence par ARN (ARNi)

A partir de la fin des années 1970, le développement de techniques de synthèse automatisée d'oligonucléotides (ON) a permis d'avoir accès facilement à des brins d'acides nucléiques de séquence souhaitée<sup>13, 14</sup>. Cette avancée représente un outil puissant pour les chimistes, biochimistes et médecins pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques impliquant l'interaction des acides nucléiques avec une cible choisie. Notamment, les thérapies dites '*géniques*' visant à agir (ou réagir) directement avec un gène ciblé sont en continuel développement. Plusieurs stratégies ont été mises

au point permettant de contrôler ou empêcher l'expression des gènes<sup>15</sup> comme la stratégie antisens, antigène et par interférence par ARN (ARNi)(Figure 9).



**Figure 9 :** Représentation schématique des trois stratégies géniques citées : a) Stratégie antisens ; b) Stratégie antigène ; c) Interférence par ARN.

## II.1) La stratégie antisens

Cette stratégie (Figure 9\_a) est parmi les premières développées pour la régulation de l'expression des gènes. Introduite par Stephenson et Zamenick en 1978, elle consiste en l'utilisation d'une courte séquence d'acide désoxyribonucléique (AON pour Antisens OligoNucleotide) complémentaire à l'ARNm cible<sup>16, 17</sup>. L'hétéro-duplex ADN-ARN formé par des interactions de type Watson Crick est reconnu par la ribonucléase H (RNase H) qui active le processus de dégradation et conduit à l'hydrolyse sélective du brin d'ARNm ciblé empêchant ainsi sa traduction en protéine et libérant l'AON qui est donc recyclé<sup>18</sup>. A ce jour de nombreux AON ont été synthétisés et utilisés à



des fins thérapeutiques<sup>19, 20</sup> comme pour le traitement d'une dégénérescence héréditaire de la rétine par exemple<sup>21</sup>.

## II.2) La stratégie antigène

La stratégie antigène (Figure 9\_b) consiste en l'inhibition du processus de transcription de l'ADN *via* la formation d'une triple hélice avec une séquence appelée TFO (pour Triplex Forming Oligonucleotide). Dans ce cas, l'appariement est de type Hoogsteen inverse ou direct (cf chapitre I.1.2, Figure 3\_D) en fonction de la séquence du double brin ciblée. Pour cette approche des simples brins d'ADN et ARN ont été synthétisés<sup>22</sup>, tout comme des analogues à squelette peptidique, les PNAs (Peptide Nucleic Acids)<sup>23</sup>. Le principal avantage par rapport à la stratégie antisens est le ciblage direct de l'ADN plutôt que l'ARNm, ce qui implique que la quantité de séquence TFO nécessaire sera moindre<sup>24</sup>. Néanmoins le manque de stabilité des triples hélices en milieu physiologique et la nécessité d'avoir des séquences riches en purines limite la mise en œuvre de cette technique *in vivo* <sup>25</sup>.

## II.3) La stratégie interférence par ARN

Plus récente et complexe que les deux précédentes, la stratégie d'interférence (Figure 9\_c) par ARN a été introduite au début des années 1990 par Jorgensen<sup>26</sup>. Ce dernier a découvert ce phénomène d'inhibition génique dans les plantes réalisé par un double brin d'ARN à séquence connue. En 1998, Mello et Fire, récompensés par le prix Nobel de médecine en 2006 <sup>27</sup>, ont montré que ce phénomène nommé PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing) chez les plantes est également présent chez les eucaryotes. Dans ce cas, le double brin d'ARN utilisé est un petit ARN interférent (pARNi), généralement constitué de 21 à 24 paires de bases, qui est reconnu dans un premier temps par le complexe enzymatique RISC (RNA *Interference Silencing Complex*)<sup>28</sup>. Lors du processus biologique naturel, ces fragments sont obtenus à partir d'une longue séquence d'ARN qui est coupée par la ribonucléase Dicer. Le RISC dissocie le double brin en restant lié au brin antisens (ARNas)<sup>29</sup> alors que le brin sens est dégradé par une composante protéique du RISC, l'endonucléase AGO2 (Argonaute protein). Le complexe RISC-ARNas devient l'espèce active qui agit *post*-transcription avec l'ARNm ciblé. En

présence du brin ARNm cible complémentaire au brin d'ARNas, ils s'assemblent pour former une double hélice reconnue par AGO2 qui dégrade la séquence d'ARNm cible<sup>30, 31</sup>. Ce mécanisme peut être déclenché artificiellement par l'introduction d'un pARNi naturel ou modifié<sup>32, 33</sup>.

L'accès rapide à tout type de séquences (ADN ou ARN) a été rendu possible par le développement de techniques automatisées de synthèse et en particulier par les méthodes supportées (SPS).

### III) Les oligonucléotides de synthèse

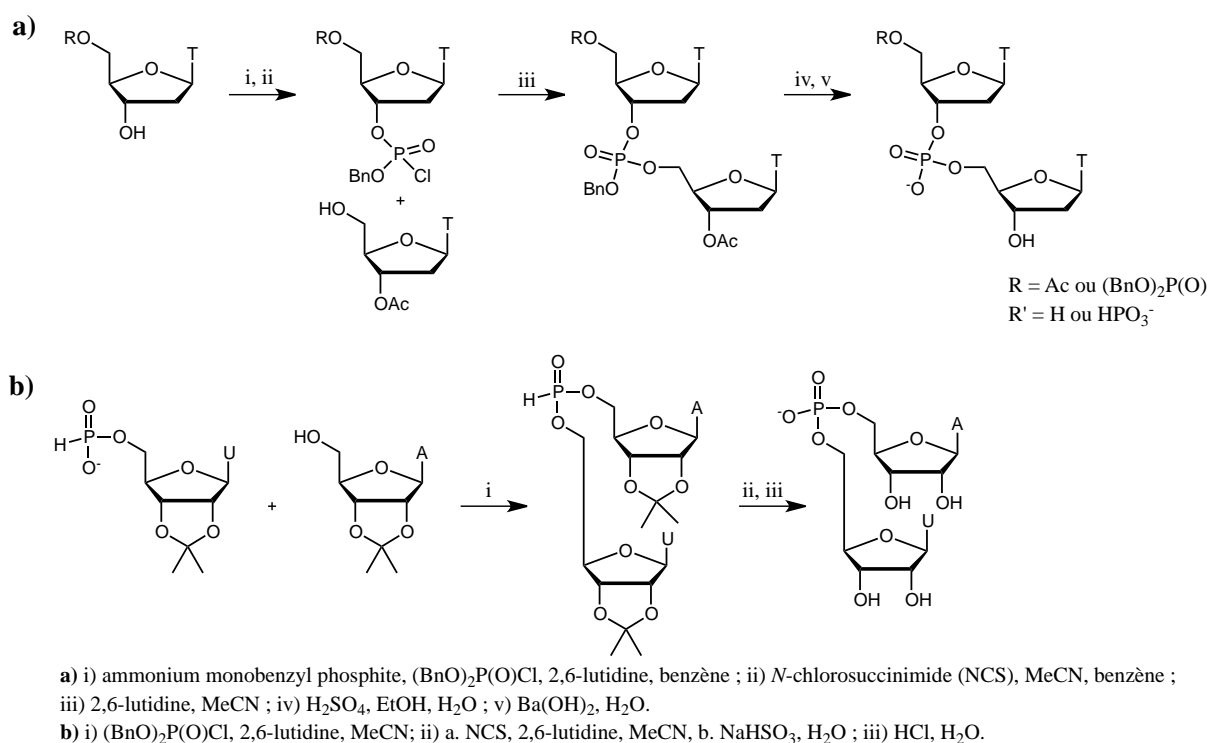
Les oligonucléotides peuvent être obtenus selon deux approches utilisant aussi bien des unités nucléotidiques naturelles que modifiées.

La première consiste en des méthodes de synthèse chimique, en solution ou sur support solide automatisées, qui permettent d'obtenir des séquences connues *via* les approches phosphotriester, *H*-phosphonate ou phosphoramidite.

La seconde, par voie enzymatique, utilise des méthodes d'amplification de biologie moléculaire qui fournissent des séquences à partir d'un brin initial donné. La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) et la RCA (*Rolling Circle Amplification*) sont deux exemples de techniques très utilisées.

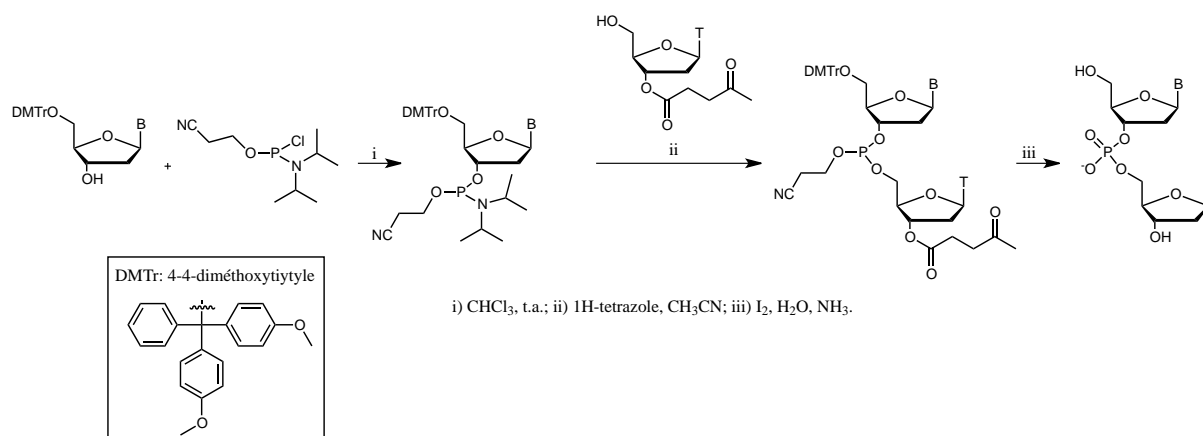
#### III.1) Les méthodes de synthèse en solution

Les avancées nécessaires pour mettre en place les techniques actuelles de synthèses automatisées d'oligonucléotides ont été longuement décrites dans la littérature<sup>34, 35</sup>. Les méthodes utilisant des phosphotriesters (Schéma 1\_a) et celles utilisant des *H*-phosphonates (Schéma 1\_b) ont été les premières mises au point par les équipes de Todd et Michelson<sup>36, 37</sup> en 1950, pionniers dans ce domaine. Ces deux approches, bien qu'importantes pour l'époque, présentaient tout de même des faibles rendements et prévoyaient l'utilisation de réactif peu réactifs comme le composé phosphoré pour l'approche phosphotriester portant un phosphore au degré d'oxydation V, et l'intermédiaire diester de l'approche *H*-phosphonate extrêmement sensible à une hydrolyse basique.



**Schéma 1 :** a) Première synthèse d'un dinucléotide par la méthode au phosphotriester ; b) Approche *H*-phosphonate.

Les travaux d'autres groupes<sup>38-43</sup>, parmi lesquels figurent ceux de Khorana<sup>44, 45</sup>, Letsinger<sup>46, 47</sup> et Eckstein et Rizk<sup>48</sup>, ont contribué à l'évolution des recherches dans ce domaine, avec en particulier l'amélioration de la méthode *H*-phosphonate par l'utilisation de chlorure de pivaloyle<sup>49, 50</sup> en tant qu'agent de couplage, qui est de nos jours encore très utilisée. L'introduction de l'approche phosphoramidite par Beaucage et Caruthers<sup>14</sup> en 1981 a été déterminante. Cette méthode, parmi les plus efficaces est majoritairement employée à ce jour et c'est celle que nous avons utilisée (Schéma 2).



**Schéma 2 : Approche phosphoramidite.**

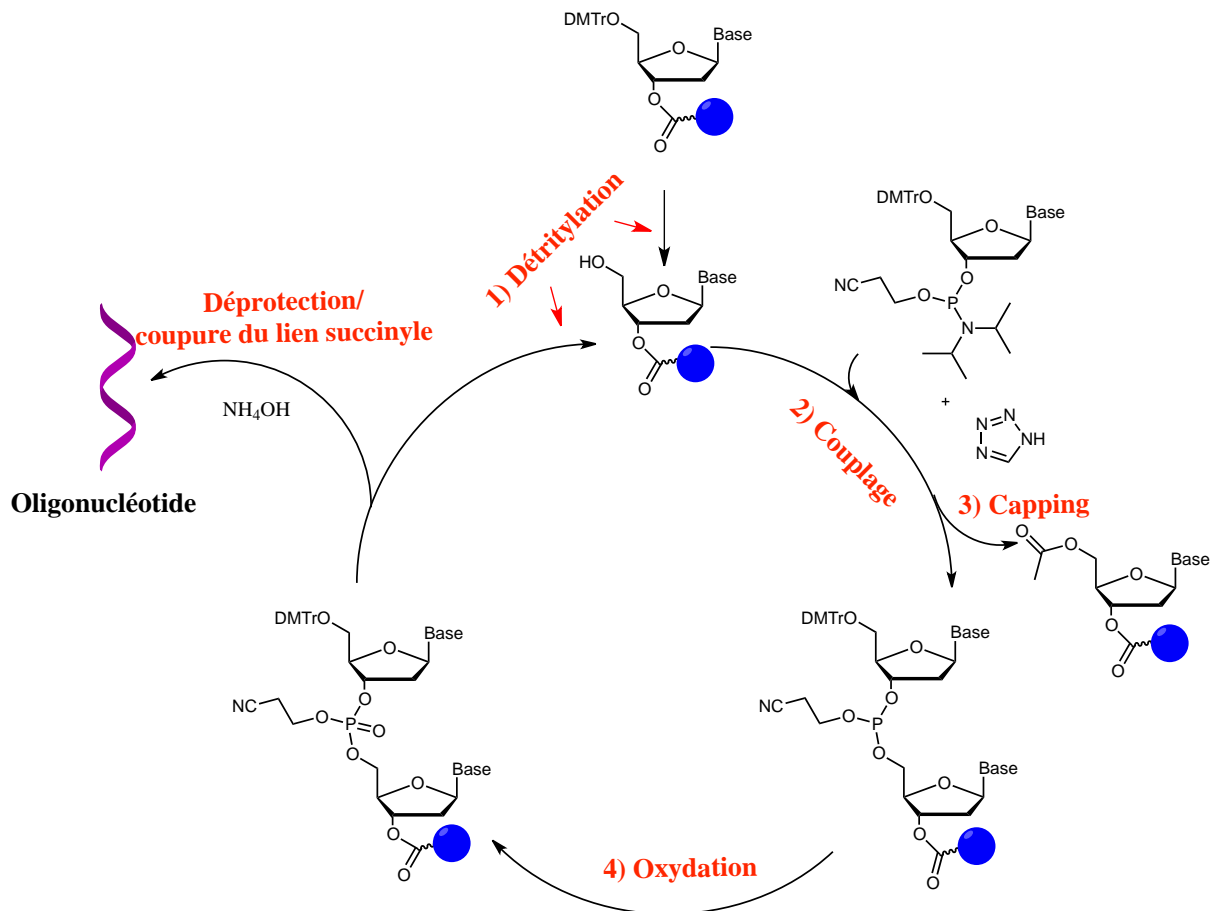
Du fait de l'utilisation de composés phosphorés portant un phosphore au degré d'oxydation III, l'approche phosphoramidite présente des temps de couplages moins longs et des rendements plus élevés. De plus, un autre avantage notable qui en fait la méthode de choix pour des synthèses rationnelles d'acides nucléiques, est sa transposabilité en synthèse supportée. De plus, des automates de synthèse très intuitifs conçus spécialement pour cette approche ont vu le jour.

### III.2) La synthèse sur support solide

La synthèse supportée pour les oligonucléotides a été introduite bien après que Merrifield ait introduit cette technique pour les peptides. En 1962, l'équipe de recherche de Letsinger et Mahdervan<sup>51, 52</sup> a créé le premier support copolymérique à base de styrène, d'acide *p*-vinylbenzoïque et de *p*-vinylbenzène. L'avantage d'utiliser un support est de faciliter la séparation des produits de réaction du milieu réactionnel. Actuellement, les supports utilisés sont à base de silice (CPG pour *Controlled Pore Glass*) ou de dérivés du polystyrène fonctionnalisés par des groupements qui permettent l'ancrage d'un premier nucléotide sur lequel se construit la chaîne oligonucléotidique souhaitée. Le lien le plus couramment utilisé est le lien succinyle qui présente l'avantage d'être rompu lors de la dernière étape du cycle. Contrairement à l'élongation *in vivo*, la synthèse se fait dans le sens 3' -> 5' afin que le couplage implique un alcool primaire et non pas un secondaire. Le processus peut être schématisé en un cycle de réactions chimiques pour chaque unité introduite. Les nucléotides incorporés, naturels ou non, portent nécessairement une protection de type 4-4'-diméthoxytrityle (DMTr) sur le OH

en position 5', un groupement phosphoramidite en position 3' et des groupements protecteurs sur les fonctions réactives des bases (benzoyle pour le NH<sub>2</sub> de la cytosine et l'adénine, *isobutyle* ou DMF (diméthylformamidino) pour le NH<sub>2</sub> de la guanosine etc...) qui sont déprotégés lors d'une même étape finale par traitement ammoniacal.

Le cycle de réaction complet consiste en 4 étapes (Schéma 3) :



**Schéma 3** : Cycle de réactions de synthèse supportée automatisée avec la méthode phosphoramidite.

- 1) Détritylation : Un traitement acide avec le TCA (acide trichloroacétique) est effectué afin d'éliminer le groupement protecteur DMTr sur la fonction hydroxyle en 5' du nucléoside ancré sur le support ou celle de la dernière unité introduite.
- 2) Etape de couplage : Le nucléotide phosphoramidite à introduire est préalablement activé en milieu acide faible pour former le tétrazole intermédiaire plus réactif par déplacement d'un groupement NiPr<sub>2</sub> sur l'atome

de phosphore par le 1*H*-tétrazole. La fonction 5'-OH libre du premier nucléotide réagit sur le phosphore activé du second nucléotide afin de créer un phosphite.

- 3) Capping : Il se peut que certaines fonctions 5'-hydroxyles libres n'aient pas réagi et sont donc acétylées afin d'éviter d'obtenir un mélange de séquences tronquées.
- 4) Oxydation : Le lien phosphite formé entre les nucléotides est oxydé, en phosphotriester penta-coordonné plus stable, par un traitement à base d'iode et d'eau.

Un nouveau cycle recommence pour l'introduction de l'unité suivante. Certains réactifs comme l'acide pour la détritulation, modulé en fonction du pKa désiré, l'agent de couplage, le 1-*H*-tétrazole n'étant commercial qu'en solution, la nature de l'agent d'oxydation pour le phosphore, peuvent être variables et sont adaptés aux modifications à introduire. Le taux de couplage ainsi que le rendement de chaque cycle complet peut être estimé par dosage par spectrométrie visible du cation diméthoxytrytile (DMTr<sup>+</sup>) de couleur orange formé en début de chaque cycle lors de l'étape de détritulation.

Le décrochage de l'oligonucléotide du support, la déprotection des bases et la  $\beta$ -élimination du groupe cyanoéthyle sur l'atome de phosphore sont réalisées en une seule fois par un traitement ammoniacal qui constitue l'étape finale.

Grace à cette approche, il est possible d'obtenir des oligonucléotides de séquences connues en utilisant des phosphoramidites commerciaux ou de synthèse, naturels ou modifiés. Bien que très performante, cette méthode présente tout de même des limites notamment en terme de taille des oligonucléotides (environ 100 bases maximum). L'approche de type enzymatique permet de faire face à cette limitation.

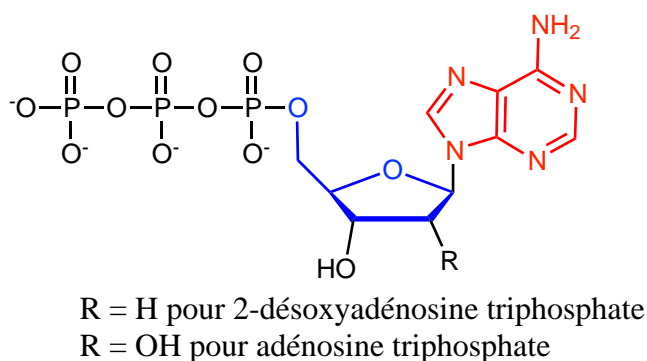
### III.3) L'approche enzymatique

L'approche enzymatique s'est développée grâce aux travaux de Spiegelman<sup>53</sup> qui a effectué le premier test d'évolution *in vitro* en s'inspirant du processus d'évolution darwinienne<sup>54, 55</sup>. Elle désigne un ensemble de méthodes d'amplification qui utilisent une enzyme, une polymérase, appelée à recopier *n* fois (jusqu'à 10<sup>8</sup> fois) une séquence

## Chapitre I : Les acides nucléiques modifiés : structures et propriétés

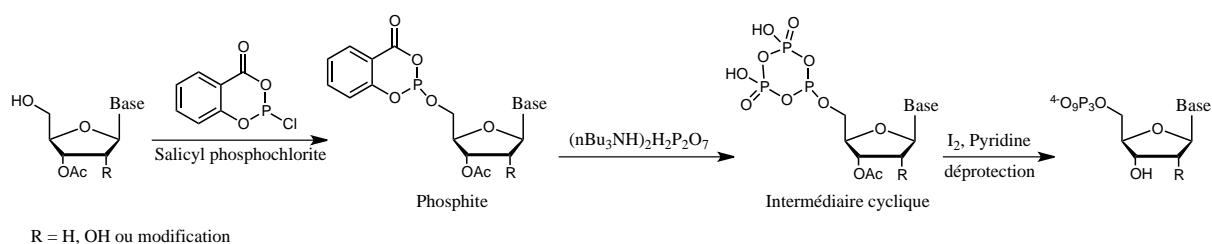
donnée. La PCR et la RCA<sup>56, 57</sup> sont deux exemples<sup>58</sup> de techniques utilisées. La polymérase utilise une amorce (complémentaire à une partie de la séquence donnée) et des nucléosides triphosphates (Figure 10) qui sont intégrés dans les séquences « copies ».

L'avantage de ces approches est qu'il est possible d'obtenir un nombre conséquent de séquences à partir d'une seule fournie en un temps relativement court (ce dernier dépendant du nombre de cycles d'amplification souhaité et de la longueur de la séquence à copier). De plus, les nucléosides triphosphates fournis peuvent être modifiés à condition qu'ils soient acceptés par les polymérases, ce qui permet d'obtenir des séquences modifiées même si la séquence initiale ne l'est pas.



**Figure 10** : Exemple de nucléoside triphosphate : Adénosine triphosphate.

Une des méthodes de préparation de nucléosides triphosphate amplement utilisée est représentée au Schéma 4<sup>59, 60</sup>.



**Schéma 4** : Méthode de synthèse Ludwig-Eckstein de nucléosides triphosphates.

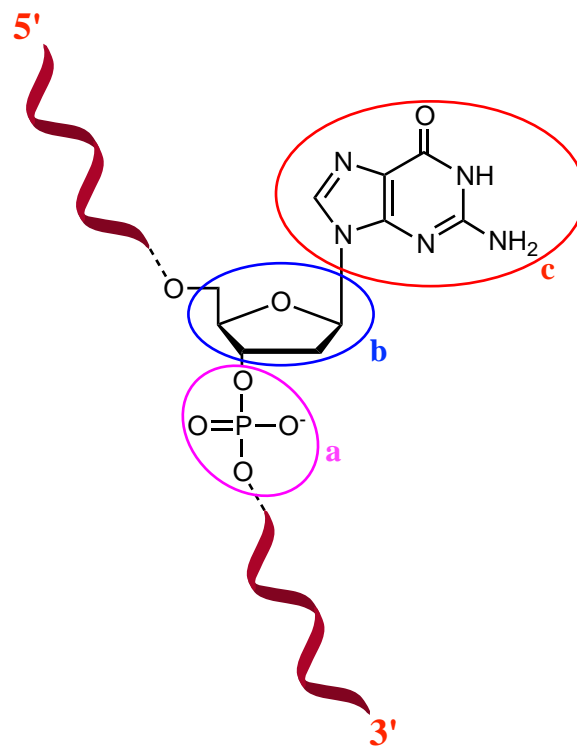
Ces deux approches présentées, synthétique et enzymatique, sont très utilisées de nos jours. Les deux présentent des avantages et inconvénients. L'approche synthétique présente des limites de taille des séquences et de quantité des oligonucléotides pouvant être obtenus, ce qui n'est pas le cas *via* une approche enzymatique. L'utilisation des

polymérase présente tout de même des restrictions au niveau des positions modifiables, les nucléosides modifiés n'étant pas tous acceptés par ces enzymes.

#### IV) Les modifications

Pour des applications thérapeutiques *in vivo*, il est nécessaire que les oligonucléotides employés soient stables vis à vis de la dégradation par des nucléases<sup>61-63</sup>, et qu'ils présentent une bonne affinité pour la cible choisie ainsi qu'une bonne biodisponibilité (pénétration cellulaire). L'utilisation d'oligonucléotides non modifiés est pour cela limitée, en revanche l'introduction d'acides nucléiques portant une ou plusieurs modification(s) permet de faire face à ces problèmes.

Ces dernières peuvent être introduites à plusieurs niveaux au sein de la séquence oligonucléotidique à savoir au niveau du lien phosphodiester (Figure 11\_a), du sucre (Figure 11\_b), et de la base azotée (Figure 11\_c). Elles peuvent être appliquées aux désoxyribo ou aux ribonucléotides, mais nous ne ferons pas de distinction particulière entre les modifications appliquées à l'une ou l'autre famille d'acides nucléiques.



**Figure 11** : Sites des modifications possibles au sein de séquences oligonucléotidiques.



Les deux techniques présentées pour l'obtention d'oligonucléotides, par synthèse chimique ou par approche enzymatique, permettent d'obtenir des séquences oligonucléotidiques qui acceptent des substrats modifiés, notamment sur les bases et sur le sucre. En revanche, la présence d'un groupement triphosphate dans le cadre de la voie enzymatique, limite les modifications au niveau du squelette phosphodiester<sup>64</sup>.

Il est possible de distinguer deux catégories de modifications :

- les modifications stabilisantes introduites pour améliorer les propriétés intrinsèques des acides nucléiques ;
- les modifications fonctionnalisantes qui permettent de conférer de nouvelles propriétés aux acides nucléiques.

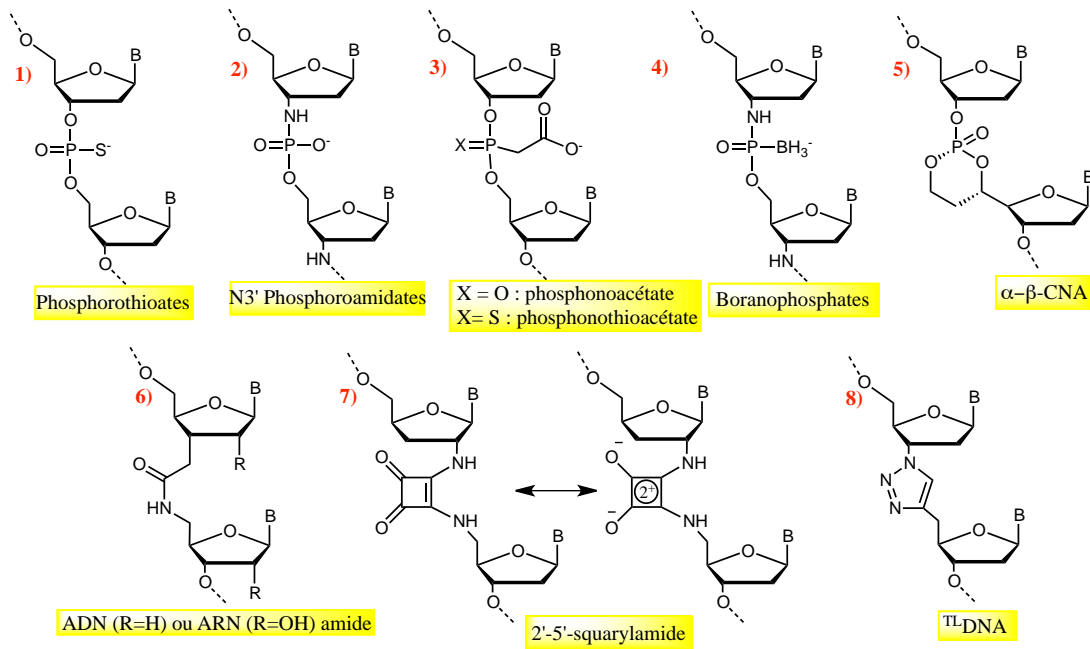
### **IV.1) Les modifications stabilisantes**

L'introduction de ces modifications a pour but d'améliorer la stabilité des structures secondaires formées comme la double hélice, ou encore permet de faire face aux problèmes de faible biodisponibilité et d'instabilité face à la dégradation des nucléases<sup>65-67</sup>.

#### ***IV.1.a) Les modifications du lien phosphodiester***

Dans le but d'améliorer la résistance envers les nucléases, les principales modifications portent sur le lien internucléotidique, site de coupure de l'oligonucléotide par hydrolyse du lien phosphodiester. Pour cela de nombreuses modifications ont été réalisées, en conservant ou pas le lien phosphodiester (Figure 12\_1-4), et en ajoutant des groupements fonctionnels, soit en substituant complètement le lien par une autre entité (Figure 12\_5-7).

## Chapitre I : Les acides nucléiques modifiés : structures et propriétés



**Figure 12 : Exemples de modification du lien phosphodiester**

Les analogues phosphorothioates<sup>68</sup>(Figure 12\_1) figurent parmi les premiers exemples de nucléotides modifiés sur le lien internucléotidique. La substitution d'un des atomes d'oxygène non impliqués dans la formation du lien phosphodiester par un atome de soufre réduit drastiquement l'effet de dégradation de la part des nucléases. L'unité N3'-phosphoramidate<sup>69</sup> (Figure 12\_2) adopte une conformation *Nord* du sucre, ce qui en fait de bons mimés d'ARN une fois introduits au sein de séquences<sup>70</sup>. Les modifications phosphonoacétates et phosphonothioacétates (Figure 12\_3) développées par l'équipe de Caruthers<sup>71</sup> sont intéressantes car l'amélioration de la stabilité *in vivo* des brins portant ces modifications est accompagnée d'une meilleure biodisponibilité de ces derniers par rapport aux non modifiés. En effet, l'absence de charge du précurseur méthyl ester neutre facilite sa pénétration cellulaire et l'action des estérases cellulaires permet le relargage de la forme anionique active au sein du noyau dans le cadre d'une approche pro-drogue<sup>71, 72</sup>. L'introduction d'un lien boranophosphate (Figure 12\_4) au sein d'un brin a montré son fort potentiel en tant que suppresseur de gène<sup>73</sup> lors d'une stratégie génique de type ARNi<sup>74</sup> (Chapitre 1.II.3). Les acides nucléiques contraints (CNA), présentent, quant à eux, un lien internucléotidique verrouillé en une conformation bien précise grâce à un cycle dioxaphosphorinane. La Figure 12\_5 décrit un exemple développé par notre équipe<sup>75</sup>, le  $\alpha,\beta$ -D-CNA portant la configuration  $R_{C5},S_P$ . L'introduction de ce cycle au sein d'une séquence induit une hyper-stabilisation des

duplex ADN : ADN avec un  $\Delta T_m/\text{mod}$  de +5 °C grâce à son caractère de mime de la conformation canonique de la double hélice ADN adoptée par le lien phosphodiester. Le remplacement total du lien phosphodiester par un lien amide (Figure 12\_6) a aussi été évalué<sup>76</sup> et a montré une excellente capacité de mime du lien internucléotidique notamment au sein de duplex de type B. Des modifications beaucoup plus ambitieuses, car s'affranchissant totalement du lien phosphodiester, comme le lien 2'-5' squaryldiamide<sup>77</sup> (Figure 12\_7) ou le triazole<sup>78</sup> dans les <sup>TL</sup>DNA (*Triazole linked DNA*) (Figure 12\_8), apportent des propriétés d'hybridation uniques aux séquences ou induisent une stabilisation importante des duplex formés une fois introduits. Pour le premier, l'existence de la forme tautomérique présente une distribution de charge similaire à celle du lien phosphodiester, et permet des appariements de type Wobble dans l'ADN avec la base thymine portant la modification qui s'apparie avec la base guanine. Et pour le deuxième l'absence de charge négative apportée par la modification triazole permet une faible répulsion électrostatique ce qui explique une stabilisation du double brin formé avec son brin complémentaire de 41 °C par rapport à l'équivalent non modifié sur une séquence d(T<sub>10</sub>).

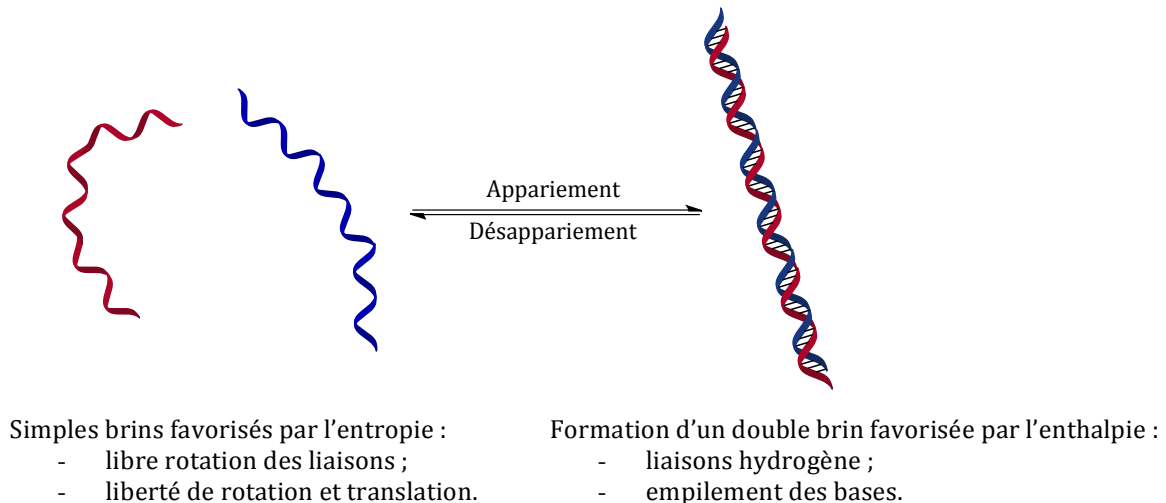
### ***IV.1.b) Les modifications du sucre***

La modulation et le contrôle de la conformation préférentielle du sucre a un impact immédiat sur la stabilité et le type de structure secondaire obtenu (double hélice A ou B par exemple). La conformation adoptée par le sucre est gouvernée par l'effet gauche et anomérique des substituants sur le cycle furanosique. La présence d'éléments structurants supplémentaires imposant une conformation bien définie se traduit par la pré-organisation du brin modifié en la structure secondaire associée.

### Concept de pré-organisation

Le concept de pré-organisation a été introduit pour la première fois par Cram<sup>79</sup> afin de décrire la relation ligand-accepteur de deux ou plusieurs molécules et/ou ions au sein d'un complexe. Les liaisons peuvent être covalentes ou non, en fonction de la nature des partenaires. D'un point de vue entropique, le processus de formation d'un complexe est défavorable en raison de la perte des degrés de liberté et de libre rotation autour de

certaines liaisons. Ce phénomène est d'autant plus accentué que les molécules d'intérêt sont flexibles. Cependant si le ligand en question est déjà pré-structuré, 'pré-organisé', en la conformation requise pour la formation du complexe, le coût entropique sera moindre. De plus, comme dans le cas des acides nucléiques, les liaisons hydrogène et le stacking des bases au sein des structures secondaires, induisent un gain enthalpique qui compense en partie la perte entropique<sup>80</sup> (Figure 13).

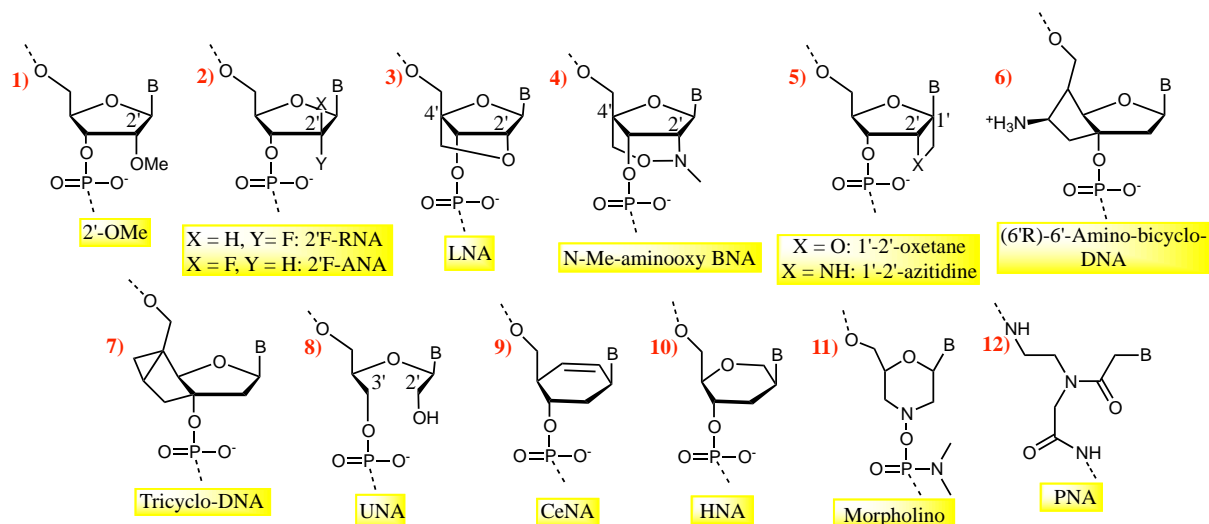


**Figure 13 : Facteurs influençant l'appariement et/ou le désappariement des brins.**

Pour cela l'introduction au sein des séquences nucléotidiques d'unités modifiées ou d'éléments qui rappellent la conformation adoptée par la structure secondaire souhaitée peut se révéler bénéfique.

Les modifications apportées au sucre (ribose ou 2'-désoxyribose) ont donc pour objectif de réduire sa flexibilité en imposant la conformation choisie Nord ou Sud (*C3'endo* ou *C2'endo*) pour le cas du duplex. Cette approche a été particulièrement utilisée en stratégie antisens par exemple (Chapitre 1\_II\_1) en imposant aux nucléotides ADN une conformation Nord. Ils deviennent ainsi de bons mimes d'ARN et peuvent alors interagir de manière plus efficace pour former un hétéroduplex ADN : ARN le plus stable possible. Dans le cas des sucres aussi, le cycle furanose peut être conservé en partie ou totalement remplacé (Figure 14).

## Chapitre I : Les acides nucléiques modifiés : structures et propriétés



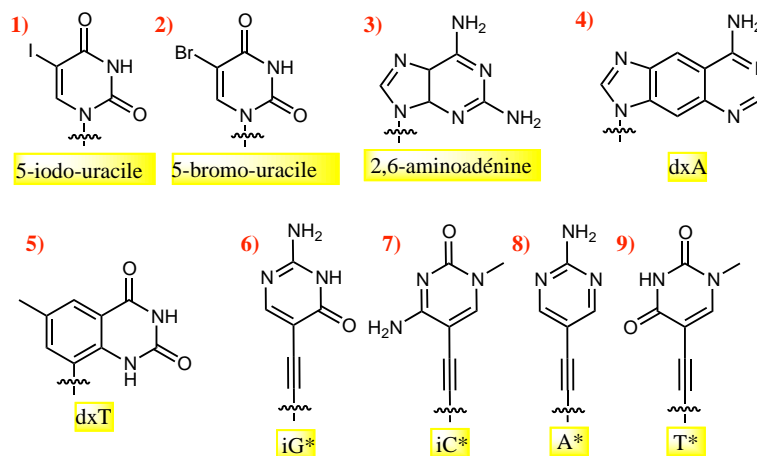
**Figure 14 :** Exemples de nucléotides modifiés au niveau du sucre.

La modification OMe en position 2' est l'une des plus utilisées (Figure 14\_1). Outre l'effet de stabilisation envers les nucléases, la présence du groupement 2'-OMe implique une conformation Nord<sup>81</sup> du sucre qui augmente l'affinité pour des brins ARN complémentaires<sup>82</sup> et fait de cet analogue un excellent candidat pour des stratégies géniques d'interférence par ARN (Chapitre 1\_II\_3). L'introduction d'un substituant électronégatif, comme un atome de fluor dans le cas du 2'F-RNA<sup>83</sup> et du 2'F-ANA<sup>84</sup> (2'F-*Arabinose Nucleic Acid*) (Figure 14\_2) fortifie les liaisons hydrogène et le stacking entre les bases et, en fonction de la position, favorise par effet gauche un des deux épimères du cycle (2'F-RNA Nord, et 2'F-ANA Sud) en stabilisant les duplex formés (+1,8 °C/mod. pour 2'F-RNA et +8 °C/base pour 2'F-ANA). Les équipes de Wengel<sup>85</sup> et Imanishi<sup>86</sup> se sont notamment intéressées à la famille des nucléosides LNA (Locked Nucleic Acids) ou BNA (Bridged Nucleic Acids) qui sont des composés bi-cycliques avec un pont reliant la position 2'-O à la position 4'-C (Figure 14\_3<sup>85</sup> et 14\_4<sup>87</sup>) ou à la position 1' (Figure 14\_5<sup>88</sup>). La présence de ce lien induit une restriction conformationnelle favorisant et stabilisant les doubles hélices (pré-organisation des brins) avec une augmentation des T<sub>m</sub> (de 4 °C à +16 °C/mod.) par rapport aux analogues non modifiés. La présence du lien amino-oxy permet *in vitro* une activité antisens accrue par rapport aux autres composés bi-cycliques. Leumann a également développé des nucléotides bicycliques<sup>89</sup> (Figure 14\_6) et tricycliques<sup>90</sup> (Figure 14\_7) visant à apporter de la rigidité aux sucres. A l'opposé, dans les unités comme les UNA (Unlocked Nucleic Acids) (Figure 13\_8<sup>91</sup>) la liaison C2'-C3' a été supprimée ce qui confère une flexibilité marquée aux brins. La

présence de ce type de modification au sein d'une séquence a montré une meilleure interaction avec les enzymes de dégradation RNase H. La conformation peut aussi être modulée en faisant varier la taille du cycle du sucre comme dans le cas des CeNA (Cyclohexene Nucleic Acids) (Figure 14\_9<sup>92</sup>) ou HNA (Hexitol Nucleic Acids) (Figure 14\_10<sup>93</sup>) qui ont un cycle à six chaînons avec ou sans oxygène inter-cyclique, et qui induisent une stabilisation cette fois-ci envers les nucléases. Dans les deux derniers exemples présentés, à la fois le sucre et le phosphodiester ont été modifiés, les unités morpholiniques<sup>94</sup> (Figure 14\_11) et les PNA (*Peptide Nucleic Acids*) (Figure 14\_12<sup>95</sup>) qui sont caractérisés par le squelette dépourvu de charge négative ce qui contribue à la stabilisation des brins. Dans le cas des PNA, dépourvus du cycle furanosique, la reconnaissance inter-brins reste possible grâce à la présence des bases azotées<sup>96</sup> ce qui permet la formation de duplex très stables.

#### IV.1.c) Les modifications des nucléobases

Dans la littérature les exemples de modifications stabilisantes des nucléobases sont moins nombreux. L'objectif principal étant d'améliorer la stabilité thermique des duplex, il est nécessaire de maintenir les liaisons hydrogène et de conserver une organisation spatiale adéquate des bases. Cela restreint le champ des possibilités de modifications qui sont donc souvent introduites simultanément sur les deux partenaires d'une paire de base impliqués dans l'appariement.



**Figure 15** : Exemples de modifications de la base azotée.

L'introduction d'un halogène sur la base uracile en position 5 tel que l'atome d'iode dans le 5-iodo-uracile (Figure 15\_1) et l'atome de brome dans le 5-bromo-uracile (Figure 15\_2) ou l'ajout d'un groupement amino sur le noyau adénine (Figure 15\_3) renforce l'appariement avec leur base complémentaire canonique<sup>97</sup>. En effet, la 2,6-aminoadénine portant un groupement donneur de liaison hydrogène supplémentaire, peut établir trois liaisons hydrogène avec la base complémentaire thymine. L'introduction des paires de bases plus volumineuses, comme le dxA (benzoadénine nucléoside) (Figure 15\_4) et le dxT (benzothymine nucléoside) (Figure 15\_5) en remplacement de l'adénine et de la thymine respectivement qui ont un cycle benzénique supplémentaire sur la base<sup>98</sup>, induit une augmentation de l'espace inter-brins lors de l'appariement. Cependant, même si la nature des liaisons hydrogène reste la même, le duplex résultant se révèle plus stable grâce à une zone de stacking plus étendue. Un système exclusivement pyrimidique a aussi été imaginé dans lequel les bases guanine et adénine sont remplacées par iG\* (pour isoguanidine) et iC\* (pour isocytosine) qui conservent leur capacité à former des liaisons hydrogène (Figure 15\_6 et 15\_7). De plus, pour chaque base modifiée, une liaison acétylène relie la base à la position 1' du sucre pour que ce dernier adopte une conformation stable avec des T<sub>m</sub> des duplex proches des équivalents non modifiés<sup>99</sup> (Figure 15\_6 à 15\_9).

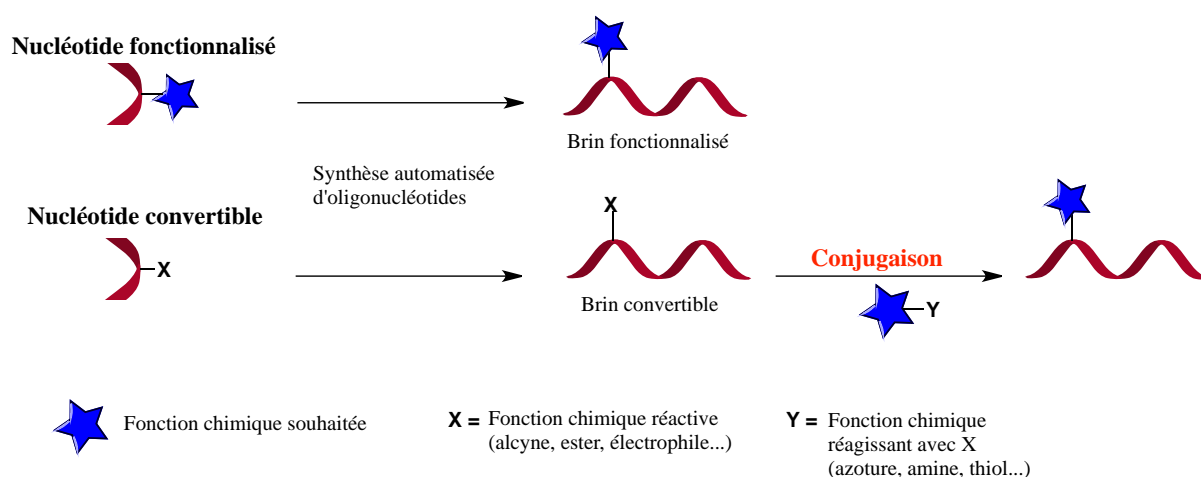
Grace à ces différents types de modifications, la stabilité des acides nucléiques synthétisés peut être améliorée et modulée en fonction de l'application souhaitée. Cependant, il n'est pas possible de définir la meilleure modification testée car cela dépend essentiellement du type d'application envisagée.

Il est également possible de conférer de nouvelles propriétés aux acides nucléiques par ajout de fonctions chimiques supplémentaires.

### IV.2) Les modifications fonctionnalisantes

Avant d'aborder cette partie, il est utile de définir la différence entre les concepts de **fonctionnalisation** et de **conjugaison**. Ces deux concepts, pas systématiquement différenciés dans la littérature peuvent se confondre. Dans ce manuscrit, ces deux concepts seront traités comme suit.

La **fonctionnalisation** a lieu lorsque une fonction chimique supplémentaire est introduite sur un oligonucléotide pendant la synthèse de ce dernier. Elle peut se faire en introduisant au sein de la séquence un nucléotide portant déjà la fonction chimique souhaitée (il s'agit dans ce cas *d'unité fonctionnalisée*), ou en introduisant un nucléotide qui porte un groupement chimique réactif (nous parlerons dans ce cas *d'unités convertibles*<sup>100, 101</sup>) qui permet l'ancrage post-synthèse sur l'oligonucléotide d'une autre entité par **conjugaison**<sup>102</sup> (Schéma 5).



**Schéma 5 : Fonctionnalisation d'acides nucléiques.**

La **conjugaison** a donc lieu sur un oligonucléotide déjà formé par création d'une liaison covalente et peut se faire en faisant réagir les extrémités libres des brins synthétisés ou par réaction chimique sur un oligonucléotide possédant un *nucléotide convertible*.

Dans tous les cas, pour une approche de fonctionnalisation ou de conjugaison, les modifications ajoutées doivent être compatibles avec la méthode de synthèse de l'oligonucléotide choisie.

Les entités portant des fonctions chimiques supplémentaires, sont particulièrement intéressantes car elles ouvrent les portes sur une multitude d'applications dans de nombreux domaines comme celui des nanotechnologies<sup>103-105</sup>, du diagnostic<sup>106</sup>, de la thérapeutique<sup>107</sup> ou de la catalyse<sup>108</sup>.

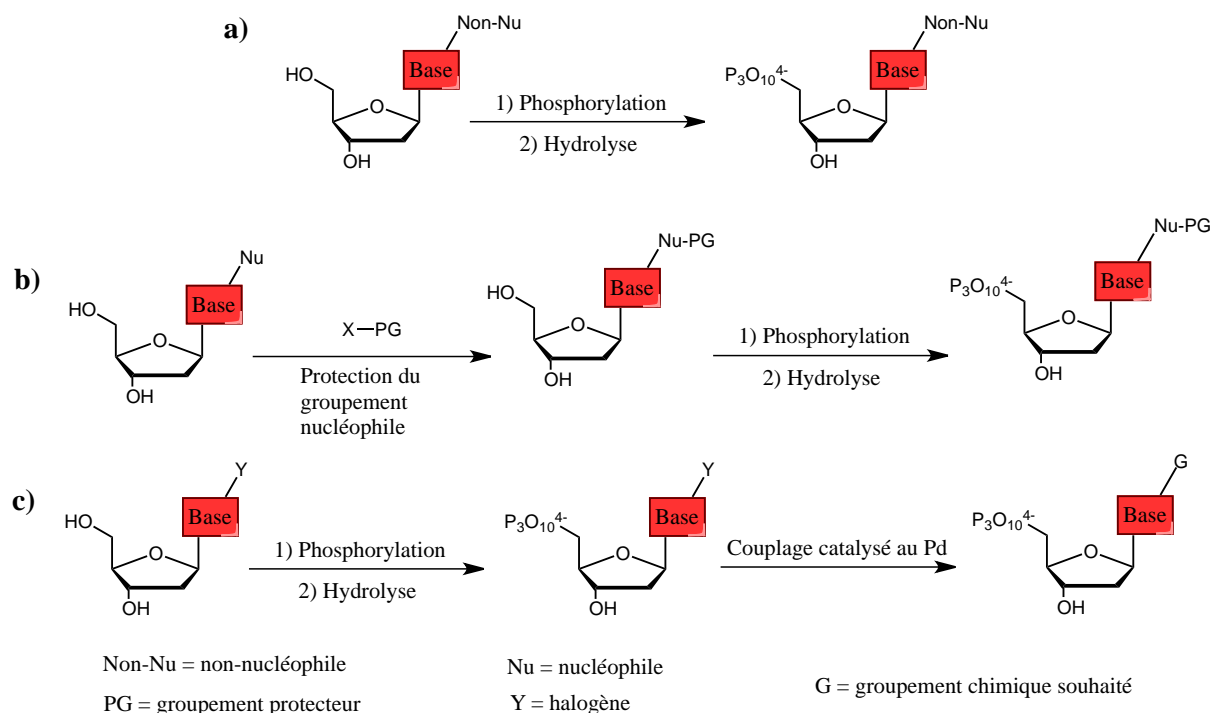
Nous présenterons les résultats de la littérature concernant les unités fonctionnalisées et les triphosphates, puis ceux concernant les unités convertibles permettant la conjugaison.



#### **IV.2.a) Les triphosphates et les phosphoramidites fonctionnalisés**

Les nucléosides triphosphates sont les substrats des polymérases permettant l'obtention de séquence oligonucléotidiques *via* les méthodes enzymatiques. Pour cette dernière il n'est pas possible d'introduire une seule modification au sein d'un brin car aucune discrimination n'est effectuée par les polymérases vis-à-vis de l'équivalent non modifié (à défaut ni le nombre de modifications incorporées, ni la position de ces dernières ne peut être contrôlée). Pour l'obtention du brin, il faut fournir à la polymérase l'unité triphosphate portant déjà la modification souhaitée et que cette dernière soit acceptée par l'enzyme. C'est pourquoi les positions modifiables sont limitées et en particulier, les fonctionnalisations sur le sucre et sur le groupement phosphodiester sont très mal tolérées par les polymérases. En revanche, l'ajout de groupements chimiques sur les bases azotées en position 5 des pyrimidines, et en position 7 des 7-déaza-purines, est très bien accepté par les enzymes. A ces positions, les modifications n'influencent pas l'appariement des bases et sont dirigées vers le grand sillon de la double hélice. Des études cristallographiques récentes<sup>109</sup> ont montré que les polymérases utilisées se structurent en formant des cavités acceptant même des nucléosides triphosphates portant des groupements très volumineux sur leurs bases. Cependant en 2008 l'équipe de Perrin<sup>110</sup> a réussi à incorporer un nucléoside triphosphate purinique modifié en position 8, la C-8-imidazole-2'-désoxyadénosine, *via* une polymérase, la *Sequenase V2.0* lors d'une campagne de recherche d'un candidat DNAzyme. Ce résultat est une première car généralement les modifications en cette position sont mal tolérées puisque la base a tendance à adopter une conformation *syn* par rapport au sucre afin de minimiser les interactions stériques défavorables<sup>111</sup> ce qui n'est pas accepté par les polymérases.

Du point de vue de la synthèse des nucléosides triphosphates, l'introduction de modifications est possible (Schéma 6\_a), même en présence de groupements hautement nucléophiles (comme par exemple des amines aliphatiques ou des guanidines) qui nécessitent d'être protégés au préalable (Schéma 6\_b).

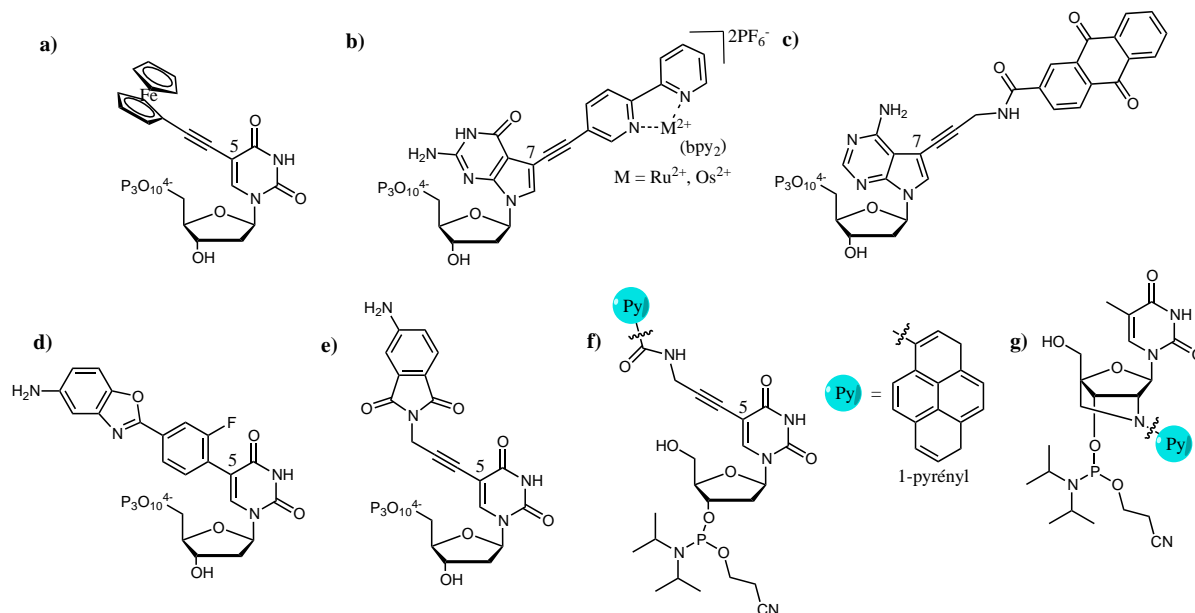


**Schéma 6 :** Approches possibles pour l'introduction de modification sur des synthons triphosphates : a) Modification non-nucléophile ; b) Modification nucléophile protégée avant phosphorylation ; c) Modification introduite par couplage pallado-catalysé.

En complément, le développement des réactions de couplage croisé pallado catalysées dans l'eau s'est révélé très utile. La phosphorylation est faite sur le nucléoside halogéné sur la position où sera introduite la modification (Schéma 6\_c). Les méthodes de couplage les plus employées sont celles de Sonogashira<sup>112</sup> et Suzuki-Miyaura<sup>113</sup>, mais des exemples récents de couplage de Heck<sup>114</sup> sur des triphosphates ont aussi été reportés.

Dans le cas d'une approche phosphoramidite, l'ajout de fonctionnalités supplémentaires est étudié de manière à être compatible avec les étapes de synthèse automatisée. Quatre étapes de réactions répétées pour chaque nucléotide introduit sont nécessaires, dont un traitement et une activation en milieu acide, une étape d'oxydation et un traitement basique final qui doivent être compatibles avec la fonction à introduire. La position de la modification et sa taille sont aussi des facteurs à prendre en compte pour ne pas perturber la synthèse automatisée, mais le choix est plus varié par rapport à l'approche enzymatique. De plus, les modifications peuvent être introduites ailleurs que sur la nucléobase.

Sont reportés ci-après quelques exemples de nucléosides fonctionnalisés acceptés par les polymérases ou compatibles avec la synthèse automatisée pour des applications des plus variées<sup>115</sup>.



**Figure 16** : Exemples de nucléosides triphosphates et de phosphoramidites fonctionnalisés.

Pour des applications bio-analytiques<sup>116, 117</sup>, des oligonucléotides couplés à des groupements redox ont été testés. Les équipes de Hocek et Fojta se sont particulièrement intéressés à ces systèmes et utilisent des nucléosides triphosphate modifiés par un ferrocène<sup>118</sup> (Figure 16\_a), des complexes métalliques à base de ruthénium ou d'osmium<sup>119</sup> greffés par couplage croisé pallado catalysé (Figure 16\_b), ou encore une antraquinone<sup>120</sup> introduite par réaction de Sonogashira (Figure 16\_c). Le marquage fluorescent d'acides nucléiques est une pratique très répandue notamment dans le domaine du séquençage<sup>112</sup> et du diagnostic. De nombreux composés dont la fluorescence est modulée en fonction de l'environnement<sup>121</sup> (pH, nature du solvant) permettent par exemple la détection d'interactions ADN-protéine<sup>122, 123</sup> ou d'erreurs de complémentarité des bases (mismatch) au sein d'une séquence<sup>124, 125</sup> (Figure 16\_d-f<sup>124, 126, 127</sup>).

Une attention particulière est à apporter au lien utilisé pour relier la modification à la base. Dans le cas des triphosphates celui-ci est souvent un lien acétylène car il contribue à en faire de bons substrats pour les polymérases et présente un avantage synthétique

en permettant entre autre de réaliser des couplages pallado catalysés de type Sonogashira.

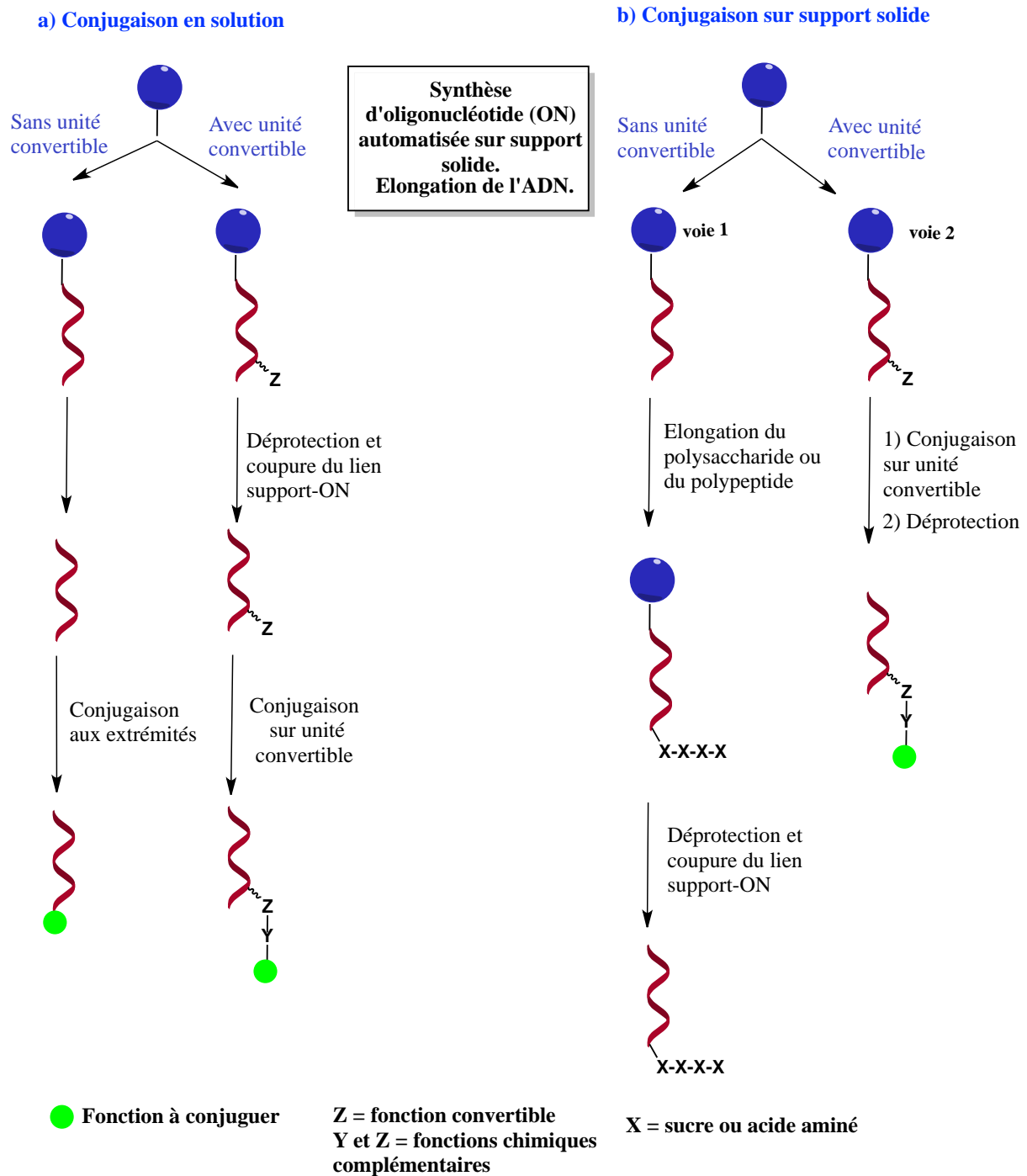
Dans le cas d'une approche phosphoramidite, les modifications peuvent aussi être introduites ailleurs que sur la base. A titre d'exemple, toujours pour des applications en diagnostic, l'équipe de Wengel<sup>128</sup> a développé des phosphoramidites portant un pyrène fluorescent en position 2' sur un composé 2' amino-LNA afin de combiner la propriété de fluorescence avec celle de stabilisation des duplex (Figure 15\_g).

Cependant certains groupements chimiques ne peuvent pas être introduits sur un nucléotide triphosphate (car non tolérés par les polymérases) ou sur un phosphoramidite (car instables face aux méthodes de synthèse supportée). Pour contourner ces problèmes, il est nécessaire d'avoir recours à des unités modifiées convertibles permettant d'introduire la modification désirée après la synthèse de la séquence. Dans ce cas théoriquement l'obtention de tout type de brin fonctionnalisé est possible par conjugaison. En utilisant des nucléotides fonctionnalisés l'approche synthétique est plutôt linéaire, nécessitant de nombreuses étapes de réaction pour obtenir le nucléotide fonctionnalisé souhaité, incorporé au sein d'un seul brin. En revanche, les nucléotides convertibles permettent une approche de synthèse plutôt divergente. A partir d'un seul brin il est possible d'obtenir plusieurs brins fonctionnalisés par conjugaison avec des entités chimiques différentes.

#### ***IV.2.b) Les unités convertibles et le concept de conjugaison***

Le processus de conjugaison<sup>102, 129</sup> permet d'améliorer les propriétés des acides nucléiques (stabilité, biodisponibilité, affinité envers la cible...) mais aussi de leur en conférer de nouvelles par greffage covalent par exemple de protéines, de sucres, d'anticorps, de lipides aux extrémités libre 5'-OH ou 3'-OH, ou au sein de la séquence d'oligonucléotides. Dans ce dernier cas, l'introduction d'une unité convertible est nécessaire par voie enzymatique ou synthétique.

La conjugaison est réalisée soit en solution, soit sur support solide et dépend essentiellement du type de résidu à greffer sur la séquence ou de l'efficacité d'une approche par rapport aux autres en termes de rendement ou de pureté (Schéma 7).

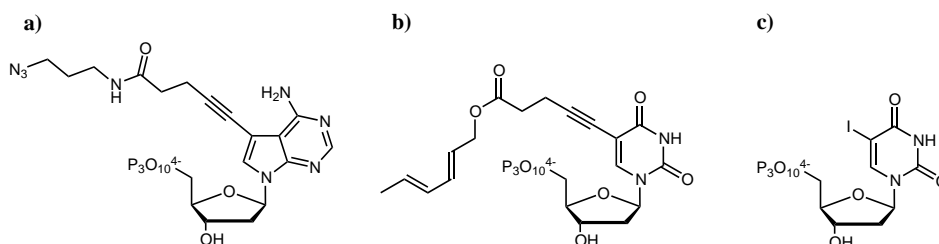


**Schéma 7 : Méthode de conjugaison en solution (a) et sur support solide (b).**

L'approche en solution prévoit la synthèse de l'oligonucléotide, le décrochage du support, une étape de purification et la conjugaison avec le groupement à greffer (Schéma 7\_a). Alternativement, en fonction de la nature du conjugué, il est possible de choisir une approche supportée (Figure 7\_b). La modification peut être un composé dont la synthèse est possible sur le support solide (comme dans le cas de polypeptides ou

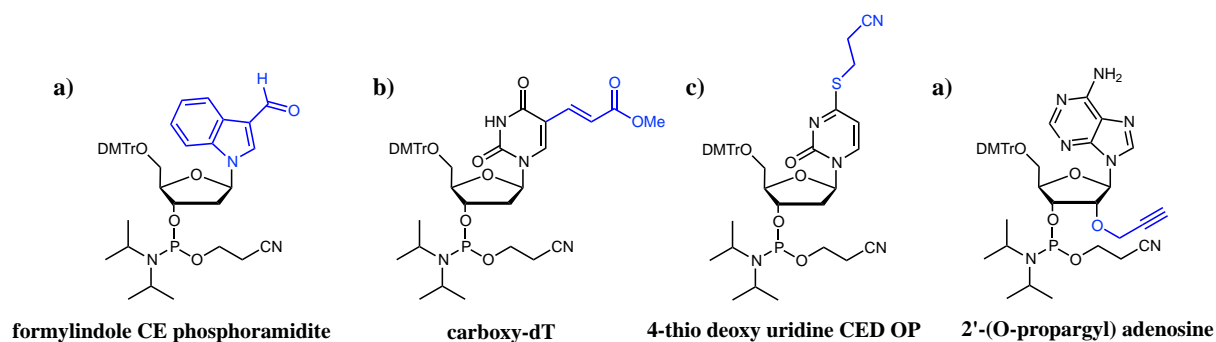
polysaccharides) et est effectuée à la suite de celle de l'oligonucléotide (Schéma 7\_b\_voie1). La modification peut aussi être greffée *via* l'ajout d'un nucléotide convertible et la conjugaison est effectuée avant l'étape de déprotection et coupure du lien support-oligonucléotide (Schéma 7\_b\_voie2).

Des nucléotides convertibles portant plusieurs types de fonction chimique ont été synthétisés<sup>129</sup> afin de former des liens de type thiourée, imine, hydrazone, oxime, disulfide qui relient le nucléotide à la fonctionnalité désirée. A la figure 17 sont représentés des exemples de nucléotides convertibles fréquemment utilisés. Une fonction azoture a été utilisée (Figure 17\_a) afin de créer des liens amide par ligation de Staudinger<sup>130</sup>. Un groupement diène (Figure 17\_b) a été introduit pour permettre des réactions de Diels-Alder<sup>131</sup>. Des bases azotées portant un atome d'halogène en position 5 sont utilisées pour des couplages catalysés type Suzuki-Miyaura par exemple<sup>132</sup> (Figure 17\_c).



**Figure 17** : Exemples de nucléotides triphosphate convertibles employés.

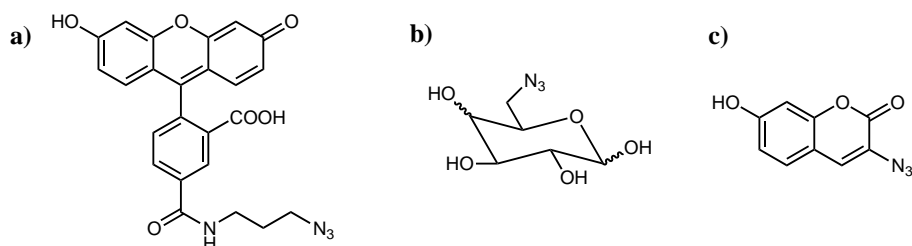
Sur ces unités convertibles il est possible de greffer tout type de conjugué *post* synthèse de l'oligonucléotide. Sont aussi disponibles des unités nucléosidiques commerciales déjà fonctionnalisées comme celles proposées par ChemGenes et Glen Research par exemple (Figure 18).



**Figure 18** : Exemples de nucléotides phosphoramidite convertibles commercialisés par Glen Research (a et b) et par ChemGenes (c et d).

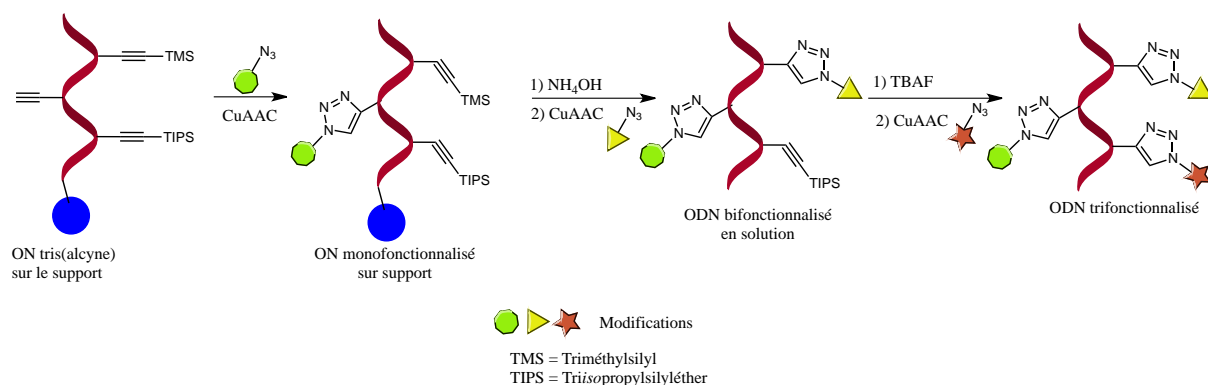
Dans ce contexte, l'esprit des réactions dites de « chimie-click » trouve largement son utilité<sup>133</sup>. La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par du Cuivre (I) (CuAAC) est ainsi une méthode de conjugaison largement utilisée<sup>134-136</sup>. Elle peut être réalisée en milieu aqueux, et cet atout majeur explique son large emploi sur des composés biologiquement actifs.

Les deux fonctions chimiques, un alcyne et un azoture, peuvent être introduites facilement au sein des oligonucléotides. Cependant la fonction azoture, si présente sur un phosphoramidite, réagit avec le P(III) de ce dernier selon une réaction de Staudinger pour donner un iminophosphorane, certes avec une vitesse de réaction qui est plus lente que le processus de couplage. Donc la fonction alcyne est généralement introduite sur les phosphoramidites et la fonction azoture sur le partenaire à conjuguer afin de s'affranchir de ces problèmes. Plusieurs revues<sup>135, 137</sup> rapportent des fonctionnalisations et conjugaisons par réaction CuAAC, pour le greffage de molécules fluorescentes comme un dérivé de la fluorescéine composé très utilisé pour des études biologiques (Figure 19\_a), de sucres, tels que le glucose ou le galactose (Figure 19\_b) qui sont des aldéhydes masqués pour réaliser des essais colorimétrique à l'argent, ou encore des fluorophores masqués, comme la coumarine dont la florescence se révèle seulement si elle est conjuguée *via* un triazole<sup>138</sup> (Figure 19\_c).



**Figure 19 :** Dérivés portant une fonction azoture pour effectuer une conjugaison *via* CuAAC : a) de la fluorescéine ; b) du glucose et du galactose ; c) de la coumarine.

Le caractère modulable et biocompatible de ce processus de cycloaddition CuAAC a permis d'avoir accès à des systèmes plus complexes. Le concept « click-click-click » développé par l'équipe de Carell<sup>139</sup> permet, par exemple, une triple conjugaison par trois azotures différents grâce à l'utilisation de groupements protecteurs silylés sur les fonctions alcynes qui sont éliminés séquentiellement et autorise trois CuAAC avec des partenaires différents en contrôlant le site d'introduction de chacun (Schéma 8).

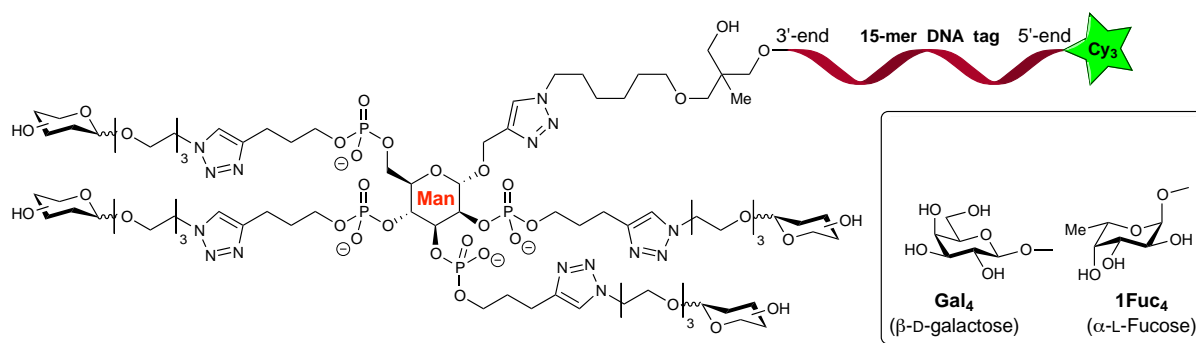


**Schéma 8 :** Concept « click-click-click » pour une triple fonctionnalisation d'oligonucléotides avec différents azotures.

Des macrosystèmes beaucoup plus complexes ont aussi été développés, comme celui des glyco-puces étudiées par l'équipe de Morvan et Vasseur<sup>140, 141</sup> pour la reconnaissance de lectines, Lec-A (spécifique du D-galactose) et Lec-B (spécifique du L-fucose), impliquées dans la virulence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Le macrosystème est bâti sur un support solide permettant à la fois la synthèse d'un brin oligonucléotidique, et, grâce à la présence d'une fonction azoture, la conjugaison par réaction de CuAAC d'une plateforme hexose sur laquelle sont greffés des bras alcynes. Sur ces derniers, toujours par CuAAC, sont ensuite introduits des sucres reconnus par les lectines (Figure 20). L'élongation du simple brin d'ADN a été faite de manière à être



complémentaire au brin présent sur la biopuce permettant l'ancrage et la structuration du système dans sa globalité.



**Figure 20** : Plateforme pour la reconnaissance des lectines lec-A et lec-B.

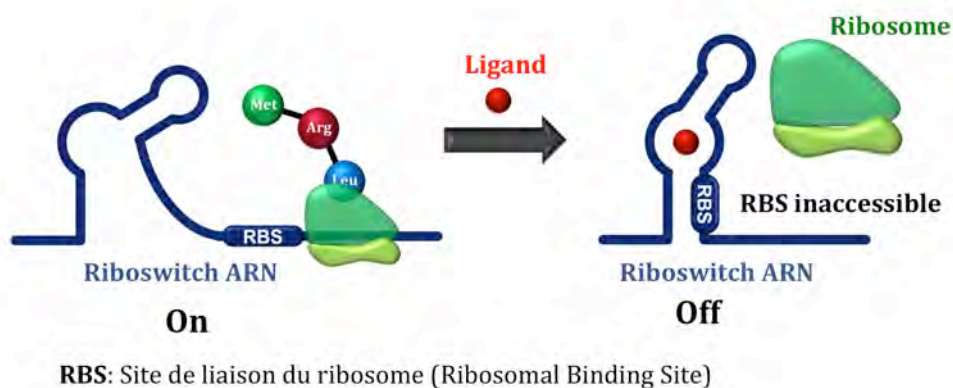
Ces exemples illustrent la polyvalence des acides nucléiques et l'ample panel d'applications potentielles. Tout cela peut être additionné aux propriétés intrinsèques des acides nucléiques. Au delà de leur rôle *in vivo* de stockage de l'information génétique, la découverte de leurs propriétés de reconnaissance et de catalyse fait place à des applications supplémentaires.

La découverte des ribozymes<sup>142</sup> (issu de la contraction de **ribo**nucléique et **enzyme**) ou DNAzymes<sup>143</sup> (de **ADN** et **enzyme**), composés ayant des propriétés catalytiques grâce à leur capacité de repliement en de complexes structures secondaires, est un domaine de recherche grandissant pour les chimistes. Cependant la faible variabilité structurelle des acides nucléiques, limite leur réactivité. En étoffant les fonctions chimiques au sein de séquences d'acides nucléiques, par exemple par le greffage de fonctions rappelant les chaînes latérales des acides aminés naturels, il a été possible d'identifier des DNAzymes et ribozymes avec de nouvelles propriétés. Cette partie, avec les exemples tirés de la littérature, sera développée et détaillée par la suite.

### V) Les propriétés des acides nucléiques

Les ribosomes ont été découverts dans les années 50 et leur mécanisme d'action *in vivo* démontré dans les années 2000 grâce aux travaux de Ramakrishnan, Yonath et Steitz, récompensés par le prix Nobel de chimie en 2009. Il s'agit d'un complexe ARN-

protéines qui assure la synthèse des polypeptides *in vivo*. L'étude du mécanisme de formation des liaisons peptidiques, par le biais d'études fonctionnelles et structurales, a permis de mettre en évidence la propriété de catalyse des ARN. En parallèle, des études sur la ribonuclease P (RNase P), enzyme responsable du processus de maturation des ARNt, ont montré que l'activité catalytique du ribosome est due à la partie nucléique et non protéique<sup>144</sup> alors que jusqu'à présent cette caractéristique *in vivo* n'était réservée qu'aux protéines. Cette propriété catalytique des ribozymes, additionnée à celle des acides nucléiques de porter l'information génétique, est à la base d'une des théories sur les origines de la vie « The RNA world » ou « monde ARN »<sup>145</sup>. Les riboswitches<sup>146, 147</sup> (Schéma 9), composés identifiés *in vivo* dans les régions non-codantes des ARNm, sont des séquences ribonucléiques dont la traduction du gène est régulée par la reconnaissance d'un substrat selon un mécanisme qui dépend de la nature du riboswitch en question. En absence de substrat la conformation de l'ARNm est telle qu'elle permet au ribosome de s'y lier et de traduire son message codé (On). La présence du ligand induit au contraire une restructuration tridimensionnelle du brin qui rend le site de liaison du ribosome RBS inaccessible empêchant la liaison du ribosome et donc la synthèse de la protéine (Off). Le ligand en question peut être une petite molécule organique en lien avec la protéine issue du gène contrôlé, ou la protéine, *via* un produit issu d'elle même, qui autorégule le riboswitch.



**Schéma 9 :** Exemple de rétrocontrôle négatif par un riboswitch.

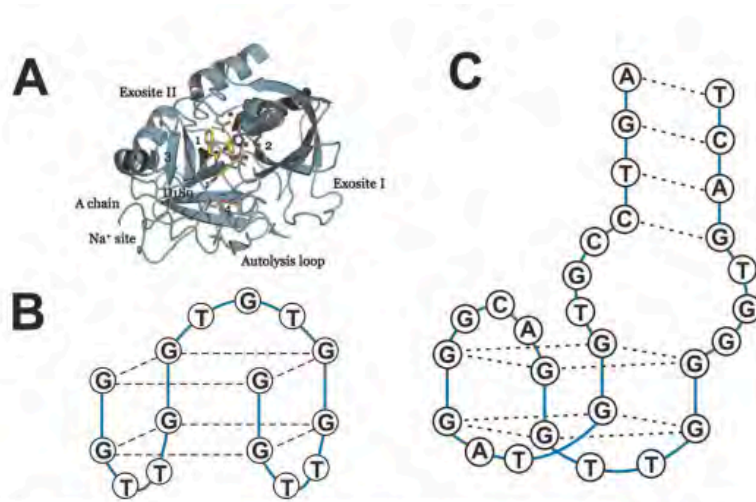
Les caractéristiques de ces composés mettent l'accent sur deux importantes propriétés des acides nucléiques, la reconnaissance et la catalyse.

## V.1) La propriété de reconnaissance

### V.1.a) Le concept d'aptamère

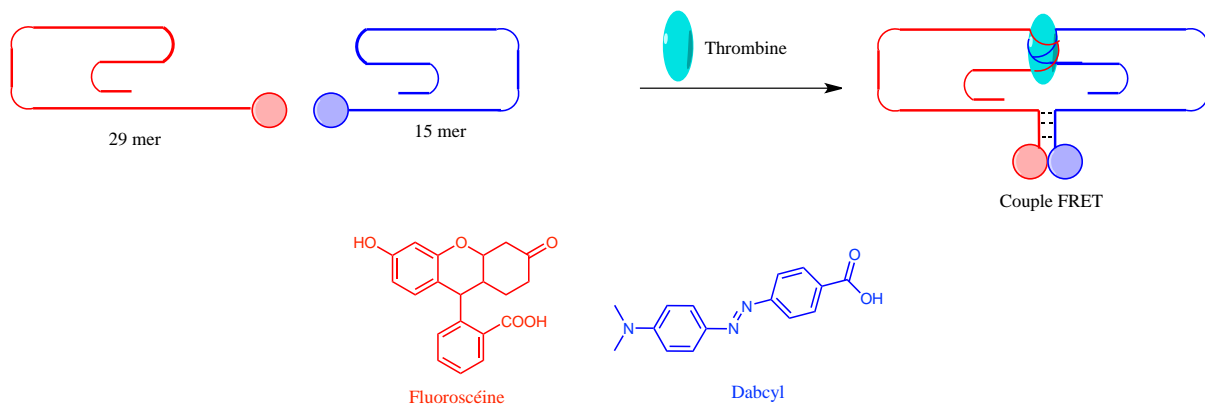
Les aptamères<sup>63, 148</sup> sont des séquences d'acides nucléiques ADN ou ARN simple brin possédant des propriétés de reconnaissance comparables à celle des anticorps monoclonaux en termes de constante d'affinité pour une cible donnée (nM-pM). La cible peut être un ion métallique, une molécule organique, même une protéine, voire une cellule et la reconnaissance se fait grâce au repliement des séquences qui porte à la formation de poches ou de fentes (bulges, G-quadruplex, épingles à cheveux etc...) pouvant accueillir la cible. Ils représentent donc une alternative valable aux anticorps, moins stables et plus difficiles à produire, en tant qu'outils issus de biotechnologies pour la recherche, le diagnostic et la thérapie. Cependant des limitations existent car à ce jour des aptamères n'ont pas pu être sélectionnés pour toutes les protéines. Toutefois dans le domaine du « protéomique », l'avancée des aptamères représente un outil de haute valeur ajoutée.

Leur excellente stabilité et leur capacité de structuration réversible font des aptamères des outils intéressants pour la constitution de tests d'affinité par exemple. Depuis les premiers rapportés par les équipes de Gold<sup>149</sup> et Ellington<sup>150</sup>, de nombreux aptamères ont été décrits, dont ceux de la thrombine, aptamères ADN qui figurent parmi les plus étudiés<sup>151</sup>. La thrombine, une protéase à sérine, joue un rôle physiologique crucial dans le contrôle de la coagulation du sang. Les deux aptamères à thrombine les plus étudiés et utilisés sont représentés Figure 21.



**Figure 21 :** A) Thrombine ; B) aptamère thrombine 15mer ; C) aptamère thrombine 29mer.

Ces deux oligonucléotides courts (15 et 29 bases) sont faciles à synthétiser, se structurent sous forme de G-quadruplex et se lient à la thrombine sur deux sites distincts et donc peuvent être utilisés simultanément. Ainsi un test a été développé par l'équipe de Heyduk<sup>152</sup> qui utilise les deux aptamères pour permettre un couplage FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) (Schéma 10).



**Schéma 10 :** Test aptamère FRET de Heyduk.

L'aptamère 29-mer est marqué avec la fluorescéine (donneur de fluorescence) et l'aptamère 15-mer avec le dabcyll (accepteur de fluorescence). En présence de thrombine, les deux aptamères reconnaissent et se lient à leur cible. Cela induit un rapprochement spatial des deux fluorophores qui permet le transfert d'énergie de fluorescence dont le signal est dosé afin d'évaluer la capacité de reconnaissance de la protéine par les deux aptamères.

L'avantage de l'utilisation d'aptamères ADN par rapport à des aptamères ARN est que les premiers sont chimiquement plus stables que les seconds. Cependant à cause de l'absence de l'hydroxyle en 2' ils génèrent des repliements moins aptes à la reconnaissance de substrats. Ce désavantage peut être contourné par l'ajout de fonctions chimiques supplémentaires au sein des séquences.

Une catégorie particulière d'aptamères ADN a été développée par l'équipe de L. Gold<sup>153, 154</sup>. Les SOMAmers (pour **S**low **O**ff-rate **M**odified **A**ptamer) sont des aptamères portant des nucléotides 2'-désoxyuridine modifiés en position 5 de la base uracile. L'ajout de fonctions chimiques qui apportent un caractère hydrophobe supplémentaire comme un benzyle, un 2-naphtyle ou un 3-indolyl-carboxamide entraîne une affinité accrue pour une protéine donnée et une vitesse de dissociation beaucoup plus lente par rapport aux aptamères naturels<sup>155</sup>.

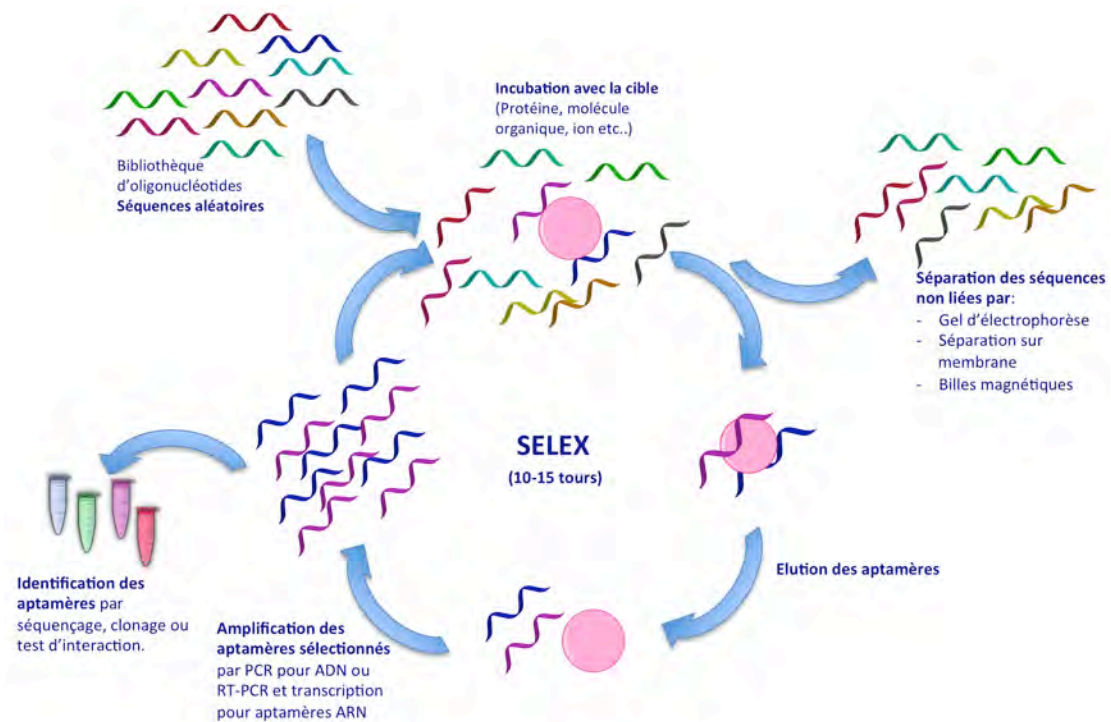
Les aptamères, sont identifiés *in vitro* par une méthode de sélection nommée SELEX pour **S**ystematic **E**volution of **L**igands by **E**xponential enrichment.

### **V.1.b) La méthode SELEX**

Il s'agit d'une méthode<sup>149, 150</sup> de sélection basée sur trois mécanismes habituellement attribués au processus d'évolution : la variation (en termes de variabilité des séquences prises en compte), la sélection et la réplication. Elle est employée pour la recherche de séquences d'ADN ou ARN capables de reconnaître une cible donnée ou de catalyser une réaction choisie.

Le processus (Schéma 11) commence par la création d'une vaste bibliothèque de séquences d'oligonucléotides<sup>106</sup> (pool  $\approx 10^{14}$  /  $10^{15}$  séquences) portant à leurs extrémités deux amorces (nécessaires pour l'étape d'amplification par PCR), et une zone centrale aléatoire (de 20 à 40 unités). Pour des raisons de coût et de facilité de synthèse, le pool de départ est généralement constitué de simples brins d'ADN (*ssADN* pour *single strand ADN*) obtenus par synthèse automatisée supportée. Néanmoins, le processus de sélection peut être aussi réalisé sur des ARN issus de banques ARN ou en ajoutant une étape de transcription des ADN en ARN simple brin (*ssARN*) par une enzyme polymérase ARN. Sur ce pool a lieu la sélection en identifiant et séparant les séquences

montrant une affinité pour la cible choisie. Les séquences retenues sont amplifiées par PCR afin d'en obtenir plusieurs copies qui sont à nouveau soumises à un tour de sélection dans des conditions de plus en plus strictes jusqu'à isoler la séquence présentant la plus forte affinité pour la cible<sup>156</sup> (en moyenne 15 tours de sélection sont effectués, mais cela peut être plus important).



**Schéma 11** : Processus SELEX

Un avantage notable de cette méthode est que les séquences utilisées et sélectionnées peuvent être naturelles ou modifiées en fonction de la réactivité désirée, à condition, qu'elles soient reconnues par les polymérases ADN pour ne pas perturber l'étape d'amplification par PCR. L'introduction de modifications permet d'aboutir à des ligands avec de nouvelles propriétés de reconnaissance<sup>157, 158</sup> (les SOMAmers en étant un exemple) et peuvent aussi servir de point d'ancrage pour l'introduction de modifications ultérieures par conjugaison.

## V.2) La propriété de catalyse

L'ADN peut être utilisé pour des applications catalytiques par le biais de formations d'hybrides ADN-complexes métalliques où la double hélice d'ADN transfère son

caractère chiral induisant un stéréocontrôle de la réaction énantiosélective. Les travaux de Feringa et Roefles<sup>159-162</sup> reposent notamment sur ce type d'utilisation. Mis à part leur rôle d'inducteurs de chiralité, les acides nucléiques possèdent eux même une capacité intrinsèque à catalyser des réactions chimiques.

L'évidente différence structurelle entre une enzyme et un ribozyme explique que la capacité à catalyser une réaction chimique de ces derniers ne soit pas aussi efficace que celle des enzymes. L'activité catalytique des ARN est due à la présence de la fonction OH en position 2' (absente chez l'ADN) et surtout à leur structure simple brin qui confère la capacité de repliement permettant d'accueillir les substrats et des cofacteurs éventuels (ions métalliques, molécules organiques etc...)<sup>163</sup>.

Outre l'intérêt porté aux ribozymes naturels la recherche d'autres réactions catalysées par des séquences d'acides nucléiques ont donné lieu à d'intenses recherches. Une réadaptation du processus SELEX, sélectionnant cette fois-ci des séquences capables de réaliser une réaction (coupure, ligation etc...) sur une cible, avec initialement seuls des oligonucléotides comme substrats<sup>164</sup> a permis la sélection *in vitro* de nouveaux ribozymes artificiels. Cette approche permet, tout comme pour les aptamères, d'utiliser des bibliothèques de séquences aléatoires naturelles ou modifiées<sup>165</sup>. C'est ainsi que la liste de ribozymes connus avec des propriétés de catalyse variées s'est amplement étoffée<sup>166</sup>. Ainsi des séquences d'ARN modifiées sur les bases U par un groupement pyridyl-méthyl-carboxamide ont montré leur capacité à catalyser la réaction de Diels-Alder<sup>167</sup>. Une séquence d'ARN modifiée par un phosphorothioate portant un résidu phénylalanine est capable de mimer la peptidyltransférase des ribosomes pour la formation de liens peptidiques<sup>168</sup>.

L'utilisation des ribozymes *in vivo* à des fins thérapeutiques a été une des premières applications envisagées. Elle est tout de même limitée à cause de l'instabilité chimique des ribozymes, de leur faible résistance face aux nucléases cellulaires et de leur faible pénétration cellulaire. De plus, pour une catalyse efficace, certains RNAzymes nécessitent des concentrations en métaux trop élevées pour une application *in vivo*. Afin d'améliorer leur stabilité, des essais ont été faits en utilisant des ribozymes portant des modifications en position 2' <sup>169</sup>. Avec une résistance accrue aux nucléases, une baisse de la capacité catalytique a été observée révélant la difficulté de trouver le juste équilibre entre activité et stabilité.

Grâce aux travaux de Joyce et Breaker<sup>170</sup>, le concept de catalyseurs à base d'acides nucléiques s'est répandu aux séquences de type ADN par la découverte en 1994 du premier DNAzyme capable de couper une séquence d'ARN au niveau du lien phosphodiester. *In vivo* l'ADN se trouve principalement sous sa forme la plus stable de double hélice appariée, expliquant pourquoi à ce jour aucun DNAzyme naturel n'est été identifié. Grâce à une sélection *in vitro* les ADN ont montré une excellente capacité de liaison à des cibles choisies (aptamères) tout comme une excellente capacité de catalyse. L'utilisation des DNAzymes plutôt que des ribozymes pour des applications *in vivo* résoudrait le problème de l'instabilité chimique envers les nucléases. Cependant la plupart des DNAzymes identifiés sont également dépendants d'ions métalliques divalents tels que  $[Mg^{2+}]$ <sup>171, 172</sup>,  $[Cu^{2+}]$ <sup>173</sup> ou  $[Zn^{2+}]$ <sup>174</sup>, ou d'autres cofacteurs comme la L-histidine<sup>175</sup> pour effectuer la catalyse souhaitée. Des travaux ont été réalisés en absence de ces ions, et la catalyse observée était beaucoup plus lente qu'en présence des cofacteurs métalliques. Des résultats importants en ce sens ont été obtenus en 1997 par les équipes de Famulok<sup>176</sup> et Sen<sup>177</sup> qui ont identifié des séquences DNAzymes dont la capacité d'hydrolyse ne dépend pas de la présence d'ions métalliques divalents même si ces derniers sont nécessaires pour la structuration du brin. Dans ces cas la réactivité résulte d'une augmentation de la concentration effective<sup>178</sup>, par des effets d'orientation<sup>179</sup> des substrats, de la catalyse acido/basique<sup>180</sup>, de la stabilisation de la charge ou de la forme de l'état de transition de la réaction<sup>181</sup>.

Ces dernières années, des avancements ont été réalisés afin d'améliorer la réactivité des acides nucléiques ribozymes ou DNAzymes et d'étoffer le catalogue de réactions pouvant être catalysées en particulier sur des substrats autres que les acides nucléiques. L'accélération de l'hydrolyse de phosphosérine<sup>182</sup>, dont le temps de demi-vie passe de environ  $10^{10}$  à une heure, la phosphorylation en position 3' de l'ADN<sup>183</sup> qu'aucune enzyme ne peut catalyser, sont des exemples de défis accomplis par les ribozymes ou DNAzymes. L'équipe de Perrin a été une des premières à obtenir par voie enzymatique un DNAzyme portant trois nucléotides modifiés avec une fonction amine et une guanidine cationiques ainsi qu'un groupement imidazole capable de se couper lui-même<sup>184</sup>.



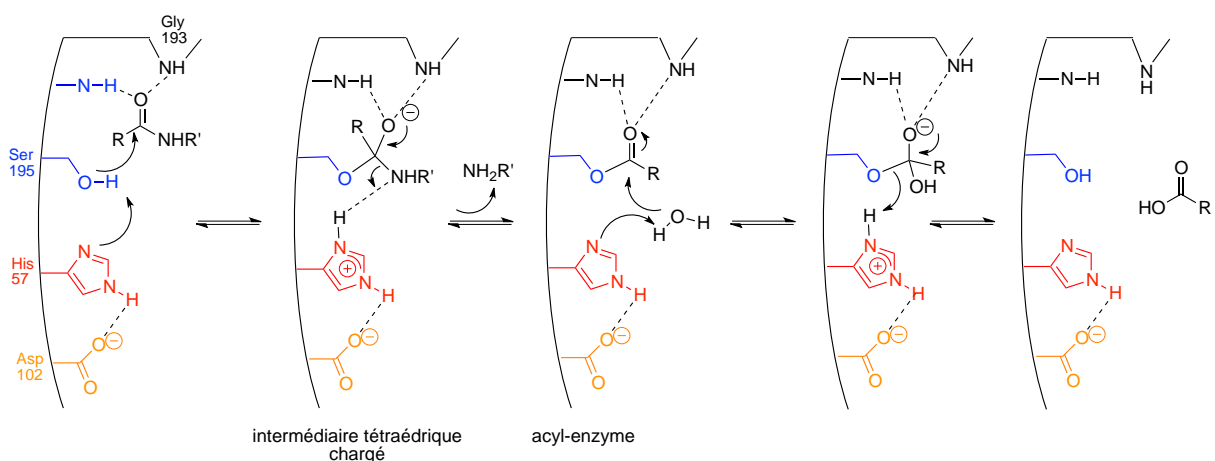
Dés 1998, Joyce entamait la réflexion :

« *Just think what RNA could do if it possessed an imidazole side chain like histidine, a carboxy group like glutamic acid or a sulfhydryl group like cysteine//...// if RNA is to be pitied for its lack of chemical functionality, then what are we to say about DNA?* »<sup>185</sup>.

### V.3) Vers une activité similaire à celle des protéases à sérine ?

*In vivo* les enzymes actives sur les protéines, capables de coupure protéolytique, sont appelées les protéases ou peptidases. Il s'agit d'une famille qui regroupe plusieurs types d'enzymes, comme les lipases, les protéases acides, les protéases à cystéine, les protéases à sérine, les métalloprotéases, qui ont pour rôle de dégrader les protéines en coupant au niveau du lien amide. Ces enzymes se différencient par les acides aminés qui coopèrent au sein de leur site actif, et par le type de protéine qu'elles sont capables de couper. Par exemple les protéases acides sont actives à pH acide et le site actif présente au moins un acide aspartique, ou encore, les protéases à cystéines ont pour nucléophile le groupement thiol de la cystéine présente.

Au sein du site actif des protéases à sérine sont présentes les chaînes latérales de trois acides aminés impliqués, à savoir l'histidine (His), la sérine (Ser) et l'acide aspartique (Asp), qui, par un mécanisme coopératif, effectuent l'hydrolyse des liens peptidiques par le biais d'une catalyse covalente<sup>186, 187</sup> (Schéma 12).



**Schéma 12 : Mécanisme proposé de la catalyse de l'hydrolyse de la liaison peptidique par une protéase à sérine, l'α-chymotrypsine.**

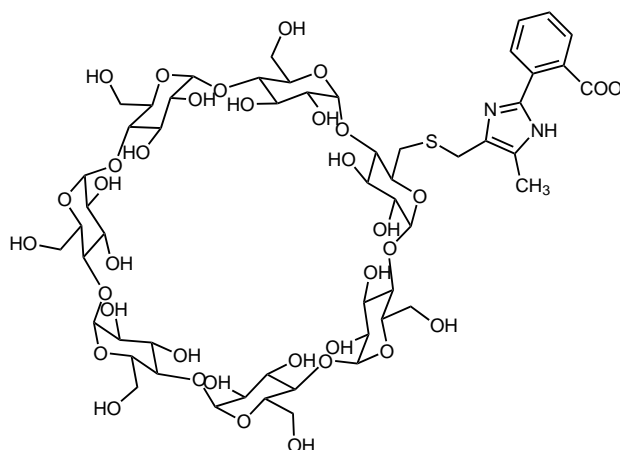
La sérine 195 de l' $\alpha$ -chymotrypsine, dont le pouvoir nucléophile de sa fonction alcool est augmenté grâce à l'histidine 57 qui agit en tant que base générale, attaque le groupement carbonyle du lien amide du peptide pour former un intermédiaire tétraédrique oxyanionique. La charge positive sur l'histidine 57 est stabilisée par l'aspartate 102 *via* la formation d'une liaison hydrogène. L'oxyanion formé, assisté par l'histidine 57 protonée, conduit à une enzyme acylée par la libération de l'extrémité *N*-terminale devenue un bon groupe partant par un processus de catalyse acide générale. L'hydrolyse de l'ester ainsi formé permet enfin la régénération de l'enzyme en passant par un deuxième intermédiaire tétraédrique. Ce mécanisme d'hydrolyse enzymatique passe par la formation de deux intermédiaires covalents afin d'abaisser l'énergie d'activation globale du processus.

La recherche de composés capables de mimer le comportement catalytique des enzymes est un domaine qui a largement inspiré les chimistes du fait de leur remarquable efficacité<sup>188</sup>. Des résultats positifs ont été obtenus en utilisant plusieurs types de structures comme des molécules organiques telles que des peptides, des composés amphiphiles, des complexes métalliques fonctionnalisés avec les groupements chimiques généralement présents au sein des sites actifs de l'enzyme visée (tel qu'une fonction amine, imine, guanidine, ou imidazole etc...). Des composés capables de mimer les glycosydases<sup>189</sup>, les phosphodiesterases<sup>190</sup> par exemple ont été ainsi identifiés. Concernant la recherche de mimes des protéases à sérine, de nombreuses équipes ont tenté de trouver des analogues synthétiques capables de réaliser la même réaction de catalyse. Néanmoins, à ce jour, dans la littérature, les exemples de composés mimes des protéases sont très peu nombreux du fait de la difficulté d'hydrolyse du lien amide. D'un point de vue chimique cette liaison a une demi vie estimée entre 350 et 600 ans à pH neutre et à température ambiante<sup>191</sup> et est stabilisée par résonance. De plus l'eau est un mauvais nucléophile pour ce type de composé. Des activités d'estérase et d'acylation de substrats organiques en utilisant des acides nucléiques modifiés<sup>192</sup>, ou des macromolécules<sup>193</sup> ont été reproduites.

### V.3.a) Les mimes non nucléiques

Afin d'identifier un mime de protéase, il est nécessaire d'obtenir un système organisé ayant une disposition optimale des résidus nécessaires à la catalyse<sup>194, 195</sup>. De ce fait l'utilisation de peptides afin de recréer une activité enzymatique paraît évidente<sup>196, 197</sup>. En 1993, Atassi et Manshoury<sup>198</sup> ont publié la découverte de « pepzymes », composés peptidiques ayant la capacité d'hydrolyser des liens esters et des liens amides à des vitesses comparables à celle de la  $\alpha$ -chymotrypsine. Cependant ces résultats ont été contestés par la suite par deux équipes de manière indépendante<sup>199, 200</sup> car non reproductibles.

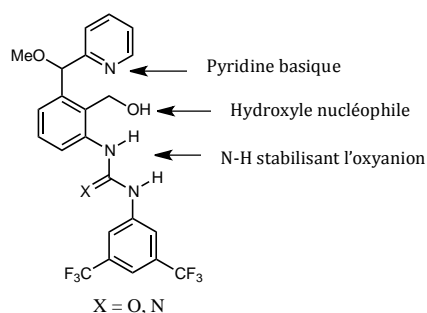
Les cyclodextrines (Figure 22), composés glycosidiques cycliques se sont révélées de bons candidats mimes des enzymes<sup>201, 202</sup>. Le cœur hydrophobe permet d'accueillir et reconnaître le substrat et les hydroxyles externes peuvent aider la catalyse qui est possible grâce à l'ajout de groupements chimiques réactifs. Les cyclodextrines se sont montrées actives avec ou sans modifications pour des réactions d'hydrolyse d'ester par exemple<sup>196</sup>.



**Figure 22** : Exemple de  $\beta$ -cyclodextrine mime de la chymotrypsine<sup>203</sup> ayant montré une activité hydrolytique sur le *m-t*-butylphénylacétate à pH 10,7 avec une  $K_{cat} = 1,1 \cdot 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$  et un  $K_m = 13,3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ .

En s'inspirant de l'analyse de l'état de transition oxyanionique du processus de catalyse des protéases, et de l'importance du réseau de liaison hydrogène crée pour le stabiliser<sup>204</sup>, l'équipe japonaise dirigée par Ema<sup>193</sup> a développé une molécule organique

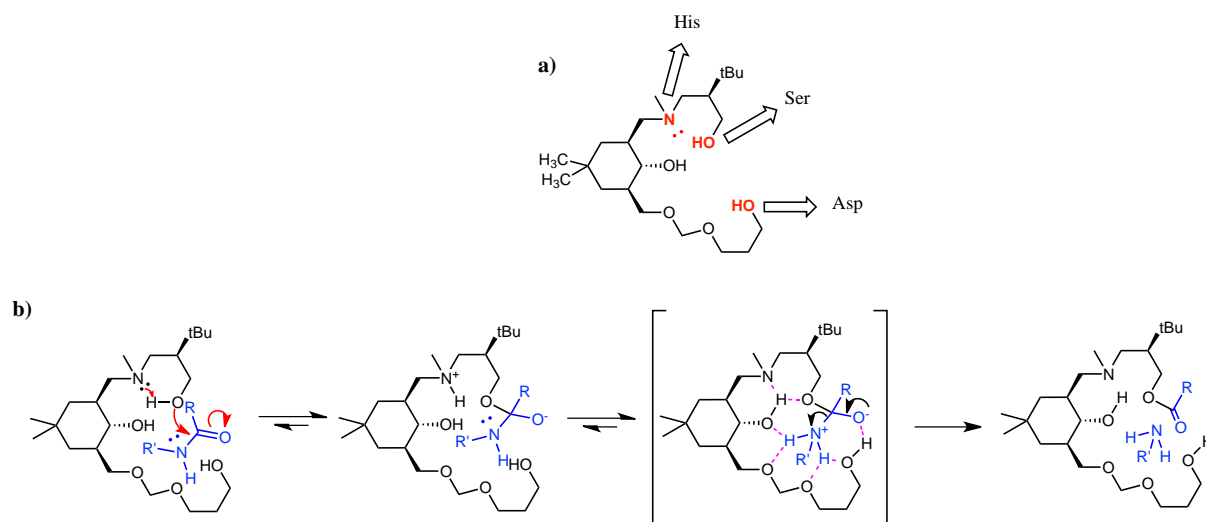
capable de mimer les lipases, c'est à dire capable d'acétyler une fonction alcool grâce à la présence des trois groupements nécessaires à son activité(Figure 23).



**Figure 23** : Organocatalyseur biomimétique de réaction de transfert d'acyle.

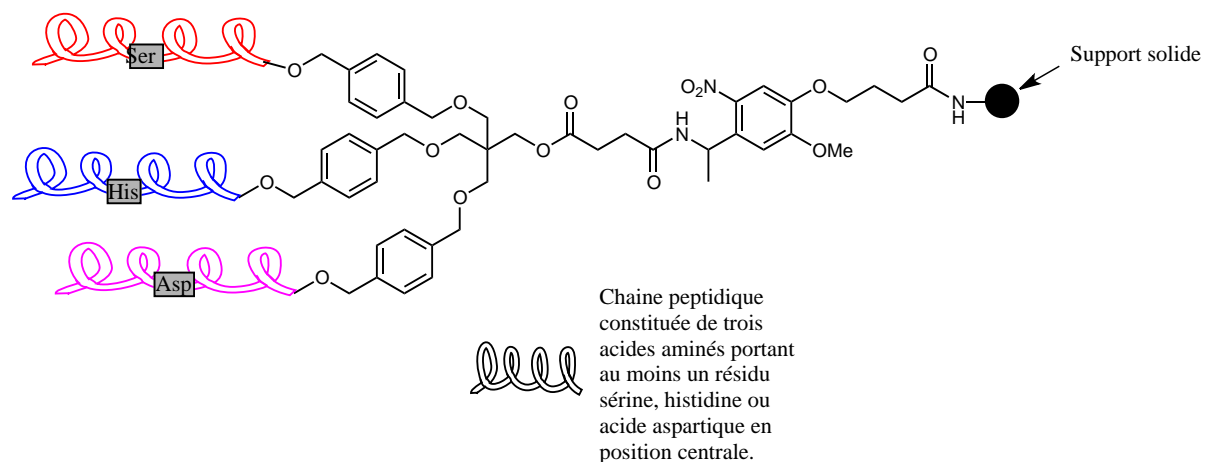
La réactivité est due à la présence d'un hydroxyle rendu nucléophile par une pyridine basique, et de deux hydrogènes d'une urée ou d'une guanidine capables de stabiliser l'oxyanion. Les études ont montré un mécanisme coopératif de ces trois fonctions chimiques, avec une vitesse de la réaction de transestérification du trifluoroacétate de vinyle  $3,7 \cdot 10^6$  fois plus grande que celle du processus non catalysé.

En 1998<sup>205</sup> l'équipe de Madder a effectué l'évaluation d'une série de composés. Un des meilleurs candidats synthétisés représenté au Schéma 13\_a, est un composé flexible mais préorganisé dont le squelette de base porte les trois fonctions visant à mimer l'action des chaînes latérales des protéases (une fonction alcool primaire pour la serine, une azote tertiaire basique pour l'histidine et l'hydroxyle primaire pour mimer la fonction acide carboxylique pour l'aspartate).



**Schéma 13 :** a) Composé aminotriol synthétisé par l'équipe de Madder; b) Mécanisme d'hydrolyse de la liaison peptidique par le composé aminotriol.

Les études mécanistiques ont montré la capacité d'hydrolyse de ces composés selon un mécanisme très similaire à celui de la triade des protéases (Schéma 13\_b). En effet il prévoit l'attaque nucléophile de l'hydroxyle (rendu plus nucléophile par la présence de l'azote tertiaire) sur le carbonyl de l'amide permettant d'aboutir à un intermédiaire covalent qui ensuite permet d'éliminer l'amine. Tout de même, l'activité catalytique reste moins importante par rapport à celle des enzymes naturelles avec une demi-vie de 112 heures sur le substrat *p*-nitro-2,2,2-trifluoroacétanilide. La même équipe a aussi envisagé l'utilisation de peptides courts. Sur un cœur tripodal flexible, ont été introduites trois chaînes peptidiques portant chacune un acide aminé de la triade catalytique, reliées par un squelette<sup>206</sup> (Figure 24).



**Figure 24 :** Structure générale des composés tripodaux synthétisés par l'équipe de Madder<sup>206</sup>.

Un des avantages de l'utilisation de composés peptidiques est la possibilité de la mise en place d'une approche de chimie combinatoire pour la synthèse de ces systèmes *via* des synthèses divergentes permettant d'aboutir à des librairies de composés. Néanmoins aucun résultat d'activité n'a été publié à ce jour, mais ces systèmes ont été par la suite source d'inspiration pour l'obtention de récepteurs artificiels<sup>207</sup>. L'utilisation de peptides ne permet pas un contrôle structural des composé obtenus car la formation de structures secondaires comme les hélices  $\alpha$  est possible, seulement avec de très longues séquences polypeptidiques<sup>208</sup>.

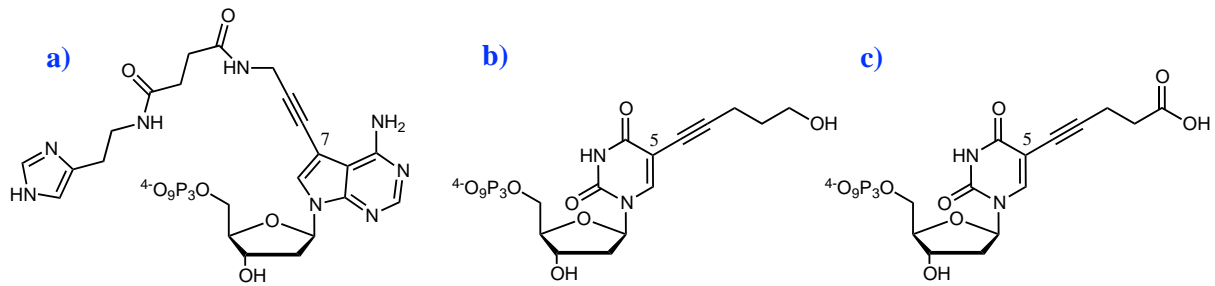
Actuellement donc, à notre connaissance, il n'existe pas de composés non nucléiques capables de reproduire de manière fidèle l'activité des protéases à sérine.

### **V.3.b) Les mimes nucléiques**

L'utilisation d'acides nucléiques pour la construction de mimes des protéases, sur la base des propriétés énoncées, semble être une alternative valable. La structuration, la reconnaissance et l'aptitude à la catalyse de ces derniers sont des atouts majeurs sur lesquels il est possible de se baser.

#### V.3.b.1) L'approche enzymatique

Les travaux d'Hollenstein portent sur la recherche de DNAzymes ayant une activité catalytique similaire aux protéases à sérine<sup>209</sup>. Les triphosphates portant les fonctions imidazole (pour l'histidine) (Figure 25\_a), hydroxyle (pour la sérine) (Figure 25\_b) et acide carboxylique (pour l'acide aspartique) (Figure 25\_c) en position 7 de la base adénine et en position 5 de la 2'-désoxyuridine et de la cytosine ont été incorporés au sein de brins *via* la méthode SELEX.

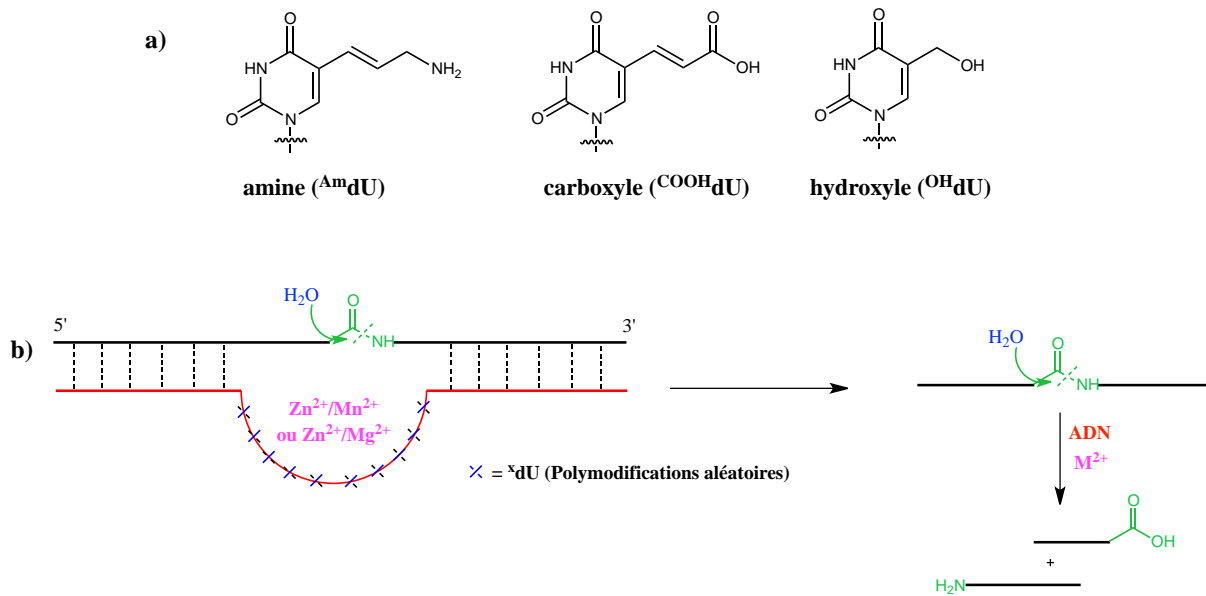


**Figure 22** : Nucléosides triphosphates synthétisés par Hollenstein.

Les nucléotides triphosphates portant ces modifications sont bien acceptés par les polymérase<sup>57</sup> et valident l'approche enzymatique permettant d'obtenir une quantité conséquente et variée de séquences. Les séquences portant ces modifications ont montré à ce jour une résistance accrue aux nucléases.

L'équipe de Silverman<sup>210, 211</sup>, en 2009, lors de ses recherches de DNAzyme « actifs » sur le lien amide, a identifié, le premier DNAzyme à activité déoxyribonucléase (DNase). Le substrat étant un hybride ADN-tripeptide, ils ont mis en évidence que l'activité de coupure du DNAzyme s'effectuait au niveau du lien phosphodiester et non pas sur le lien amide. Après amélioration du processus de sélection, un DNAzyme a été identifié par la même équipe comme étant capable d'hydrolyser un lien ester et un lien amide aromatique<sup>212</sup>. Même en présence de cofacteurs métalliques, le lien amide aliphatique reste intact. En effet le caractère moins électrophile du carbonyle de l'amide aliphatique comparé à celui d'un carbonyle d'une amide aromatique nécessite l'utilisation de nucléophiles plus fort. Récemment, un DNAzyme modifié a été sélectionné portant les unités nucléotidiques décorées au niveau de la position 5 de la base uracile soit avec une fonction amine nucléophile, un carboxyle ou un hydroxyle (Schéma 14\_a).

## Chapitre I : Les acides nucléiques modifiés : structures et propriétés



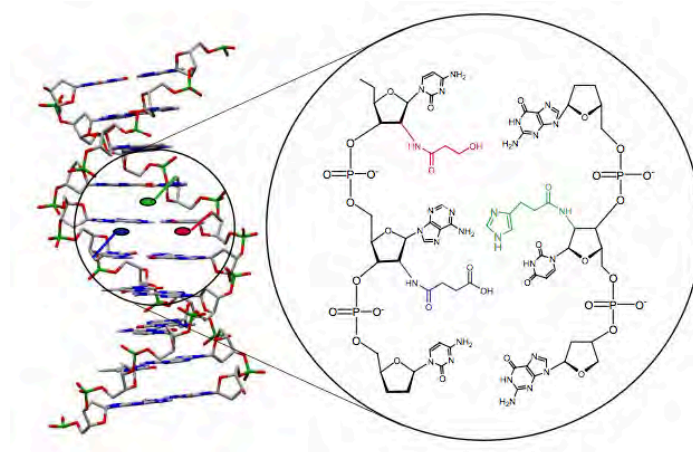
**Schéma 14 :** a) Modifications introduites par l'équipe de Silverman ; b) Coupure d'un lien peptidique au sein d'une séquence oligonucléotidique effectuée par une séquence portant les résidus  $A^m dU$ ,  $COOHdU$  et  $OHdU$ .

Grâce à l'introduction de ces substitutions, en présence de cations métalliques tels que  $Zn^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ , il a été possible d'aboutir à la coupure d'un lien amide aliphatique<sup>213</sup> introduit au sein d'une séquence oligonucléotidique (Schéma 14\_b).

### V.3.b.2) L'approche synthétique

L'équipe de Madder<sup>214, 215</sup>, après des tentatives d'utilisation de composés non nucléiques, a synthétisé par approche phosphoramidite des séquences incorporant des nucléotides modifiés en positions 2' par des fonctions rappelant les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans les catalyses enzymatique des protéases à serine. Une structuration en double hélice a été envisagée et ainsi les fonctionnalités sont orientées vers le grand sillon (Figure 26).





**Figure 26** : Double hélice portant des fonctions mimes de la triade réactive des protéases à sérine synthétisée par l'équipe de Madder<sup>208</sup>.

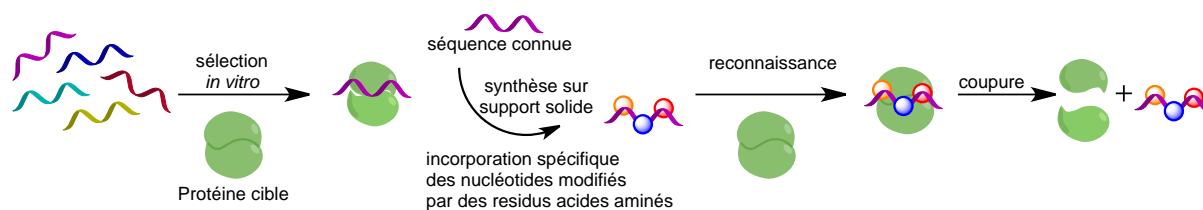
Les auteurs ont montré qu'en modulant l'introduction de ces modifications il est possible de stabiliser ou déstabiliser la double hélice ce qui indique une interaction stabilisante entre les groupements chimiques imidazole, hydroxyle et acide carboxylique introduits. En revanche à ce jour aucun résultat d'activité catalytique n'a été publié.

A ce jour, pour l'obtention d'un système capable de mimer l'activité catalytique des protéases à sérine, il est nécessaire, outre que l'optimisation de l'activité catalytique même, de surmonter des écueils tels que la reconnaissance du substrat, la sélectivité et la nécessité de la présence de ions métalliques.

## VI) Notre approche

L'objectif de mon projet est de synthétiser une nouvelle classe d'aptazymes, composés présentant les propriétés des aptamères et des DNAzymes. Le concept général consiste en la sélection d'une séquence capable de reconnaître une protéine donnée (aptamère) qui est ensuite re-synthétisée par voie chimique en incorporant, à des positions clés proches des sites de reconnaissance aptamère-protéine, des fonctions chimiques capable de couper la protéine d'intérêt *via* un mécanisme mimant celui des protéases à sérine (Schéma 15).

## Chapitre I : Les acides nucléiques modifiés : structures et propriétés

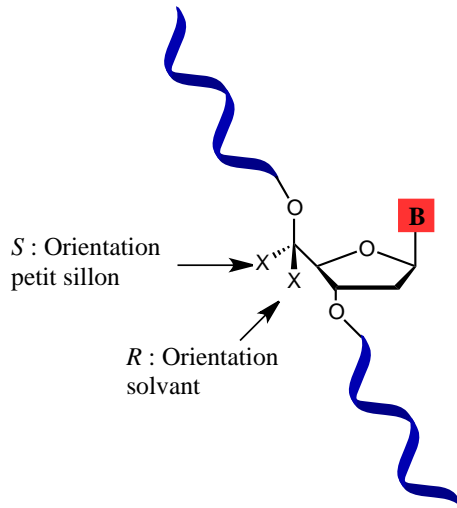


**Schéma 15 :** Représentation schématique du design de l'aptazyme.

Dans un premier temps, afin de valider le concept général du projet, nous avons focalisé notre attention sur l'obtention par voie synthétique d'un oligonucléotide capable de réaliser la coupure d'un lien peptidique. Par la suite cela sera combiné avec l'identification de séquences aptamères capables de reconnaître la cible choisie.

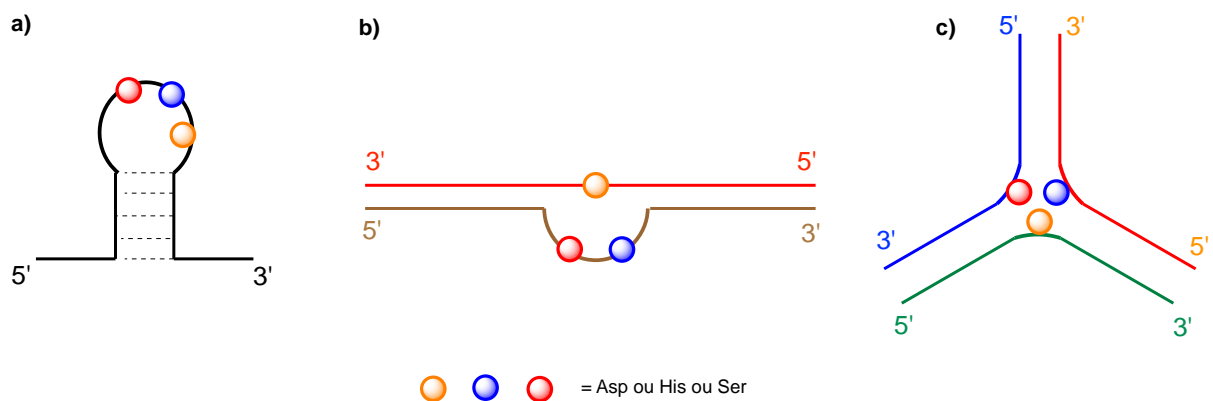
Notre approche consiste en la synthèse de phosphoramidites modifiés avec les fonctions chimiques rappelant les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la catalyse enzymatique des protéases à sérine. Deux approches sont envisageables : l'utilisation d'unités fonctionnalisées ou l'utilisation d'unités convertibles. Nous avons décidé d'exploiter ces deux approches, afin d'avoir une boîte à outils suffisamment variée permettant d'envisager la plupart des combinaisons possibles et ainsi assurer l'obtention de structures multi-fonctionnalisées. Au moins deux nucléotides convertibles orthogonaux peuvent être obtenus, qui sont aussi précurseurs des nucléotides fonctionnalisés visés.

Le positionnement des modifications est un critère crucial à prendre en compte afin d'assurer leurs bonnes orientations. A la différence des travaux précédemment publiés avec les modifications sur les bases azotées (par les équipes de Hollenstein<sup>209</sup>, Perrin<sup>216</sup> et Silverman<sup>213</sup>) ou en position 2' (par l'équipe de Madder<sup>215</sup>), nous avons décidé d'exploiter la position 5'C des nucléotides. Cela nous permet de ne déstabiliser ni l'appariement au niveau des bases azotées, ni l'équilibre des charges des groupements phosphodiester, et d'avoir une orientation des modifications vers le petit sillon ou vers le solvant en fonction de la stéréochimie *R* ou *S* du carbone 5' à la différence des positions 5 et 2' qui orientent les fonction vers le grand sillon (Figure 27).



**Figure 23 :** Orientation des substituants en position 5'C.

Ces nucléotides seront ensuite introduits au sein de séquences par synthèse oligonucléotidique sur support solide automatisée. Les séquences seront choisies de manière à avoir des structures stables du fait de l'hybridation des bases, mais qui conservent une part de flexibilité permettant d'accueillir les substrats. L'idée est donc d'obtenir des structures type bulge, épingles à cheveux ou jonctions trois voies accueillant au sein de la zone non appariée les fonctions chimiques réactives nécessaires à la catalyse enzymatique (Figure 28).



**Figure 28 :** Représentation des structures secondaires portant la triade catalytique: a) épingle à cheveux; b) bulge; c) jonction trois voies.

En fonction de la structure secondaire choisie les modifications se trouvent sur le même brin (épingle à cheveux), sur deux brins en partie complémentaires (bulge) ou sur trois

## Chapitre I : Les acides nucléiques modifiés : structures et propriétés

brins différents (jonction trois voies) ce qui justifie la nécessité d'avoir plusieurs types de nucléotides fonctionnalisés ou convertibles orthogonaux.

Après un introduction qui explicite l'esprit des travaux réalisés pour ce projet, dans le chapitre suivant la synthèse des phosphoramidites convertibles et fonctionnalisés est détaillée.

## VII) Références bibliographiques du Chapitre I

- [1] Dahm, R. (2005) Friedrich Miescher and the discovery of DNA, *Dev. Biol.* 278, 274-288.
- [2] Avery, O. T., MacLeod, C. M., and McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III, *J. Exp. Med.* 79, 137-158.
- [3] Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953) Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature* 171, 737-738.
- [4] Franklin, R. E., and Gosling, R. G. (1953) Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate, *Nature* 171, 740-741.
- [5] Ho, P. S., and Carter, M. (2011) *DNA Structure: Alphabet Soup for the Cellular Soul*.
- [6] Neidle, S. (2008) Principles of Nucleic Acid Structure, *S. Elsevier Inc., Amsterdam, The Netherlands*.
- [7] Mathé, C., and Périgaud, C. (2008) Recent Approaches in the Synthesis of Conformationally Restricted Nucleoside Analogues, *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 1489-1505.
- [8] E.T., K. (2001) *Annu Rev Biophys biomol Structu* 30, 1-22.
- [9] Pohl, F. M., Jovin, T. M., Baehr, W., and Holbrook, J. J. (1972) Ethidium Bromide as a Cooperative Effector of a DNA Structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69, 3805-3809.
- [10] Rich, A., and Zhang, S. (2003) Z-DNA: the long road to biological function, *Nat. Rev. Genet.* 4, 566-572.
- [11] Strobel, S. A., and Cochrane, J. C. (2007) RNA Catalysis: Ribozymes, Ribosomes and Riboswitches, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11, 636-643.
- [12] Patel, D. J., Phan, A. T., and Kuryavyi, V. (2007) Human telomere, oncogenic promoter and 5' -UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics, *Nucleic Acids Res.* 35, 7429-7455.
- [13] Matteucci, M. D., and Caruthers, M. H. (1981) Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 3185-3191.

- [14] Beaucage, S. L., and Caruthers, M. H. (1981) Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis, *Tetrahedron Lett.* 22, 1859-1862.
- [15] Kurreck, J. (2008) Therapeutic Oligonucleotides, *RSC Publishing*, 23-79.
- [16] Stephenson, M. L., and Zamecnik, P. C. (1978) Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 285-288.
- [17] Zamecnik, P. C., and Stephenson, M. L. (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 280-284.
- [18] Bennett, C. F., and Swayze, E. E. (2010) RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 259-293.
- [19] Chan, J. H. P., Lim, S., and Wong, W. S. F. (2006) ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: FROM DESIGN TO THERAPEUTIC APPLICATION, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 533-540.
- [20] Dias, N., and Stein, C. A. (2002) Antisense Oligonucleotides: Basic Concepts and Mechanisms, *Mol. Cancer Ther.* 1, 347-355.
- [21] Collin, R. W. J., den Hollander, A. I., van der Velde-Visser, S. D., Bennicelli, J., Bennett, J., and Cremers, F. P. M. (2012) Antisense Oligonucleotide (AON)-based Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by a Frequent Mutation in CEP290, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 1, e14.
- [22] Hoyne, P. R., Edwards, L. M., Viari, A., and Maher I, L. J. (2000) Searching genomes for sequences with the potential to form intrastrand triple helices<sup>1</sup>, *J. Mol. Biol.* 302, 797-809.
- [23] Braasch, D. A., and Corey, D. R. (2002) Novel Antisense and Peptide Nucleic Acid Strategies for Controlling Gene Expression, *Biochemistry* 41, 4503-4510.
- [24] Buchini, S., and Leumann, C. J. (2003) Recent improvements in antigene technology, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 717-726.
- [25] Zaghoul, E. M., Madsen, A. S., Moreno, P. M. D., Oprea, I. I., El-Andaloussi, S., Bestas, B. et al., and Smith, C. I. E. (2011) Optimizing anti-gene oligonucleotide 'Zorro-LNA' for improved strand invasion into duplex DNA, *Nucleic Acids Res.* 39, 1142-1154.

- [26] Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans, *Plant Cell* 2, 279-289.
- [27] Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391, 806-811.
- [28] Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003) Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex, *Cell* 115, 199-208.
- [29] Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias, *Cell* 115, 209-216.
- [30] Whitehead, K. A., Langer, R., and Anderson, D. G. (2009) Knocking down barriers: advances in siRNA delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 129-138.
- [31] Kurreck, J. (2009) RNA Interference: From Basic Research to Therapeutic Applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 1378-1398.
- [32] Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* 411, 494-498.
- [33] Devi, G. R. (2006) siRNA-based approaches in cancer therapy, *Cancer Gene Ther.* 13, 819-829.
- [34] Reese, C. B. (2005) Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis, *Org. Biomol. Chem.* 3, 3851-3868.
- [35] Beaucage, S. L., and Iyer, R. P. (1992) Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach, *Tetrahedron* 48, 2223-2311.
- [36] Michelson, A. M., and Todd, A. R. (1955) Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3[prime or minute]: 5[prime or minute]-internucleotidic linkage, *J. Chem. Soc. (Resumed)*, 2632-2638.
- [37] Hall, R. H., Todd, A., and Webb, R. F. (1957) 644. Nucleotides. Part XLI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates, *J. Chem. Soc. (Resumed)*, 3291-3296.
- [38] Katagiri, N., Itakura, K., and Narang, S. A. (1975) Use of arylsulfonyltriazoles for the synthesis of oligonucleotides by the triester approach, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 7332-7337.

- [39] Katagiri, N., Itakura, K., and Narang, S. A. (1974) Novel condensing reagents for polynucleotide synthesis, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 325-326.
- [40] P.J. Garegg, T. R., J. Stawinski, R. Stromberg. (1985) Formation of internucleotidic bonds via phosphonate intermediates, *Chem. Scr.* 25, 280-282.
- [41] Froehler, B. C., and Matteucci, M. D. (1986) Nucleoside h-phosphonates: Valuable intermediates in the synthesis of deoxyoligonucleotides, *Tetrahedron Lett.* 27, 469-472.
- [42] Froehler, B. C., N, P. G., and Matteucci, M. D. (1986) Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates, *Nucleic Acids Res.* 14, 5399-5407.
- [43] Letsinger, R. L., and Lunsford, W. B. (1976) Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates, *J. Am. Chem. Soc.* 98, 3655-3661.
- [44] Khorana, H. G., Agarwal, K. L., Besmer, P., Büchi, H., Caruthers, M. H., Cashion, P. J. et al., and van de Sande, J. H. (1976) Total synthesis of the structural gene for the precursor of a tyrosine suppressor transfer RNA from Escherichia coli. 1. General introduction, *J. Biol. Chem.* 251, 565-570.
- [45] Khorana, H. G., Agarwal, K. L., Büchi, H., Caruthers, M. H., Gupta, N. K., Klbppe, K. et al., and Yamada, T. (1972) CIII. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast, *J. Mol. Biol.* 72, 209-217.
- [46] Letsinger, R. L., Ogilvie, K. K., and Miller, P. S. (1969) Nucleotide chemistry. XV. Developments in syntheses of oligodeoxyribonucleotides and their organic derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 91, 3360-3365.
- [47] Letsinger, R. L., and Ogilvie, K. K. (1967) Convenient method for stepwise synthesis of oligothymidylate derivatives in large-scale quantities, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 4801-4803.
- [48] Eckstein, F., and Rizk, I. (1967) Synthesis of Oligonucleotides by Use of Phosphoric Triesters, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 6, 695-696.
- [49] Froehler, B. C., Ng, P. G., and Matteucci, M. D. (1986) Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates, *Nucleic Acids Res.* 14, 5399-5407.
- [50] Garegg, P. J., Lindh, I., Regberg, T., Stawinski, J., Strömberg, R., and Henrichson, C. (1986) Nucleoside H-phosphonates. III. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach, *Tetrahedron Lett.* 27, 4051-4054.



- [51] Letsinger, R. L., and Mahadevan, V. (1965) Oligonucleotide Synthesis on a Polymer Support<sup>1,2</sup>, *J. Am. Chem. Soc.* *87*, 3526-3527.
- [52] Gait, M. J., and Sheppard, R. C. (1977) Rapid synthesis of oligodeoxyribonucleotides: a new solid-phase method, *Nucleic Acids Res.* *4*, 1135-1158.
- [53] Spiegelman, S. (1971) An approach to the experimental analysis of precellular evolution, *Q. Rev. Biophys.* *4*, 213-253.
- [54] Joyce, G. F. (2007) Forty Years of In Vitro Evolution, *Angew. Chem. Int. Ed.* *46*, 6420-6436.
- [55] Joyce, G. F. (1994) In vitro evolution of nucleic acids, *Curr. Opin. Struct. Biol.* *4*, 331-336.
- [56] Ali, M. M., Li, F., Zhang, Z., Zhang, K., Kang, D.-K., Ankrum, J. A. et al., and Zhao, W. (2014) Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine, *Chem. Soc. Rev.* *43*, 3324-3341.
- [57] Hollenstein, M. (2015) Generation of long, fully modified, and serum-resistant oligonucleotides by rolling circle amplification, *Org. Biomol. Chem.* *13*, 9820-9824.
- [58] Yan, L., Zhou, J., Zheng, Y., Gamson, A. S., Roembke, B. T., Nakayama, S., and Sintim, H. O. (2014) Isothermal amplified detection of DNA and RNA, *Mol. BioSyst.* *10*, 970-1003.
- [59] Hollenstein, M. (2012) Nucleoside Triphosphates — Building Blocks for the Modification of Nucleic Acids, *Molecules* *17*, 13569.
- [60] Ludwig, J., and Eckstein, F. (1989) Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one, *J. Org. Chem.* *54*, 631-635.
- [61] Rhodes, A., Deakin, A., Spaul, J., Coomber, B., Aitken, A., Life, P., and Rees, S. (2000) The Generation and Characterization of Antagonist RNA Aptamers to Human Oncostatin M, *J. Biol. Chem.* *275*, 28555-28561.
- [62] Schmidt, K. S., Borkowski, S., Kurreck, J., Stephens, A. W., Bald, R., Hecht, M. et al., and Erdmann, V. A. (2004) Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function, *Nucleic Acids Res.* *32*, 5757-5765.
- [63] Uzawa, T., Tada, S., Wang, W., and Ito, Y. (2013) Expansion of the aptamer library from a "natural soup" to an "unnatural soup", *Chem. Commun.* *49*, 1786-1795.
- [64] Kuwahara, M., and Sugimoto, N. (2010) Molecular Evolution of Functional Nucleic Acids with Chemical Modifications, *Molecules* *15*, 5423.

- [65] Deleavey, Glen F., and Damha, Masad J. (2012) Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing, *Chem. Biol.* 19, 937-954.
- [66] Bell, N. M., and Micklefield, J. (2009) Chemical Modification of Oligonucleotides for Therapeutic, Bioanalytical and other Applications, *ChemBioChem* 10, 2691-2703.
- [67] Watts, J. K., Deleavey, G. F., and Damha, M. J. (2008) Chemically modified siRNA: tools and applications, *Drug Discov. Today* 13, 842-855.
- [68] Eckstein, F. (2000) Phosphorothioate oligodeoxynucleotides: what is their origin and what is unique about them?, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10, 117-121.
- [69] Chen, J.-K., Schultz, R. G., Lioyd, D. H., and Gryaznov, S. M. (1995) Synthesis of oligodeoxyribonucleotide N3'  $\rightarrow$ P5' phosphoramidates, *Nucleic Acids Res.* 23, 2661-2668.
- [70] Gryaznov, S. M. (2010) Oligonucleotide N3'  $\rightarrow$ P5' Phosphoramidates and Thio-Phosphoramidates as Potential Therapeutic Agents, *Chem. Biodiversity* 7, 477-493.
- [71] Sheehan, D., Lunstad, B., Yamada, C. M., Stell, B. G., Caruthers, M. H., and Dellinger, D. J. (2003) Biochemical properties of phosphonoacetate and thiophosphonoacetate oligodeoxyribonucleotides, *Nucleic Acids Res.* 31, 4109-4118.
- [72] Yamada, C. M., Dellinger, D. J., and Caruthers, M. H. (2007) Synthesis and biological activity of phosphonocarboxylate DNA, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 26, 539-546.
- [73] Kowalska, J., Wypijewska del Nogal, A., Darzynkiewicz, Z. M., Buck, J., Nicola, C., Kuhn, A. N. et al., and Jemielity, J. (2014) Synthesis, properties, and biological activity of boranophosphate analogs of the mRNA cap: versatile tools for manipulation of therapeutically relevant cap-dependent processes, *Nucleic Acids Res.* 42, 10245-10264.
- [74] Hall, A. H. S., Wan, J., Shaughnessy, E. E., Ramsay Shaw, B., and Alexander, K. A. (2004) RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships, *Nucleic Acids Res.* 32, 5991-6000.
- [75] Dupouy, C., Iché-Tarrat, N., Durrieu, M.-P., Rodriguez, F., Escudier, J.-M., and Vigroux, A. (2006) Watson-Crick Base-Pairing Properties of Nucleic Acid Analogues with Stereocontrolled  $\alpha$  and  $\beta$  Torsion Angles ( $\alpha,\beta$ -D-CNAs), *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 3623-3627.
- [76] Mutisya, D., Selvam, C., Lunstad, B. D., Pallan, P. S., Haas, A., Leake, D. et al., and Rozners, E. (2014) Amides are excellent mimics of phosphate internucleoside

- linkages and are well tolerated in short interfering RNAs, *Nucleic Acids Res.* **42**, 6542-6551.
- [77] Sato, K., Tawarada, R., Seio, K., and Sekine, M. (2004) Synthesis and Structural Properties of New Oligodeoxynucleotide Analogues Containing a 2' ,5' - Internucleotidic Squaryldiamide Linkage Capable of Formation of a Watson–Crick Base Pair with Adenine and a Wobble Base Pair with Guanine at the 3' -Downstream Junction Site, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 2142-2150.
- [78] Isobe, H., Fujino, T., Yamazaki, N., Guillot-Nieckowski, M., and Nakamura, E. (2008) Triazole-Linked Analogue of Deoxyribonucleic Acid (TLDNA): Design, Synthesis, and Double-Strand Formation with Natural DNA, *Org. Lett.* **10**, 3729-3732.
- [79] Cram, D. J. (1986) Preorganization—From Solvents to Spherands, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25**, 1039-1057.
- [80] Kool, E. T. (1997) Preorganization of DNA: Design Principles for Improving Nucleic Acid Recognition by Synthetic Oligonucleotides, *Chem. Rev.* **97**, 1473-1488.
- [81] Nishizaki, T., Iwai, S., Ohtsuka, E., and Nakamura, H. (1997) Solution Structure of an RNA·2'-O-Methylated RNA Hybrid Duplex Containing an RNA·DNA Hybrid Segment at the Center, *Biochemistry* **36**, 2577-2585.
- [82] Majlessi, M., Nelson, N. C., and Becker, M. M. (1998) Advantages of 2' -O-methyl oligoribonucleotide probes for detecting RNA targets, *Nucleic Acids Res.* **26**, 2224-2229.
- [83] Ikeda, H., Fernandez, R., Barchi, J. J., Huang, X., Marquez, V. E., and Wilk, A. (1998) The effect of two antipodal fluorine-induced sugar puckers on the conformation and stability of the Dickerson-Drew dodecamer duplex [d (CGCGAATTCGCG)]<sub>2</sub>, *Nucleic Acids Res.* **26**, 2237-2244.
- [84] Trempe, J.-F., Wilds, C. J., Denisov, A. Y., Pon, R. T., Damha, M. J., and Gehring, K. (2001) NMR Solution Structure of an Oligonucleotide Hairpin with a 2'F-ANA/RNA Stem: Implications for RNase H Specificity toward DNA/RNA Hybrid Duplexes, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 4896-4903.
- [85] Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M. et al., and Wengel, J. (1998) LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition, *Tetrahedron* **54**, 3607-3630.

- [86] Obika, S., Onoda, M., Morita, K., Andoh, J.-i., Koizumi, M., and Imanishi, T. (2001) 3[prime or minute]-Amino-2[prime or minute],4[prime or minute]-BNA: novel bridged nucleic acids having an N3[prime or minute][rightward arrow]P5[prime or minute] phosphoramidate linkage, *Chem. Commun.*, 1992-1993.
- [87] Prakash, T. P., Siwkowski, A., Allerson, C. R., Migawa, M. T., Lee, S., Gaus, H. J. et al., and Bhat, B. (2010) Antisense oligonucleotides containing conformationally constrained 2', 4' -(N-methoxy) aminomethylene and 2', 4' -aminooxymethylene and 2' -O, 4' -C-aminomethylene bridged nucleoside analogues show improved potency in animal models, *J. Med. Chem.* 53, 1636-1650.
- [88] Pradeepkumar, P. I., Cheruku, P., Plashkevych, O., Acharya, P., Gohil, S., and Chattopadhyaya, J. (2004) Synthesis, Physicochemical and Biochemical Studies of 1',2'-Oxetane Constrained Adenosine and Guanosine Modified Oligonucleotides, and Their Comparison with Those of the Corresponding Cytidine and Thymidine Analogues, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11484-11499.
- [89] Meier, R., Gruschow, S., and Leumann, C. (1999) Nucleic-Acid Analogs with Restricted Conformational Flexibility in the Sugar-Phosphate Backbone ('Bicyclo-DNA'), Part 7, Synthesis and Properties of Oligodeoxynucleotides Containing [(3' S,5' S,6' R)-6' -Amino-2' -deoxy-3' , 5' -ethano-  $\beta$  -D-ribofuranosyl]thymine [(6' R)-6' -Amino-bicyclo-thymidine), *Helv. Chim. Acta* 82, 1813-1828.
- [90] Steffans, R., and Leumann, C. (1997) Nucleic Acid Analogs with Constraint Conformational Flexibility in the Sugar-Phosphate Backbone "Tricyclo-DNA" . Part 1. Preparation of [(5' R,6' R)-2' -deoxy-3' ,5' -ethano-5' ,6' -methano-  $\beta$  -D-ribofuranosyl]thymine and -adenine, and the corresponding phosphoramidites for oligonucleotide synthesis, *Helv. Chim. Acta* 80, 2426-2439.
- [91] Mangos, M. M., Min, K.-L., Viazovkina, E., Galarneau, A., Elzagheid, M. I., Parniak, M. A., and Damha, M. J. (2003) Efficient RNase H-Directed Cleavage of RNA Promoted by Antisense DNA or 2'F-ANA Constructs Containing Acyclic Nucleotide Inserts, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 654-661.
- [92] Nauwelaerts, K., Fisher, M., Froeyen, M., Lescrinier, E., Van Aerschot, A., Xu, D. et al., and Herdewijn, P. (2007) Structural Characterization and Biological Evaluation of

- Small Interfering RNAs Containing Cyclohexenyl Nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 9340-9348.
- [93] Fisher, M., Abramov, M., Van Aerschot, A., Rozenski, J., Dixit, V., Juliano, R. L., and Herdewijn, P. (2009) Biological effects of hexitol and altritol-modified siRNAs targeting B-Raf, *Eur. J. Pharmacol.* **606**, 38-44.
- [94] Summerton, J. (1999) Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type, *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr.* **1489**, 141-158.
- [95] Demidov, V. V., Potaman, V. N., Frank-Kamenetskii, M. D., Egholm, M., Buchard, O., Sönnichsen, S. H., and Nielsen, P. E. (1994) Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts, *Biochem. Pharmacol.* **48**, 1310-1313.
- [96] Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A. et al., and Nielsen, P. E. (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, *Nature* **365**, 566-568.
- [97] Chiu, Y.-L., and Rana, T. M. (2003) siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis, *RNA* **9**, 1034-1048.
- [98] Liu, H., Gao, J., Lynch, S. R., Saito, Y. D., Maynard, L., and Kool, E. T. (2003) A Four-Base Paired Genetic Helix with Expanded Size, *Science* **302**, 868-871.
- [99] Doi, Y., Chiba, J., Morikawa, T., and Inouye, M. (2008) Artificial DNA Made Exclusively of Nonnatural C-Nucleosides with Four Types of Nonnatural Bases, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8762-8768.
- [100] MacMillan, A. M., and Verdine, G. L. (1990) Synthesis of functionally tethered oligodeoxynucleotides by the convertible nucleoside approach, *J. Org. Chem.* **55**, 5931-5933.
- [101] Macmillan, A. M., and Verdine, G. L. (1991) Engineering tethered DNA molecules by the convertible nucleoside approach, *Tetrahedron* **47**, 2603-2616.
- [102] Singh, Y., Murat, P., and Defrancq, E. (2010) Recent developments in oligonucleotide conjugation, *Chem. Soc. Rev.* **39**, 2054-2070.
- [103] Qun, G., Chuanding, C., Ravikanth, G., Shivashankar, S., Sathish, A., Kun, D., and Donald, T. H. (2006) DNA nanowire fabrication, *Nanotechnology* **17**, R14.
- [104] Braun, E., Eichen, Y., Sivan, U., and Ben-Yoseph, G. (1998) DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire, *Nature* **391**, 775-778.

- [105] Kinsella, J. M., and Ivanisevic, A. (2007) DNA-Templated Magnetic Nanowires with Different Compositions: Fabrication and Analysis, *Langmuir* 23, 3886-3890.
- [106] Jayasena, S. D. (1999) Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics, *Clin. Chem.* 45, 1628-1650.
- [107] Nimjee, S. M., Rusconi, C. P., and Sullenger, B. A. (2005) Aptamers: An Emerging Class of Therapeutics, *Annu. Rev. Med.* 56, 555-583.
- [108] Jager, S., Rasched, G., Kornreich-Leshem, H., Engeser, M., Thum, O., and Famulok, M. (2005) A Versatile Toolbox for Variable DNA Functionalization at High Density, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 15071-15082.
- [109] Hottin, A., and Marx, A. (2016) Structural Insights into the Processing of Nucleobase-Modified Nucleotides by DNA Polymerases, *Acc. Chem. Res.* 49, 418-427.
- [110] Lam, C., Hipolito, C., and Perrin, D. M. (2008) Synthesis and Enzymatic Incorporation of Modified Deoxyadenosine Triphosphates, *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 4915-4923.
- [111] Cahova, H., Pohl, R., Bednarova, L., Novakova, K., Cvacka, J., and Hocek, M. (2008) Synthesis of 8-bromo-, 8-methyl- and 8-phenyl-dATP and their polymerase incorporation into DNA, *Org. Biomol. Chem.* 6, 3657-3660.
- [112] Thoresen, L. H., Jiao, G.-S., Haaland, W. C., Metzker, M. L., and Burgess, K. (2003) Rigid, Conjugated, Fluoresceinated Thymidine Triphosphates: Syntheses and Polymerase Mediated Incorporation into DNA Analogues, *Chem.-Eur. J.* 9, 4603-4610.
- [113] Čapek, P., Pohl, R., and Hocek, M. (2006) Cross-coupling reactions of unprotected halopurine bases, nucleosides, nucleotides and nucleoside triphosphates with 4-boronophenylalanine in water. Synthesis of (purin-8-yl)-and (purin-6-yl) phenylalanines, *Org. Biomol. Chem.* 4, 2278-2284.
- [114] Dadová, J., Vidláková, P., Pohl, R., Havran, L. k., Fojta, M., and Hocek, M. (2013) Aqueous Heck cross-coupling preparation of acrylate-modified nucleotides and nucleoside triphosphates for polymerase synthesis of acrylate-labeled DNA, *J. Org. Chem.* 78, 9627-9637.
- [115] Hocek, M. (2014) Synthesis of Base-Modified 2' -Deoxyribonucleoside Triphosphates and Their Use in Enzymatic Synthesis of Modified DNA for Applications in Bioanalysis and Chemical Biology, *J. Org. Chem.* 79, 9914-9921.

- [116] Patolsky, F., Weizmann, Y., and Willner, I. (2002) Redox-Active Nucleic-Acid Replica for the Amplified Bioelectrocatalytic Detection of Viral DNA, *J. Am. Chem. Soc.* *124*, 770-772.
- [117] Di Giusto, D. A., Wlassoff, W. A., Giesebrecht, S., Gooding, J. J., and King, G. C. (2004) Multipotential Electrochemical Detection of Primer Extension Reactions on DNA Self-Assembled Monolayers, *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 4120-4121.
- [118] Brázdilová, P., Vrábek, M., Pohl, R., Pivoňková, H., Havran, L., Hocek, M., and Fojta, M. (2007) Ferrocenylethynyl Derivatives of Nucleoside Triphosphates: Synthesis, Incorporation, Electrochemistry, and Bioanalytical Applications, *Chem.-Eur. J.* *13*, 9527-9533.
- [119] Vrábek, M., Horáková, P., Pivoňková, H., Kalachova, L., Černocká, H., Cahová, H. et al., and Fojta, M. (2009) Base-Modified DNA Labeled by [Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> and [Os(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> Complexes: Construction by Polymerase Incorporation of Modified Nucleoside Triphosphates, Electrochemical and Luminescent Properties, and Applications, *Chem.-Eur. J.* *15*, 1144-1154.
- [120] Balintová, J., Pohl, R., Horáková, P., Vidláková, P., Havran, L., Fojta, M., and Hocek, M. (2011) Anthraquinone as a Redox Label for DNA: Synthesis, Enzymatic Incorporation, and Electrochemistry of Anthraquinone-Modified Nucleosides, Nucleotides, and DNA, *Chem.-Eur. J.* *17*, 14063-14073.
- [121] Riedl, J., Pohl, R., Rulíšek, L., and Hocek, M. (2012) Synthesis and Photophysical Properties of Biaryl-Substituted Nucleos(t)ides. Polymerase Synthesis of DNA Probes Bearing Solvatochromic and pH-Sensitive Dual Fluorescent and <sup>19</sup>F NMR Labels, *J. Org. Chem.* *77*, 1026-1044.
- [122] Riedl, J., Pohl, R., Ernsting, N. P., Orsag, P., Fojta, M., and Hocek, M. (2012) Labelling of nucleosides and oligonucleotides by solvatochromic 4-aminophthalimide fluorophore for studying DNA-protein interactions, *Chem. Sci.* *3*, 2797-2806.
- [123] Riedl, J., Ménová, P., Pohl, R., Orsag, P., Fojta, M., and Hocek, M. (2012) GFP-like Fluorophores as DNA Labels for Studying DNA-Protein Interactions, *J. Org. Chem.* *77*, 8287-8293.
- [124] Okamoto, A., Kanatani, K., and Saito, I. (2004) Pyrene-Labeled Base-Discriminating Fluorescent DNA Probes for Homogeneous SNP Typing, *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 4820-4827.

- [125] Ostergaard, M. E., and Hrdlicka, P. J. (2011) Pyrene-functionalized oligonucleotides and locked nucleic acids (LNAs): Tools for fundamental research, diagnostics, and nanotechnology, *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5771-5788.
- [126] Skorobogatyi, M. V., Malakhov, A. D., Pchelintseva, A. A., Turban, A. A., Bondarev, S. L., and Korshun, V. A. (2006) Fluorescent 5-Alkynyl-2' -Deoxyuridines: High Emission Efficiency of a Conjugated Perylene Nucleoside in a DNA Duplex, *ChemBioChem* **7**, 810-816.
- [127] Østergaard, M. E., Kumar, P., Baral, B., Guenther, D. C., Anderson, B. A., Ytreberg, F. M. et al., and Hrdlicka, P. J. (2011) C5-Functionalized DNA, LNA, and  $\alpha$ -L-LNA: Positional Control of Polarity-Sensitive Fluorophores Leads to Improved SNP-Typing, *Chem.-Eur. J.* **17**, 3157-3165.
- [128] Kumar, T. S., Madsen, A. S., Østergaard, M. E., Sau, S. P., Wengel, J., and Hrdlicka, P. J. (2009) Functionalized 2' -Amino-  $\alpha$  -L-LNA - Directed Positioning of Intercalators for DNA Targeting, *J. Org. Chem.* **74**, 1070-1081.
- [129] Singh, Y., Murat, P., Spinelli, N., and Defrancq, E. (2012) Oligonucleotide Conjugates: Rationale, Synthesis, and Applications, In *From Nucleic Acids Sequences to Molecular Medicine* (Erdmann, A. V., and Barciszewski, J., Eds.), pp 85-120, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [130] Weisbrod, S. H., and Marx, A. (2007) A nucleoside triphosphate for site-specific labelling of DNA by the Staudinger ligation, *Chem. Commun.*, 1828-1830.
- [131] Borsenberger, V., and Howorka, S. (2009) Diene-modified nucleotides for the Diels-Alder-mediated functional tagging of DNA, *Nucleic Acids Res.* **37**, 1477-1485.
- [132] Lercher, L., McGouran, J. F., Kessler, B. M., Schofield, C. J., and Davis, B. G. (2013) DNA Modification under Mild Conditions by Suzuki-Miyaura Cross-Coupling for the Generation of Functional Probes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 10553-10558.
- [133] Kolb, H. C., Finn, M. G., and Sharpless, K. B. (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2004-2021.
- [134] Ustinov, A. V., Stepanova, I. A., Dubnyakova, V. V., Zatsepin, T. S., Nozhevnikova, E. V., and Korshun, V. A. (2010) Modification of nucleic acids using [3 + 2]-dipolar cycloaddition of azides and alkynes, *Russ. J. Bioorg. Chem.* **36**, 401-445.



- [135] El-Sagheer, A. H., and Brown, T. (2010) Click chemistry with DNA, *Chem. Soc. Rev.* 39, 1388-1405.
- [136] Amblard, F., Cho, J. H., and Schinazi, R. F. (2009) Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry, *Chem. Rev.* 109, 4207-4220.
- [137] Ustinov, A., Stepanova, I., Dubnyakova, V., Zatsepin, T., Nozhevnikova, E., and Korshun, V. (2010) Modification of nucleic acids using [3+ 2]-dipolar cycloaddition of azides and alkynes, *Russ. J. Bioorg. Chem.* 36, 401-445.
- [138] Gierlich, J., Burley, G. A., Gramlich, P. M. E., Hammond, D. M., and Carell, T. (2006) Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA, *Org. Lett.* 8, 3639-3642.
- [139] Gramlich, P. M. E., Warncke, S., Gierlich, J., and Carell, T. (2008) Click-Click-Click: Single to Triple Modification of DNA, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 3442-3444.
- [140] Gerland, B., Goudot, A., Ligeour, C., Pourceau, G., Meyer, A., Vidal, S. et al., and Morvan, F. (2014) Structure Binding Relationship of Galactosylated Glycoclusters toward *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA Using a DNA-Based Carbohydrate Microarray, *Bioconjugate Chem.* 25, 379-392.
- [141] Chevlot, Y., Laurenceau, E., Phaner-Goutorbe, M., Monnier, V., Souteyrand, E., Meyer, A. et al., and Morvan, F. (2014) DNA directed immobilization glycocluster array: applications and perspectives, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 18, 46-54.
- [142] Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme, *Cell* 35, 849-857.
- [143] Breaker, R. R., and Joyce, G. F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA, *Chem. Biol.* 1, 223-229.
- [144] Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., and Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme, *Cell* 35, 849-857.
- [145] Gilbert, W. (1986) Origin of life: The RNA world, *Nature* 319, 618-618.
- [146] Edwards, T. E., Klein, D. J., and Ferré-D'Amaré, A. R. (2007) Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17, 273-279.

- [147] Blouin, S., Mulhbachter, J., Penedo, J. C., and Lafontaine, D. A. (2009) Riboswitches: Ancient and Promising Genetic Regulators, *ChemBioChem* 10, 400-416.
- [148] Famulok, M., Hartig, J. S., and Mayer, G. (2007) Functional Aptamers and Aptazymes in Biotechnology, Diagnostics, and Therapy, *Chem. Rev.* 107, 3715-3743.
- [149] Tuerk, C., and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science* 249, 505-510.
- [150] Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346, 818-822.
- [151] Deng, B., Lin, Y., Wang, C., Li, F., Wang, Z., Zhang, H. et al., and Le, X. C. (2014) Aptamer binding assays for proteins: The thrombin example—A review, *Anal. Chim. Acta* 837, 1-15.
- [152] Heyduk, E., and Heyduk, T. (2005) Nucleic Acid-Based Fluorescence Sensors for Detecting Proteins, *Anal. Chem.* 77, 1147-1156.
- [153] Kraemer, S., Vaught, J. D., Bock, C., Gold, L., Katilius, E., Keeney, T. R. et al., and Sanders, G. M. (2011) From SOMAmer-Based Biomarker Discovery to Diagnostic and Clinical Applications: A SOMAmer-Based, Streamlined Multiplex Proteomic Assay, *PLoS One* 6, e26332.
- [154] Gold, L., Ayers, D., Bertino, J., Bock, C., Bock, A., Brody, E. N. et al., and Zichi, D. (2010) Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery, *PLoS One* 5, e15004.
- [155] Rohloff, J. C., Gelinas, A. D., Jarvis, T. C., Ochsner, U. A., Schneider, D. J., Gold, L., and Janjic, N. (2014) Nucleic Acid Ligands With Protein-like Side Chains: Modified Aptamers and Their Use as Diagnostic and Therapeutic Agents, *Mol. Ther. Nucleic Acids* 3, e201.
- [156] Toulmé J.J., G. R. (1998) Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro, *medecine/science* 14, 155-166.
- [157] King, D. J., Bassett, S. E., Li, X., Fennewald, S. A., Herzog, N. K., Luxon, B. A. et al., and Gorenstein, D. G. (2002) Combinatorial Selection and Binding of Phosphorothioate Aptamers Targeting Human NF- $\kappa$ B RelA(p65) and p50, *Biochemistry* 41, 9696-9706.

- [158] Jhaveri, S., Olwin, B., and Ellington, A. D. (1998) In vitro selection of phosphorothiolated aptamers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 2285-2290.
- [159] Coquière, D., Feringa, B. L., and Roelfes, G. (2007) DNA-Based Catalytic Enantioselective Michael Reactions in Water, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 9308-9311.
- [160] Boersma, A. J., Klijin, J. E., Feringa, B. L., and Roelfes, G. (2008) DNA-Based Asymmetric Catalysis: Sequence-Dependent Rate Acceleration and Enantioselectivity, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11783-11790.
- [161] Boersma, A. J., Feringa, B. L., and Roelfes, G. (2009) Enantioselective Friedel-Crafts Reactions in Water Using a DNA-Based Catalyst, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 3346-3348.
- [162] Boersma, A. J., Megens, R. P., Feringa, B. L., and Roelfes, G. (2010) DNA-based asymmetric catalysis, *Chem. Soc. Rev.* **39**, 2083-2092.
- [163] Jaeger, L. (1997) The new world of ribozymes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 324-335.
- [164] Silverman, S. K. (2004) Deoxyribozymes: DNA catalysts for bioorganic chemistry, *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2701-2706.
- [165] Famulok, M., and Jenne, A. (1999) Catalysis Based on Nucleic Acid Structures, In *Implementation and Redesign of Catalytic Function in Biopolymers* (Schmidtchen, F. P., Baltzer, L., Chamberlin, A. R., McDonnell, K. A., Famulok, M., Gilmore, M. A., Imperiali, B., Jenne, A., Shogren-Knaak, M., and Steward, L. E., Eds.), pp 101-131, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [166] Silverman, S. K. (2009) Deoxyribozymes: Selection Design and Serendipity in the Development of DNA Catalysts, *Acc. Chem. Res.* **42**, 1521-1531.
- [167] Tarasow, T. M., Tarasow, S. L., and Eaton, B. E. (1997) RNA-catalysed carbon-carbon bond formation, *Nature* **389**, 54-57.
- [168] Zhang, B., and Cech, T. R. (1997) Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes, *Nature* **390**, 96-100.
- [169] Heidenreich, O., Kang, S. H., Brown, D. A., Xu, X., Swiderski, P., Rossi, J. J. et al., and Nerenberg, M. (1995) Ribozyme-mediated RNA degradation in nuclei suspension, *Nucleic Acids Res.* **23**, 2223-2228.
- [170] Breaker, R. R., and Joyce, G. F. (1994) A DNA enzyme that cleaves RNA, *Chemistry and Biology* **1**, 223-229.

- [171] Santoro, S. W., and Joyce, G. F. (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 4262-4266.
- [172] Feldman, A. R., and Sen, D. (2001) A new and efficient DNA enzyme for the sequence-specific cleavage of RNA1, *J. Mol. Biol.* 313, 283-294.
- [173] Carmi, N., Shultz, L. A., and Breaker, R. R. (1996) In vitro selection of self-cleaving DNAs, *Chem. Biol.* 3, 1039-1046.
- [174] Li, J., Zheng, W., Kwon, A. H., and Lu, Y. (2000) In vitro selection and characterization of a highly efficient Zn(II)-dependent RNA-cleaving deoxyribozyme, *Nucleic Acids Res.* 28, 481-488.
- [175] Roth, A., and Breaker, R. R. (1998) An amino acid as a cofactor for a catalytic polynucleotide, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6027-6031.
- [176] Faulhammer, D., and Famulok, M. (1997) Characterization and divalent metal-ion dependence of in vitro selected deoxyribozymes which cleave DNA/RNA chimeric oligonucleotides1, *J. Mol. Biol.* 269, 188-202.
- [177] Geyer, C. R., and Sen, D. (1997) Evidence for the metal-cofactor independence of an RNA phosphodiester-cleaving DNA enzyme, *Chem. Biol.* 4, 579-593.
- [178] Wecker, M., Smith, D., and Gold, L. (1996) In vitro selection of a novel catalytic RNA: characterization of a sulfur alkylation reaction and interaction with a small peptide, *RNA* 2, 982-994.
- [179] Hsu, Y.-T., Wolter, K. G., and Youle, R. J. (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3668-3672.
- [180] Connell, G., and Yarus, M. (1994) RNAs with dual specificity and dual RNAs with similar specificity, *Science* 264, 1137-1141.
- [181] Muche, M.-S., and Göbel, M. W. (1996) Bis(guanidinium) Alcohols as Models of Staphylococcal Nuclease: Substrate Binding through Ion Pair Complexes and Fast Phosphoryl Transfer Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35, 2126-2129.
- [182] Chandrasekar, J., and Silverman, S. K. (2013) Catalytic DNA with phosphatase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 5315-5320.
- [183] Camden, A. J., Walsh, S. M., Suk, S. H., and Silverman, S. K. (2016) DNA Oligonucleotide 3' -Phosphorylation by a DNA Enzyme, *Biochemistry* 55, 2671-2676.

- [184] Hollenstein, M., Hipolito, C. J., Lam, C. H., and Perrin, D. M. (2009) A self-cleaving DNA enzyme modified with amines, guanidines and imidazoles operates independently of divalent metal cations (M<sup>2+</sup>), *Nucleic Acids Res.* *37*, 1638-1649.
- [185] Joyce, G. F. (1998) Nucleic acid enzymes: Playing with a fuller deck, *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 5845-5847.
- [186] Hedstrom, L. (2002) Serine Protease Mechanism and Specificity, *Chem. Rev.* *102*, 4501-4524.
- [187] Ameta, S., and Jaschke, A. (2013) An RNA catalyst that reacts with a mechanistic inhibitor of serine proteases, *Chem. Sci.* *4*, 957-964.
- [188] Bernardi, L., Fochi, M., Comes Franchini, M., and Ricci, A. (2012) Bioinspired organocatalytic asymmetric reactions, *Org. Biomol. Chem.* *10*, 2911-2922.
- [189] Lindbäck, E., Zhou, Y., Pedersen, C. M., and Bols, M. (2012) Artificial enzymes based on cyclodextrin with phenol as the catalytic group, *Tetrahedron Lett.* *53*, 5023-5026.
- [190] Salvio, R., Cacciapaglia, R., and Mandolini, L. (2011) General Base-Guanidinium Cooperation in Bifunctional Artificial Phosphodiesterases, *J. Org. Chem.* *76*, 5438-5443.
- [191] Radzicka, A., and Wolfenden, R. (1996) Rates of Uncatalyzed Peptide Bond Hydrolysis in Neutral Solution and the Transition State Affinities of Proteases, *J. Am. Chem. Soc.* *118*, 6105-6109.
- [192] Xu, L., Ji, C., Bai, Y., He, J., and Liu, K. (2013) DNA duplex-supported artificial esterase mimicking by cooperative grafting functional groups, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *434*, 516-520.
- [193] Ema, T., Tanida, D., Matsukawa, T., and Sakai, T. (2008) Biomimetic trifunctional organocatalyst showing a great acceleration for the transesterification between vinyl ester and alcohol, *Chem. Commun.*, 957-959.
- [194] Richter, F., Blomberg, R., Khare, S. D., Kiss, G., Kuzin, A. P., Smith, A. J. T. et al., and Baker, D. (2012) Computational Design of Catalytic Dyads and Oxyanion Holes for Ester Hydrolysis, *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 16197-16206.
- [195] Matsumoto, M., Lee, S. J., Waters, M. L., and Gagné, M. R. (2014) A Catalyst Selection Protocol That Identifies Biomimetic Motifs from  $\beta$ -Hairpin Libraries, *J. Am. Chem. Soc.* *136*, 15817-15820.

- [196] Kirby, A. J. (1996) Enzyme Mechanisms, Models, and Mimics, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **35**, 706-724.
- [197] Albada, H. B., and Liskamp, R. M. J. (2008) TAC-Scaffolded Tripeptides as Artificial Hydrolytic Receptors: A Combinatorial Approach Toward Esterase Mimics, *J. Comb. Chem.* **10**, 814-824.
- [198] Atassi, M. Z., and Manshouri, T. (1993) Design of peptide enzymes (pepzymes): surface-simulation synthetic peptides that mimic the chymotrypsin and trypsin active sites exhibit the activity and specificity of the respective enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8282-8286.
- [199] Corey, D. R., and Phillips, M. A. (1994) Cyclic peptides as proteases: a reevaluation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4106-4109.
- [200] Wells, J. A., Fairbrother, W. J., Otlewski, J., Laskowski, M., and Burnier, J. (1994) A reinvestigation of a synthetic peptide (TrPepz) designed to mimic trypsin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 4110-4114.
- [201] Katakya, R., and Morgan, E. (2003) Potential of enzyme mimics in biomimetic sensors: a modified-cyclodextrin as a dehydrogenase enzyme mimic, *Biosensors and Bioelectronics* **18**, 1407-1417.
- [202] Breslow, R. (1995) Biomimetic Chemistry and Artificial Enzymes: Catalysis by Design, *Acc. Chem. Res.* **28**, 146-153.
- [203] D'Souza, V. T., Hanabusa, K., O'Leary, T., Gadwood, R. C., and Bender, M. L. (1985) Synthesis and evaluation of a miniature organic model of chymotrypsin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**, 727-732.
- [204] Taylor, M. S., and Jacobsen, E. N. (2006) Asymmetric Catalysis by Chiral Hydrogen-Bond Donors, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1520-1543.
- [205] Madder, A., De Clercq, P. J., and Declercq, J.-P. (1998) Stepwise Approach toward First Generation Nonenzymatic Hydrolases, *J. Org. Chem.* **63**, 2548-2559.
- [206] Gea, A., Farcy, N., Roqué i Rossell, N., Martins, J. C., De Clercq, P. J., and Madder, A. (2006) Solid-Supported Synthesis of Highly Functionalized Tripodal Peptides with Flexible but Preorganized Geometry: Towards Potential Serine Protease Mimics, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4135-4146.
- [207] Van der Plas, S. E., Gea, A., Figaroli, S., De Clercq, P. J., and Madder, A. (2008) Synthesis of a Tripodal Scaffold for Solid Phase Synthesis of Artificial Receptors, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 1582-1588.

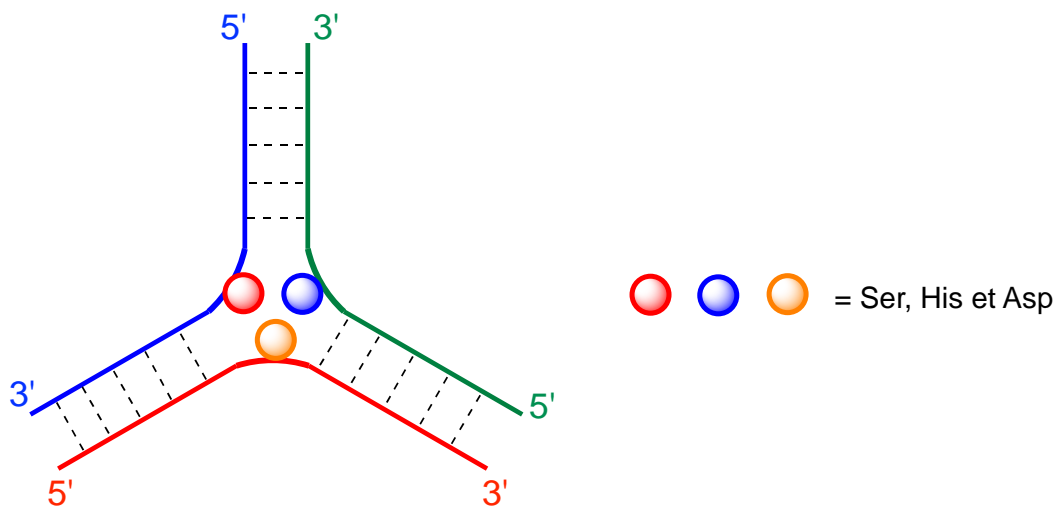
- [208] Catry, M., and Madder, A. (2007) Synthesis of Functionalised Nucleosides for Incorporation into Nucleic Acid-Based Serine Protease Mimics, *Molecules* 12, 114.
- [209] Hollenstein, M. (2013) Deoxynucleoside triphosphates bearing histamine, carboxylic acid, and hydroxyl residues - synthesis and biochemical characterization, *Org. Biomol. Chem.* 11, 5162-5172.
- [210] Silverman, S. K. (2010) DNA as a Versatile Chemical Component for Catalysis, Encoding, and Stereocontrol, *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 7180-7201.
- [211] Chandra, M., Sachdeva, A., and Silverman, S. K. (2009) DNA-catalyzed sequence-specific hydrolysis of DNA, *Nat. Chem. Biol.* 5, 718-720.
- [212] Brandsen, B. M., Hesser, A. R., Castner, M. A., Chandra, M., and Silverman, S. K. (2013) DNA-Catalyzed Hydrolysis of Esters and Aromatic Amides, *J. Am. Chem. Soc.* 135, 16014-16017.
- [213] Zhou, C., Avins, J. L., Klauser, P. C., Brandsen, B. M., Lee, Y., and Silverman, S. K. (2016) DNA-Catalyzed Amide Hydrolysis, *J. Am. Chem. Soc.* 138, 2106-2109.
- [214] Catry, M., and Madder, A. (2007) Synthesis of Functionalised Nucleosides for Incorporation into Nucleic Acid-Based Serine Protease Mimics, *Molecules* 12, 114-129.
- [215] Catry, M. A., Gheerardijn, V., and Madder, A. (2010) Surprising duplex stabilisation upon mismatch introduction within triply modified duplexes, *Bioorg. Chem.* 38, 92-97.
- [216] Hollenstein, M., Hipolito, C. J., Lam, C. H., and Perrin, D. M. (2013) Toward the Combinatorial Selection of Chemically Modified DNAzyme RNase A Mimics Active Against all-RNA Substrates, *ACS Comb. Sci.* 15, 174-182.

## **Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés**





Le projet prévoit dans un premier temps la synthèse des nucléotides convertibles et fonctionnalisés et ensuite l'introduction de ces derniers en des positions stratégiques au sein de séquences permettant la formation des structures secondaires souhaitées. Nous avons décidé de commencer par la formation de la jonction trois voies, système combinant stabilité et flexibilité<sup>1, 2</sup> grâce à l'appariement des bases et à la cavité qui accueille les modifications. De plus cette construction présente l'avantage de n'introduire qu'une seule modification par brin. La jonction a été projetée de manière à avoir une base non appariée pour chaque brin au niveau du cœur central de la jonction afin de créer une cavité plus large pouvant accueillir les fonctions chimiques supplémentaires<sup>3, 4</sup>. C'est en effet sur cette position que seront positionnés les nucléotides modifiés (Figure 29).

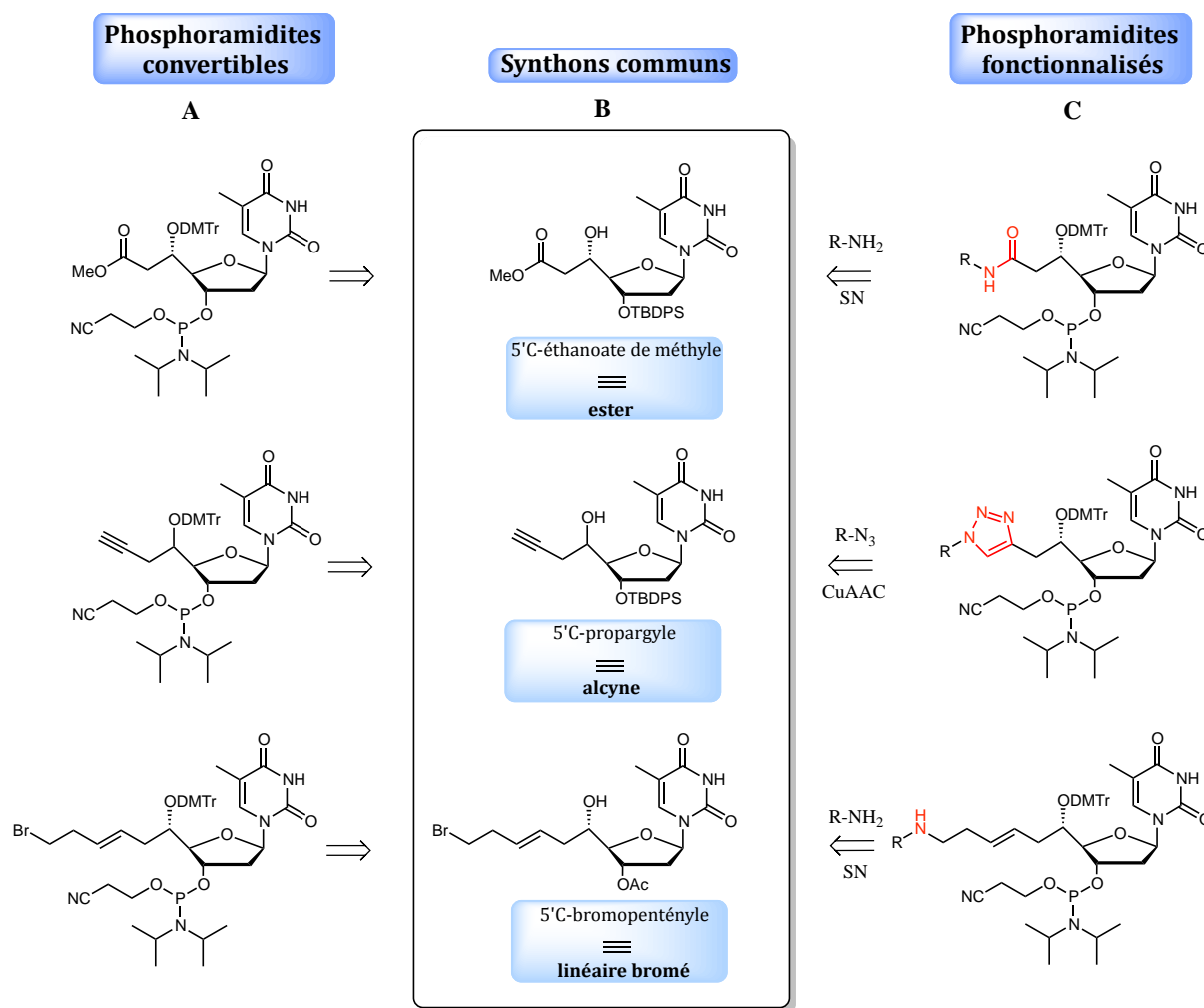


**Figure 29** : Représentation schématique d'une jonction trois voies avec les nucléotides centraux non appariés.

En tenant compte de l'expertise de notre laboratoire, nous avons décidé de focaliser notre attention sur trois composés, le 5'C-éthanoate de méthyle nommé « ester », le 5'C-propargyle nommé « alcynes » et le 5'C-bromopentényle nommé « linéaire bromé ». (Schéma 16\_B). Ces trois synthons communs peuvent être exploités à la fois pour obtenir des nucléotides convertibles (Schéma 16\_A) et des nucléotides fonctionnalisés (Schéma 16\_C). Pour répondre à nos exigences concernant la totalité des structures secondaires visées (épingles à cheveux, bulge, jonctions trois voies), il a été nécessaire d'envisager des nucléotides modifiés permettant d'introduire au sein des séquences une seule modification (comme dans le cas du type de jonction trois voie envisagée), ou plusieurs modification sur un même brin (ce qui est le cas des épingles à cheveux et des bulges). Pour cela le choix de la nature des nucléotides modifiés à utiliser

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés

a été un point fondamental pour l'avancée du projet. Afin de faciliter les étapes de synthèse, les nucléotides modifiés ont été réalisés en série thymidine pour des raisons de coût des nucléosides de départ, et car cette base ne nécessite pas d'étapes de protection/déprotection supplémentaires.



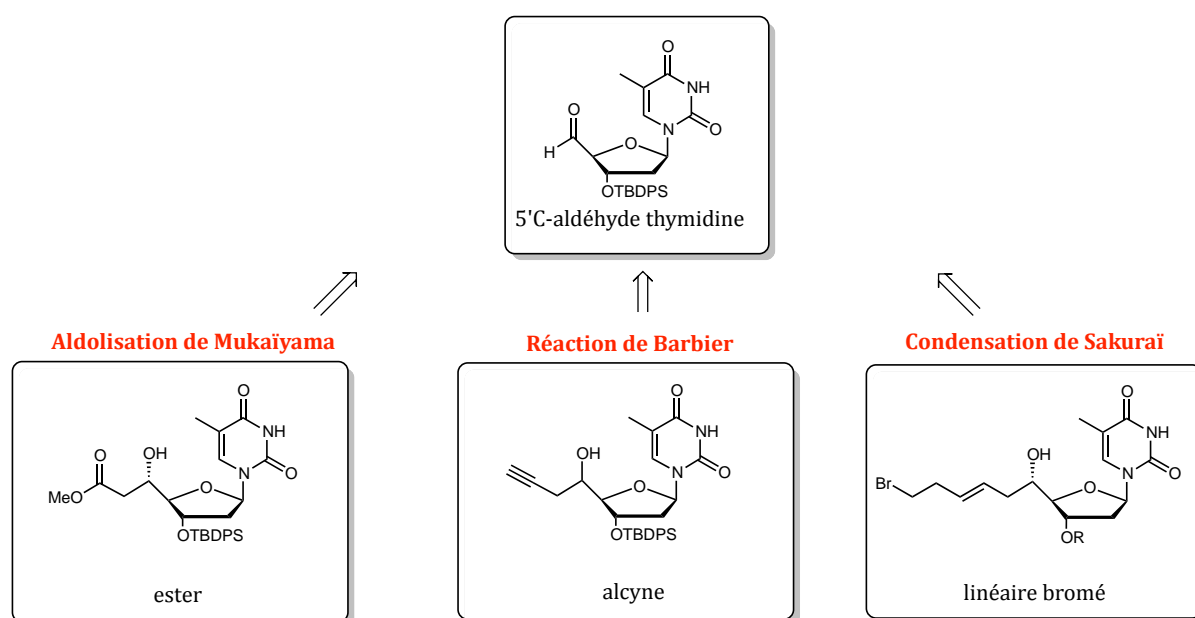
**Schéma 16** : Nucléotides convertibles et fonctionnalisés obtenus à partir des trois synthons communs ester, alcyne et linéaire bromé.

L'ester permet la formation d'un lien amide par substitution nucléophile ce qui confère au nucléotide obtenu un caractère de mime de la liaison peptidique accrue. L'alcyne, permet une fonctionnalisation par réaction click de cycloaddition catalysée par du cuivre I (CuAAC). Le lien triazole formé, au caractère hydrophobe, peut favoriser des interactions supplémentaires de  $\pi$ -stacking ainsi que conférer de la rigidité aux brins. Enfin, le linéaire bromé peut être fonctionnalisé ou conjugué par substitution nucléophile directe de l'atome de brome, ou par substitution électrophile après

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés

conversion de ce dernier en amine par exemple. Ce nucléotide, grâce une longue chaîne carbonée, permet d'apporter un caractère hydrophobe supplémentaire aux séquences et la longueur de la chaîne confère de la flexibilité aux substituants. L'ester, l'alcyne et le linéaire bromé permettent aussi d'obtenir des nucléotides convertibles portant les fonctions chimiques correspondantes. Nous souhaitons mettre l'accent sur la nature de ces derniers. En effet les nucléotides convertibles envisagés obtenus à partir de l'alcyne et du linéaire bromé sont conjuguables de manière orthogonale permettant donc une fonctionnalisation multiple sur un même brin. Le phosphoramidite convertible obtenu à partir de l'ester est en effet bivalent car il peut être conjugué par substitution nucléophile mais peut aussi être utilisé en tant que nucléotide fonctionnalisé par une fonction acide carboxylique masquée sous forme d'ester.

Nous avons choisi de travailler sur ces trois composés, d'une part pour la différence fonctionnelle qu'ils permettent d'apporter aux oligonucléotides, et d'autre part car ils sont obtenus à partir d'un seul et même composé, le nucléoside 5'C-aldéhyde thymidine qui conduit par aldolisation de Mukaiyama à l'ester, par réaction de Barbier à l'alcyne et par condensation de Sakurai au linéaire bromé (Schéma 17).

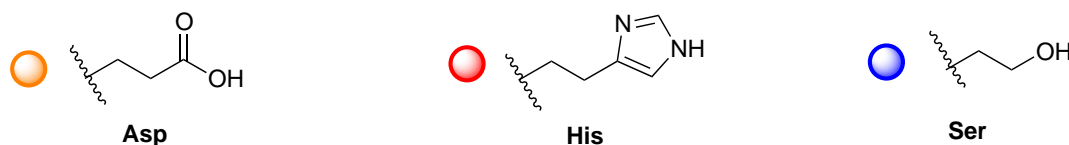


**Schéma 17 :** Schéma rétrosynthétique des trois synthons ester, alcyne et linéaire bromé synthétisés à partir de la 5'C-aldéhyde thymidine commune aux nucléotides convertibles et fonctionnalisés.

Les fonctions chimiques à introduire sur les nucléotides convertibles, après avoir été incorporés au sein de séquence d'ADN, et sur les nucléosides à fonctionnaliser, sont

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés

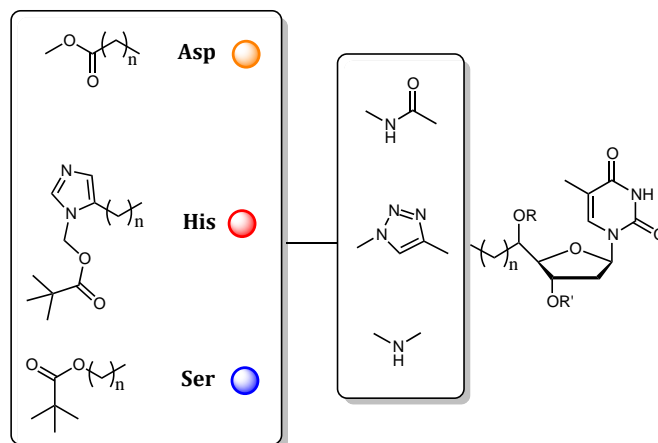
des analogues des chaînes latérales de la triade catalytique des protéases à serine, l'acide aspartique (Asp), l'histidine (His) et la serine (Ser) (Figure 30).



**Figure 30 :** Chaînes latérales de l'histidine (His), l'aspartate (Asp) et la serine (Ser).

Les équivalents synthétiques correspondants aux trois conversions (azoture pour la CuAAC et amine pour les substitutions nucléophiles) ont été utilisés.

Pour des raisons liées à la stratégie de synthèse et aux contraintes de la synthèse automatisée des oligonucléotides, les fonctions potentiellement réactives, le N-H du noyau imidazole du mime de l'histidine, l'OH de la fonction acide carboxylique du mime de l'aspartate et l'hydroxyle du mime de la serine ont été protégées par les groupements protecteurs pivaloyloxyméthyl (PivOM), pivaloyle (Piv) et ester de méthyle respectivement. (Figure 31).



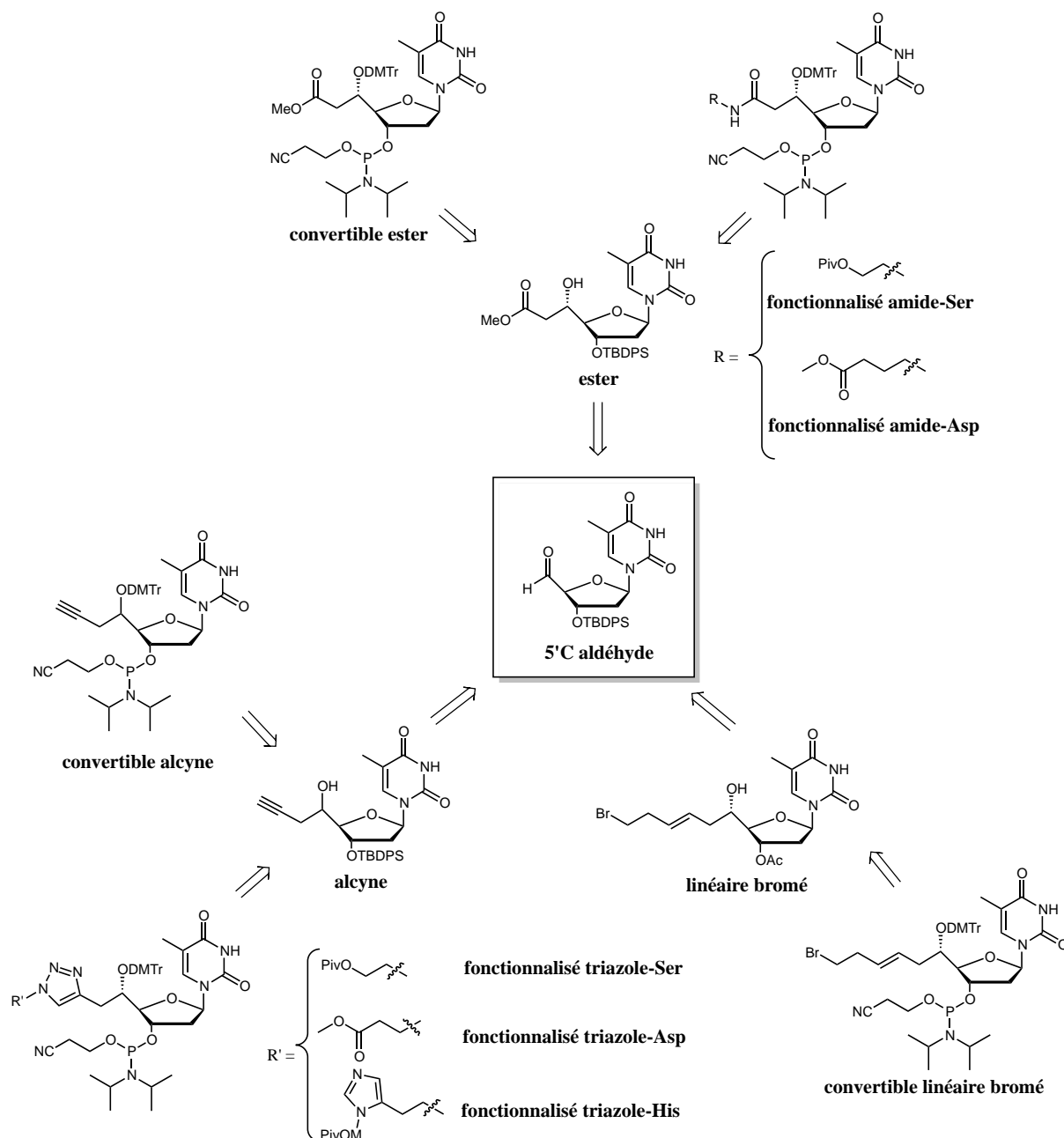
**Figure 31 :** Nucléotides fonctionnalisés avec groupements protecteurs.

Les groupements protecteurs ont été choisis de manière à être orthogonaux au *tert*-butyldiphénylsilyléther (TBDPS) en position 3', groupe protecteur sensible aux ions fluorure, présent sur les synthons communs, et de manière à résister aux étapes de synthèse supportée. L'ester de méthyle est un groupement facilement hydrolysable par traitement avec de la lithine (solution aqueuse de LiOH). Les groupements Piv et PivOM peuvent être éliminés par traitement ammoniacal. Dans le cas des nucléotides fonctionnalisés, après incorporation au sein des séquences, la déprotection est effectuée

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés

simultanément au décrochage de l'oligonucléotide du support et de la déprotection des bases azotées.

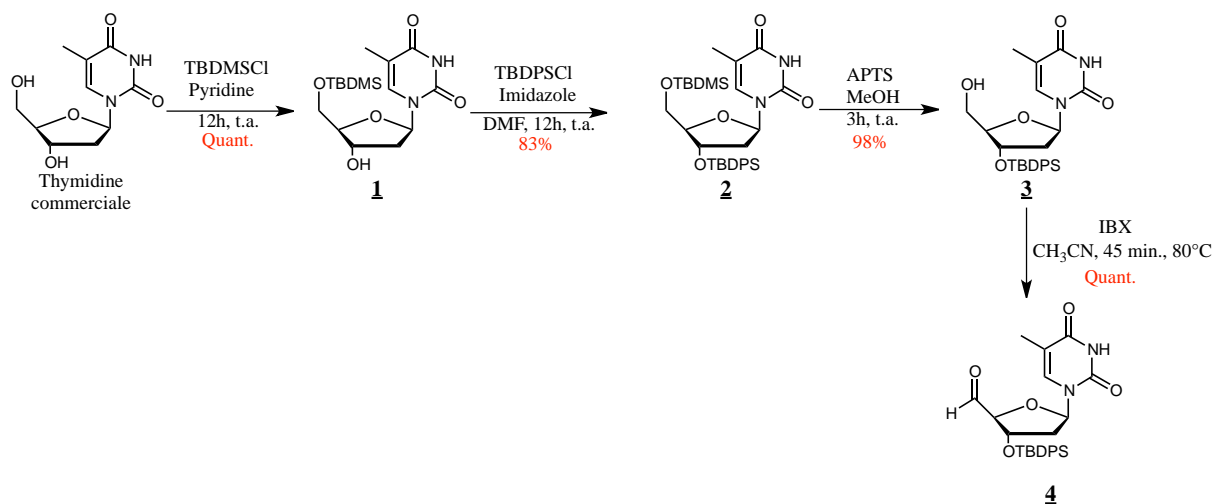
Le Schéma 18 représente une analyse rétrosynthétique des composés qui seront présentés dans cette partie.



**Schéma 18** : Schéma rétrosynthétique de tous les nucléotides convertibles et fonctionnalisés synthétisés.

### I) Synthèse de la thymidine aldéhyde

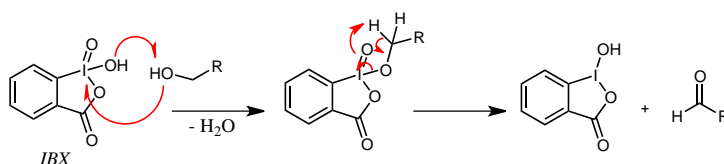
Le synthon clé de départ de tous les produits synthétisés est la thymidine 5'C-aldéhyde **4**. La synthèse de ce composé a déjà été développée au laboratoire<sup>5</sup> et est réalisée en suivant une séquence de quatre étapes à partir de la thymidine commerciale (Schéma 19)



**Schéma 19** : Synthèse de la thymidine aldéhyde **4**.

La synthèse débute par une protection sélective de l'alcool primaire sur le carbone 5' avec un groupement protecteur silylé le *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS) suivie par la protection du deuxième hydroxyle libre secondaire en position 3' avec un autre groupement silylé plus encombré le TBDPS. Cette séquence permet la déprotection sélective de l'alcool primaire sur le carbone en 5' du composé **2** par traitement avec de l'acide *para*-toluènesulfonique (APTS) dans du méthanol. Une étape d'oxydation finale conduit à la thymidine aldéhyde **4** avec un très bon rendement global de 81%. L'optimisation de cette dernière étape d'oxydation a été effectuée. En effet, effectuée au préalable par une réaction de Moffatt-Pfitzner en utilisant la dicyclocarbodiimide (DCC) et l'acide dichloroacétique dans le DMSO, l'aldéhyde **4** était obtenu avec un rendement brut de 82%. Cependant, la formation de la dicyclohexylurée, sous produit de la réaction difficile à séparer de **4**, et du diméthylsulfure (DMS) malodorant rendait ce procédé peu attrayant. Grâce à l'utilisation de l'acide 2-iodoxybenzoïque (IBX) (Schéma 20), la dernière étape d'oxydation devient quantitative, et nous permet d'augmenter le

rendement global de la réaction, de diminuer les temps de réactions et de récupérer le composé **4** pur par simple filtration (Schéma 19).



**Schéma 20 : Mécanisme d'oxydation avec l'IBX.**

Une synthèse à plus grande échelle a été possible pour cette synthèse, en passant de 1 g à 100 g de thymidine de départ utilisés démontrant l'intérêt d'optimiser les étapes afin d'utiliser des méthodes de purification aisées.

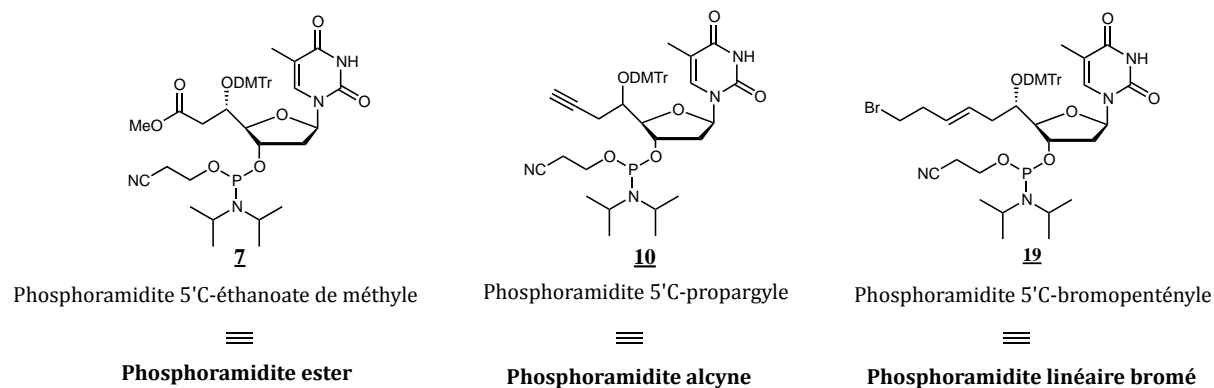
A partir de **4** il a été possible d'obtenir tous les nucléotides convertibles et fonctionnalisés. Dans la partie qui suit est présentée la synthèse des unités convertibles et ensuite celle des unités fonctionnalisées.

## II) La synthèse des nucléotides convertibles

Les unités convertibles sont des nucléotides modifiés portant une fonction chimique réactive permettant une fonctionnalisation après introduction au sein d'une séquence d'oligonucléotides. Dans le cadre de cette approche il est nécessaire que cette modification soit compatible avec toutes les étapes de synthèse du brin oligonucléotidique, et qu'elle soit réactive après introduction sur un brin dans des conditions qui ne perturbent pas la stabilité de ce dernier. Les trois nucléotides convertibles obtenus sont le phosphoramidite 5'C-éthanoate de méthyle (phosphoramidite ester) **7**, le phosphoramidite 5'C-propargyle (phosphoramidite alcyne) **10** et le phosphoramidite 5'C-bromopentényle (phosphoramidite linéaire bromé) **19** (Figure 32).

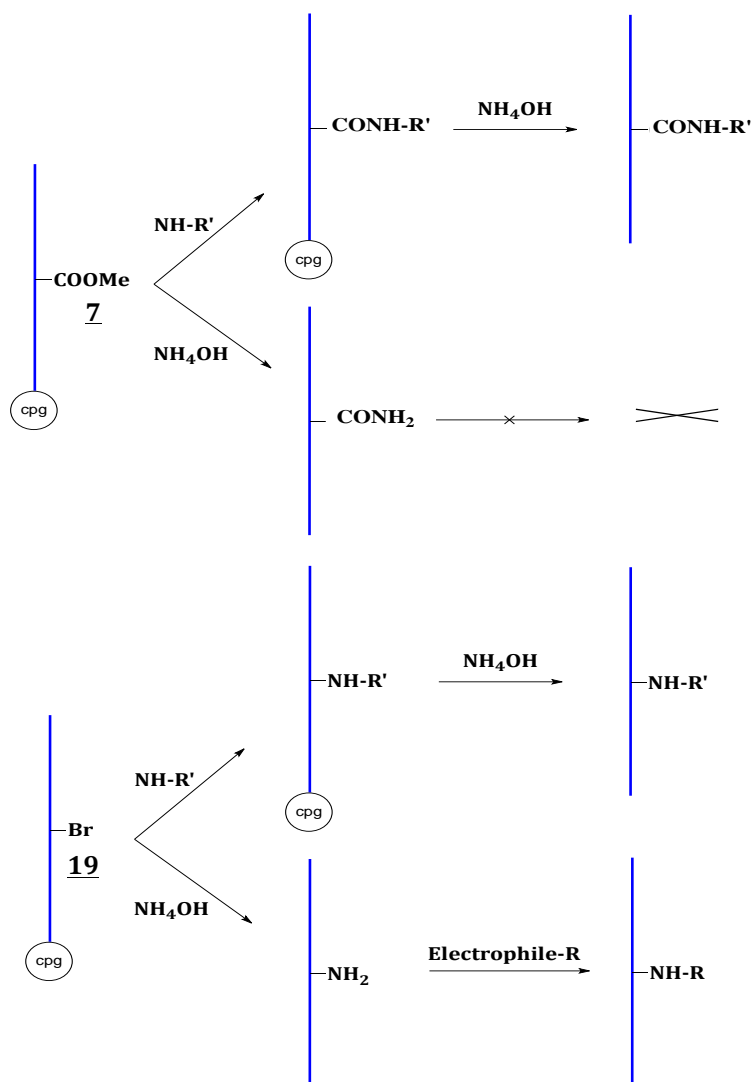


## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés



**Figure 32** : Phosphoramidites convertibles synthétisés.

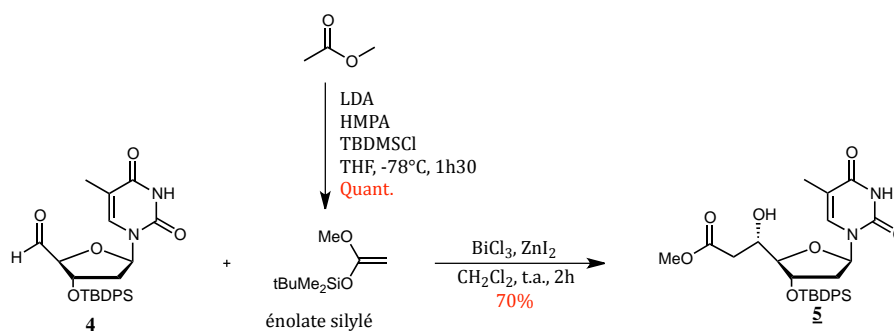
Afin que tous les critères précités soient respectés, des précautions sont à envisager lors de l'utilisation des phosphoramidites **7** et **19**. En effet, avec le phosphoramidite ester **7** la conjugaison post synthèse automatisée doit se faire avant le traitement ammoniacal final qui permet de décrocher la séquence du support solide car l'ammoniaque va substituer le méthylate en formant ainsi un amide terminal incapable de réagir ultérieurement (Schéma 21 à gauche). Dans le cas du phosphoramidite halogéné **19** le traitement ammoniacal induit la substitution de l'atome de brome par un NH<sub>2</sub> nucléophile. Dans ce cas la substitution conjugaison par substitution nucléophile serait toujours envisageable mais en inversant les rôle du nucléophile et de l'électrophile (Schéma 21, à droite).



**Schéma 21 :** Effet du traitement ammoniacal final pré ou post conjugaison sur une séquence obtenue avec un phosphoramidite ester **7** (en haut) et une séquence obtenue avec un phosphoramidite linéaire bromé **19** (en bas).

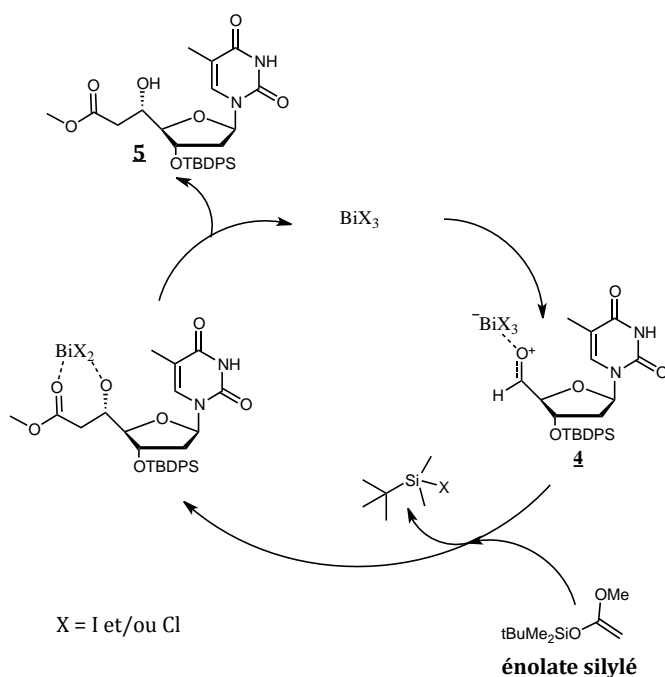
### II.1) Synthèse du phosphoramidite ester

L'introduction de la fonction ester peut être obtenue *via* la réaction d'aldolisation de Mukaiyama en faisant réagir l'aldéhyde **4** avec l'énolate silylé *tert*-butyl((1-méthoxyvinyl)oxy)diméthylsilane. Ce dernier est synthétisé à partir de l'acétate de méthyle, du diisopropylamide de lithium (LDA), du chlorure de *tert*ibutyl diméthylsilyle (TBDMSCl), en présence de hexaméthylphosphoramide (HMPA) (Schéma 22).



**Schéma 22 : Aldolisation de Mukaiyama catalysée par Bi(III).**

L'aldolisation de Mukaiyama est un processus catalytique qui ici a lieu en présence de trichlorure de bismuth (BiCl<sub>3</sub>) activé par un iodure métallique comme l'iodure de zinc (ZnI<sub>2</sub>) qui *in situ* par réaction d'échange d'halogènes forment l'espèce active mixte BiCl<sub>x</sub>I<sub>3-x</sub><sup>6</sup>.



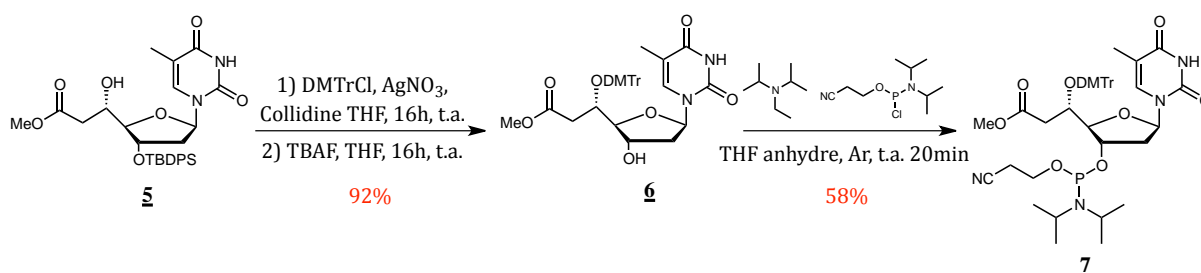
**Schéma 23 : Mécanisme d'aldolisation de Mukaiyama.**

L'acide de Lewis formé *in situ* se coordonne au groupement carbonyle de l'aldéhyde **4** qui subit un attaque nucléophile de la part de l'énolate. Un traitement final aqueux permet de récupérer le produit d'aldolisation **5** (Schéma 23). Il est à noter que si ce type de réaction est réalisée avec un énolate portant un groupement silylé moins encombrant comme le SiMe<sub>3</sub>, un adduit avec l'hydroxyle protégé par le groupement silylé est formé.

La présence du TBDMS beaucoup plus encombrant nous permet d'obtenir le composé souhaité ester **5** non protégé.

Concernant la stéréochimie, théoriquement, en suivant les modèles de Felkin <sup>7</sup> et Cram<sup>8</sup>, les deux diastéréoisomères peuvent être obtenus, néanmoins ce processus est diastéréospécifique permettant l'obtention de l'adduit *syn* uniquement, le composé *S* **5**. Cette même réaction a été effectuée auparavant au laboratoire sur des nucléosides en base uracile. Dans ce cas, effectivement, le mélange de diastéréoisomères est observé mais avec une nette majorité du diastéréoisomère *S* par rapport au *R* (90 : 10 respectivement)<sup>9</sup>. Le remplacement du groupement protecteur sur le OH en 3' par un TBDMS à la place du TBDPS, induit également la formation du diastéréoisomère *R* mais toujours en nette minorité (5%). La diastéréosélectivité peut être inversée (jusqu'à un rapport 19 : 1 *R* : *S*) en utilisant un énolate silylé lithié, mais cela est accompagné d'une baisse du rendement global de la réaction (45%)<sup>5</sup>. Les modèles de Felkin et Cram, ne tenant pas compte des contraintes liées aux conformations des substrats lorsque ces derniers sont très complexes, ne peuvent pas être utilisés pour rationaliser ces résultats. Nous expliquons ces derniers par le moindre encombrement stérique dans le cas du TBDMS et par une contrainte moins importante du ribose ou désoxyribose dans le cas de la base uridine.

Pour des raisons liées à la synthèse d'oligonucléotides automatisée sur support solide, il est nécessaire de protéger la fonction OH en position 5' par un groupement 4,4'-diméthoxytrityle (DMTr) en faisant réagir le substrat avec le chlorure de 4,4'-diméthoxytrityle en présence d'AgNO<sub>3</sub> et de la collidine. La déprotection du OH en 3' est ensuite effectuée par traitement avec le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF) et, après purification sur colonne de silice, le composé **6** est converti en phosphoramidite **7** par réaction avec de la diisopropyléthylamine et le 2-cyanoéthyle-*N,N*-diisopropylamino-chlorophosphite (Schéma 24).



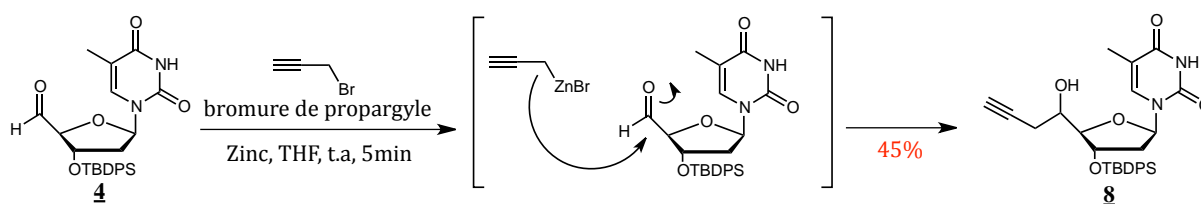
**Schéma 24** : Synthèse du phosphoramidite **7** à partir de l'ester **5**.

La formation du produit désiré a été confirmée par l'analyse du spectre de masse ainsi que par spectroscopie RMN du phosphore ( $^{31}\text{P}$ ) qui indique deux signaux à 148,6 ppm et 150,1 ppm correspondants aux deux diastéréoisomères due à la présence de l'atome de phosphore.

## II.2) Synthèse du phosphoramidite alcyne

Dans la littérature sont déjà rapportés des exemples d'ajouts d'une fonction propargyle sur des nucléotides<sup>10</sup>. Les plus courantes se retrouvent au niveau de la base azotée notamment sur des bases pyrimidiques en position 5 reliée directement au cycle ou par le biais de chaînes aliphatiques<sup>11, 12</sup>. L'équipe de Vasseur et Morvan a introduit une fonction alcyne au niveau du lien phosphodiester par le biais de bras aliphatique ou d'éthylène glycol<sup>13, 14</sup>. Les positions 2'<sup>15</sup> et 3'<sup>16</sup> ont aussi été exploitées.

La synthèse du phosphoramidite alcyne **10** a été mise au point au sein du laboratoire en 2010<sup>17</sup>. La synthèse de ce phosphoramidite commence par une réaction de Barbier entre l'aldéhyde **4** et le bromure de propargyle transformé en organozincique en présence de zinc activé (Schéma 25).



**Schéma 25** : Réaction de Barbier sur l'aldéhyde **4**.

Le nucléoside propargyle **8** est obtenu en mélange diastéréoisomérique en rapport 70 : 30 comme confirmé par spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  par intégration des protons  $\text{H}_{1'}$  des deux produits obtenus **8a** et **8b** (Figure 33).

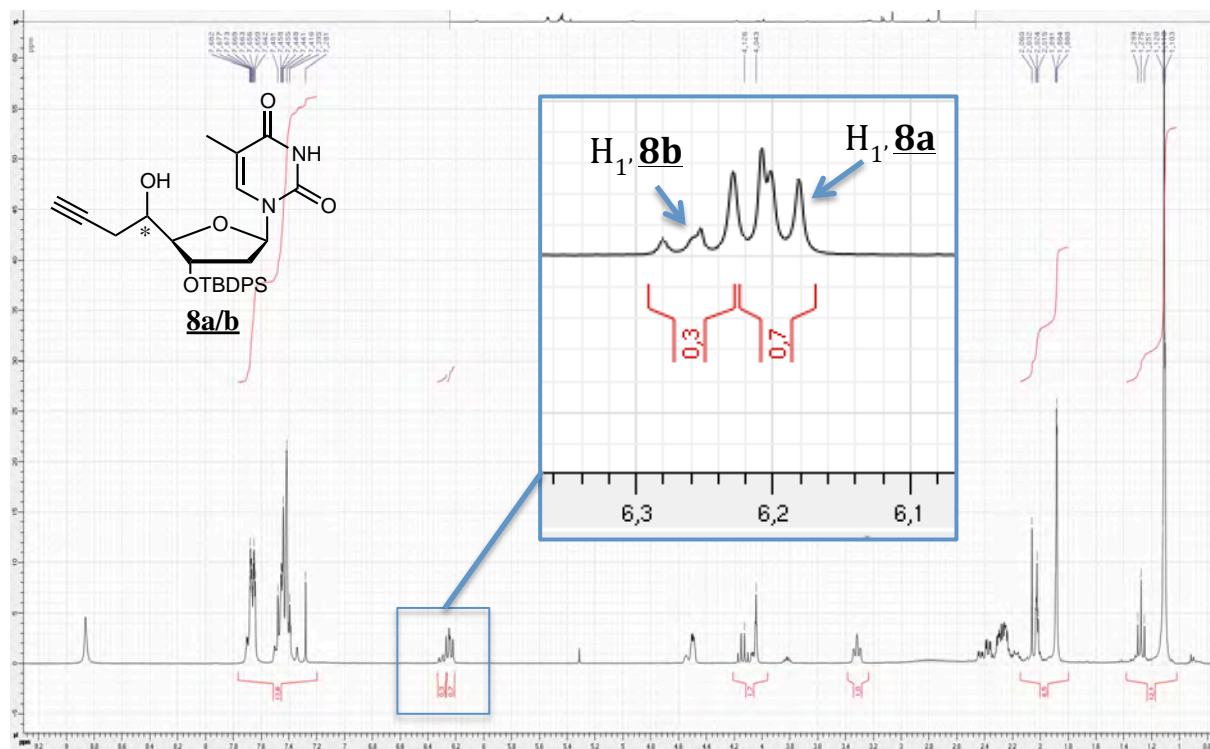


Figure 33 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) du mélange de diastéréoisomères **8**.

Par rapport aux travaux précédemment publiés<sup>17</sup>, des conditions de séparation du mélange ont pu être mises au point. Les deux diastéréoisomères ont été séparés par chromatographie préparative sur colonne de silice HPLC. A cause de la difficulté de séparation des deux diastéréoisomères ( $\Delta R_f < 0,1$ ) la méthode de multi-injections séquentielles (100 mg/mL pour un total de 3g environ) s'est révélée la plus efficace (Figure 34).

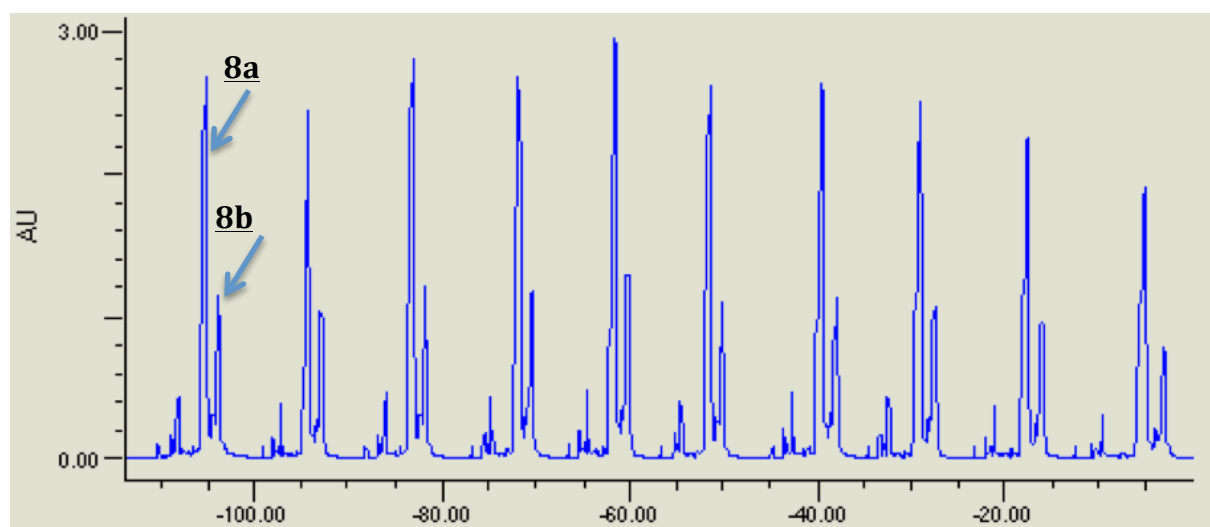
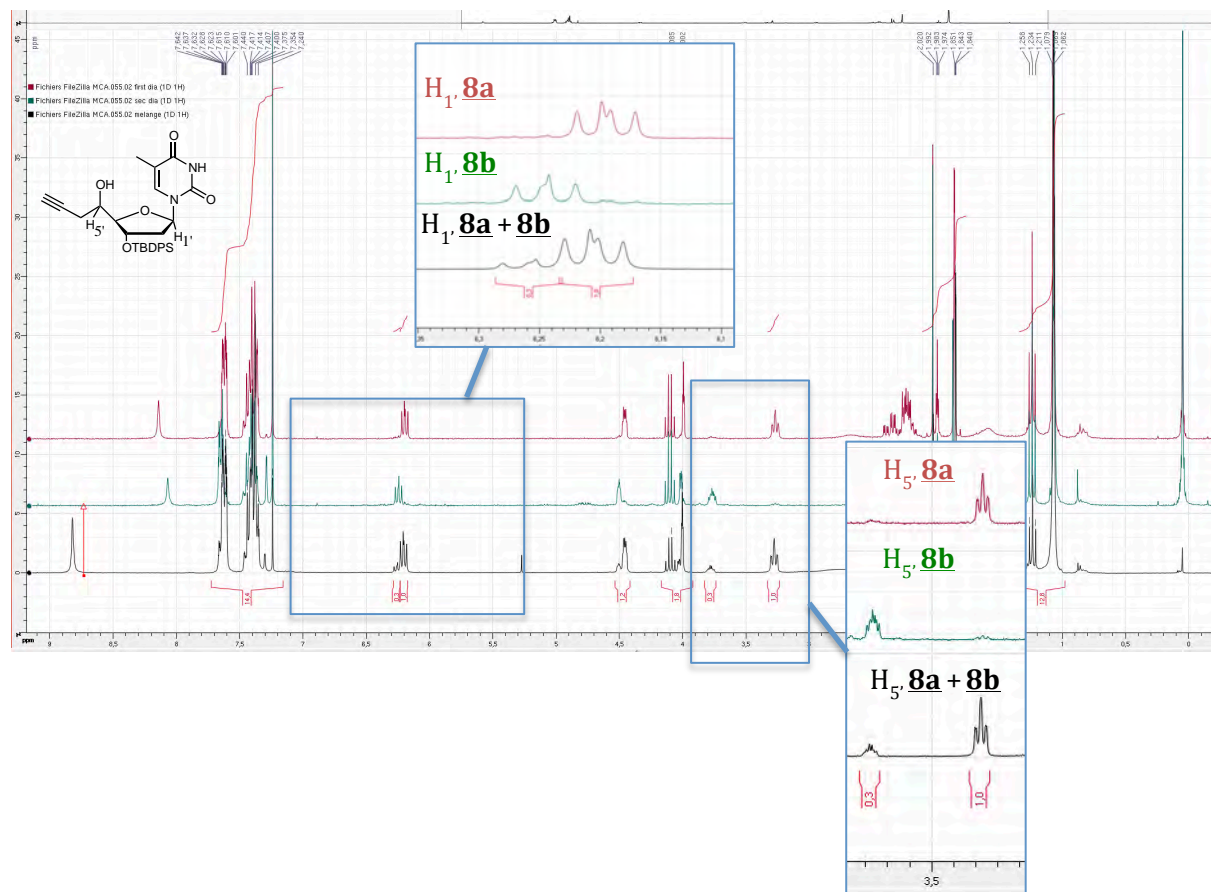


Figure 34 : Profil chromatographique de séparation des deux diastéréoisomère de **8a** et **8b**.

Le profil chromatographique enregistré montre une bonne reproductibilité des injections et l'analyse des spectres RMN du proton permet de confirmer la bonne séparation des deux diastéréoisomères (Figure 35).



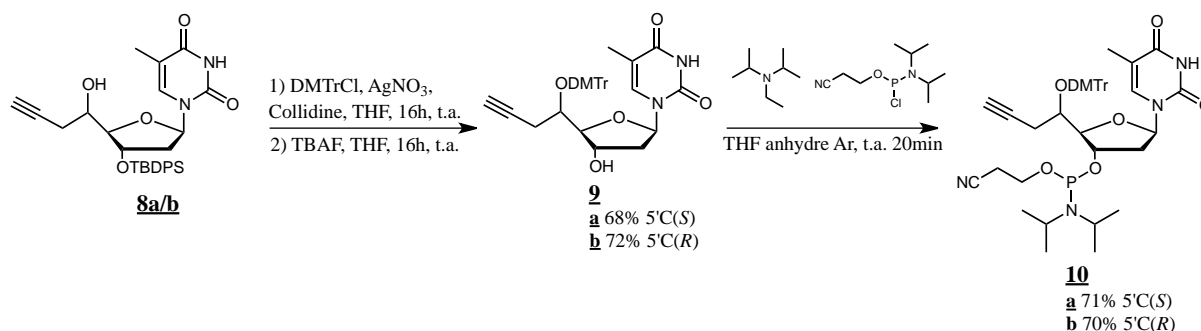
**Figure 35** : Superposition des spectres RMN du mélange des deux diastéréoisomères **8a** + **8b** (en noir) avec le **8a** (en rouge) et le **8b** (en vert).

Chaque spectre montre qu'un seul nucléoside est présent, avec les déplacements chimiques correspondants aux H<sub>1'</sub> à 6,27 ppm pour **8a** et 6,34 ppm pour **8b**. En particulier les signaux des protons H<sub>5'</sub> (3,27 ppm pour **8a** et 3,77 ppm pour **8b**), ont des déplacements chimiques différents en raison de la présence du centre stéréogène.

La stéréochimie *S* du produit majoritaire **8a** a été confirmée après hydrogénation en présence du catalyseur de Lindlar en l'alcool 5'C-allylthymidine correspondant. Le spectre RMN <sup>1</sup>H de ce composé a été comparé avec celui du 5'C(*S*)-allylthymidine précédemment synthétisé au laboratoire et dont la stéréochimie avait été déterminée<sup>18</sup>.

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés

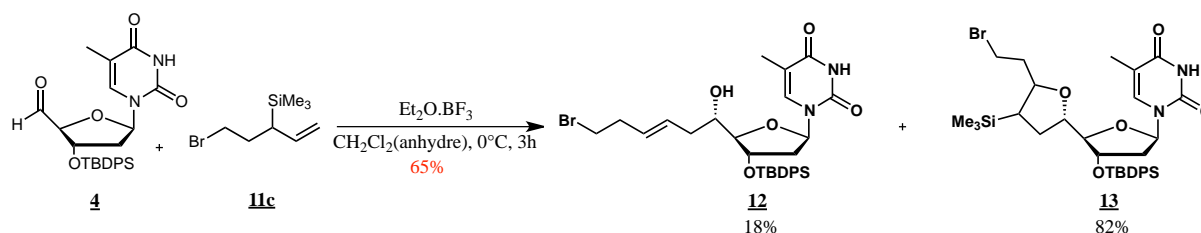
L'hydroxyle en position 5' des deux diastéréoisomères **8a(S)** et **8b(R)** a été protégé par un groupement protecteur DMTr dans les mêmes conditions que précédemment, puis l'hydroxyle en position 3' a été déprotégé. Les alcynes **9a** et **9b** obtenus ont été ensuite convertis en leurs phosphoramidites correspondants **10a** et **10b** dont la formation a été confirmée par spectroscopie RMN <sup>31</sup>P avec deux signaux à 149,7 ppm et 148,8 ppm pour **10a** et à 148,3 ppm et 148,2 ppm pour **10b** (Schéma 26).



**Schéma 26** : Introduction du groupement protecteur DMTr sur le OH en position 5' (**1**), déprotection du OH en position 3' (**2**) et formation des phosphoramidites **10a** et **10b** à partir des composés **8a** et **8b**.

### II.3) Synthèse du phosphoramidite linéaire bromé

La réaction clé pour la synthèse du phosphoramidite 5'C-bromopentényle **19** est la condensation de Sakurai<sup>19</sup> entre l'aldéhyde **4** et l' $\omega$ -bromo-allyltriméthylsilane **11c** (Schéma 27).



**Schéma 27** : Condensation de Sakurai sur l'aldéhyde **4** avec l' $\omega$ -bromo-allyltriméthylsilane **11c**.

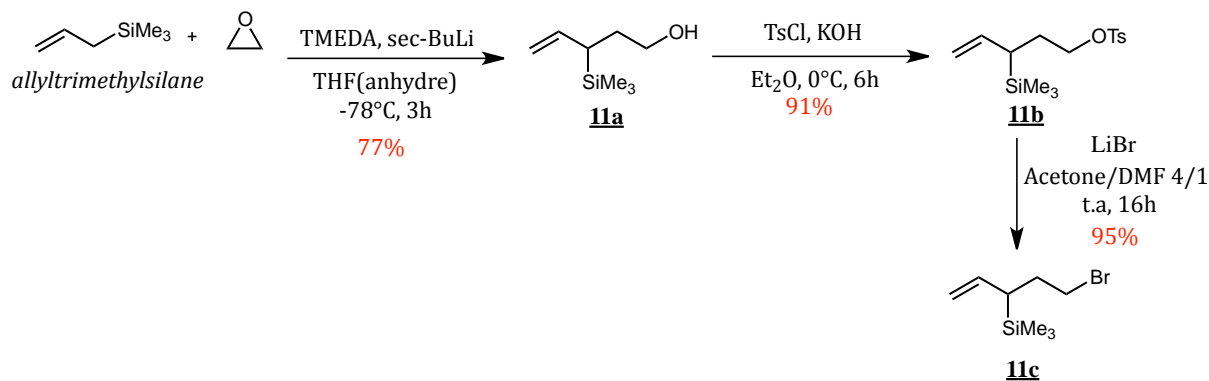
Cette réaction permet la formation de liaisons carbone-carbone de manière stéréocontrôlée par la condensation d'un allylsilane chiral sur un composé carbonyle<sup>20</sup> en présence d'éthérate de trifluorure de bore (Et<sub>2</sub>O.BF<sub>3</sub>) en tant qu'acide de Lewis.

L' $\omega$ -bromo-allyltriméthylsilane **11c** est obtenu à partir de l'allyltriméthylsilane qui, traité par un organolithien, le *sec*-BuLi, en présence de triméthyléthylènediamine



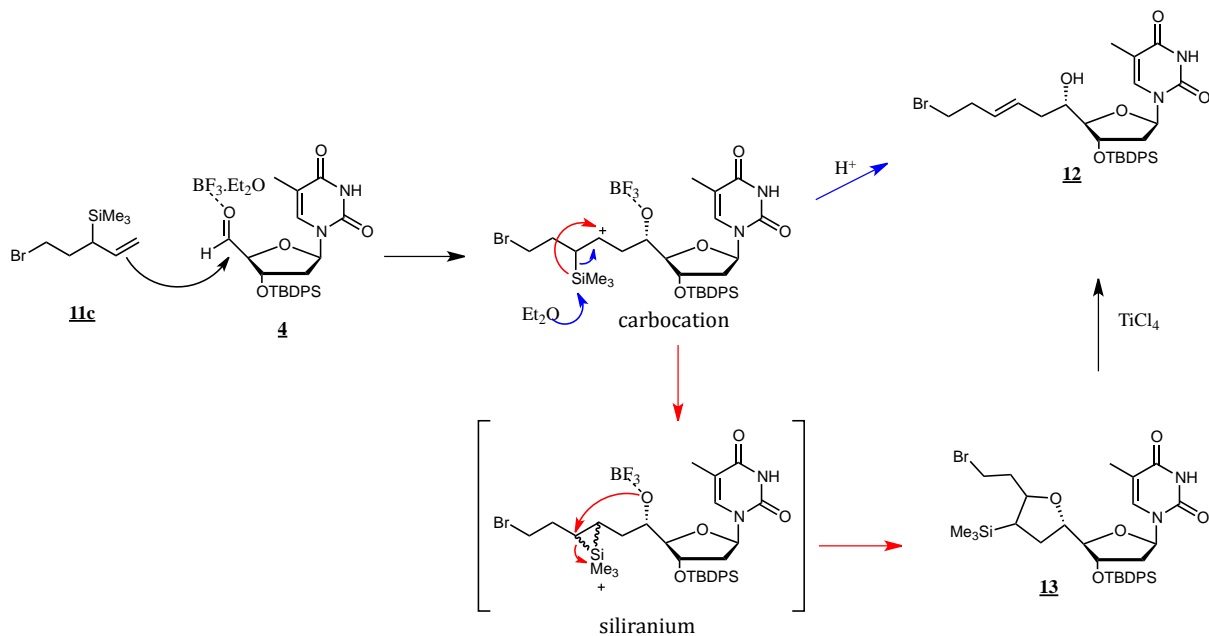
## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés

(TMEDA), s'additionne sur l'oxyde d'éthylène. La fonction hydroxyle est alors convertie en groupement tosyle, bon groupement partant permettant l'introduction d'un atome de brome par traitement avec LiBr (Schéma 28).



**Schéma 28 :** Synthèse du  $\omega$ -bromo-allyltriméthylsilane **11c**.

Par la réaction de Sakurai sur l'aldéhyde **4** un mélange de produits est obtenu, l'alcool homoallylique linéaire **12** et un composé cyclique de type tétrahydrofurane **13** selon les mécanismes décrits en schéma 29. Ce dernier, par traitement avec du  $\text{TiCl}_4$  peut être converti en produit linéaire.



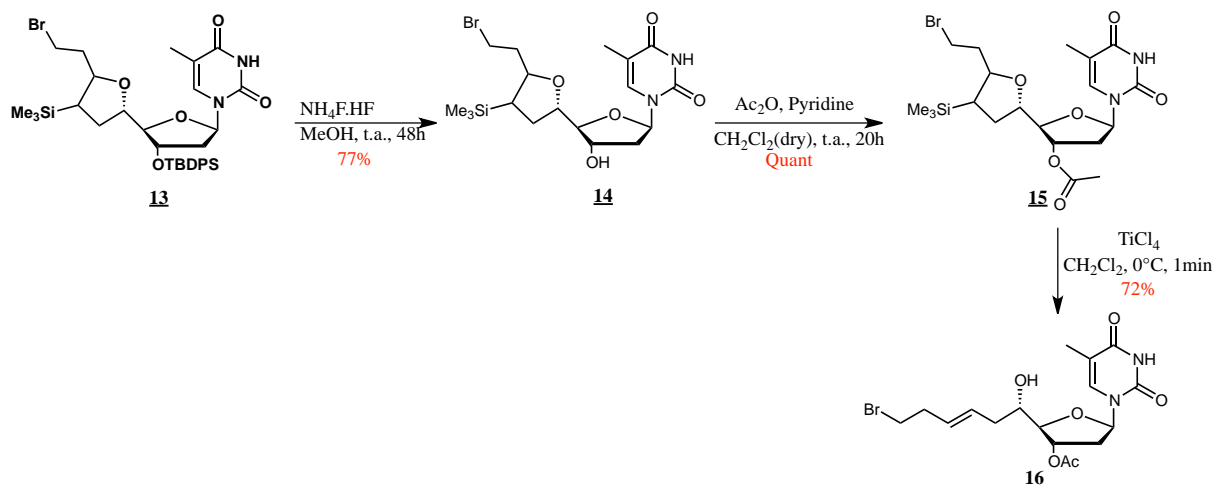
**Schéma 29 :** Mécanisme de condensation de Sakurai permettant la formation des composés **12** et **13**.

Cette condensation a été faite sur l'aldéhyde **4** en présence de  $\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{BF}_3$  dans du dichlorométhane à  $0^\circ\text{C}$  pendant trois heures. L'acide de Lewis active le groupement carbonyle de l'aldéhyde qui subit une attaque nucléophile de la part de la double liaison

de l'allylsilane. Le carbocation formé est stabilisé par effet  $\beta$  permettant la formation après hydrolyse du composé **12** et peut évoluer en formant un siliranium intermédiaire qui mène à la formation du composé cyclique **13**<sup>18</sup>.

Après l'étape de tritylation de la fonction hydroxyle en position 5', la déprotection du groupement silylé en position 3' n'a pas été possible en utilisant des ions fluorure sans induire un déplacement du brome. C'est pourquoi nous avons décidé d'exploiter le composé cyclique **13**, produit majoritaire de la condensation. Le nucléoside linéaire bromé **12** peut être toutefois exploité pour la formation de nucléotides fonctionnalisés.

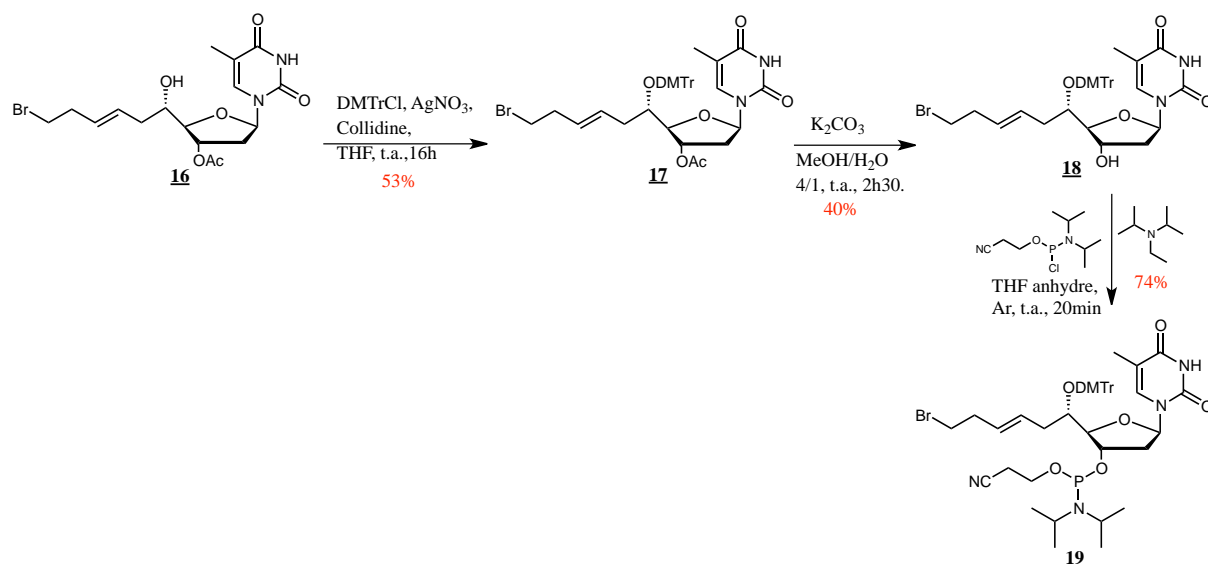
Sur le composé **13**, afin de contourner le problème d'incompatibilité entre l'atome de bore et les conditions de déprotection du TBDPS en 3', nous avons envisagé de remplacer ce dernier par un acétyle qui peut être éliminé en conditions basiques douces ( $K_2CO_3$  dans un mélange eau/méthanol) sans déplacer l'atome de brome (Schéma 30). Ainsi le composé **13**, traité dans des conditions plus douces en utilisant le  $NH_4F.HF$ , qui ne perturbe pas l'atome de brome, a permis d'obtenir le produit déprotégé **14** dont la structure a été confirmée par analyse des spectres RMN ( $^1H$  et  $^{13}C$ ) et en particulier le spectre de masse exclu le déplacement du brome par le fluor. Un traitement très rapide (1 minute) avec du  $TiCl_4$ , nous a ensuite conduit au produit linéaire **16**.



**Schéma 30** : Changement du groupement protecteur sur le OH en 3' et linéarisation à partir de **13**.

Le phosphoramidite linéaire bromé **19** a ensuite été obtenu en suivant la séquence classique d'installation prévoyant la protection de l'hydroxyle en 5', la déprotection de l'hydroxyle en position 3' et formation de la fonction phosphoramidite avec un rendement modeste de 36% sur trois étapes. (Schéma 31).

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés



**Schéma 31** : Synthèse du phosphoramidite linéaire bromé **19**.

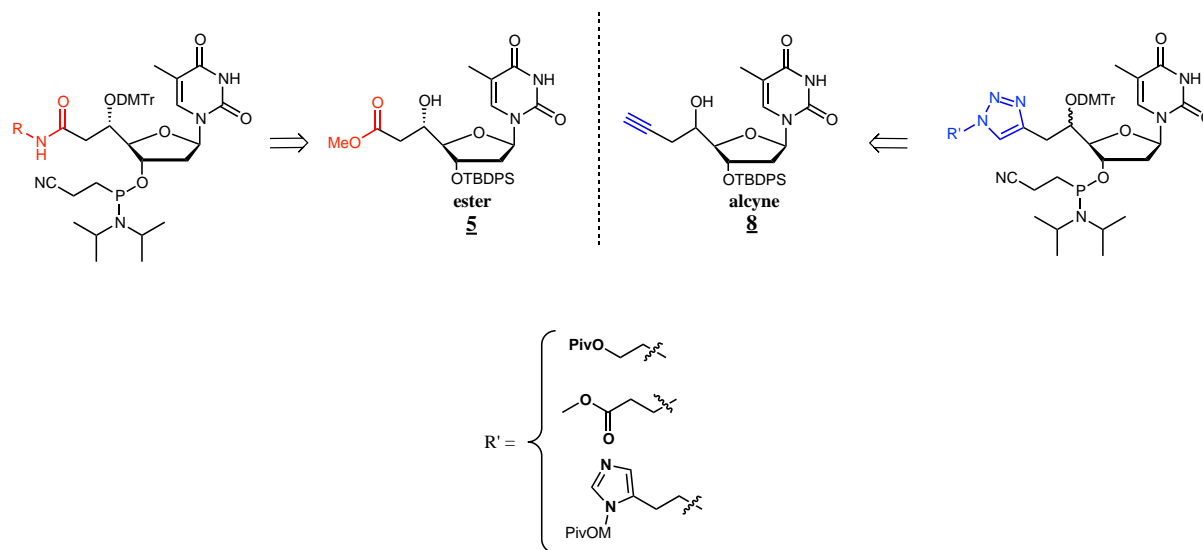
La formation du produit **19** a été confirmée par l'apparition de deux signaux à 148,6 ppm et 149,1 ppm correspondants aux deux diastéréoisomères sur le spectre RMN <sup>31</sup>P.

Les phosphoramidites convertibles **7**, **10a**, **10b** et **19** ont été obtenus purs avec des rendements globaux modestes (37% pour **7**, 15% pour **10a**, 7% pour **10b** sur 4 étapes, et 7% sur 7 étapes pour **19** à partir de l'aldéhyde **4**) mais à l'échelle du gramme et conditionnés sous atmosphère d'argon de manière fractionnée (entre 50 et 100 mg) permettant de réaliser la synthèse automatisée.

### III) Synthèse des nucléotides fonctionnalisés

Les nucléotides fonctionnalisés, tout comme les nucléotides convertibles, doivent être compatibles avec la synthèse supportée automatisée d'oligonucléotides. Comme explicité dans le schéma rétrosynthétique (Schéma 18, page 86), l'ester **5**, les alcynes **8a/b** et le linéaire bromé **12** peuvent être exploités pour synthétiser les nucléotides fonctionnalisés par les groupements chimiques mimant les chaînes latérales des acides aminés acide aspartique, serine et histidine.

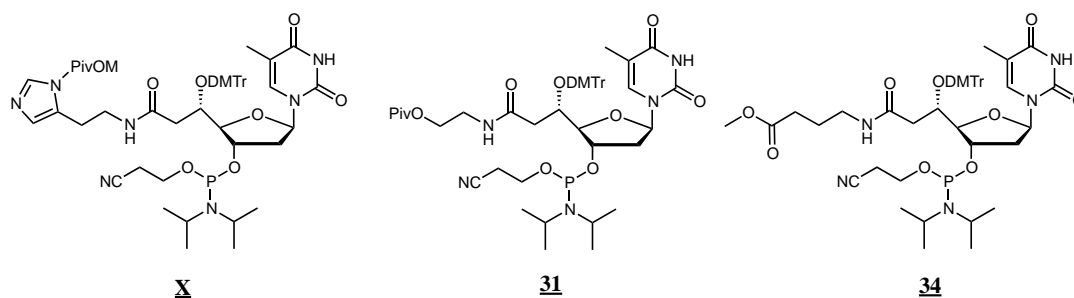
Sur les trois approches possibles pour l'obtention des nucléosides fonctionnalisés, nous ne présenterons dans ce mémoire que celles utilisant les dérivés 5'C-ester de méthyle et 5'C-S-propargyle thymidine (Schéma 32).



**Schéma 32** : Rétrosynthèse des phosphoramidites fonctionnalisés à synthétiser.

### III.1) Synthèse des phosphoramidites fonctionnalisés amides à partir du dérivé 5'C-ester de méthyle

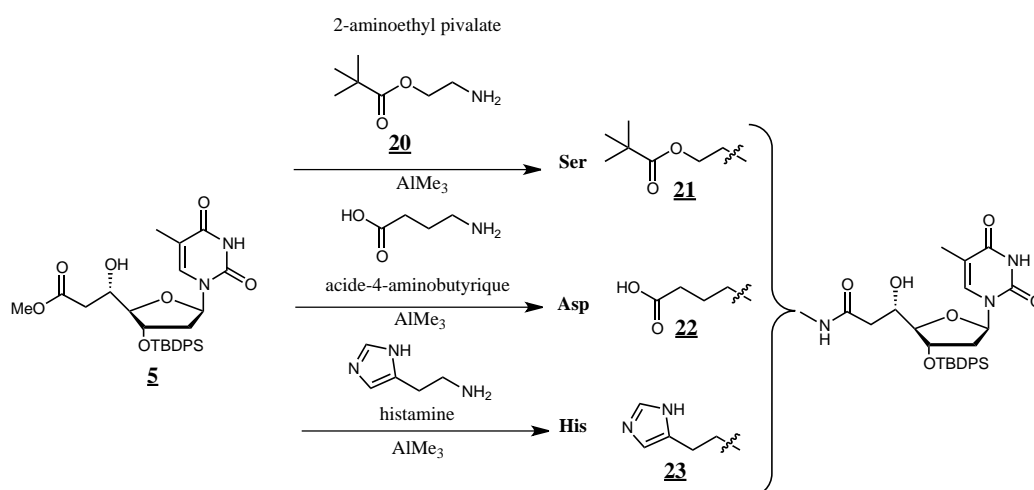
Le composé ester 5 a été utilisé afin d'obtenir des phosphoramidites fonctionnalisés portant un lien amide décrits en figure 36.



**Figure 36** : Phosphoramidites amide cibles portant un cycle imidazole mime de l'histidine, une fonction alcool mime de la serine et un acide carboxylique mime de l'acide aspartique.

La substitution nucléophile directe du groupement ester de méthyle par une amine en condition basique de triéthylamine ne nous a pas permis d'aboutir aux composés amides souhaités, aucune conversion n'ayant été observée. Pour la formation de liens amides la littérature reporte généralement des processus de couplages peptidiques impliquant un acide carboxylique et une amine. Afin éviter une étape de synthèse supplémentaire pour obtenir l'acide carboxylique à partir de l'ester, nous avons décidé d'exploiter la voie

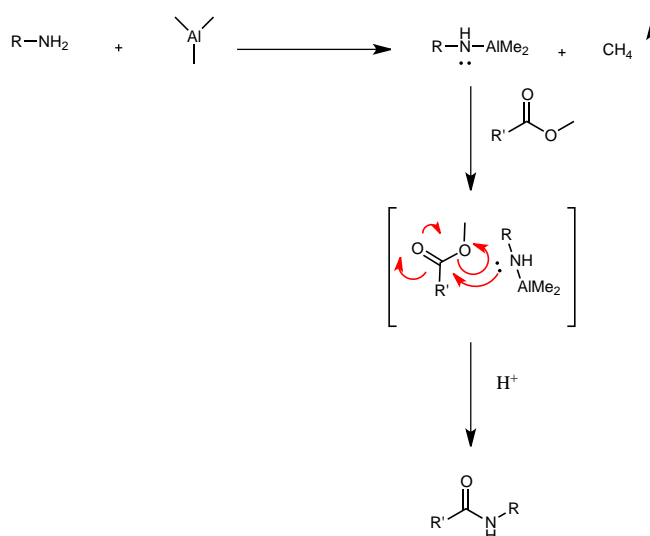
d'aminolyse d'esters introduite pour la première fois par Weinreb<sup>21</sup> en 1977 qui prévoit l'activation des amines par du triméthylaluminium (AlMe<sub>3</sub>). Pour cela nous avons fait réagir l'ester **5** avec les équivalents aminés tels que le pivalate de 2-aminoéthyl **20** pour la serine, l'acide aminobutyrique pour l'aspartate et l'histamine pour l'histidine (Schéma 33).



**Schéma 33** : Schéma général des nucléotides obtenus à partir de **5**.

### III.1.a) Condensation des amines sur l'ester avec AlMe<sub>3</sub>

L'AlMe<sub>3</sub> rend les amines plus nucléophiles en formant un amidure d'aluminium *in situ* qui, en présence d'un ester mène à la formation de l'amide correspondant (Schéma 34).

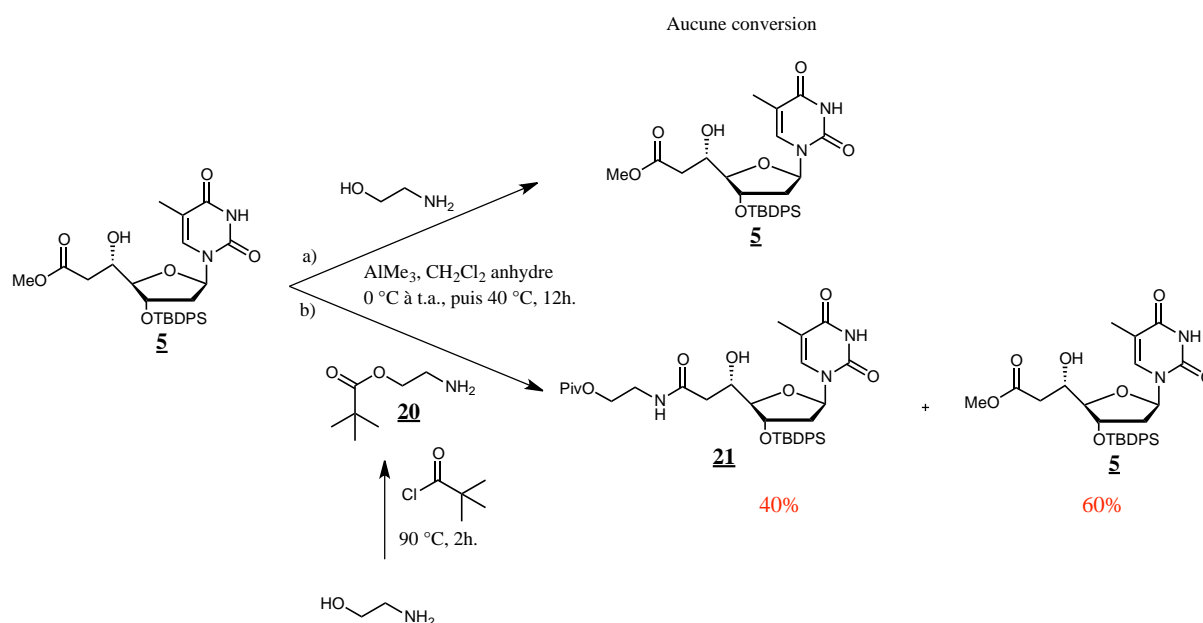


**Schéma 34** : Mécanisme d'activation d'une amine avec AlMe<sub>3</sub> et formation d'un amide par réaction avec un ester.

L'AlMe<sub>3</sub> étant un organo-aluminique pyrophorique, il est à manipuler avec précaution. Il existe une alternative moins contraignante, le bis(triméthylaluminium)-1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABAL-Me<sub>3</sub>)<sup>22, 23</sup> qui est un complexe stable à l'air constitué de 1,4-diazobicyclo(2.2.2.)octane (DABCO) avec du triméthylaluminium. Néanmoins les essais que nous avons faits avec ce réactif ne nous ont pas permis d'aboutir aux amides désirés.

### III.1.a.1) Condensation du pivalate de 2-aminoéthyle sur l'ester

Pour l'introduction de la fonction alcool sur le nucléoside **5** nous avons décidé dans un premier temps d'utiliser l'éthanolamine commerciale. Lors d'un premier essai de condensation sur l'ester avec de l'AlMe<sub>3</sub> dans du dichlorométhane anhydre le produit désiré n'a pas été obtenu laissant intact l'ester **5** de départ (Schéma 35\_a). Un dégagement gazeux important est observé lors de l'ajout de l'AlMe<sub>3</sub> sur le 2-aminoéthanol, ce qui laisse supposer que l'hydroxyle libre du 2-aminoéthanol hydrolyse l'AlMe<sub>3</sub>.



**Schéma 35 : Formation du composé amide-Ser 21.**

Nous avons donc décidé de protéger la fonction alcool libre de l'éthanolamine avec un groupement compatible avec la synthèse supportée, le Piv, car résistant aux conditions acides de déprotection ainsi qu'à l'étape d'oxydation. De plus, étant baso-labile, il peut être éliminé pendant l'étape finale de traitement ammoniacal. Cela est effectué en faisant réagir le 2-aminoéthanol avec du chlorure de pivaloyle pendant deux heures à 90°C permettant d'aboutir au composé **20** avec un rendement quantitatif. Ce dernier en présence d'AlMe<sub>3</sub> est alors condensé sur l'ester **5** dans du dichlorométhane anhydre pour former le composé **21** avec un rendement de 40% (Schéma 35\_b) mais nous permettant de récupérer 60% d'ester de départ. Le produit obtenu a été caractérisé par spectrométrie de masse, ( $m/z = 666,5 [M+H^+]$ ), et par spectroscopie RMN <sup>1</sup>H qui indique la formation du lien amide par la présence d'un signal sous forme d'un triplet correspondant au proton N-H<sub>8'</sub> avec un déplacement chimique de 6,17 ppm et une constante de couplage <sup>3</sup>J = 5,2 Hz avec les protons H<sub>9'</sub> (Figure 37).

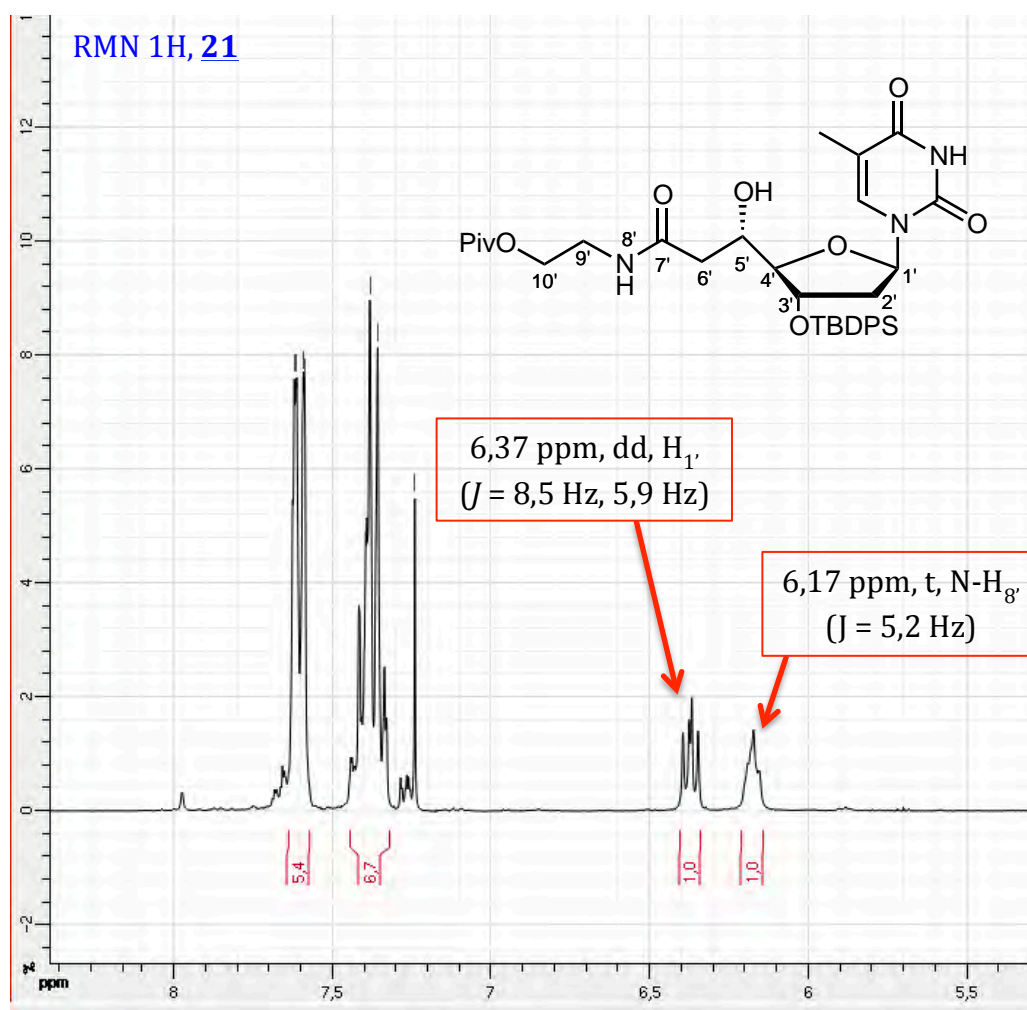
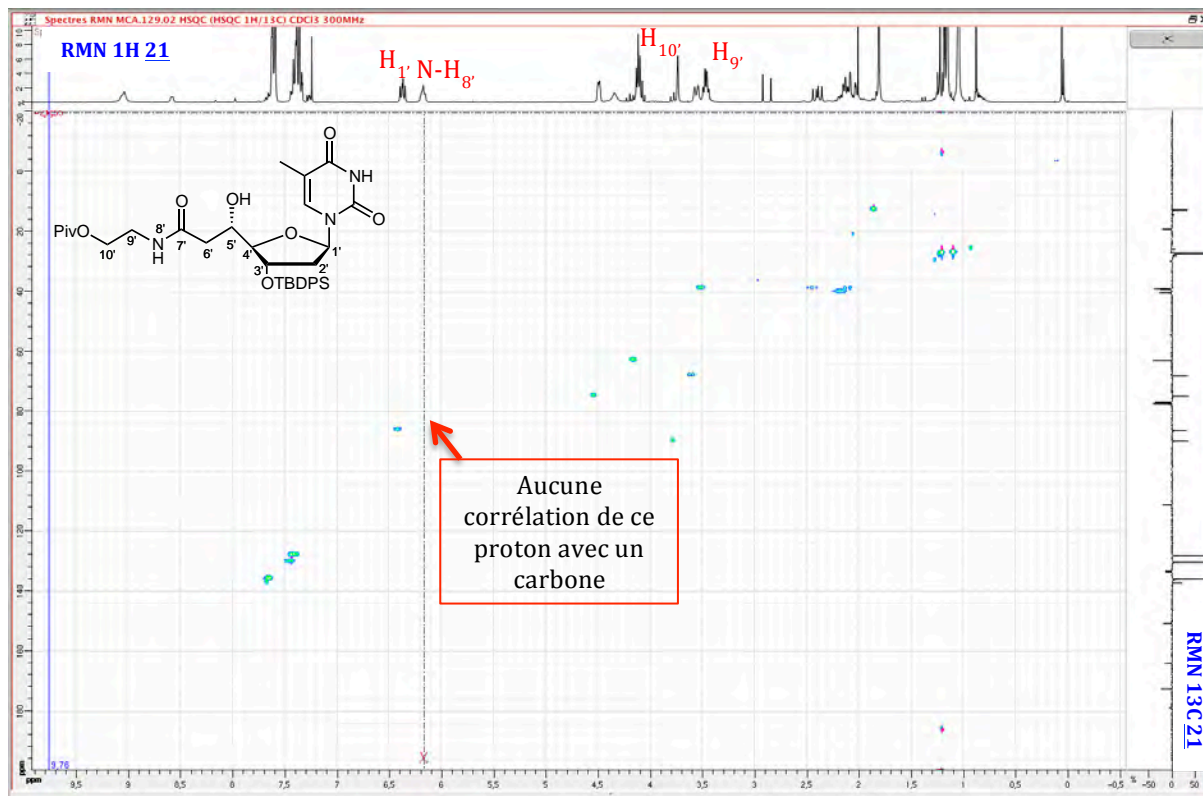


Figure 37 : Extrait du spectre de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) du composé **21**.

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés

Par spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  et grâce aux méthodes d'analyse en deux dimension HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (Figure 38), COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  (Figure 39) et HMBC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  (Figure 40), nous avons pu confirmer que le proton à 6,17 ppm n'est pas relié à un carbone et corrèle avec les protons  $\text{H}_{9'}$  et avec le carbonyle  $\text{C}_{7'}$ .



**Figure 38** : Spectre de RMN HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) du composé **21**.



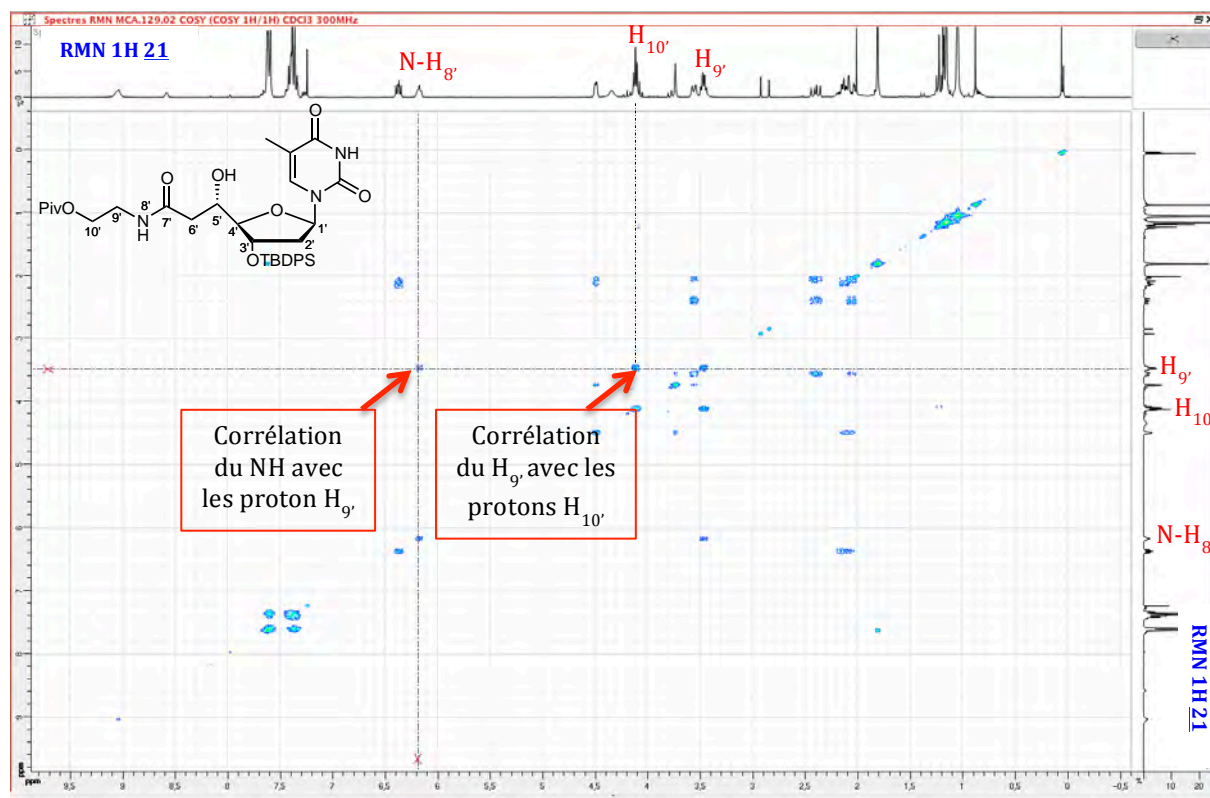


Figure 39 : Spectre de RMN COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) du composé **21**.

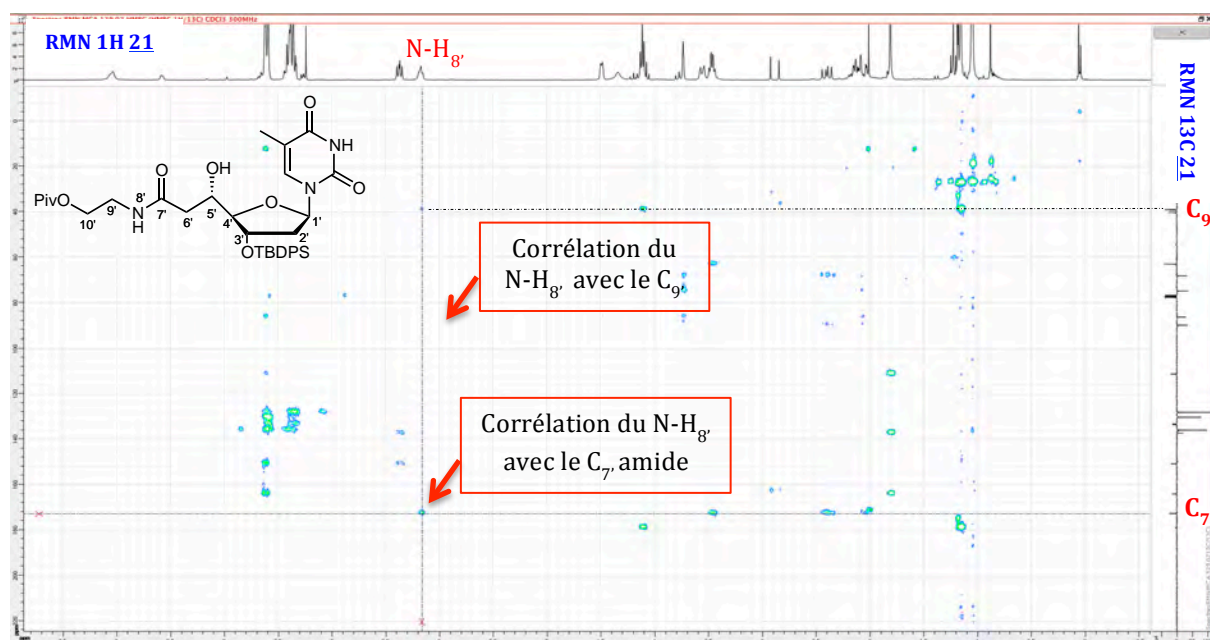
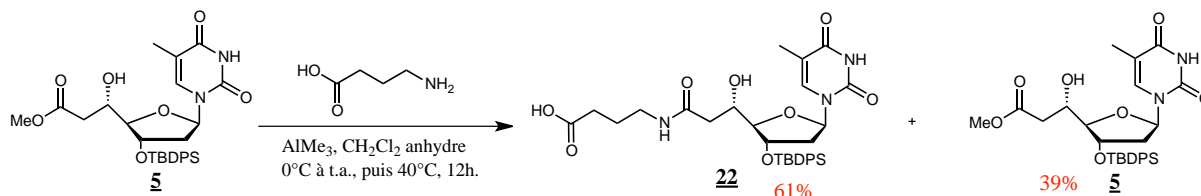


Figure 40 : Spectre de RMN HMBC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) du composé **21**.

### III.1.a.2) Condensation de l'acide 4-aminobutyrique sur l'ester

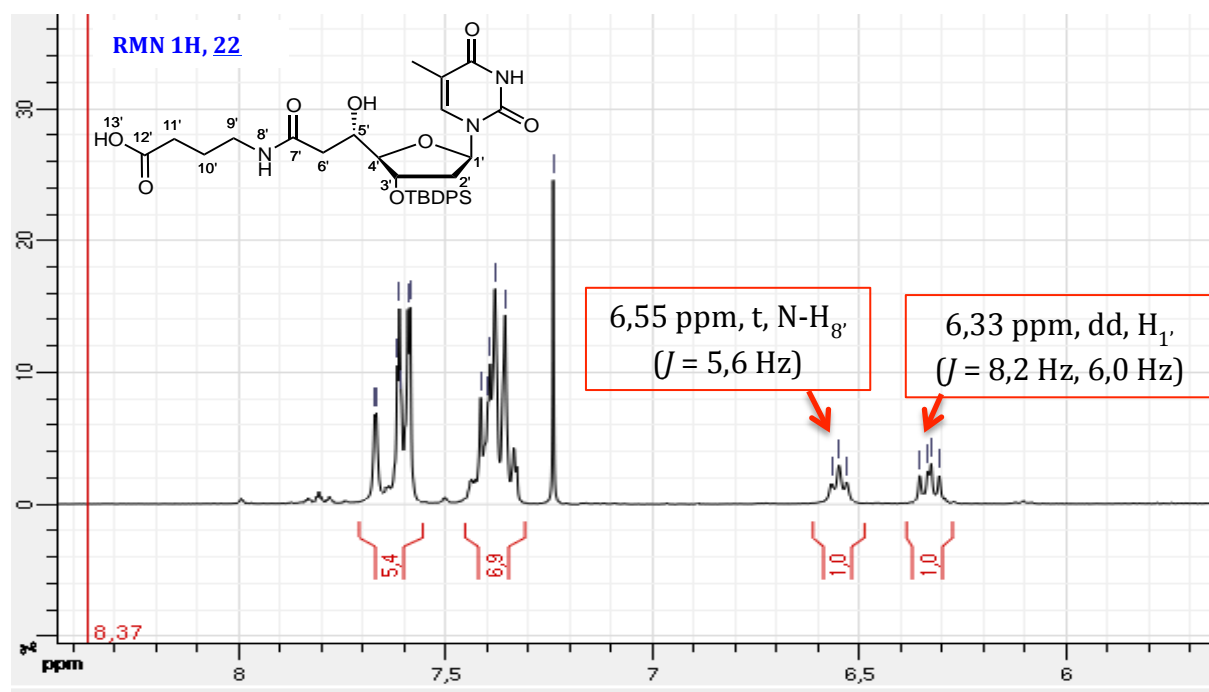
Le produit de condensation **22** a été obtenu en faisant réagir l'ester **5** avec l'acide 4-aminobutyrique commercial. Dans ce cas une protection préalable n'a pas été

nécessaire, la condensation de l'acide 4-aminobutyrique sur l'ester **5** avec l'AlMe<sub>3</sub> a permis d'obtenir le composé **22** avec un rendement de 61% en récupérant 39% d'ester **5** n'ayant pas réagi. (Schéma 36).



**Schéma 36** : Synthèse du composé amide-Asp **22**.

Dans ce cas aussi l'obtention du produit désiré a été confirmée par spectrométrie de masse ( $m/z = 624,3$  [M-H<sup>+</sup>]) et par l'analyse combinée des spectres de RMN <sup>1</sup>H (Figure 41), RMN <sup>13</sup>C, HSQC <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C (Figure 42), COSY <sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H (Figure 43) et HMBC <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C (Figure 44) enregistrés. La présence d'un triplet à 6,55 ppm avec une constante de couplage de  $^3J = 5,6$  Hz relatif à un proton non relié à un carbone nous a permis de confirmer la formation du lien amide. Ce signal présente de plus une corrélation avec le groupement carbonyle C<sub>7'</sub> du lien amide formé.



**Figure 41** : Extrait du spectre de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) du composé **22**.

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés

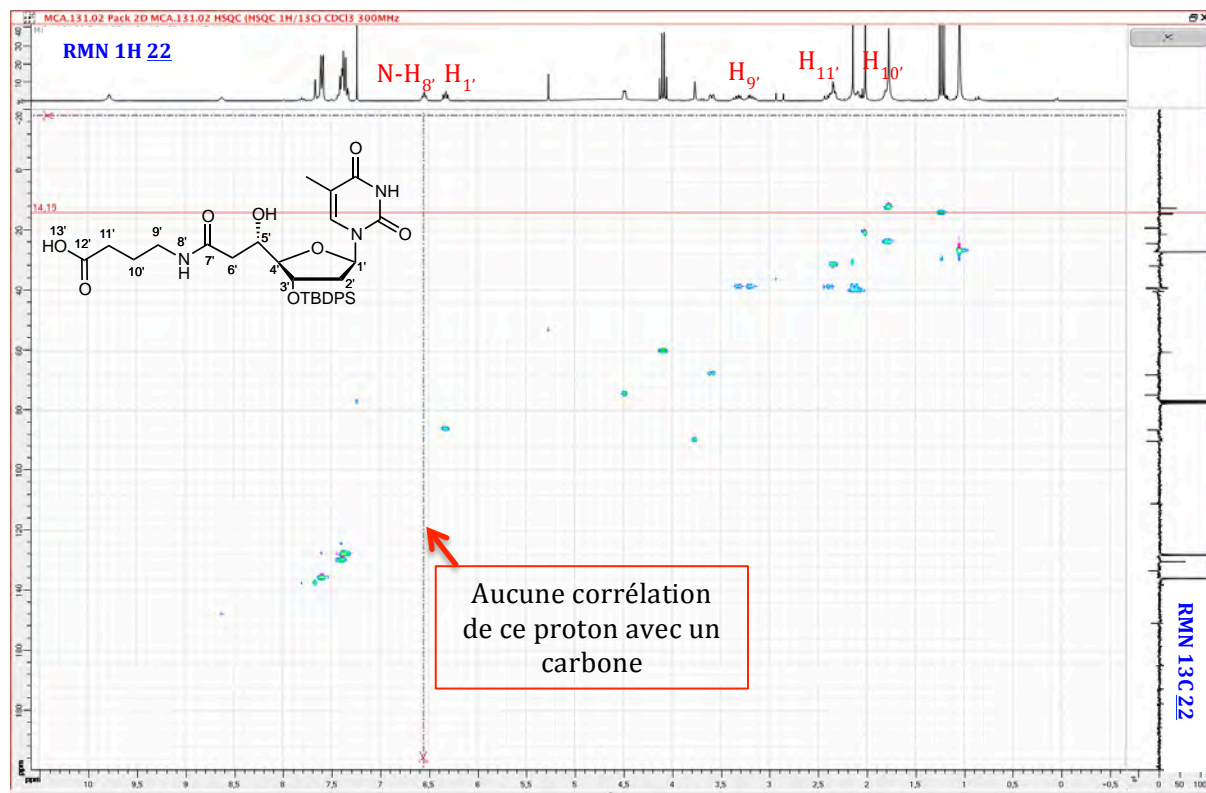


Figure 42 : Spectre de RMN HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) du composé.

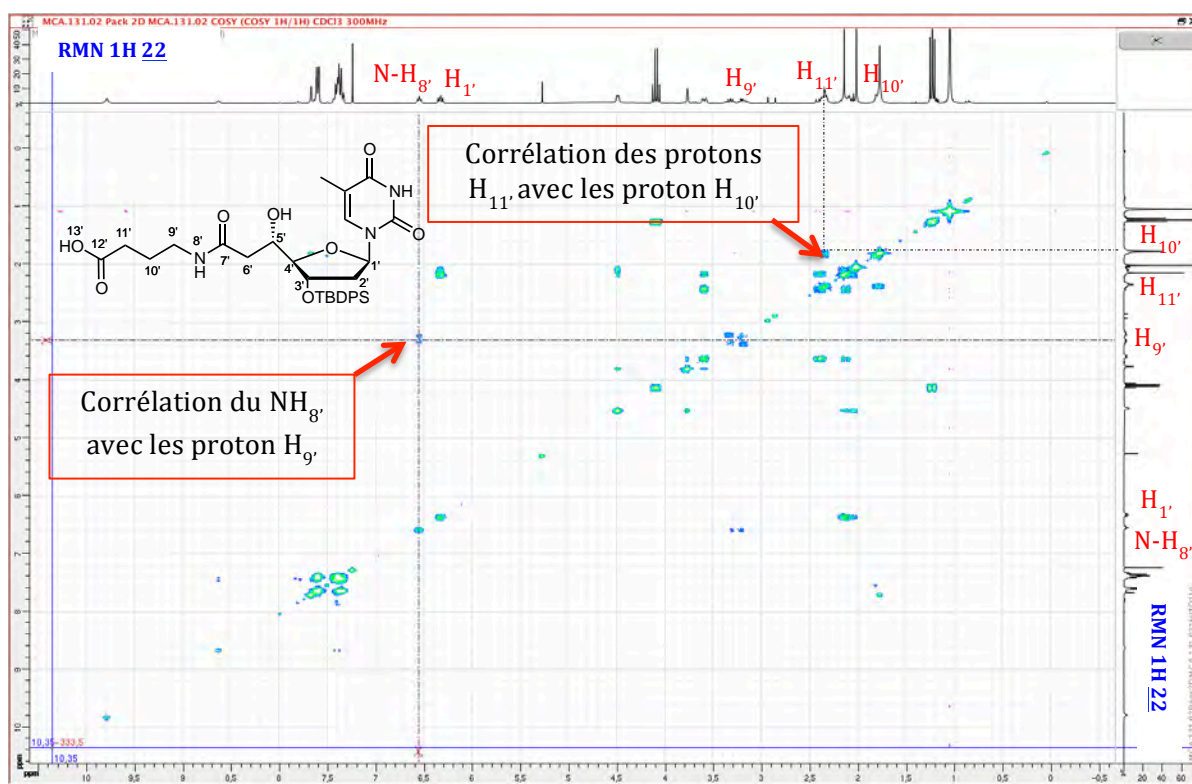


Figure 43 : Spectre de RMN COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) du composé 22.

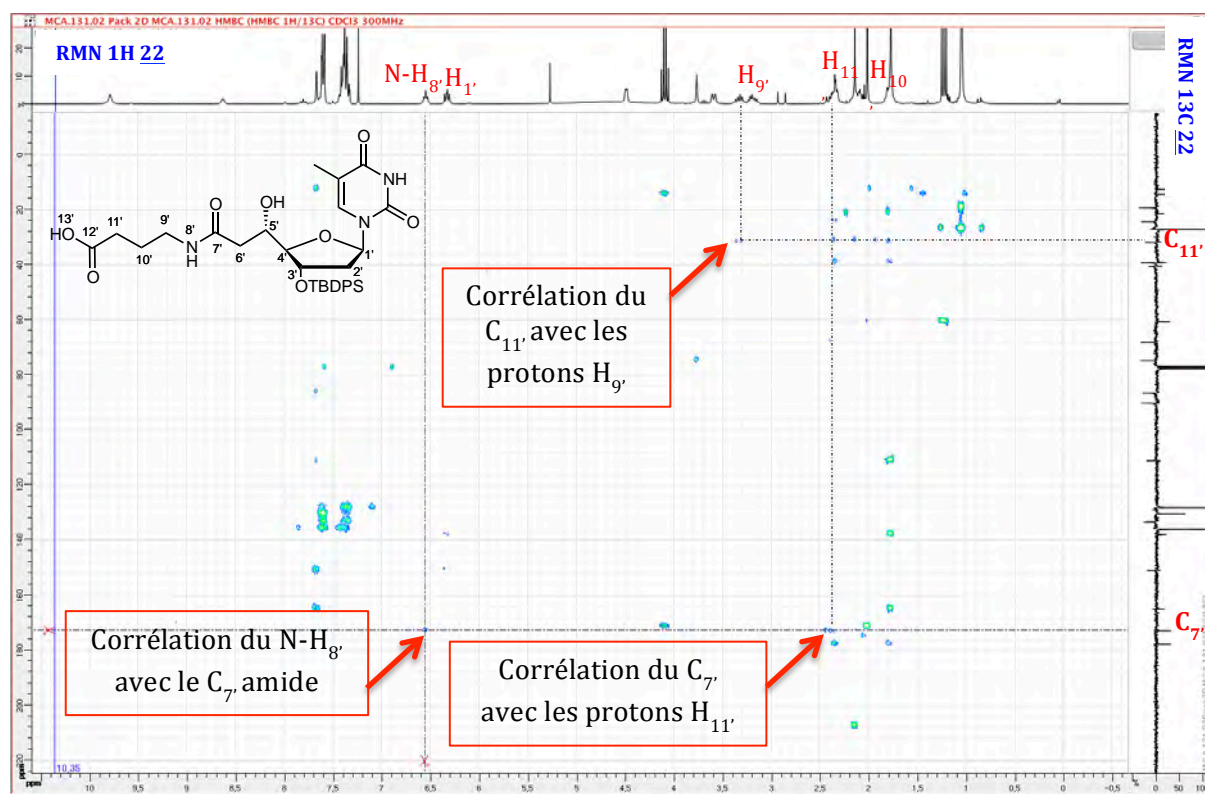


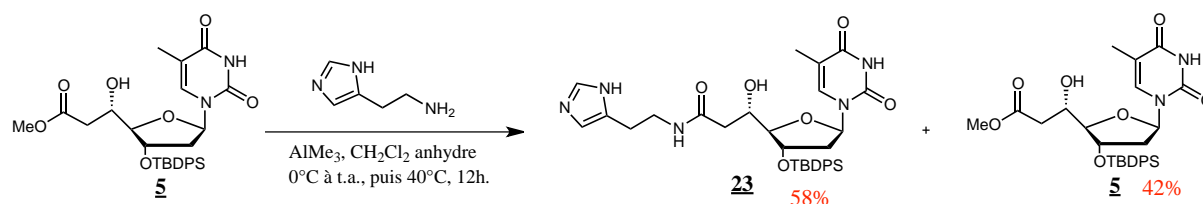
Figure 44 : Spectre de RMN HMBC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) du composé **22**.

### III.1.a.3) Condensation de l'histamine sur l'ester.

Des exemples de condensations sur des esters en utilisant des amines hydrochlorées activées en présence d' $\text{AlMe}_3$  sont rapportés dans la littérature<sup>24</sup>. Dans notre cas en utilisant l'histamine dihydrochlorée commerciale, la formation du produit désiré **23** n'a pas été observée. Malgré nos efforts de déhydrochloration par extraction en continu en milieu basique nous n'avons pas réussi à obtenir l'équivalent non hydrochloré de l'histamine. Nous avons donc utilisé l'histamine commerciale non-hydrochlorée, bien plus chère que la précédente (67,60€ les 5 g pour la dihydrochlorée contre 247,50€ les 5g pour l'histamine non hydrochlorée).

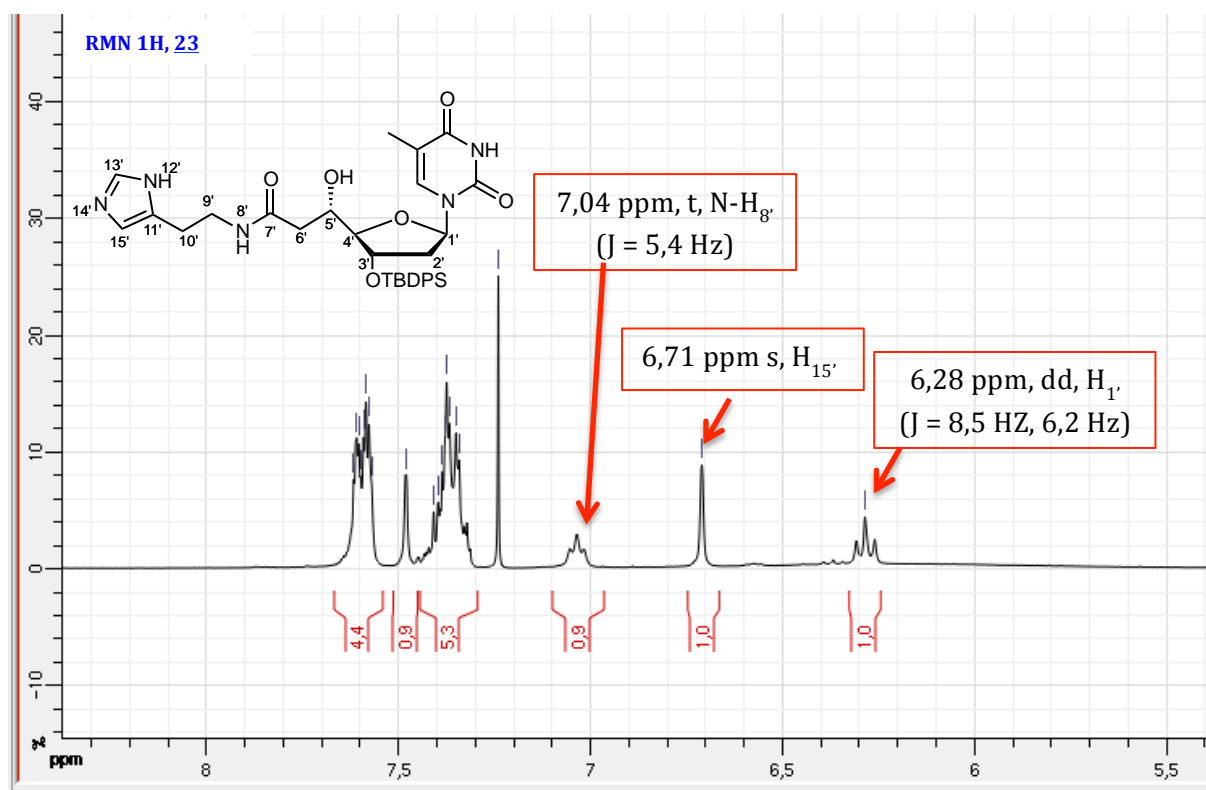
Comme dans le cas de l'acide 4-aminobutyrique, aucune protection préalable n'a été effectuée malgré le risque de formation d'un produit secondaire par condensation du N-H du cycle imidazole sur l'ester. Cependant, pour privilégier une synthèse courte sans une séquence de protection/déprotection entre l'amine secondaire de l'imidazole et l'amine primaire, la réaction de condensation sur l'ester **5** a été testée dans ces conditions. Le produit d'addition **23** a ainsi été obtenu avec un rendement assez satisfaisant de 58% tout en récupérant les 42% d'ester n'ayant pas réagi (Schéma 37).

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés



**Schéma 37 :** Synthèse du composé amide-His **23**.

La structure du produit a été confirmée par spectrométrie de masse ( $m/z = 632,29$  [ $M-H^+$ ]), et par l'analyse combinée des spectres de RMN  $^1H$  (Figure 45), RMN  $^{13}C$ , HSQC  $^1H/^{13}C$  (Figure 46), COSY  $^1H/^1H$  (Figure 47) et HMBC  $^1H/^{13}C$  (Figure 48). Outre la présence d'un signal triplet à 7,04 ppm avec une constante de couplage de  $^3J = 5,4$  Hz sur le spectre de RMN  $^1H$  relatif au proton  $N-H_{8'}$  non relié à un carbone, la corrélation de ce dernier avec les protons  $H_{9'}$  de l'histamine mise en évidence par le spectre COSY  $^1H/^1H$  confirme que la condensation a lieu par l'amine primaire et non pas par l'amine secondaire de l'imidazole.



**Figure 45 :** Extrait du spectre  $^1H$  RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) du composé **23**.

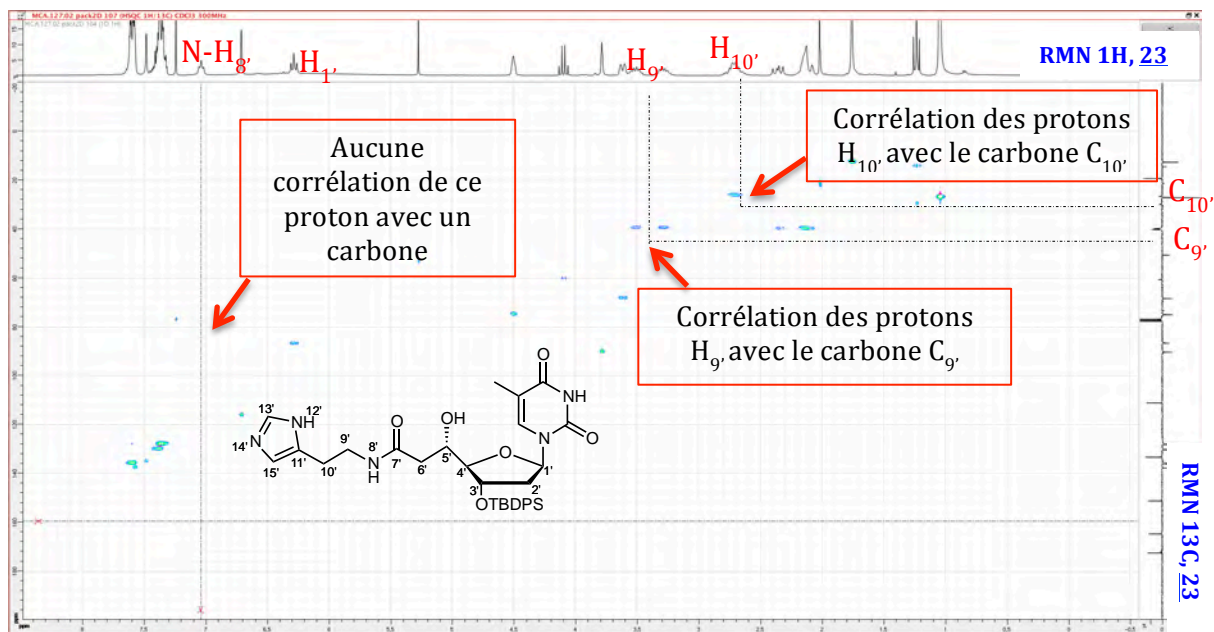


Figure 46 : Spectre de RMN HSQC  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) du composé **23**.

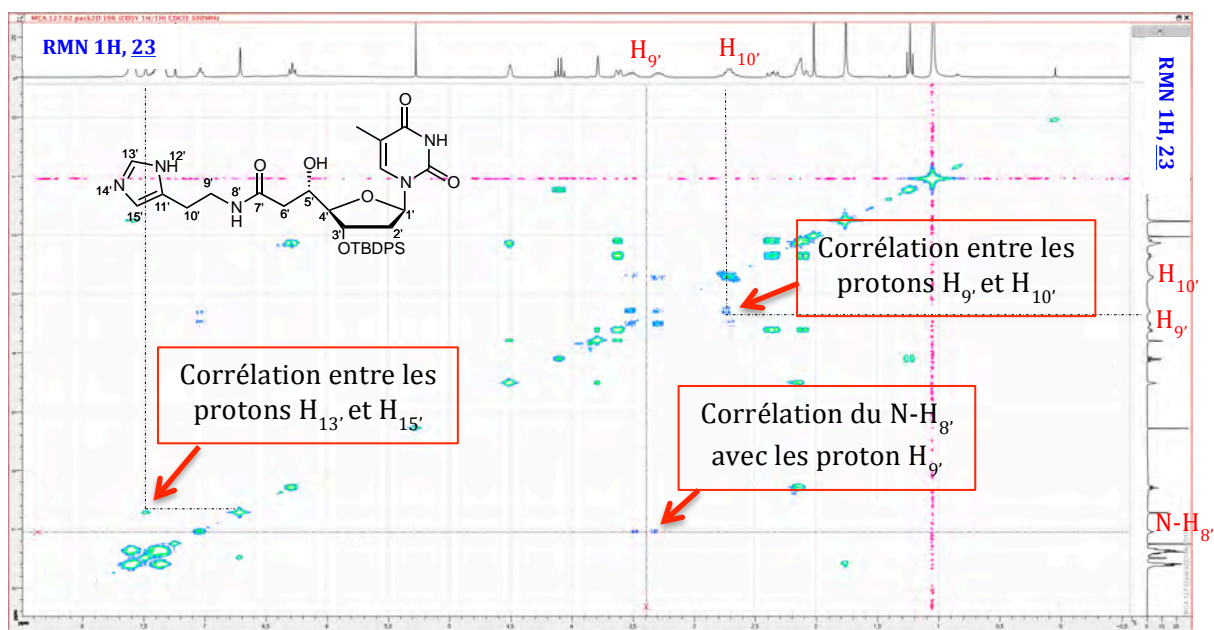


Figure 47 : Spectre de RMN COSY  $^1\text{H}/^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) du composé **23**.

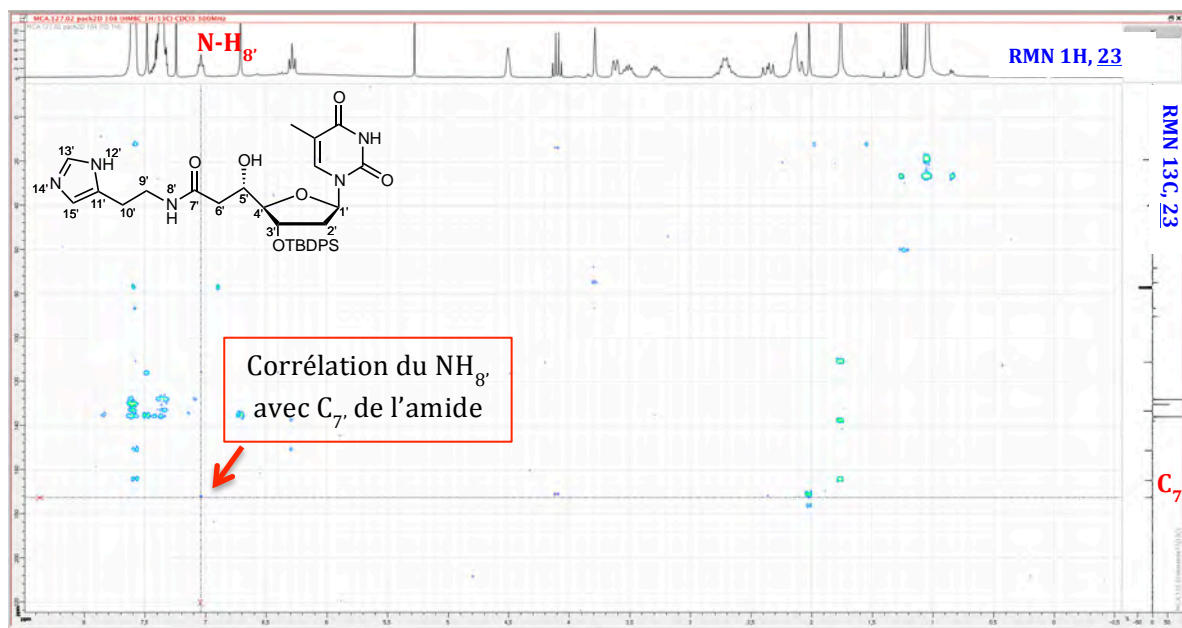


Figure 48 : Spectre de RMN HMBC <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) du composé **23**.

### III.1.b) Protections des fonctions chimiques introduites

La fonction acide carboxylique du composé **22** et le N-H de l'imidazole du produit **23** doivent être protégés afin de ne pas interférer lors de la synthèse automatisée d'oligonucléotides.

#### III.1.b.1) Protection de la fonction acide carboxylique du composé amide-Asp

La présence d'un acide carboxylique sur un nucléotide n'est pas compatible avec la synthèse automatisée, et a donc été convertie en ester de méthyle. La réaction d'estérification a été effectuée en utilisant une résine échangeuse d'ions, l'Amberlite IR-120 dans du méthanol (Schéma 38).

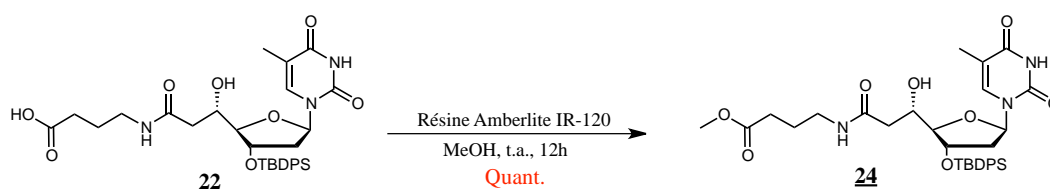
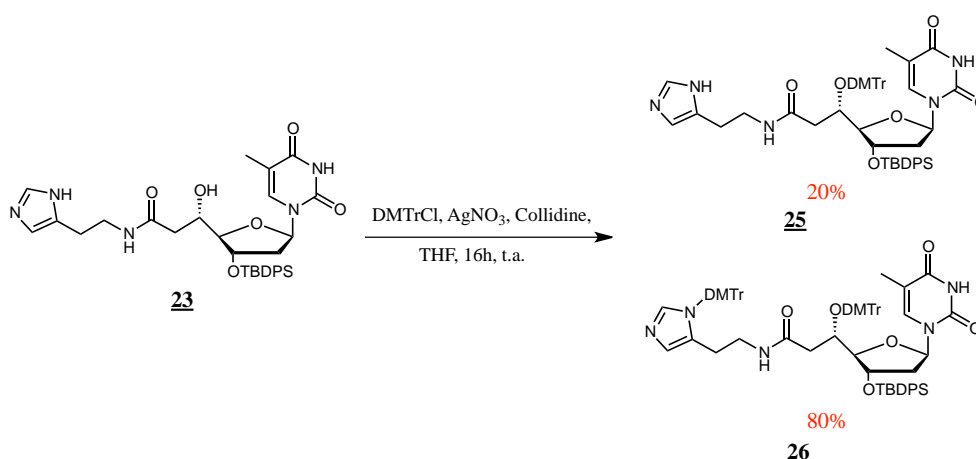


Schéma 38 : Protection de la fonction acide carboxylique du composé **22**.

Cette méthode nous a permis d'avoir une conversion totale de **22** en **24** et le produit pur a été récupéré après simple filtration des billes de résine et évaporation du solvant.

### III.1.b.2) Protection du N-H de l'imidazole du composé amide-His

L'amine secondaire de l'imidazole, de par son caractère basique, peut interférer lors de l'activation du diamidite par le tétrazole. La stratégie de protection de cette fonction sur **23** s'est avérée plus délicate que prévue à mettre en place. Le PivOM a été choisi comme groupement protecteur car il est baso labile et résistant aux étapes de déprotection acide et d'oxydation de la synthèse automatisée d'oligonucléotides. En raison de la présence de l'hydroxyle libre sur le carbone 5', nous avons tenté dans un premier temps de protéger ce dernier par le groupement DMTr dans les mêmes conditions utilisées pour tous les autres composés synthétisés en utilisant 2,5 équivalents de DMTrCl. Un mélange de deux produits a été obtenu qui ont été séparés par chromatographie HPLC préparative. L'analyse du spectre de RMN  $^1\text{H}$  du produit minoritaire nous a confirmé la formation du produit attendu **25**, en revanche pour le produit majoritaire **26**, le spectre de RMN  $^1\text{H}$  étant très complexes, il n'a pas été possible d'identifier la structure produits. En revanche les résultats en spectrométrie de masse des deux fractions récupérées nous ont permis de déterminer que le produit **26** majoritairement obtenu (80%) présentait deux groupements DMTr ( $m/z = 1235,1$   $[\text{M-H}]^-$ ), le deuxième DMTr étant vraisemblablement installé sur l'amine secondaire de l'imidazole (Schéma 39).



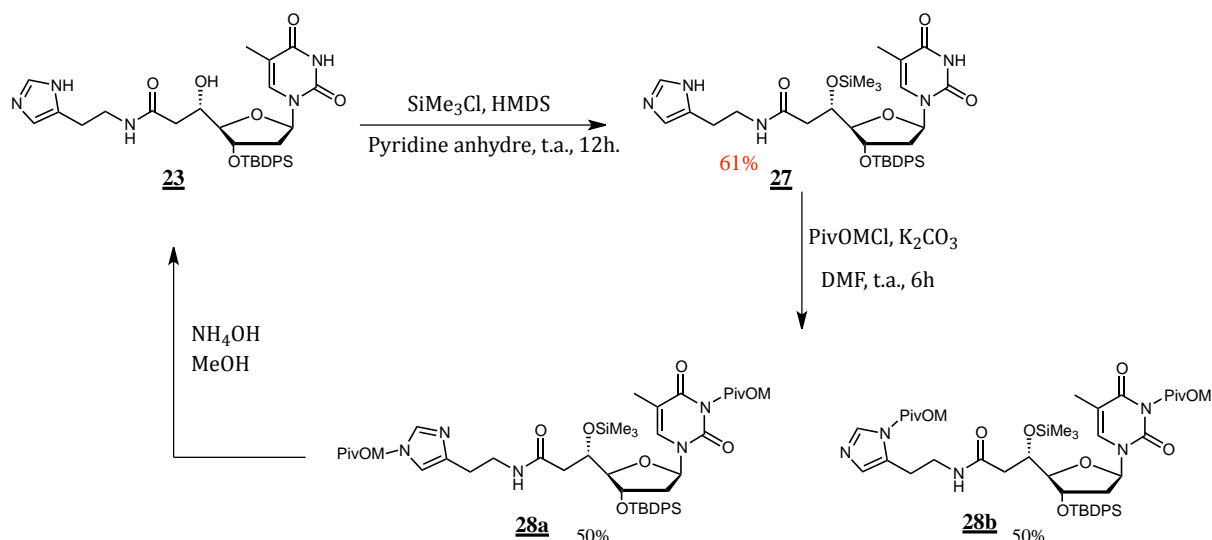
**Schéma 39** : Essai de protection de l'hydroxyle 5'C avec le DMTr.

La tentative de protection de l'amine secondaire de l'imidazole du composé **25** par le PivOM en faisant réagir le substrat avec le chlorure de pivaloyloxyméthyle dans du DMF



en présence de  $K_2CO_3$ , a conduit à un mélange de produit qu'il n'a pas été possible de séparer par chromatographie sur colonne et le spectre RMN  $^1H$  du brut ne nous a pas permis d'en identifier les composants.

Nous avons alors décidé d'installer un groupement protecteur silylé temporaire sur l'hydroxyle en position 5' du composé **23** nous permettant de protéger l'amine secondaire avec le PivOM avant l'introduction du DMTr. La silylation a donné le produit souhaité **27** avec un rendement moyen de 61%. Cependant la réaction de protection avec le PivOM a fourni un mélange de produits **28a** et **28b** qui n'a pas pu être séparé sur colonne de silice en HPLC. L'analyse par spectrométrie de ce dernier indique la présence d'un seul pic ( $m/z = 932,5 [M-H^+]$ ) correspondant au produit doublement protégé par deux groupements PivOM. L'analyse des spectres RMN 1D et 2D s'est révélée très compliquée, mais nous avons tout de même pu confirmer la présence du groupement PivOM sur le N-H de l'imidazole mais aussi sur le N3 de la base thymine. De plus la protection du N-H de l'imidazole a eu lieu sur les deux formes de résonance de ce dernier, fournissant ainsi un mélange 50/50 de deux produits protégés (Schéma 40). Pour confirmer cette hypothèse nous avons soumis le mélange **28a** et **28b** à un traitement ammoniacal dans du méthanol, conditions permettant l'élimination du groupement protecteur PivOM et  $SiMe_3$ . Le spectre  $^1H$  RMN du produit ainsi obtenu après ce traitement confirme la reconversion de **28a** et **28b** en **23**.

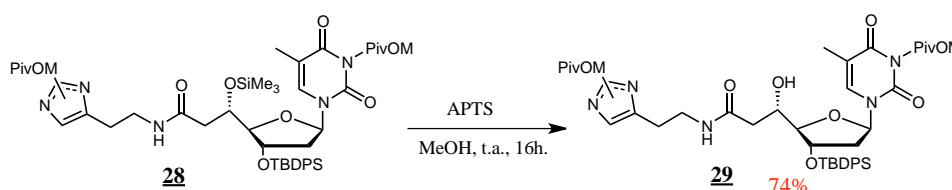


**Schéma 40** : Silylation de l'hydroxyle en position 5'C et protections avec le PivOM.

La protection de l'amine secondaire sur les deux formes de résonance du noyau imidazole ne pose pas de problèmes car après incorporation au sein des séquences oligonucléotidiques, le groupement PivOM sera déprotégé. La présence d'une protection

sur la base thymine, bien que compliquant l'analyse des spectres RMN et l'identification des produits, n'est pas non plus un obstacle. Nous avons ainsi décidé de poursuivre la synthèse sur ce mélange.

Afin d'introduire le groupement protecteur DMTr sur l'hydroxyle en position 5', nous avons dans un premier temps déprotégé sélectivement l'éther silylé en position 5' par traitement avec de l'APTS dans du méthanol, conditions compatibles avec le groupement silylé TBDPS présent sur l'hydroxyle en position 3'. La réaction a été réalisée avec succès pour aboutir au composé **29** (en mélange de régioisomères) avec un très bon rendement de 74% (Schéma 41).



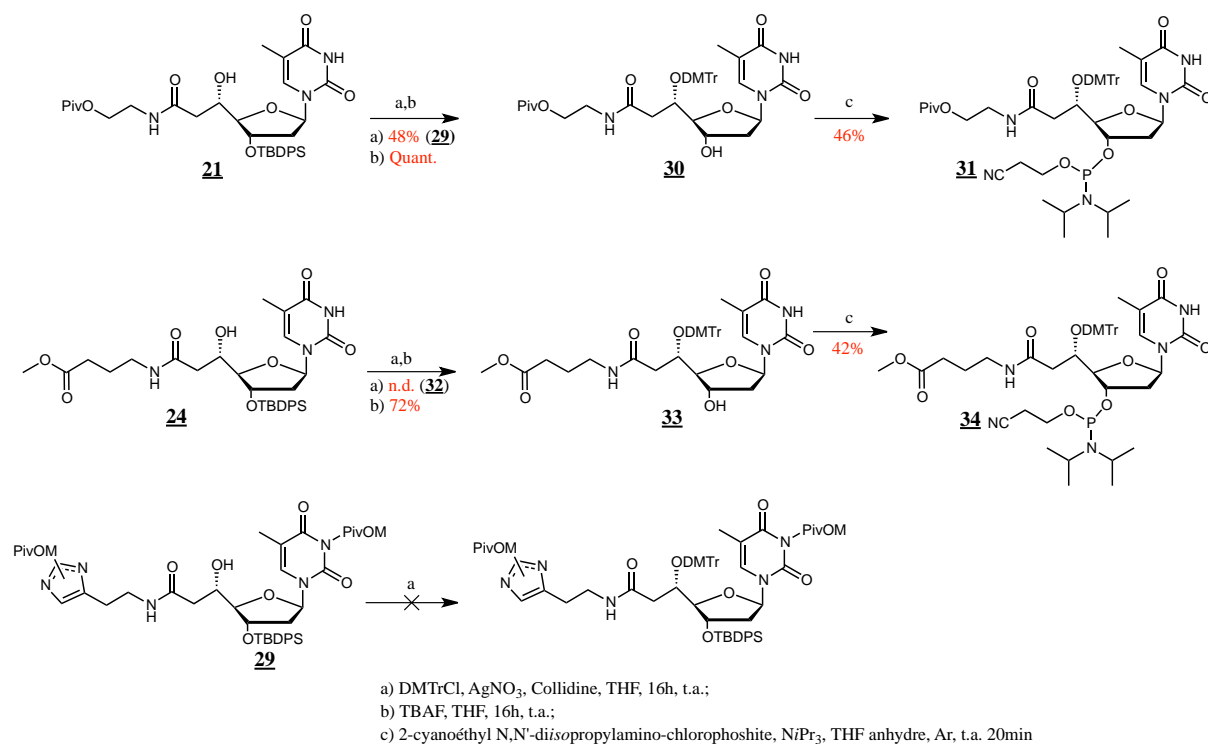
**Schéma 41** : Désilylation de l'hydroxyle en position C3' du composé **28**.

### III.1.c) Synthèse des phosphoramidites fonctionnalisés amides

A partir des synthons **21**, **24** et **29**, la formation des phosphoramidites correspondants nécessite la même séquence d'étapes (protection de l'hydroxyle secondaire sur le carbone 5' avec un DMTr, déprotection de l'alcool sur le carbone 3' et formation du phosphoramidite à partir de ce dernier) que pour les phosphoramidites convertibles.

A partir des composés **21** et **24** ces étapes ont été effectuées avec succès permettant d'aboutir aux phosphoramidites fonctionnalisés finaux **32** et **35** portant respectivement la fonction alcool mime de la serine et la fonction acide carboxylique mime de l'acide aspartique, avec un rendement global de 8% et 6% respectivement à partir de l'ester **5** (Schéma 42). Ces deux produits ont été caractérisés par spectrométrie de masse indiquant un m/z de 952,4 ([M-Na]<sup>+</sup>) pour **32** et de 924,4 ([M-Na]<sup>+</sup>) pour **35**, et par spectroscopie RMN <sup>31</sup>P indiquant la présence de deux pics à 150,1 ppm et 148,3 ppm pour **32** et à 150,1 ppm et 148,7 ppm pour **35** caractéristiques des phosphoramidites. Dans le cas du produit **35** nous observons aussi, malgré la purification sur colonne de silice HPLC, un pic à 14,3 ppm sur le spectre RMN <sup>31</sup>P indiquant la présence de H-phosphonate résiduel formé par hydrolyse du chlorophosphite.

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés



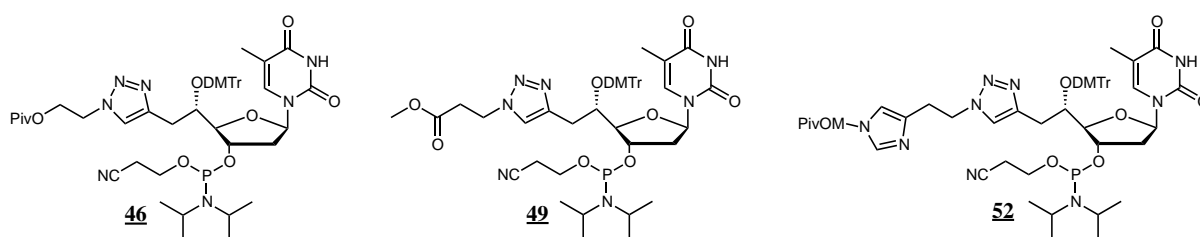
**Schéma 42 : Synthèse des phosphoramidites Ser 32 et Asp 35.**

Malheureusement à partir du composé 29 le groupement protecteur DMTr n'a pas pu être introduit probablement en raison de l'encombrement stérique des deux groupements PivOM. De ce fait, le phosphoramidite portant la fonction mime de l'histidine n'a pas pu être obtenu. Pour s'affranchir des complications liées aux doubles protections, il serait envisageable de réaliser l'étape de substitution nucléophile sur l'ester 5 en utilisant l'histamine déjà protégée par le groupement protecteur PivOM sur le N-H du noyau imidazole.

Nous avons donc réussi à obtenir les deux phosphoramidites fonctionnalisés porteurs des fonctions mimes de la serine Ser 32 et de l'aspartate Asp 35, avec un rendement respectif global de 8% et 18% à partir de l'ester 5. La synthèse du troisième phosphoramidite, portant la fonction imidazole, n'ayant pas abouti, une voie de synthèse alternative est en cours.

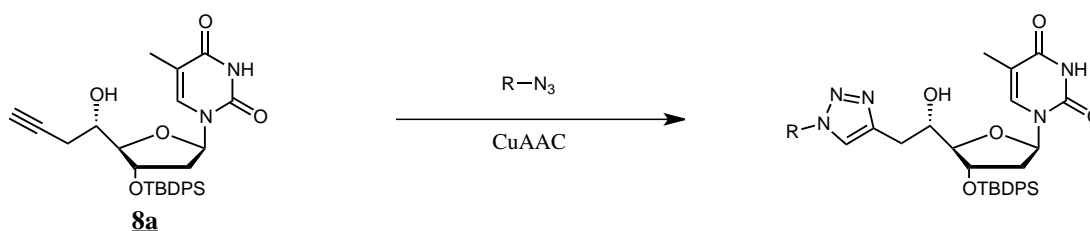
### III.2) Synthèse des phosphoramidites fonctionnalisés triazoles à partir du dérivé alcyne

Le nucléoside alcyne 5'C-S **8a** peut permettre d'obtenir des nucléotides fonctionnalisés avec un lien de type triazole reliant la modification au sucre. Cet hétérocycle confère aux structures un fort caractère hydrophobe et de la rigidité, importante pour l'orientation des modifications au sein des structures secondaires formées par les brins dans lesquels sont introduits ces nucléotides. Nous avons donc décidé dans un premier temps d'utiliser uniquement le nucléoside **8a** afin de valider la procédure de synthèse car d'une part c'est le produit majoritaire de la réaction de condensation de Barbier, et d'autre part il possède la même stéréochimie que celle des nucléosides ester et linéaire bromé ce qui nous permet d'obtenir une librairie de produits complète. Les nucléotides synthétisés sont présentés à la Figure 49.



**Figure 49** : Phosphoramidites triazole synthétisés.

La réaction clé est la réaction CuAAC effectuée sur l'alcyne **8a** avec les azotures correspondants (Schéma 43).

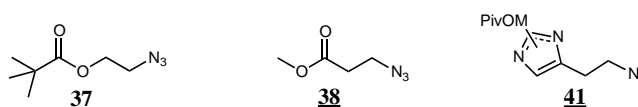


**Schéma 43** : Schéma général d'obtention des nucléotides par CuAAC à partir de **8a**.

Dans un premier temps il a fallu synthétiser les azotures nécessaires à l'introduction des fonctions chimiques souhaitées par réaction CuAAC.

### III.2.a) Synthèse des azotures

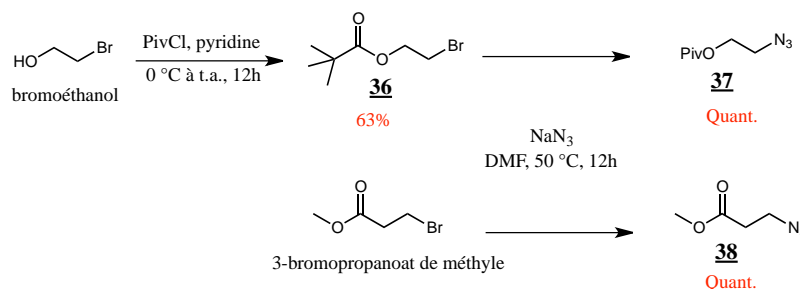
Les trois azotures **37**, **38** et **41** ont été choisis pour introduire les fonctions mimes des chaînes latérales de la sérine, de l'acide aspartique et de l'histidine (Figure 50). La fonction alcool, acide carboxylique et le cycle imidazole doivent, dans ce cas aussi, être protégés avant l'incorporation au sein des séquences. Nous avons envisagé des voies de synthèse permettant d'obtenir les azotures déjà protégés et comme pour les amines condensées sur l'ester **5**, nous avons choisi pour les azotures les groupements protecteurs Piv pour l'alcool, ester de méthyle pour l'acide carboxylique et PivOM pour le noyau imidazole.



**Figure 50** : Azotures **37**, **38** et **41** utilisés pour introduire les fonctions alcool, acide carboxylique et imidazole.

#### III.2.a.1) Synthèse des azotures 2-azidoéthyl-pivalate et 3-azidopropanoate de méthyle (respectivement azoture de la sérine et de l'acide aspartique)

Les azotures **37** et **38** ont été synthétisés par substitution nucléophile à partir des équivalents commerciaux bromés à savoir le bromoéthanol pour l'azoture **37** et le méthyl-3-bromopropanoate pour l'azoture **38**. Concernant le bromoéthanol la fonction alcool du bromoéthanol a été protégée par réaction avec le chlorure de pivaloyle dans de la pyridine afin d'obtenir le bromoéthyl-pivalate **36** avec un rendement de 63%. Le composé **36** et le 3-bromopropanoate de méthyle ont tous les deux été traités avec de l'azoture de sodium permettant d'aboutir respectivement à l'azoture **37** et à l'azoture **38** avec des rendements quantitatifs (Schéma 44).

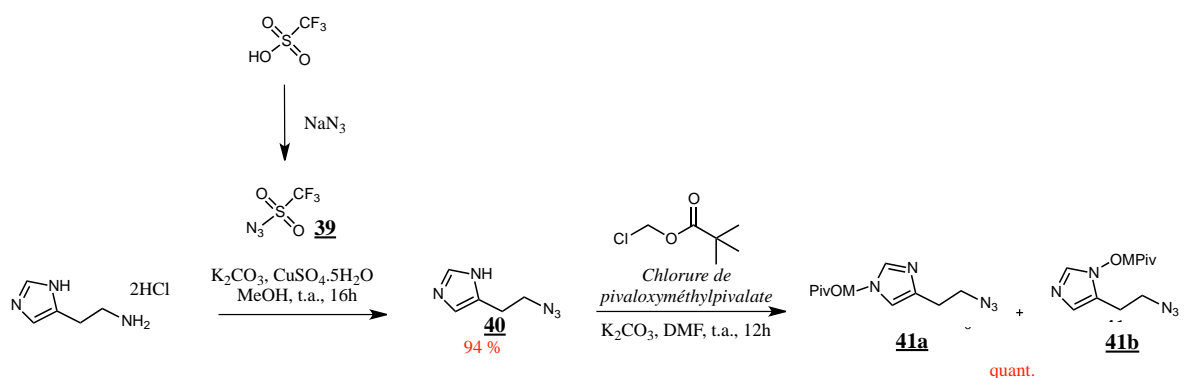


**Schéma 44** : Synthèse des azotures **37** et **38**.

Les produits formés ont été caractérisés par spectroscopie RMN et par spectroscopie infrarouge indiquant pour les deux composés la bande caractéristique de la fonction azoture à 2103,7  $\text{cm}^{-1}$  pour **37** et 2107,5  $\text{cm}^{-1}$  pour **38**.

### III.2.a.2) Synthèse de l'azoture (5-(2-azidoéthyl)-1*H*-imidazol-1-yl)méthyl pivalate (azoture de l'histamine)

Pour des raisons de coût, la synthèse de **41** a été réalisée à partir de l'histamine commerciale dihydrochlorée, et nous avons étudié une voie d'accès à sa forme azoture par réaction de transfert de diazote<sup>25-27</sup> (Schéma 45).

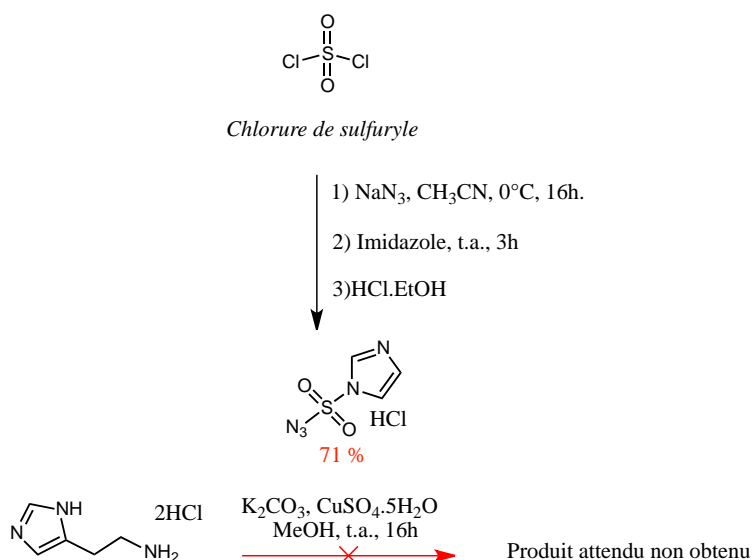


**Schéma 45** : Synthèse de l'azoture **41**.

Cette méthode catalysée par du cuivre II, utilise l'azoture de trifluorométhanesulfonyle (ou azoture triflique,  $\text{TfN}_3$  **39**) en tant que donneur de diazote et permet d'obtenir des azotures avec conservation de la stéréochimie présente sur la molécule si besoin. Le  $\text{TfN}_3$  étant potentiellement explosif lorsqu'il n'est pas solubilisé dans un solvant organique, une alternative moins dangereuse a été proposée par Goddarq-Borger et Stick<sup>28</sup> en remplaçant **39** par l'azoture d'imidazole-1-sulfonyle. Ces deux méthodes permettent d'utiliser des amines hydrochlorées ou dihydrochlorées.

Nous avons dans un premier temps essayé la méthode avec l'azoture d'imidazole-1-sulfonyle moins dangereux (Schéma 46), mais la réaction sur l'histamine dihydrochlorée n'a pas fourni l'azoture désiré. Le produit obtenu, faiblement soluble dans les solvants apolaires, n'a pas pu être caractérisé.

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés



**Schéma 46** : Essai d'utilisation de l'azoture d'imidazole-1-sulfonyle pour la réaction de transfert de diazote sur l'histamine dihydrochlorée.

Le TfN<sub>3</sub> **39** a donc été synthétisé en faisant réagir l'anhydride triflique avec l'azoture de sodium pendant deux heures, et a ensuite été additionné à l'histamine dihydrochlorée solubilisée dans du méthanol en présence de carbonate de potassium et de sulfate de cuivre pentahydraté. Ainsi nous avons obtenu l'azoture histidine **40** avec un très bon rendement de 94%. Le groupement protecteur PivOM a enfin été introduit de manière quantitative en faisant réagir **40** avec le chlorométhylpivalate en milieu basique dans du DMF (Schéma 45).

Le spectre de masse du composé **41**, montre la présence d'un seul produit avec un m/z de 252,1 mais l'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H montre dans ce cas aussi la présence de deux produits similaires en rapport 9 :1 (Figure 51). La protection de l'amine secondaire du cycle imidazole a eu lieu sur les deux formes de résonance, le majoritaire étant celui dont le PivOM est le plus éloigné de la chaîne éthylénique reliée au cycle (**41a**) identifié grâce à l'analyse du spectre HMBC (<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C) du produit (Figure 52) qui permet de mettre en évidence la corrélation entre les protons H<sub>8'</sub> et H<sub>4'</sub> pour le produit majoritaire obtenu, ce qui prouve qu'il s'agit bien du composé **41a**. La formation de l'azoture a été confirmée par spectroscopie infrarouge avec la bande d'absorption caractéristique de la fonction azoture à 2102,5 cm<sup>-1</sup>.

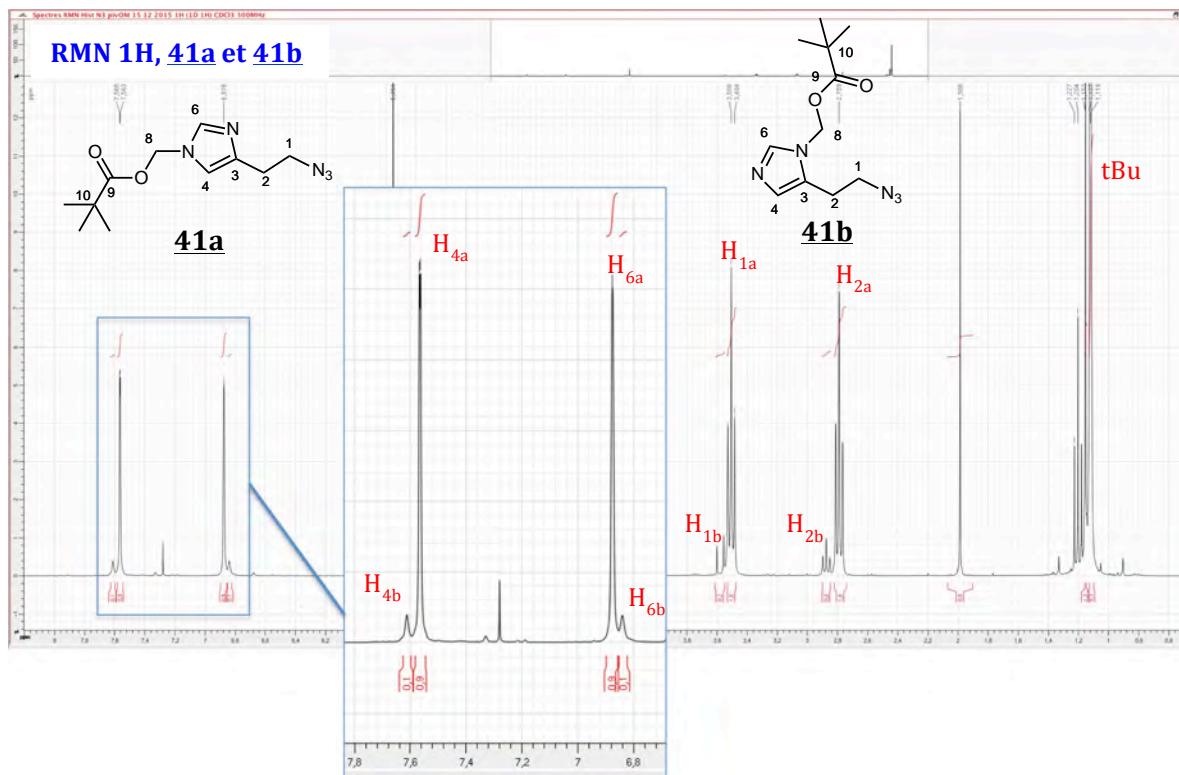


Figure 51 : Spectre  $^1\text{H}$  RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) des deux régioisomères 40.

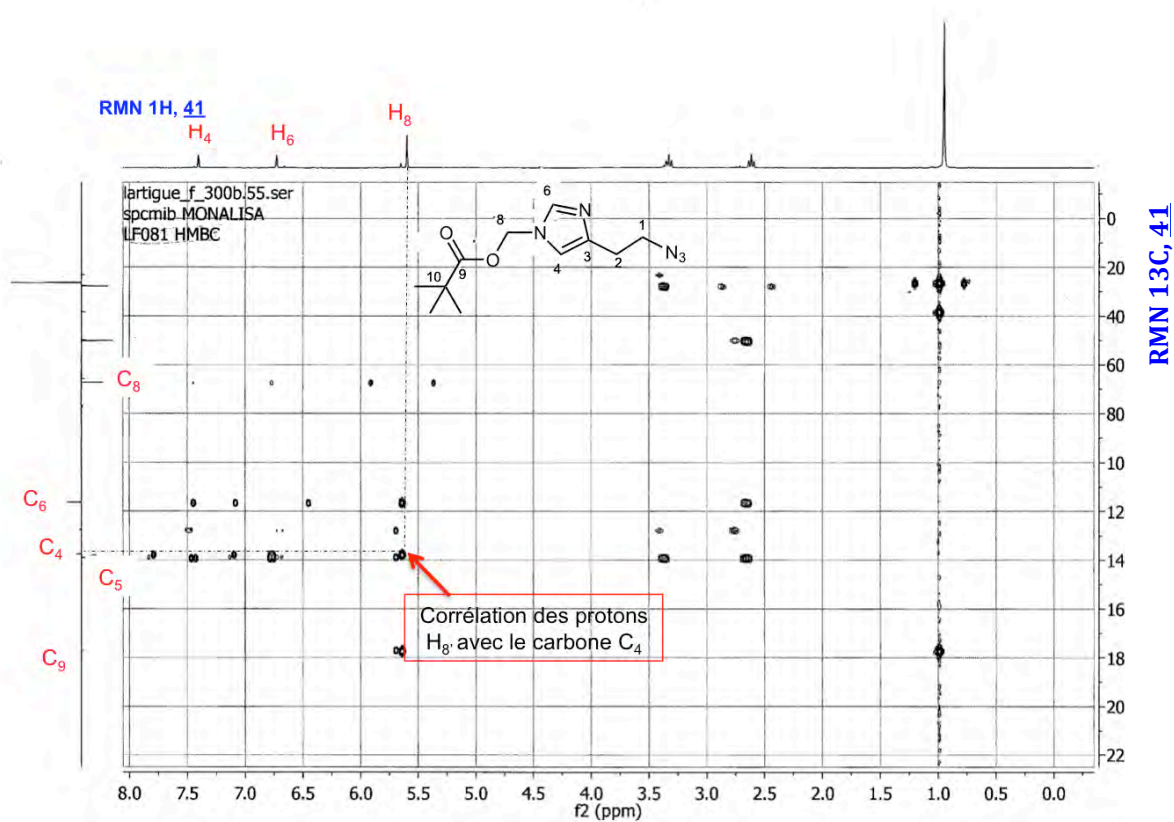


Figure 52 : Spectre HMBC (CDCl<sub>3</sub>) du composé 41.

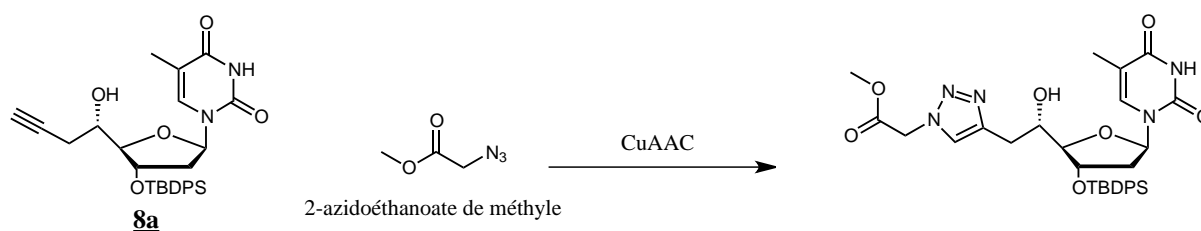


La formation de ces deux isomères est une confirmation supplémentaire de notre hypothèse concernant la formation des deux isomères **28a** et **28b** (Chapitre II\_III\_1\_b.2).

### III.2.b) Réactions de cycloaddition azoture-alcyne catalysées par du Cu(I)

Avec les trois azotures **37**, **38** et **41** il a été possible d'effectuer les réactions de « chimie click » CuAAC sur l'alcyne (*S*) majoritaire **8a**. Cette variante de la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen introduite par Sharpless<sup>29</sup> et Meldal<sup>30</sup> permet d'obtenir uniquement l'adduit 1,4 de manière régiosélective.

Afin d'optimiser la réaction nous avons réalisé plusieurs essais en utilisant le 2-azidoéthanoate de méthyle disponible en grande quantité au laboratoire (Schéma 47), en faisant varier la source et la quantité du catalyseur à base de cuivre, le solvant, la température et le temps de réaction (Tableau 1).



**Schéma 47** : Réaction de CuAAC d'optimisation des conditions réalisée avec le 2-azidoéthanoate de méthyle sur le composé **8a**.

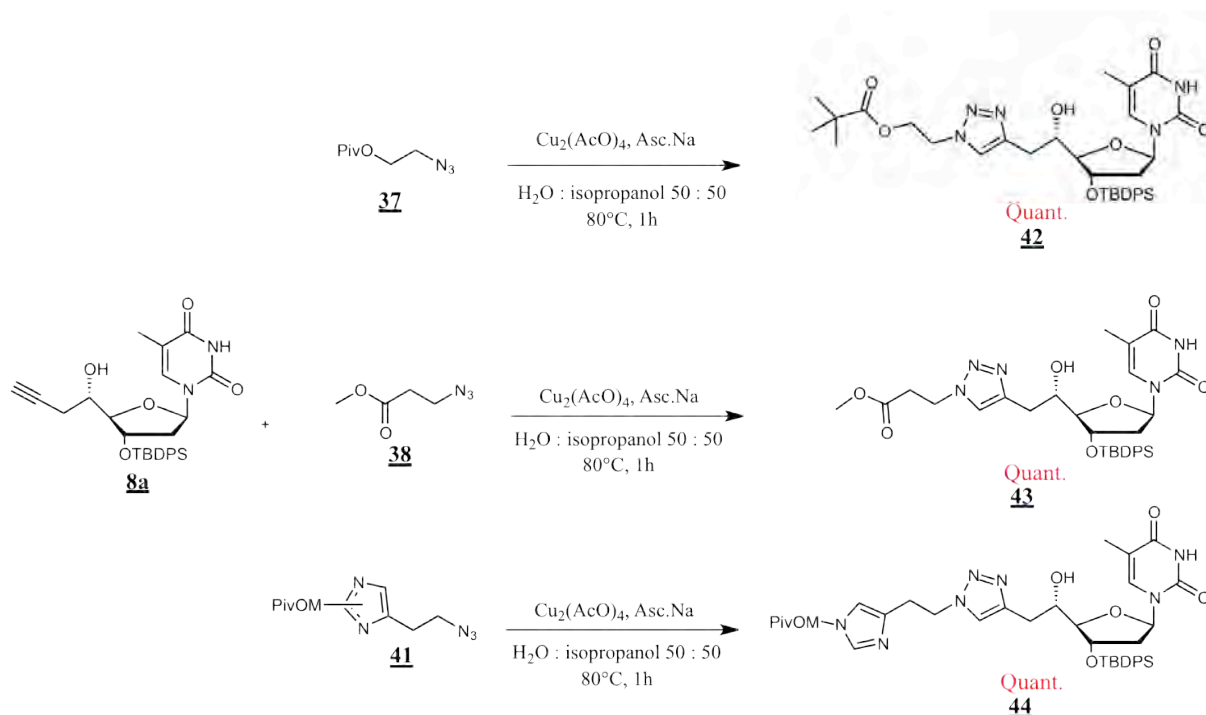
**Tableau 1** : Mise au point des conditions de CuAAC du 2-azidoéthanoate de méthyle sur le composé **8a**.

Entrée	Source de Cuivre	Eq.	Asc.Na (eq.)	Solvants	T.(°C)	Temps (h)	Rdt %
1	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,3	0,3	CH <sub>3</sub> CN	30	12	0
2	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,3	0,3	H <sub>2</sub> O/MeOH 1 :1	30	12	0
3	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,3	0,3	H <sub>2</sub> O/MeOH 1 :1	80	12	0
4	CuI	0,5	0,5	MeCN/DIPA 4 :1	30	12	38
5	Cu <sub>2</sub> (AcO) <sub>4</sub>	0,2	0,2	H <sub>2</sub> O/iPrOH 1 :1	30	12	0
6	Cu <sub>2</sub> (AcO) <sub>4</sub>	1,2	1,2	H <sub>2</sub> O/iPrOH 1 :1	30	12	53
7	Cu <sub>2</sub> (AcO) <sub>4</sub>	1,2	1,2	H <sub>2</sub> O/iPrOH 1 :1	80	1	100

En présence de cuivre II en quantité catalytique (entrée 1,2,3), la cycloaddition n'a pas eu lieu malgré les changements de solvant (entrée 2) et de température (entrée 3). La catalyse au cuivre II en présence de réducteur (ascorbate de sodium) ne donnant aucun résultat, un essai avec du cuivre I en présence d'une base a été mené (entrée 4). Dans ces conditions, le produit a été obtenu avec un rendement de 38%.

En parallèle, les essais avec du cuivre II en quantité catalytique ont été poursuivis en remplaçant le sulfate de cuivre par de l'acétate de cuivre (entrée 5) afin de vérifier si la source de cuivre était à l'origine du problème, mais comme pour le sulfate de cuivre (entrée 3), la cycloaddition ne se produit pas. En supposant que le cuivre pourrait se complexer avec d'autres fonctions présentes sur les nucléosides (N-H de la base azotée par exemple), la quantité de cuivre a été augmentée (entrée 6). Dans ce cas 53% de conversion en produit attendu est obtenue. Une augmentation de la température de 30°C à 80°C (entrée 7) a finalement permis d'obtenir 100% de conversion de l'alcyne. Ces dernières conditions ont donc été retenues pour la réaction de CuAAC entre les azotures **37**, **38** et **41** sur l'alcyne **8a**.

Les réactions ont donc été réalisées dans un mélange eau/isopropanol en présence d'acétate de cuivre et d'ascorbate de sodium en chauffant pendant une heure à 80°C. Dans ces conditions la cycloaddition a permis d'obtenir avec les trois azotures les produits attendus **42**, **43** et **44** avec d'excellents rendements quantitatifs (Schéma 48).



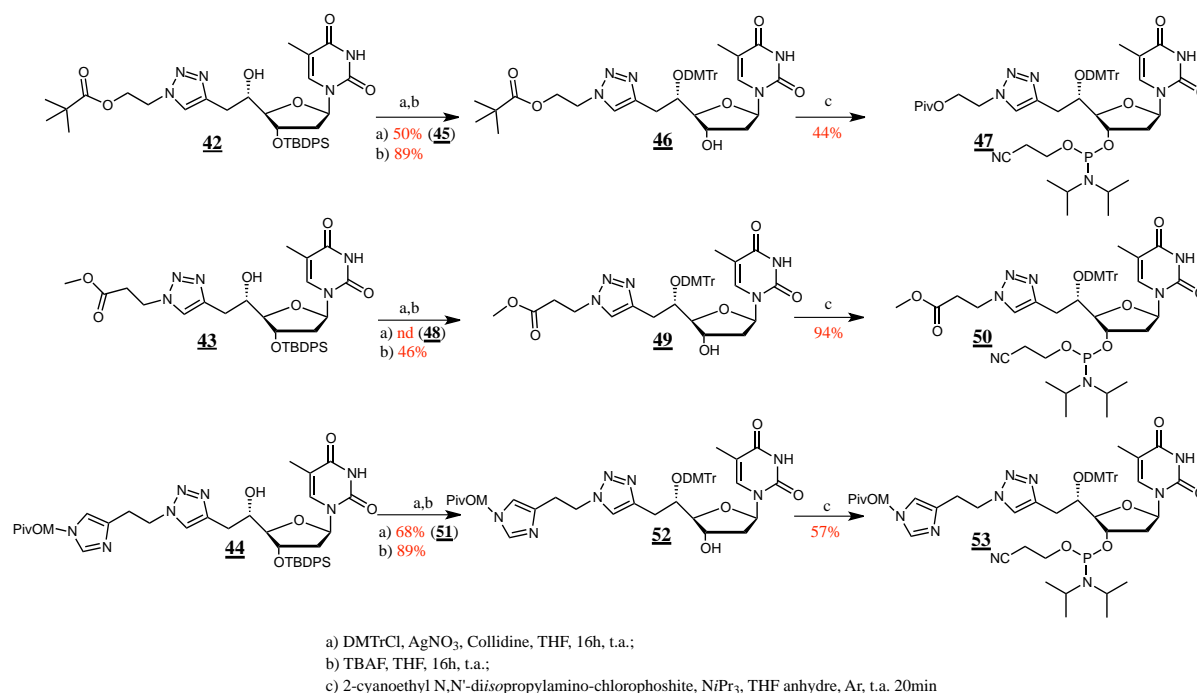
**Schéma 48 : Obtention des produits de cycloaddition 42, 43 et 44.**

L'obtention de ces produits a été confirmée par spectrométrie de masse et spectroscopies RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . Concernant le composé 44, malgré l'utilisation d'un mélange d'azotures (41a et 41b), nous observons la formation d'un seul régioisomère correspondant au produit de click avec l'azoture majoritaire 41a.

### III.2.c) Synthèse des phosphoramidites triazoles

Les étapes de protection de la fonction OH en position 5' par un groupement DMTr, la déprotection du OH en 3' et la phosphitylation en cette position ont été effectuées sur les composés 42, 43 et 44 (Schéma 49). Les nucléotides phosphoramidites 47, 50 et 53 ont été obtenus avec un rendement global de 20%, 43% et 34 % respectivement à partir de l'alcyne 8a.

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés



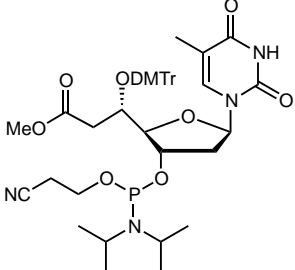
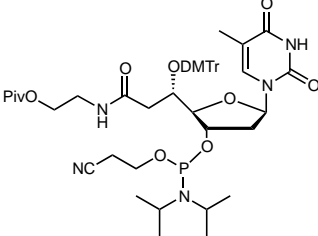
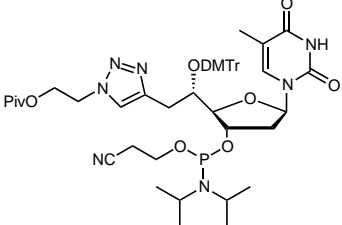
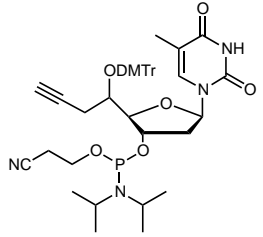
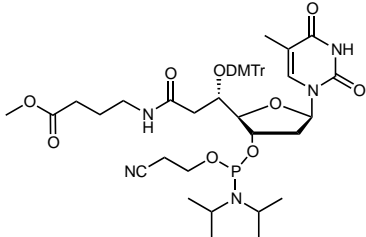
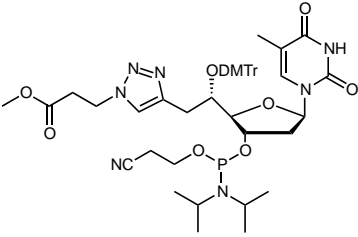
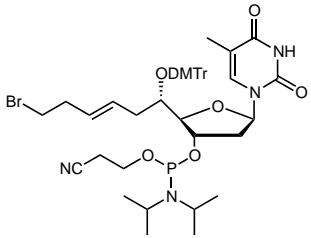
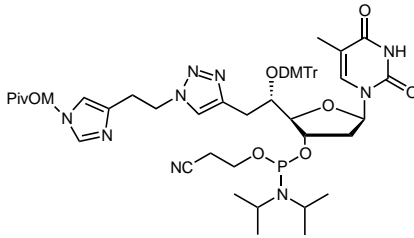
**Schéma 49 : Synthèses des phosphoramidites triazoles 47, 50 et 53.**

Les produits formés ont été caractérisés par spectrométrie de masse et par spectroscopie RMN <sup>31</sup>P avec pour cette dernière deux signaux à 150,10 et 148,32 ppm pour 47, à 149,93 et 148,33 ppm pour 50 et à 148,95 et 148,19 ppm pour 53.

### IV) Conclusion

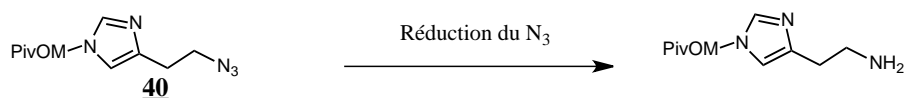
Nous avons en main à ce jour neuf phosphoramidites modifiés dont quatre convertibles, en considérant les formes diastéréoisomériques, et cinq fonctionnalisés disponibles en plusieurs lots pouvant être introduits au sein de séquences oligonucléotidiques (Tableau 2).

**Tableau 2 : Phosphoramidites convertibles et fonctionnalisés disponibles**

Nucléotides convertibles	Nucléotides fonctionnalisés	
	Amides	Triazoles
 <p><b>7</b> convertible ester</p>	 <p><b>32</b> fonctionnalisé amide-Ser</p>	 <p><b>47</b> fonctionnalisé triazole-Ser</p>
 <p><b>10a/10b</b> convertibles alcyne</p>	 <p><b>35</b> fonctionnalisé amide-Asp</p>	 <p><b>50</b> fonctionnalisé triazole-Asp</p>
 <p><b>19</b> convertible linéaire bromé</p>		 <p><b>53</b> fonctionnalisé triazole-His</p>

Pour la synthèse du nucléotide phosphoramidite fonctionnalisé manquant (soit le fonctionnalisé amide-His), une voie possible serait l'utilisation de la fonction azoture en tant que groupement protecteur de la fonction amine permettant l'installation de la protection sur l'amine secondaire du cycle imidazole, en utilisant donc le composé **41** réduit en amine (Schéma 50).

## Chapitre II : Synthèse de nucléotides convertibles et fonctionnalisés



**Schéma 50** : Voie de synthèse envisagée de l'amine protégée sur le N-H de l'imidazole pour l'obtention du nucléoside fonctionnalisé amide-His

Avec cette boîte à outils de phosphoramidites convertibles et fonctionnalisés, il est possible d'envisager plusieurs combinaisons permettant une fonctionnalisation multiple et orthogonale des séquences oligonucléotidiques. Le nucléotide convertible ester **7** présente un double caractère, car il peut être utilisé en tant que tel pour effectuer une conjugaison des brins par substitution nucléophile avec des composés diamines par exemple, mais peut aussi être considéré comme nucléotide fonctionnalisé du fait de sa fonction acide carboxylique masquée sous forme d'ester de méthyle. Les nucléotides convertibles alcyne **10a** et **10b** et le linéaire bromé **19**, conjugables de manière orthogonale peuvent être utilisés pour introduire deux modifications différentes sur un même brin. Les phosphoramidites fonctionnalisés permettent l'introduction directe, simple ou multiple, des modifications souhaitées au sein d'une séquence.

## V) Références bibliographiques du Chapitre II

- [1] Shlyakhtenko, L. S., Potaman, V. N., Sinden, R. R., Gall, A. A., and Lyubchenko, Y. L. (2000) Structure and dynamics of three-way DNA junctions: atomic force microscopy studies, *Nucleic Acids Res.* *28*, 3472-3477.
- [2] Sabir, T., Schröder, G. F., Toulmin, A., McGlynn, P., and Magennis, S. W. (2011) Global Structure of Forked DNA in Solution Revealed by High-Resolution Single-Molecule FRET, *J. Am. Chem. Soc.* *133*, 1188-1191.
- [3] Goodman, R. P., Berry, R. M., and Turberfield, A. J. (2004) The single-step synthesis of a DNA tetrahedron, *Chem. Commun.*, 1372-1373.
- [4] Barth, A., Kobbe, D., and Focke, M. (2016) DNA–DNA kissing complexes as a new tool for the assembly of DNA nanostructures, *Nucleic Acids Res.* *44*, 1502-1513.
- [5] Escudier, J.-M., Tworkowski, I., Bouziani, L., and Gorrichon, L. (1996) Synthèse stéréosélective de thymidine substituée en C-5' , *Tetrahedron Lett.* *37*, 4689-4692.
- [6] Le Roux, C., Gaspard-Iloughmane, H., Dubac, J., Jaud, J., and Vignaux, P. (1993) New effective catalysts for Mukaiyama-aldol and -Michael reactions: bismuth trichloride-metallic iodide systems, *J. Org. Chem.* *58*, 1835-1839.
- [7] Chérest, M., Felkin, H., and Prudent, N. (1968) Torsional strain involving partial bonds. The stereochemistry of the lithium aluminium hydride reduction of some simple open-chain ketones, *Tetrahedron Lett.* *9*, 2199-2204.
- [8] Cram, D. J., and Kopecky, K. R. (1959) Studies in Stereochemistry. XXX. Models for Steric Control of Asymmetric Induction<sup>1</sup>, *J. Am. Chem. Soc.* *81*, 2748-2755.
- [9] Clézio, I. L. (2003) Synthèse, structure et propriétés de dinucléotides contraints par une structure diaxophosphorinane, *Thèse*.
- [10] Amblard, F., Cho, J. H., and Schinazi, R. F. (2009) Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide–Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry, *Chem. Rev.* *109*, 4207-4220.
- [11] Gramlich, P. M. E., Wirges, C. T., Manetto, A., and Carell, T. (2008) Postsynthetic DNA Modification through the Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction, *Angew. Chem. Int. Ed.* *47*, 8350-8358.
- [12] Seela, F., Sirivolu, V. R., and Chittepu, P. (2008) Modification of DNA with Octadiynyl Side Chains: Synthesis, Base Pairing, and Formation of Fluorescent Coumarin Dye

- Conjugates of Four Nucleobases by the Alkyne–Azide “Click” Reaction, *Bioconjugate Chem.* **19**, 211-224.
- [13] Gerland, B., Goudot, A., Ligeour, C., Pourceau, G., Meyer, A., Vidal, S. et al., and Morvan, F. (2014) Structure Binding Relationship of Galactosylated Glycoclusters toward *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA Using a DNA-Based Carbohydrate Microarray, *Bioconjugate Chem.* **25**, 379-392.
- [14] Lietard, J., Meyer, A., Vasseur, J.-J., and Morvan, F. (2008) New Strategies for Cyclization and Bicyclization of Oligonucleotides by Click Chemistry Assisted by Microwaves, *J. Org. Chem.* **73**, 191-200.
- [15] Berndl, S., Herzig, N., Kele, P., Lachmann, D., Li, X., Wolfbeis, O. S., and Wagenknecht, H.-A. (2009) Comparison of a Nucleosidic vs Non-Nucleosidic Postsynthetic “Click” Modification of DNA with Base-Labile Fluorescent Probes, *Bioconjugate Chem.* **20**, 558-564.
- [16] Qiu, J., El-Sagheer, A. H., and Brown, T. (2013) Solid phase click ligation for the synthesis of very long oligonucleotides, *Chem. Commun.* **49**, 6959-6961.
- [17] James, D., Escudier, J.-M., Amigues, E., Schulz, J., Vitry, C., Bordenave, T. et al., and Fouquet, E. (2010) A ‘click chemistry’ approach to the efficient synthesis of modified nucleosides and oligonucleotides for PET imaging, *Tetrahedron Lett.* **51**, 1230-1232.
- [18] Banuls, V., and Escudier, J.-M. (1999) Allylsilanes in the preparation of 5'-C-hydroxy or bromo alkylthymidines, *Tetrahedron* **55**, 5831-5838.
- [19] Hosomi, A., and Sakurai, H. (1976) Syntheses of  $\gamma,\delta$ -unsaturated alcohols from allylsilanes and carbonyl compounds in the presence of titanium tetrachloride, *Tetrahedron Lett.* **17**, 1295-1298.
- [20] Masse, C. E., and Panek, J. S. (1995) Diastereoselective Reactions of Chiral Allyl and Allenyl Silanes with Activated C:X . $\pi$ -Bonds, *Chem. Rev.* **95**, 1293-1316.
- [21] Basha, A., Lipton, M., and Weinreb, S. M. (1977) A mild, general method for conversion of esters to amides, *Tetrahedron Lett.* **18**, 4171-4172.
- [22] Novak, A., Humphreys, L. D., Walker, M. D., and Woodward, S. (2006) Amide bond formation using an air-stable source of AlMe<sub>3</sub>, *Tetrahedron Lett.* **47**, 5767-5769.
- [23] Dubois, N., Glynn, D., McNally, T., Rhodes, B., Woodward, S., Irvine, D. J., and Dodds, C. (2013) On DABAL-Me<sub>3</sub> promoted formation of amides, *Tetrahedron* **69**, 9890-9897.

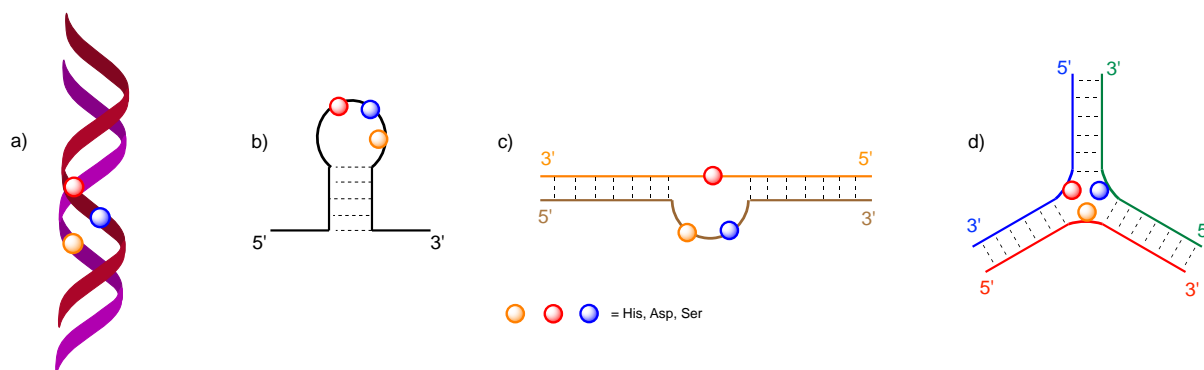


- [24] Glynn, D., Bernier, D., and Woodward, S. (2008) Microwave acceleration in DABAL-Me<sub>3</sub>-mediated amide formation, *Tetrahedron Lett.* *49*, 5687-5688.
- [25] Cavender, C. J., and Shiner, V. J. (1972) Trifluoromethanesulfonyl azide. Its reaction with alkyl amines to form alkyl azides, *J. Org. Chem.* *37*, 3567-3569.
- [26] Vasella, A., Witzig, C., Chiara, J.-L., and Martin-Lomas, M. (1991) Convenient Synthesis of 2-Azido-2-deoxy-aldoses by Diazo Transfer, *Helv. Chim. Acta* *74*, 2073-2077.
- [27] Alper, P. B., Hung, S.-C., and Wong, C.-H. (1996) Metal catalyzed diazo transfer for the synthesis of azides from amines, *Tetrahedron Lett.* *37*, 6029-6032.
- [28] Goddard-Borger, E. D., and Stick, R. V. (2007) An Efficient, Inexpensive, and Shelf-Stable Diazotransfer Reagent: Imidazole-1-sulfonyl Azide Hydrochloride, *Org. Lett.* *9*, 3797-3800.
- [29] Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., and Sharpless, K. B. (2002) A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.* *41*, 2596-2599.
- [30] Tornøe, C. W., Christensen, C., and Meldal, M. (2002) Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides, *J. Org. Chem.* *67*, 3057-3064.

**Chapitre III : Synthèse des oligonucléotides**



Les nucléotides synthétisés présentés dans le chapitre II ont été utilisés pour la synthèse de séquences oligonucléotidiques modifiées. L'objectif est de réussir à obtenir plusieurs structures secondaires portant des modifications qui miment les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans le site actif des protéases à serine et de contrôler l'orientation de ces dernières, afin de recréer un centre catalytique capable d'hydrolyser un lien peptidique. La double hélice canonique a aussi été envisagée (Figure 52\_a), mais du fait de sa rigidité nous envisageons d'exploiter dans un premier temps d'autres structures secondaires. De plus, les travaux de l'équipe de Madder, visant à reproduire là même catalyse avec une structure en double hélice, n'ont pas fourni, à ce jour, des résultats de catalyse positifs<sup>1</sup>. Les trois autres structures secondaires envisagées sont de type épingle à cheveux (Figure 53\_b), de type bulge (Figure 53\_c) et de type jonction trois voies (Figure 53\_d).



**Figure 53 : Structures secondaires fonctionnalisées envisagées.**

Ces agencements, du fait de la présence de bases non appariées, sont caractérisés par une flexibilité plus importante par rapport à la double hélice classique. De plus les cavités ainsi formées, dans lesquelles nous installons les modifications, et dont la taille est modulable en fonction de ces dernières en modifiant la séquence, permettraient de recréer des poches induisant la catalyse.

Les séquences ont été définies de façon à être les plus polyvalentes possibles, c'est à dire de façon à pouvoir être utilisées pour la construction de plusieurs structures quand cela est possible. Le tableau 3 présente toutes les séquences envisagées ainsi que les structures dans lesquelles ces dernières peuvent être impliquées.

### Chapitre III : Synthèse des oligonucléotides

**Tableau 3 : Séquences synthétisées (code couleur correspondant au code couleur des brins Figure 52).**

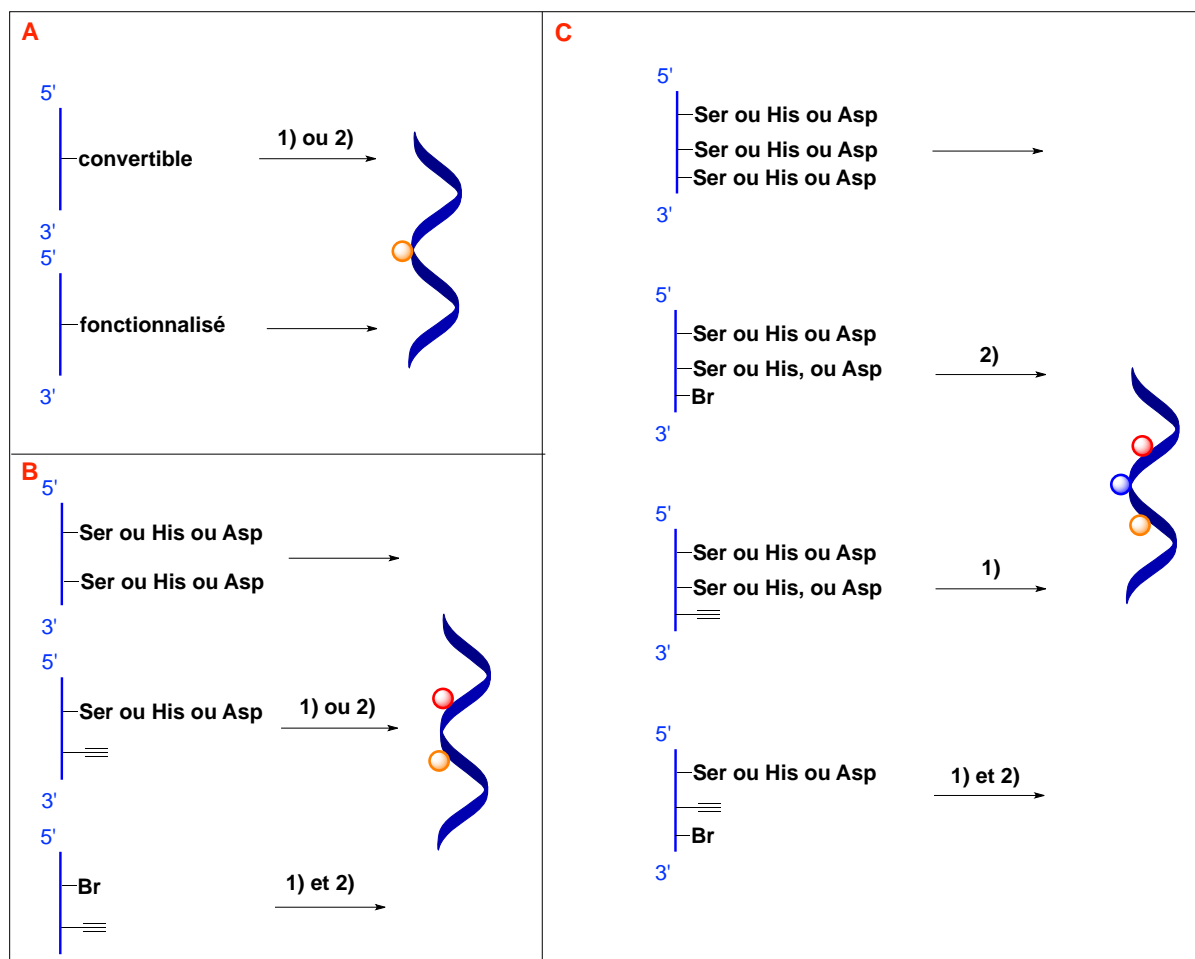
Nom	Séquence	Structure
S <sub>1</sub>	5'- GCG ACC TAT TGC AAG TGG -3'	Jonction trois voies
S <sub>2</sub>	5'- CCA CTT GCA TGT GTG TGC C -3'	Jonction trois voies
S <sub>3</sub>	5'- GGC ACA CAC TTA GGT CGC -3'	Jonction trois voies
S <sub>4</sub>	5'- GGC ACA CAC TTA GGT CGC -3'	Duplex/bulge
S <sub>5</sub>	5'- GCG ACC TAA GTG TGT GCC -3'	Duplex
S <sub>6</sub>	5'- GCG ACC TTT TTT AGT GTG TGC C -3'	Bulge
S <sub>7</sub>	5'- ATC CTA TTT TTT AGG AT -3'	Épingle à cheveux

Avec ces séquences il est possible d'obtenir les structures duplex (S<sub>4</sub>, S<sub>5</sub>), épingle à cheveux (S<sub>7</sub>), bulge (S<sub>4</sub>, S<sub>6</sub>) et jonction trois voies (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>). Comme nous disposons de phosphoramidites modifiés uniquement en base T, les séquences ont été établies de manière à avoir ces dernières aux points stratégiques d'intérêt.

La position des modifications a été choisie de manière à ce que lorsque les trois sont combinées, celles-ci puissent s'organiser dans l'espace sans induire une gêne supplémentaire à la structure tout en pouvant interagir entre elles. Pour les structures de type jonction trois voies, bulge et épingle à cheveux, les modifications ont été situées au niveau des zones non appariées des séquences. Dans le cas particulier du duplex, la position des trois modifications sur les deux brins complémentaires a été choisie grâce à un modèle moléculaire 3D. Cela a été nécessaire afin de s'assurer que les trois modifications (deux sur le brin S<sub>5</sub> et une sur le brin S<sub>4</sub>) soient positionnées correctement et puissent interagir entre elles.

D'un point de vue synthétique, l'obtention des quatre structures souhaitées nécessite une approche différente. En effet, dans le cas de la jonction trois voies, une seule modification par brin est nécessaire. Pour les structures duplex et bulge, une des deux séquences nécessite deux modifications au sein du même brin. Et enfin l'épingle à cheveux comporte un seul brin portant les trois modifications nécessaires à la formation de la triade catalytique. De ce fait, pour la jonction trois voies, il est possible d'employer indistinctement tous les nucléotides modifiés présentés, convertibles et/ou fonctionnalisés (Schéma 51\_A). Pour l'obtention des brins doublement modifiés du

duplex et du bulge, et du brin portant trois modifications de l'épingle à cheveux, plusieurs approches sont envisageables (Schéma 51\_B et C). Il est possible d'intégrer plusieurs nucléotides fonctionnalisés au sein de la même séquence, ainsi aucune autre étape de synthèse n'est nécessaire, ou alors il faut combiner les nucléotides convertibles linéaire bromé et alcyne qui sont orthogonaux entre eux et les nucléotides fonctionnalisés de manière à obtenir une pluri-fonctionnalisation.



1) CuAAC

2) Substitution nucléophile

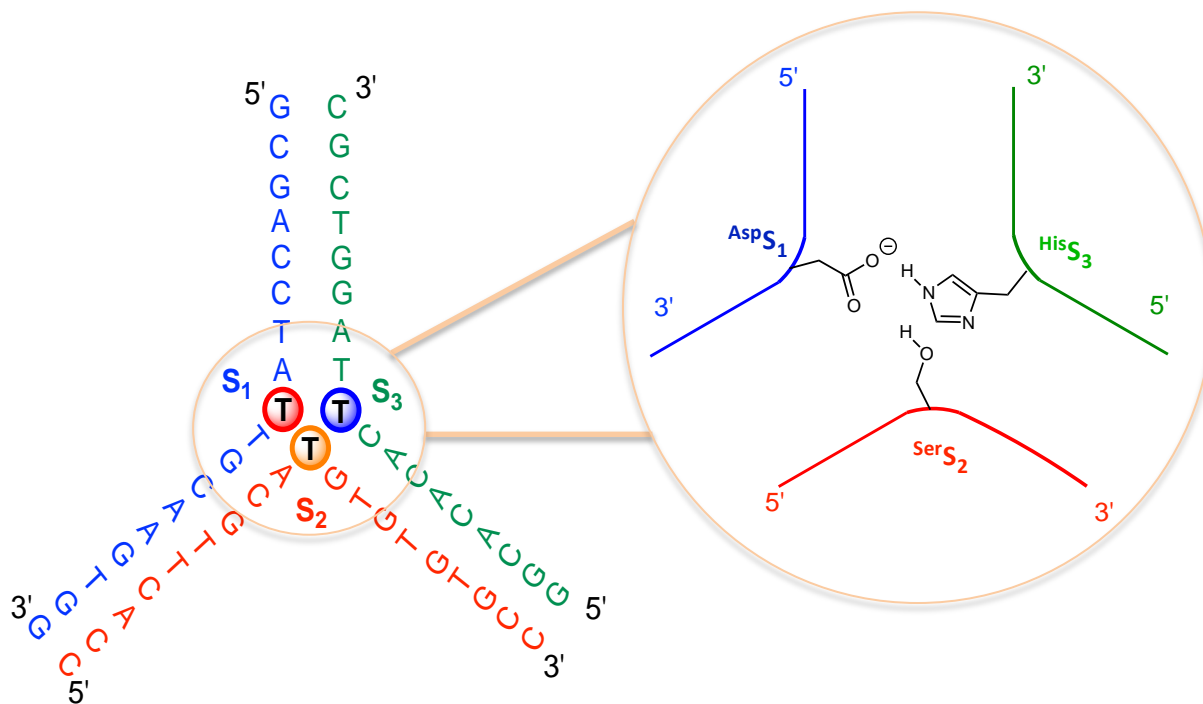
**Schéma 51** : Différentes approches envisageables pour l'obtention de séquence mono (A), bi (B) et tri-modifiées (C).

Afin de valider le concept général du projet et afin de vérifier l'incorporation des nucléotides modifiés au sein des séquences lors de la synthèse automatisée, nous avons décidé de commencer par la construction de la jonction trois voies car il s'agit de la structure secondaire la plus simple à réaliser puisqu'elle ne nécessite que la synthèse de brins portant une seule modification. Les nombreux travaux antérieurs rapportés dans

la littérature justifient de l'intérêt pour ce type de structure. L'équipe de Duprey a développé une jonction trois voie portant un ligand bidentate de type bipyridine sur chaque brin capable de complexer un ion métallique central comme le nickel (II), le fer (II) ou le cobalt II par exemple permettant de stabiliser ultérieurement la structure<sup>2</sup>. L'importance de la jonction trois voie dans les processus de recombinaison et répliation biologiques a induit l'équipe de Sartor a développer des systèmes où la jonction trois voie est couplée à un complexe de ruthénium polypyridiles par stratégie sticky end. Un très bon contrôle du nombre de complexes de ruthénium couplés et de la distance entre le cœur de la jonction et ces derniers est obtenu<sup>3</sup>. Cette structure nous semble la plus prometteuse car stable grâce à l'appariement des bases, et est reconnue pour sa flexibilité notamment lorsque des bases non appariées sont présentes au cœur de la jonction permettant d'accueillir entre autre des modifications et des substrats<sup>4-7</sup>.

### **I) Synthèse et caractérisation de la jonction trois voies**

Une jonction trois voies est constituée de trois brins semi-complémentaires entre eux qui s'associent en créant une cavité centrale.  $S_1$ ,  $S_2$  et  $S_3$  étant les trois séquences qui forment la jonction, nous avons choisi de laisser au sein de cette cavité un nucléotide T non apparié sur chaque brin qui porte la modification (Figure 54).

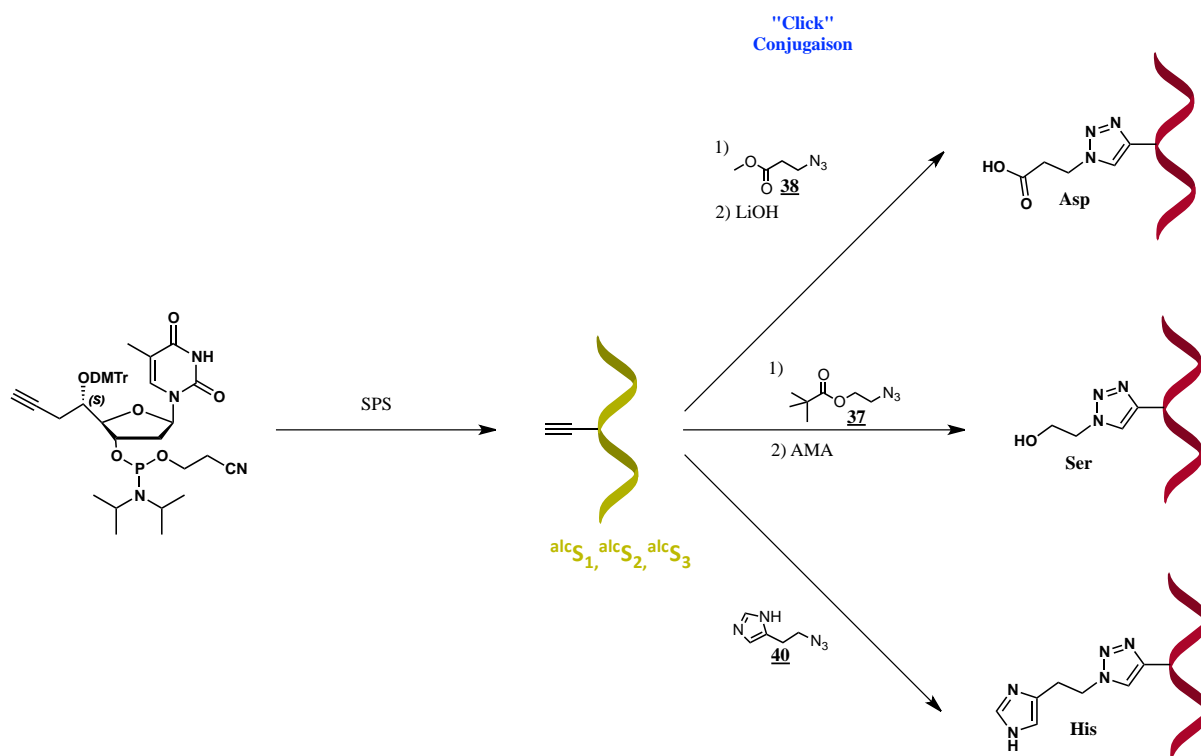


**Figure 54** : Jonction trois voies construite avec les T centraux non appariés (à gauche), agrandissement de la cavité centrale portant les trois modifications rappelant les chaînes latérales des acides aminés acide aspartique, serine et histidine (à droite).

Nous avons décidé de n'utiliser dans un premier temps que le nucléotides convertible alcyne **10a** car il nous paraît plus prometteur. En effet, d'une part, sa synthèse chimique est plus simple par rapport aux nucléotides fonctionnalisés synthétisés, et, par rapport aux nucléotides convertibles ester **7** et linéaire bromé **19**, le composé **10a** porte une fonction alcyne qui, différemment des deux autres, est orthogonale à l'étape de décrochage du support, permettant de récupérer les séquences synthétisées afin de les caractériser avant l'étape de conjugaison. Comme explicité dans le schéma 21, l'utilisation des nucléotides convertibles ester **7** et linéaire bromé **19** nécessiterait une conjugaison avant d'effectuer le décrochage de la séquence du support.

De ce fait nous avons commencé par la synthèse de brins portant comme modifications le nucléotide convertible alcyne **S 10a** permettant une conjugaison avec les azotures déjà à disposition **37**, **38** et **40** car auparavant utilisés pour la synthèse des nucléotides fonctionnalisés **47**, **50** et **53** (Schéma 52). Pour les azotures **37** et **38** une étape ultérieure de déprotection de ces dernier est nécessaire, respectivement avec une solution d'AMA et de LiOH, afin d'aboutir aux séquences finales.





**Schéma 52** : Schéma général de la synthèse et de la conjugaison des brins par CuAAC pour la construction de la jonction trois voies.

### I.1) Synthèse des brins porteurs de la fonction alcyne (<sup>alc</sup>S<sub>i</sub>)

Les séquences S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> obtenues par synthèse automatisée sur support solide (cycle complet détaillé dans le Chapitre I\_III\_2) ont été synthétisées avec en position non pariée un T modifié ou non par un alcyne. Cela nous permet de construire la jonction trois voies avec et sans modifications afin d'évaluer l'effet de ces dernières sur la jonction. Dans le tableau 4 sont représentées les séquences synthétisés ainsi que les analyses des temps de rétention (T<sub>r</sub>) obtenus par HPLC analytique en phase inverse et les masses obtenues par spectroscopie de masse MALDI-TOF après purification par HPLC préparative en phase inverse. Les séquences définies avec un exposant « wt » pour « wild-type » désignent des séquences non modifiées, celles avec un exposant « alc » désignent des séquences portant le nucléotide **10a**. L'indice identifie le numéro de la séquence.

## Chapitre III : Synthèse des oligonucléotides

**Tableau 4 :** Tableau récapitulatif des séquences synthétisées. <sup>wt</sup>S<sub>x</sub>: séquence non modifiée. <sup>alc</sup>S<sub>x</sub>: séquence incorporant le nucléotide alcyne **10a**. T<sub>r</sub> : Temps de rétention. [M-H]<sup>-</sup>: masse anionique calculée et trouvée.

Séquences		T <sub>r</sub> (min.)	[M-H] <sup>-</sup> théorique	[M-H] <sup>-</sup> trouvée
<sup>wt</sup> S <sub>1</sub>	5'-GCG ACC TAT TGC AAG TGG-3'	6,35 <sup>1</sup>	5538,6	5539,9
<sup>wt</sup> S <sub>2</sub>	5'-CCA CTT GCA TGT GTG TGC C-3'	6,40 <sup>1</sup>	5769,7	5771,0
<sup>wt</sup> S <sub>3</sub>	5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	6,27 <sup>1</sup>	5483,6	5484,3
<sup>alc</sup> S <sub>1</sub>	5'-GCG ACC TAT <b>T</b> TGC AAG TGG-3'	6,52 <sup>2</sup>	5576,6	5577,0
<sup>alc</sup> S <sub>2</sub>	5'-CCA CTT GCA TG <b>T</b> GTG TGC C-3'	6,57 <sup>2</sup>	5807,8	5806,7
<sup>alc</sup> S <sub>3</sub>	5'-GGC ACA CAC <b>T</b> TA GGT CGC-3'	6,49 <sup>2</sup>	5521,6	5520,8

<sup>1</sup> Analyses effectuées sur un appareil Waters 717 plus combiné avec un détecteur UV 600, avec un débit de 1ml/min en utilisant un gradient de solvants tampon aqueux triéthylammonium à pH=7/acétonitrile de 85/15 à 95/5 pendant 15 minutes.

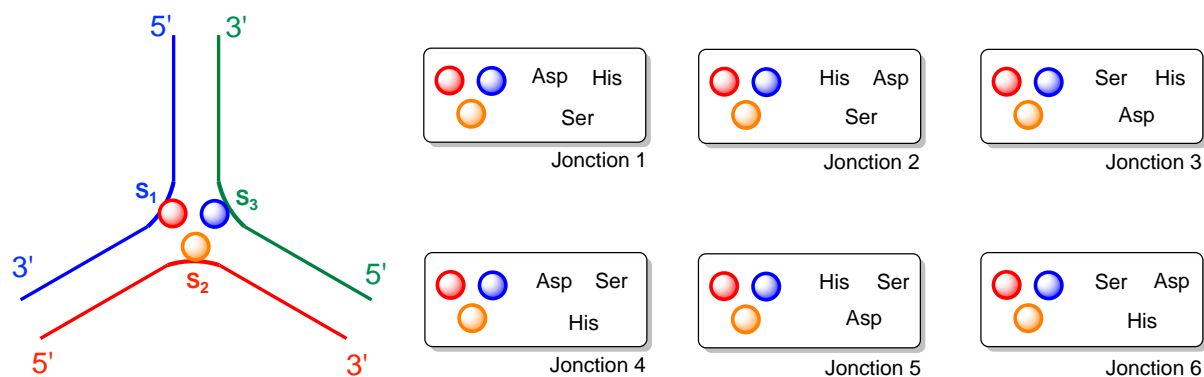
<sup>2</sup> Analyses effectuées sur une Alliance Waters 2695-Separation module, avec un débit de 1ml/min en utilisant un gradient de solvants tampon aqueux triéthylammonium / acétonitrile à pH=7 de 85/15 à 95/5 pendant 15 minutes.

L'incorporation du nucléotide alcyne **10a** a fourni de très bons rendements d'incorporation (> 90%) qui sont déterminés par le synthétiseur grâce au dosage de l'ion DMTr<sup>+</sup> libéré lors de l'étape de déprotection.

Les temps de rétention des séquences portant la modification alcyne présentent des temps de rétention plus longs par rapport aux séquences équivalentes non modifiées du fait de la présence d'un groupement propargyle apolaire supplémentaire. Avant de passer à l'étape successive de conjugaison, les brins portant les modifications ont été purifiés par HPLC préparative en phase inverse afin d'éliminer toute trace d'impuretés éventuellement présentes.

### I.2) Conjugaison avec les fonctions mimes des chaînes latérales des acides aminés histidine, serine et acide aspartique (<sup>Asp</sup>S<sub>1</sub>, <sup>His</sup>S<sub>2</sub>, <sup>Ser</sup>S<sub>3</sub>)

A partir des trois séquences portant le nucléotide convertibile **10a** en main neuf combinaisons de conjugaisons sont possibles (les trois séquences conjuguées avec les trois azoture). Avec l'assemblage de ces dernières il est possible d'obtenir six jonctions trois voies (Figure 55).



**Figure 55 :** Combinaisons possibles des brins constituant les jonctions trois voies.

Nous avons effectué les conjugaisons par CuAAC avec les azotures **37**, **38**, et **40** sur les trois brins S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub>. Les réactions de click ont été réalisées en suivant un même protocole standard avec l'utilisation de trois équivalents d'azoture, 0,4 équivalents de sulfate de cuivre pentahydraté et cinq équivalents d'ascorbate de sodium dans un mélange eau/méthanol (1/1). Le Tableau 5 résume les conditions de réaction mises en places ainsi que les analyses HPLC et MALDI-TOF effectuées après purification par HPLC préparative en phase inverse.

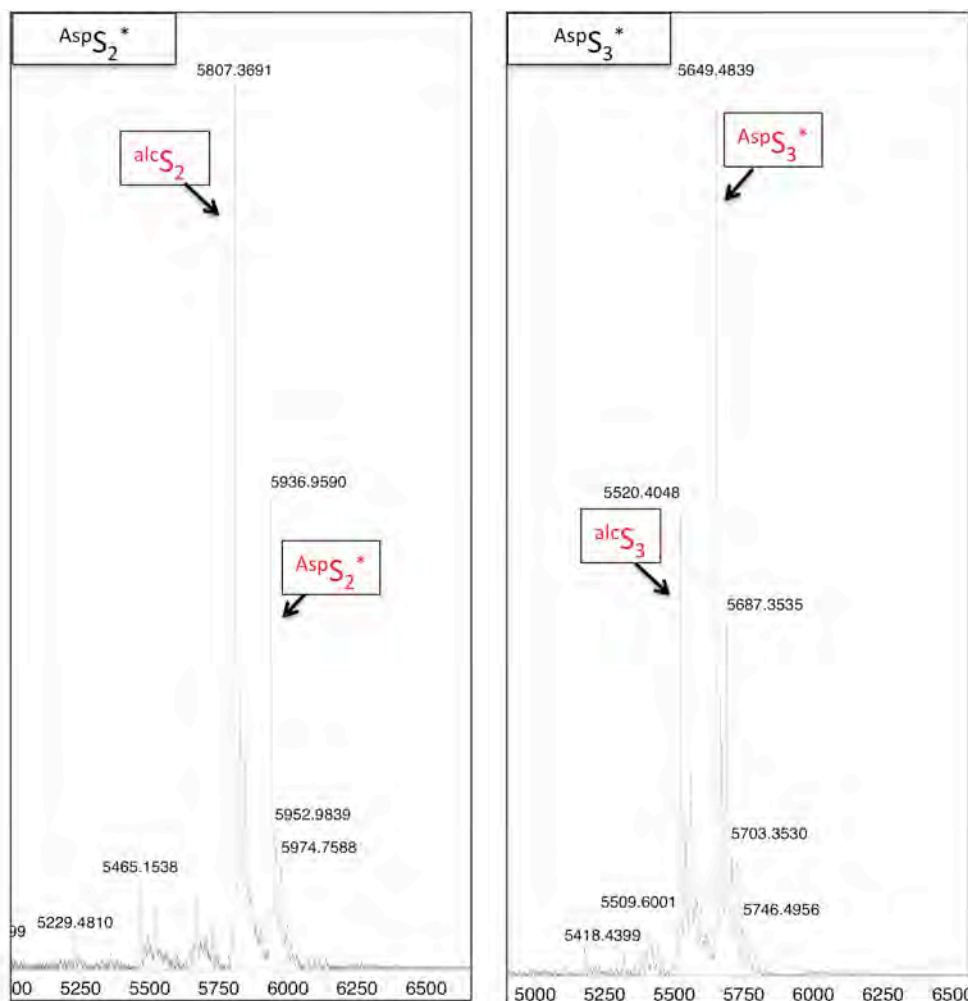
**Tableau 5 :** Conjugaisons des séquences <sup>alc</sup>S<sub>1</sub>, <sup>alc</sup>S<sub>2</sub> et <sup>alc</sup>S<sub>3</sub> avec les azotures **37**, **38** et **40**.

Séquence	Conditions de CuAAC			t <sub>r</sub> (min.) <sup>1</sup>	[M-H] <sup>-</sup> théorique	[M-H] <sup>-</sup> trouvée
	Azoture	Source de Cu	Temps			
SerS <sub>1</sub> *	<b>37</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	30min	8,96	5747,8	5746,8
HisS <sub>1</sub>	<b>40</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	30min	5,85	5713,8	5712,5
AspS <sub>1</sub> *	<b>38</b>	TBTA-Cu	1h	6,60	5705,8	5706,2
SerS <sub>2</sub> *	<b>37</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	90min.	8,63	5979,0	5979,7
HisS <sub>2</sub>	<b>40</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	30min	6,07	5944,9	5946,0
AspS <sub>2</sub> *	<b>38</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	3h	6,72	5936,9	5936,6
SerS <sub>3</sub> *	<b>37</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	90min	8,43	5692,8	5693,1
HisS <sub>3</sub>	<b>40</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	30min.	6,02	5658,7	5660,4
AspS <sub>3</sub> *	<b>38</b>	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	3h	6,57	5650,7	5651,4

\* Séquences portant les groupements protecteurs sur l'azoture conjugué.

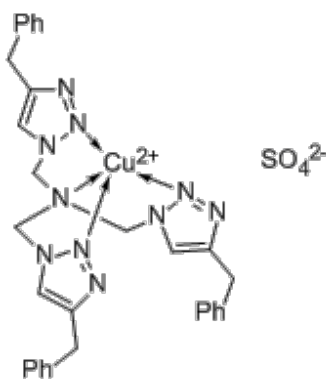
<sup>1</sup> Analyses effectuées sur une Alliance Waters 2695-Separation moduler, avec un débit de 1ml/min en utilisant un gradient de solvants tampon aqueux triéthylammonium / acétonitrile à pH=7 de 85/15 à 95/5 pendant 15 minutes.

Les conjugaisons avec les azotures **37** et **40** ont fourni les séquences désirées  $^{Ser}S_1^*$ ,  $^{Ser}S_2^*$ ,  $^{Ser}S_3^*$ ,  $^{His}S_1$ ,  $^{His}S_2$  et  $^{His}S_3$  avec des rendements quantitatifs. L'introduction de l'azoture **38** s'est révélée plus difficile, comme montré par les temps de réaction plus longs pour les séquences  $^{Asp}S_2^*$  et  $^{Asp}S_3^*$ . Ces dernières ont été obtenues avec des rendements non quantitatifs mais, comme illustré par les spectres MALDI-TOF enregistrés (Figure 56), avec récupération des séquences alcyne  $^{alc}S_2$  et  $^{alc}S_3$  de départ.



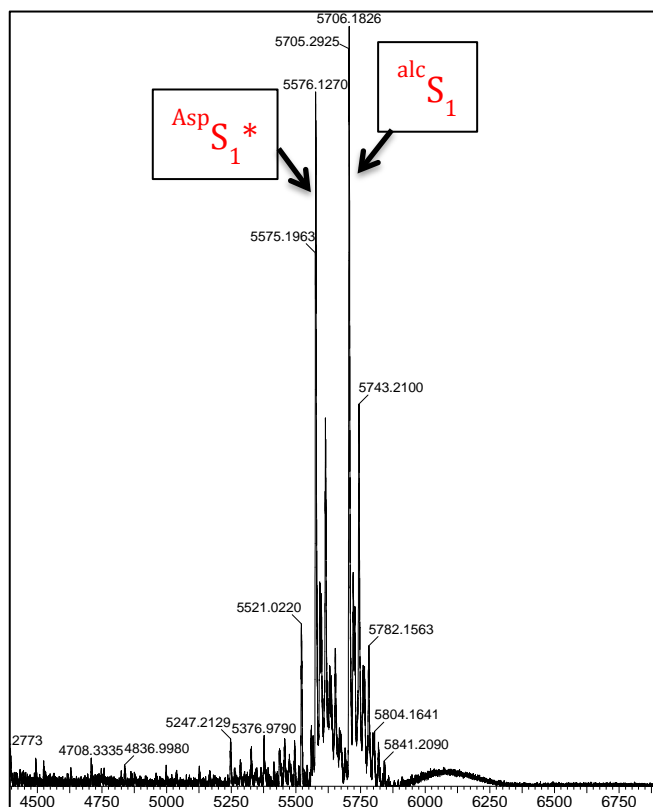
**Figure 56** : Extraits des spectres MALDI-TOF des bruts de réaction de CuAAC  $^{Asp}S_2^*$  et  $^{Asp}S_3^*$ .

Dans le cas de la réaction de conjugaison permettant d'obtenir  $^{Asp}S_1^*$ , aucune conversion n'a été observée dans les conditions classiques et nous n'avons pas d'explication rationnelle à donner. Nous avons alors essayé d'effectuer cette conjugaison en changeant la source de cuivre par du Tris(benzyltriazolylméthyl)amine-cuivre (TBTA-Cu) (Figure 57).



**Figure 57 :** Tris(benzyltriazolylméthyl)amine-cuivre II (TBTA-Cu).

Ce complexe, constitué d'une amine tertiaire substituée par trois cycles triazoles aide à la stabilisation du cuivre dans son état d'oxydation I. Dans ces conditions la conjugaison a donné des résultats positifs pour la réaction de CuAAC avec l'azoture **38** sur la séquence  $S_1$  avec un rendement non quantitatif mais permettant de récupérer majoritairement le produit désiré  $^{Asp}S_1^*$  (Figure 58).

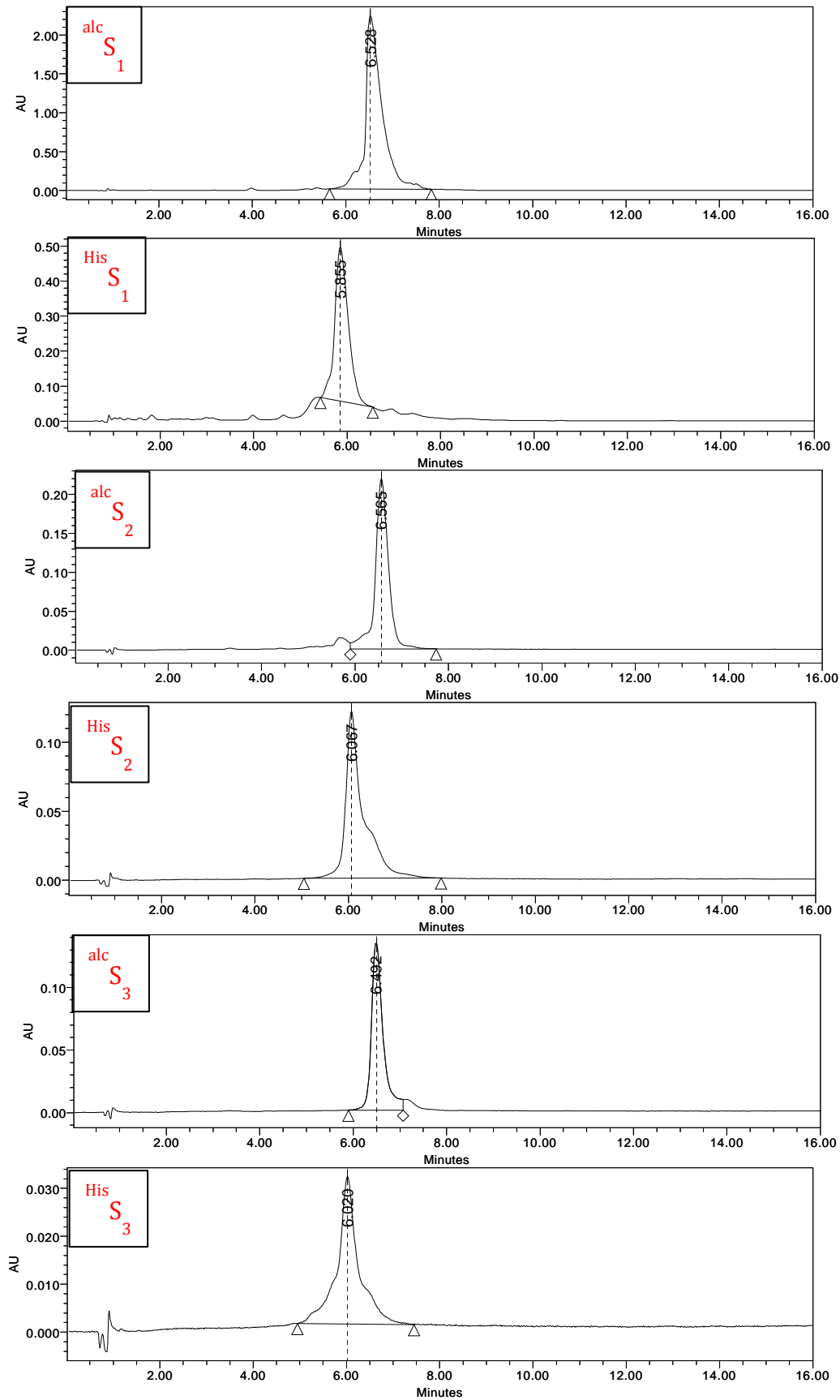


**Figure 58 :** Extrait du spectre Mald-TOF du brut de réaction de CuAAC sur  $^{alc}S_1$  avec l'azoture **38** et le complexe TBTA-Cu.

Les temps de rétention des différentes séquences sont en accord avec les conjugaisons effectuées. Les triazoles formés par la réaction de CuAAC et les groupements protecteurs encore présents sur  $^{Asp}S_x^*$  et  $^{Ser}S_x^*$ , apportent un fort caractère hydrophobe aux

séquences qui se traduit par des temps de rétention plus longs par rapport à ceux des séquences avant conjugaison. Dans le cas de l'introduction de l'azoture **40** sur les trois séquences S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub>, la présence de l'amine secondaire libre de l'imidazole apporte une forte contribution hydrophile qui induit des temps de rétentions plus courts que ceux des séquences alcynes avant conjugaison (<sup>alc</sup>S<sub>1</sub>/<sup>His</sup>S<sub>1</sub> : T<sub>r</sub> = 6,52/5,85 min. ; <sup>alc</sup>S<sub>2</sub>/<sup>His</sup>S<sub>2</sub> : T<sub>r</sub> = 6,57/6,07 min. ; <sup>alc</sup>S<sub>3</sub>/<sup>His</sup>S<sub>3</sub> : T<sub>r</sub> = 6,49/6,02 min.) (Figure 59).

### Chapitre III : Synthèse des oligonucléotides



Analyses effectuées sur une Alliance Waters 2695-Separation moduler, avec un débit de 1ml/min en utilisant un gradient de solvants tampon aqueux triéthylammonium / acétonitrile à pH=7 de 85/15 à 95/5 pendant 15 minutes.

**Figure 59** : Chromatogrammes HPLC analytique des séquences alcS<sub>1</sub>/HisS<sub>1</sub>, alcS<sub>2</sub>/HisS<sub>2</sub> et alcS<sub>3</sub>.

Les séquences conjuguées avec les azotures protégés **37** et **38** ont ensuite été soumises à une étape de déprotection par traitement avec une solution aqueuse 0,5 M de AMA pour les séquences  $^{Ser}S_1$ ,  $^{Ser}S_2$  et  $^{Ser}S_3$  et 0,5M de lithine pour les séquences  $^{Asp}S_1$ ,  $^{Asp}S_2$  et  $^{Asp}S_3$  **38** (Tableau 6).

**Tableau 6** : Temps de rétention et analyses MALDI-TOF après déprotection des séquences conjuguées avec les azotures **37** et **38**.

Séquence	Conditions de déprotection	$T_r$ (min) <sup>1</sup>	$\Delta T_r$ <sup>2</sup>	[M-H] <sup>-</sup> théorique	[M-H] <sup>-</sup> trouvée
$^{Ser}S_1$	AMA 0,5 M	5,37	3,59	5663,7	5662,3
$^{Asp}S_1$	Lithine 0,5 M	5,04	1,66	5691,7	5692,3
$^{Ser}S_2$	AMA 0,5 M	5,74	2,89	5894,8	5893,7
$^{Asp}S_2$	Lithine 0,5 M	5,18	1,54	5922,9	5923,1
$^{Ser}S_3$	AMA 0,5 M	5,44	2,99	5608,7	5607,5
$^{Asp}S_3$	Lithine 0,5 M	4,75	1,82	5936,7	5636,8

<sup>1</sup> Analyses effectuées sur une Alliance Waters 2695-Separation moduler, avec un débit de 1ml/min en utilisant un gradient de solvants tampon aqueux triéthylammonium / acétonitrile à pH=7 de 85/15 à 95/5 pendant 15 minutes.

<sup>2</sup>. Par rapport au  $T_r$  avant déprotection

Dans ce cas aussi les temps de rétention obtenus par les analyses HPLC reflètent la présence de fonctions hautement polaires (l'hydroxyle pour les séquences conjuguées avec **37** et la fonction acide carboxylique des séquences conjuguées avec **38**).

### I.3) Formation des jonctions trois voies

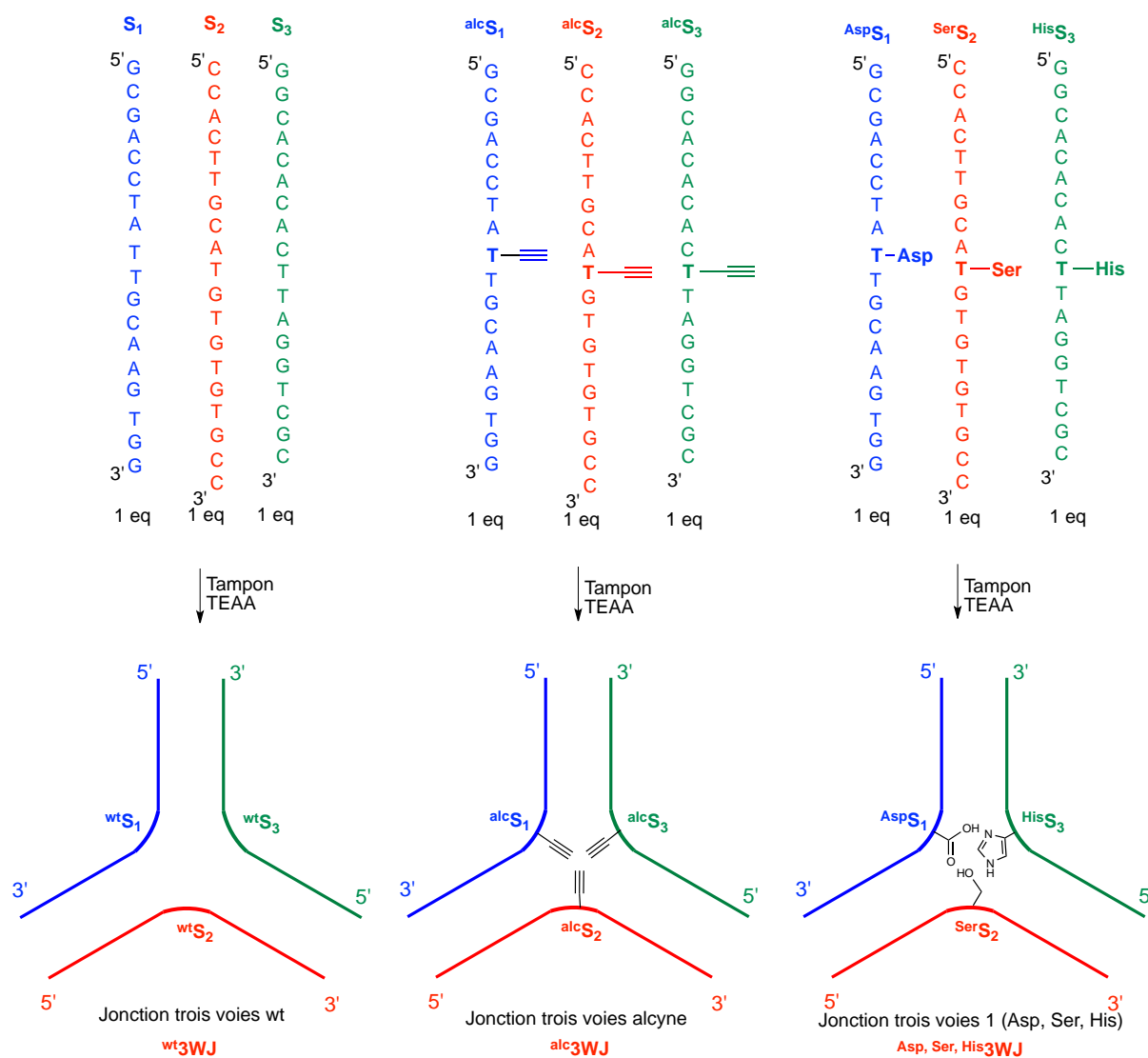
Par la combinaison des séquences  $S_1$ ,  $S_2$  et  $S_3$ , avec et sans fonctions supplémentaires, il a été possible d'obtenir les jonctions trois voies.

Nous avons choisi dans un premier temps de manière arbitraire une des combinaisons possibles décrites Figure 50 à savoir, celle relative à la jonction 1 constituée par la combinaison de  $^{Asp}S_1$ ,  $^{Ser}S_2$  et  $^{His}S_3$  que nous appellerons  $^{Asp, Ser, His}3WJ$ . Parallèlement les jonctions alcyne  $^{alc}3WJ$ , constituée de  $^{alc}S_1$ ,  $^{alc}S_2$  et  $^{alc}S_3$ , et la jonction non modifiée  $^{wt}3WJ$  constituée de  $^{wt}S_1$ ,  $^{wt}S_2$  et  $^{wt}S_3$  ont aussi été préparées (Schéma 53). Ceci a été possible grâce à un dosage UV effectué au préalable sur chacune des solutions contenant les



### Chapitre III : Synthèse des oligonucléotides

séquences. Grâce à la loi de Beer Lambert  $A = \epsilon \times l \times C$  avec  $A$  absorbance,  $\epsilon$  coefficient d'extinction molaire,  $l$  longueur du trajet optique et  $C$  concentration de la solution, il a été possible de déterminer les concentrations de chaque solution. La valeur de  $\epsilon$  prise en compte pour chaque séquence est celle relative à la séquence non modifiée estimée sur le site [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com).



**Schéma 53 : Jonctions trois voies préparées.**

Les trois brins semi complémentaires entre eux ont été mélangés en quantité équimolaire et solubilisés dans un milieu tamponné d'acétate de triéthylammonium (TEAA) 0.05 M à pH 7. Afin d'assurer que les brins s'associent entre eux pour former les jonctions trois voies, les solutions ont été soumises à une étape de dénaturation

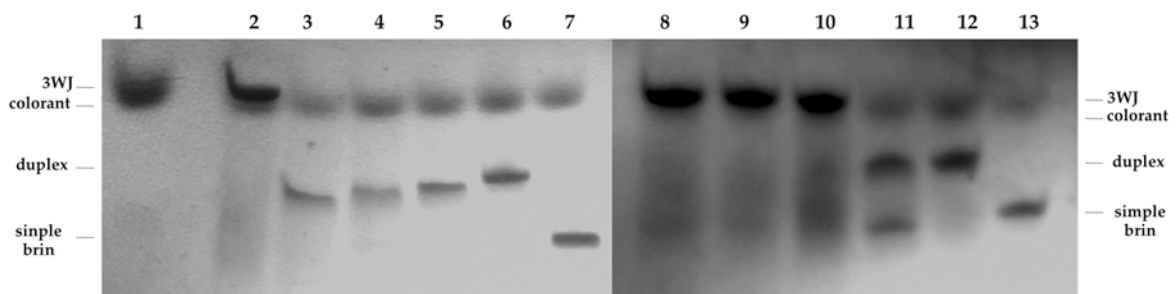
thermique en chauffant à 90°C, puis laissées revenir à température ambiante très lentement.

#### I.4) Etudes physico-chimiques des structures obtenues

Des études physico-chimiques ont été menées afin d'évaluer d'une part la formation des jonctions trois voies et d'autre part les effets des modifications sur la stabilité de ces dernières. Pour cela nous avons dans un premier temps étudié les structures par électrophorèse sur gel de polyacrilamide (PAGE), ensuite nous avons déterminé les températures de dénaturation ( $T_m$ ) en UV et enfin enregistré les spectres de dichroïsme circulaire.

##### I.4.a) Electrophorèse sur gel de Polyacrylamide (PAGE)

Par analyse par électrophorèse PAGE dans des conditions non dénaturantes, il est possible de déterminer si la formation de structures secondaires a eu lieu car en fonction de leur taille elles migrent plus ou moins rapidement sur le gel. Nous avons pour cela fait migrer les jonctions parallèlement à un duplex, à des semi-jonctions (constituées de seulement de deux brins semi-appariés entre eux) et à un simple brin (Figure 60).



**Figure 60** : Analyse PAGE des 3WJs. Colonne 1: xylène cyanol (visible dans toutes les colonnes); colonne 2: wt3WJ (wtS<sub>1</sub> + wtS<sub>2</sub> + wtS<sub>3</sub>); colonne 3: wtS<sub>3</sub> + wtS<sub>1</sub>; colonne 4: wtS<sub>3</sub> + wtS<sub>2</sub>; colonne 5: wtS<sub>1</sub> + wtS<sub>2</sub>; colonne 6: dwtS<sub>1</sub> + wtS<sub>1</sub>; colonne 7: wtS<sub>2</sub>; colonne 8: wt3WJ (wtS<sub>1</sub> + wtS<sub>2</sub> + wtS<sub>3</sub>); colonne 9: alc3WJ (alcS<sub>1</sub> + alcS<sub>2</sub> + alcS<sub>3</sub>); colonne 10: Asp,Ser,His3WJ (AspS<sub>1</sub> + SerS<sub>2</sub> + HisS<sub>3</sub>); colonne 11: alcS<sub>1</sub> + alcS<sub>2</sub>; colonne 12: alcS<sub>2</sub> + alcS<sub>2</sub>'; colonne 13: alcS<sub>1</sub>.

Les trois jonctions présentent la même mobilité (Figure 59, colonne 2, 8, 9 et 10) et comme attendu migrent beaucoup plus lentement que les doubles brins (Figure 59,

colonne 2 vs colonne 6, colonne 8 et 9 vs colonne 12). De plus, par comparaison avec la migration des semi-jonctions (Figure 59, colonne 3, 4, 5 et 11) et des simples brins (Figure 59, colonne 7 et 13), il est possible de conclure que lorsque les trois brins constituant les jonctions sont mélangés, seules ces dernières se forment.

#### ***1.4.b) Détermination des $T_m$***

La capacité d'appariement des séquences oligonucléotidiques est déterminée par l'étude de leur dénaturation thermique par spectroscopie UV en soumettant les solutions à des variations de température. La  $T_m$  est la température à laquelle 50% de la structure est dénaturée. En partant d'une température initiale de 90 °C, une descente en température lente contrôlée de 1°C par minute permet la formation de la structure secondaire. Ensuite, une montée en température de 0,5 °C par minute permet de séparer à nouveau les brins et de déterminer la  $T_m$ . Enfin, afin de vérifier que l'association est réversible et que l'équilibre est atteint, une nouvelle descente en température est enregistrée.

Pour une vue d'ensemble sur le comportement des brins synthétisés nous avons dans un premier temps déterminé les  $T_m$  des duplex formés avec les séquences  $S_1$ ,  $S_2$  et  $S_3$  modifiées ou pas avec les brins complémentaires non modifiés (séquences  $S'_x$ ) (Tableau 7).

### Chapitre III : Synthèse des oligonucléotides

**Tableau 7 : Valeurs des T<sub>m</sub> mesurées pour les duplex préparés. Les valeurs de T<sub>m</sub> de duplex<sup>wt</sup>S<sub>1</sub> (Ref 1), duplex<sup>wt</sup>S<sub>2</sub> (Ref 2) et duplex<sup>wt</sup>S<sub>3</sub> (Ref 3) servent de références pour les calculs des ΔT<sub>m</sub>.**

Entrée	Nom Duplex	Duplex - Séquences	T <sub>m</sub> (ΔT <sub>m</sub> °C)
1	Duplex <sup>wt</sup> S <sub>1</sub>	<sup>wt</sup> S <sub>1</sub> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <sup>wt</sup> S' <sub>1</sub> 3'CGC TGG ATA ACG TTC ACC	66 °C (ref 1)
2	Duplex <sup>wt</sup> S <sub>2</sub>	<sup>wt</sup> S <sub>2</sub> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <sup>wt</sup> S' <sub>2</sub> 3'GGT GAA CGT ACA 147ACA CG G	69 °C (ref 2)
3	Duplex <sup>wt</sup> S <sub>3</sub>	<sup>wt</sup> S <sub>3</sub> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC <sup>wt</sup> S' <sub>3</sub> 3'CCG TGT GTG AAT CCA GCG	68 °C (ref 3)
4	Duplex <sup>alc</sup> S <sub>1</sub>	<sup>alc</sup> S <sub>1</sub> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <sup>wt</sup> S' <sub>1</sub> 3'CGC TGG ATA ACG TTC ACC	65 °C (-1)
5	Duplex <sup>alc</sup> S <sub>2</sub>	<sup>alc</sup> S <sub>2</sub> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <sup>wt</sup> S' <sub>2</sub> 3'GGT GAA CGT ACA CAC ACG G	68 °C (-1)
6	Duplex <sup>alc</sup> S <sub>3</sub>	<sup>alc</sup> S <sub>3</sub> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC <sup>wt</sup> S' <sub>3</sub> 3'CCG TGT GTG AAT CCA GCG	66 °C (-2)
7	Duplex <sup>Asp</sup> S <sub>1</sub>	<sup>Asp</sup> S <sub>1</sub> 5'GCG ACC TAT <sup>Asp</sup> TGC AAG TGG <sup>wt</sup> S' <sub>1</sub> 3'CGC TGG ATA ACG TTC ACC	64 °C (-2)
8	Duplex <sup>Ser</sup> S <sub>2</sub>	<sup>Ser</sup> S <sub>2</sub> 5'CCG CTT GCA T <sup>Ser</sup> GT GTG TGC C <sup>wt</sup> S' <sub>2</sub> 3'GGC GAA CGT ACA CAC ACG G	68 °C (-1)
9	Duplex <sup>His</sup> S <sub>3</sub>	<sup>His</sup> S <sub>3</sub> 5'GGC ACA CAC T <sup>His</sup> TA GGT CGC <sup>wt</sup> S' <sub>3</sub> 3'CCG TGT GTG AAT CCA GCG	68 °C (0)

Au sein des duplexes analysés, du fait de la stéréochimie *S* du carbone chiral 5' des nucléotides modifiés utilisés, les modifications sont dirigées vers le petit sillon. Cela implique une compétition avec les molécules d'eau qui solvatent la structure et, en fonction de la longueur des chaînes introduites, les modifications peuvent dans certains cas interagir avec le groupement phosphodiester. Des études menées auparavant ont démontré que l'introduction de groupements alkyle<sup>8</sup>, allyle, hydroxypropyle ou aminométhyle<sup>9</sup> au sein d'oligonucléotides induit une perte significative de stabilité thermique des structures. Dans le cas d'un substituant aminopropyle-aminopentényle l'effet stabilisant a été expliqué par une interaction favorable entre l'amine protonée et le groupement phosphodiester<sup>10</sup>. Dans notre cas, nous avons, dans le cas des duplexes portant un alcyne (Tableau 7, entrées 4, 5 et 6) une déstabilisation de -1 °C pour <sup>alc</sup>S<sub>1</sub> et <sup>alc</sup>S<sub>2</sub> et de -2 °C pour <sup>alc</sup>S<sub>3</sub>. Dans le cas des duplex <sup>Asp</sup>S<sub>1</sub>, <sup>Ser</sup>S<sub>2</sub> et <sup>His</sup>S<sub>3</sub> (Tableau 7 entrées 7, 8 et 9), malgré la présence du cycle triazole encombrant induisant un important degré de rigidité, la présence des fonctions mimes des chaînes latérales des acides aminés, arrive en partie à compenser l'effet déstabilisant. De fait, les duplex <sup>Ser</sup>S<sub>2</sub> et <sup>Asp</sup>S<sub>1</sub> ne sont que légèrement déstabilisés avec un ΔT<sub>m</sub> de -1°C et -2°C respectivement par rapport aux duplex constitués uniquement de séquences non modifiées, et dans le cas du duplex <sup>His</sup>S<sub>3</sub> un ΔT<sub>m</sub> = 0 a été déterminé par rapport à la référence <sup>wt</sup>S<sub>3</sub> (Tableau 7, entrées 7, 8 et 9).

### Chapitre III : Synthèse des oligonucléotides

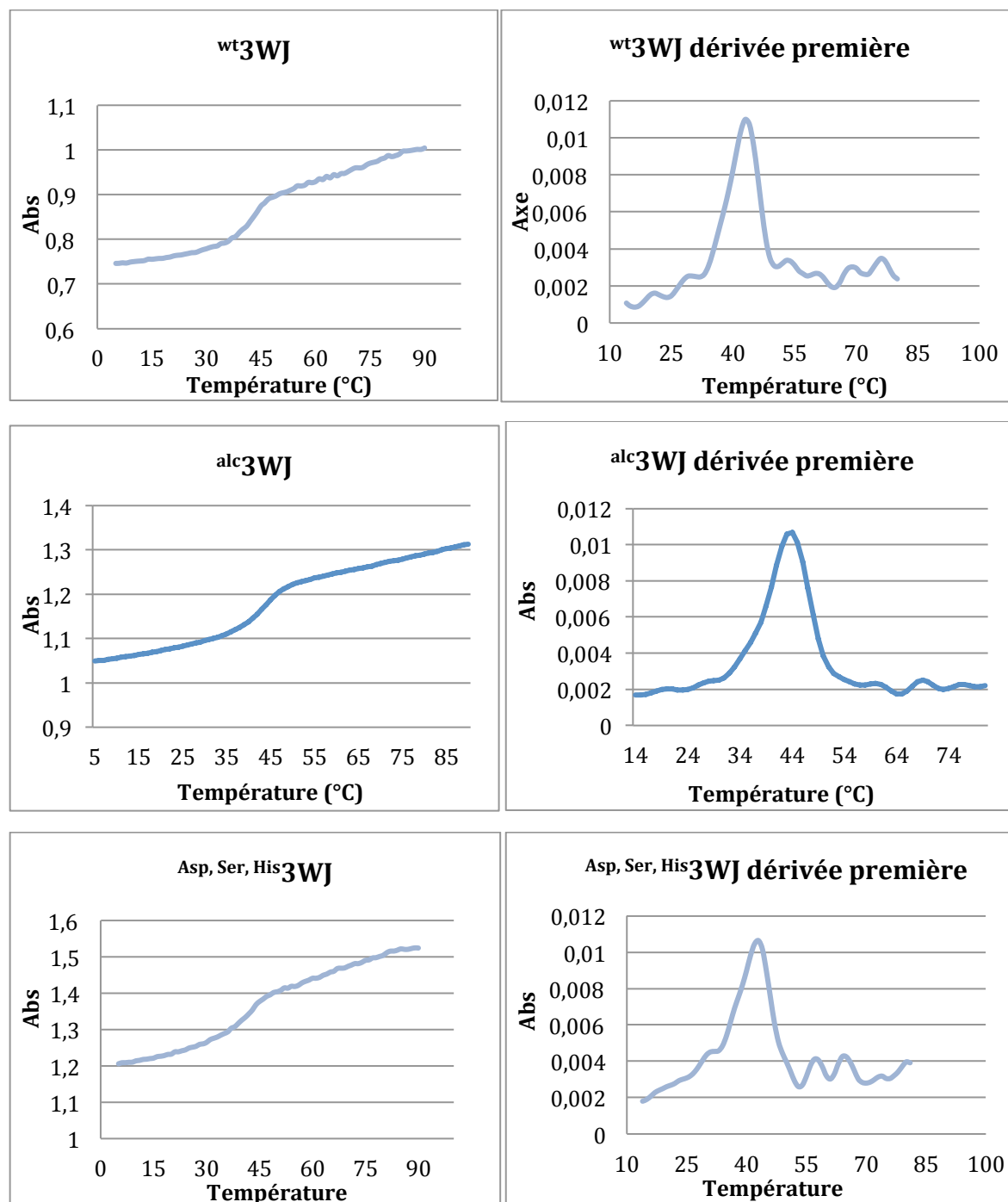
Ensuite, nous avons déterminé les  $T_m$  de la jonction non modifiée <sup>wt</sup>3WJ (Tableau 8 entrée 1) et des jonctions obtenues avec un, deux et trois brins modifiés (Tableau 8 entrées 2-15).

**Tableau 8 : Valeurs des  $T_m$  mesurées pour les jonctions trois voies obtenues.**

Entrée	Nom Jonction	Séquences	$T_m$ ( $\Delta T_m$ °C)
1	Jonction wt ( <sup>wt</sup> 3WJ)	<b>wtS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>wtS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>wtS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	43°C (ref4)
2	Jonction <sup>alc</sup> S <sub>1</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>2</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>3</sub>	<b>alcS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>wtS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>wtS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	43°C (0)
3	Jonction <sup>wt</sup> S <sub>1</sub> , <sup>alc</sup> S <sub>2</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>3</sub>	<b>wtS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>alcS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>wtS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	43 °C (0)
4	Jonction <sup>wt</sup> S <sub>1</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>2</sub> , <sup>alc</sup> S <sub>3</sub>	<b>wtS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>wtS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>alcS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	43 °C (0)
5	Jonction <sup>wt</sup> S <sub>1</sub> , <sup>alc</sup> S <sub>2</sub> , <sup>alc</sup> S <sub>3</sub>	<b>wtS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>alcS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>alcS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	43 °C (0)
6	Jonction <sup>alc</sup> S <sub>1</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>2</sub> , <sup>alc</sup> S <sub>3</sub>	<b>alcS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>wtS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>alcS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	42 °C (-1)
7	Jonction <sup>alc</sup> S <sub>1</sub> , <sup>alc</sup> S <sub>2</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>3</sub>	<b>alcS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>alcS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>wtS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	43 °C (0)
8	Jonction alcyne ( <sup>alc</sup> 3WJ)	<b>alcS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>alcS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>alcS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	43 °C (0)
9	Jonction <sup>Asp</sup> S <sub>1</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>2</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>3</sub>	<b>AspS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT <sup>Asp</sup> TGC AAG TGG <b>wtS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>wtS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	42 °C (-1)
10	Jonction <sup>wt</sup> S <sub>1</sub> , <sup>Ser</sup> S <sub>2</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>3</sub>	<b>wtS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>SerS<sub>2</sub></b> 5'CCG CTT GCA T <sup>Ser</sup> GT GTG TGC C <b>wtS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	44 °C (+1)
11	Jonction <sup>wt</sup> S <sub>1</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>2</sub> , <sup>His</sup> S <sub>3</sub>	<b>wtS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>wtS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>HisS<sub>3</sub></b> 5'GGCACACT <sup>His</sup> TAGGTCCG	44 °C (+1)
12	Jonction <sup>Asp</sup> S <sub>1</sub> , <sup>Ser</sup> S <sub>2</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>3</sub>	<b>AspS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT <sup>Asp</sup> TGC AAG TGG <b>SerS<sub>2</sub></b> 5'CCG CTT GCA T <sup>Ser</sup> GT GTG TGC C <b>wtS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	43 °C (0)
13	Jonction <sup>Asp</sup> S <sub>1</sub> , <sup>wt</sup> S <sub>2</sub> , <sup>His</sup> S <sub>3</sub>	<b>AspS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT <sup>Asp</sup> TGC AAG TGG <b>wtS<sub>2</sub></b> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C <b>HisS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC T <sup>His</sup> TA GGT CGC	43 °C (0)
14	Jonction <sup>wt</sup> S <sub>1</sub> , <sup>Ser</sup> S <sub>2</sub> , <sup>His</sup> S <sub>3</sub>	<b>wtS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG <b>SerS<sub>2</sub></b> 5'CCG CTT GCA T <sup>Ser</sup> GT GTG TGC C <b>HisS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC T <sup>His</sup> TA GGT CGC	44 °C (+1)
15	Jonction Asp, Ser, His ( <sup>Asp, Ser, His</sup> 3WJ)	<b>AspS<sub>1</sub></b> 5'GCG ACC TAT <sup>Asp</sup> TGC AAG TGG <b>SerS<sub>2</sub></b> 5'CCG CTT GCA T <sup>Ser</sup> GT GTG TGC C <b>HisS<sub>3</sub></b> 5'GGC ACA CAC T <sup>His</sup> TA GGT CGC	43 °C (0)

Nous avons choisi de former les jonctions trois voies par la combinaison de trois séquences dont deux sont constituées de 18 bases et une de 19 bases. De ce fait pour toutes les jonctions trois voies formées, les courbes de  $T_m$  enregistrées indiquent une

seule transition d'état. Pour les trois jonctions d'intérêt <sup>wt</sup>3WJ, <sup>alc</sup>3WJ et <sup>Asp, Ser, His</sup>3WJ, une  $T_m$  de 43 °C a été enregistrée (Figure 61).



**Figure 61 :** Courbes de  $T_m$  des trois jonctions <sup>wt</sup>3WJ, <sup>alc</sup>3WJ et <sup>Asp, Ser, His</sup>3WJ (à gauche) et les dérivées premières (à droite).

Afin d'évaluer l'influence des modifications introduites au cœur de la jonction, nous avons déterminé les  $T_m$  des structures portant, une, deux et trois modifications. La présence de modifications alcyne ne déstabilise pas la jonction, comme montré par les

valeurs des  $T_m$  retrouvées (Tableau 8, entrées 2-8) indiquant un  $\Delta T_m = 0$  par rapport à la jonction totalement non modifiée (Tableau 8, entrée 1) même dans le cas de <sup>alc</sup>3WJ (Tableau 8, entrée 7) qui porte une fonction alcyne sur chaque brin. La présence de fonctions mimes des chaînes latérales des acides aminés, n'a, comme dans le cas des duplex, qu'une légère influence sur la stabilité thermique des jonctions. La présence de la fonction carboxylate déstabilise la jonction trois voies lorsque c'est la seule modification introduite induisant un  $\Delta T_m = -1$  °C (Tableau 8, entrée 9), alors que dans le cas des fonctions hydroxyle et imidazole, nous retrouvons une augmentation de  $T_m$  de +1 °C (Tableau 8, entrées 10 et 11). Il est intéressant de noter que l'effet déstabilisant induit par la présence du carboxylate est compensé par la présence de l'hydroxyle et/ou de l'imidazole lors de combinaisons multiples de modifications au sein des jonctions (Tableau 8, entrées 12-15). Ces résultats nous laissent supposer que le cœur de la jonction est assez large pour accueillir les modifications choisies sans que ces dernières déstabilisent la structure dans sa globalité.

Enfin, nous avons fait une évaluation des  $T_m$  de solutions contenant seulement deux des trois brins constituant les trois jonctions afin de vérifier le comportement des séquences lorsqu'elles ne sont que partiellement hybridées (Tableau 9).

## Chapitre III : Synthèse des oligonucléotides

**Tableau 9 :** Valeurs des  $T_m$  mesurées pour les semi jonctions obtenues. La valeurs de référence utilisée pour le calcul des  $\Delta T_m$  est celle de la wt3WJ (ref4) présentée dans le tableau 8, entrée 1.

Entrée	Nom semi jonction	Structure – Séquences	$T_m$ ( $\Delta T_m$ °C)
1	Semi jonction wt A	wtS <sub>3</sub> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC wtS <sub>1</sub> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG	34 °C (-9)
2	Semi jonction wt B	wtS <sub>3</sub> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC wtS <sub>2</sub> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C	41 °C (-2)
3	Semi jonction wt C	wtS <sub>1</sub> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG wtS <sub>2</sub> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C	32 °C (-11)
4	Semi jonction alcyne A	alcS <sub>1</sub> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG alcS <sub>3</sub> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	35 °C (-8)
5	Semi jonction alcyne B	alcS <sub>1</sub> 5'GCG ACC TAT TGC AAG TGG alcS <sub>2</sub> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C	35 °C (-8)
6	Semi jonction alcyne C	alcS <sub>2</sub> 5'CCA CTT GCA TGT GTG TGC C alcS <sub>3</sub> 5'GGC ACA CAC TTA GGT CGC	nd
7	Semi jonction Asp, Ser, His A	AspS <sub>1</sub> 5'GCG ACC TAT <sup>Asp</sup> TGC AAG TGG HisS <sub>3</sub> 5'GGC ACA CAC T <sup>His</sup> TA GGT CGC	32 °C (-11)
8	Semi jonction Asp, Ser, His B	AspS <sub>1</sub> 5'GCG ACC TAT <sup>Asp</sup> TGC AAG TGG SerS <sub>2</sub> 5'CCG CTT GCA T <sup>Ser</sup> GT GTG TGC C	nd
9	Semi jonction Asp, Ser, His C	SerS <sub>2</sub> 5'CCG CTT GCA T <sup>Ser</sup> GT GTG TGC C HisS <sub>3</sub> 5'GGC ACA CAC T <sup>His</sup> TA GGT CGC	41 °C (-2)

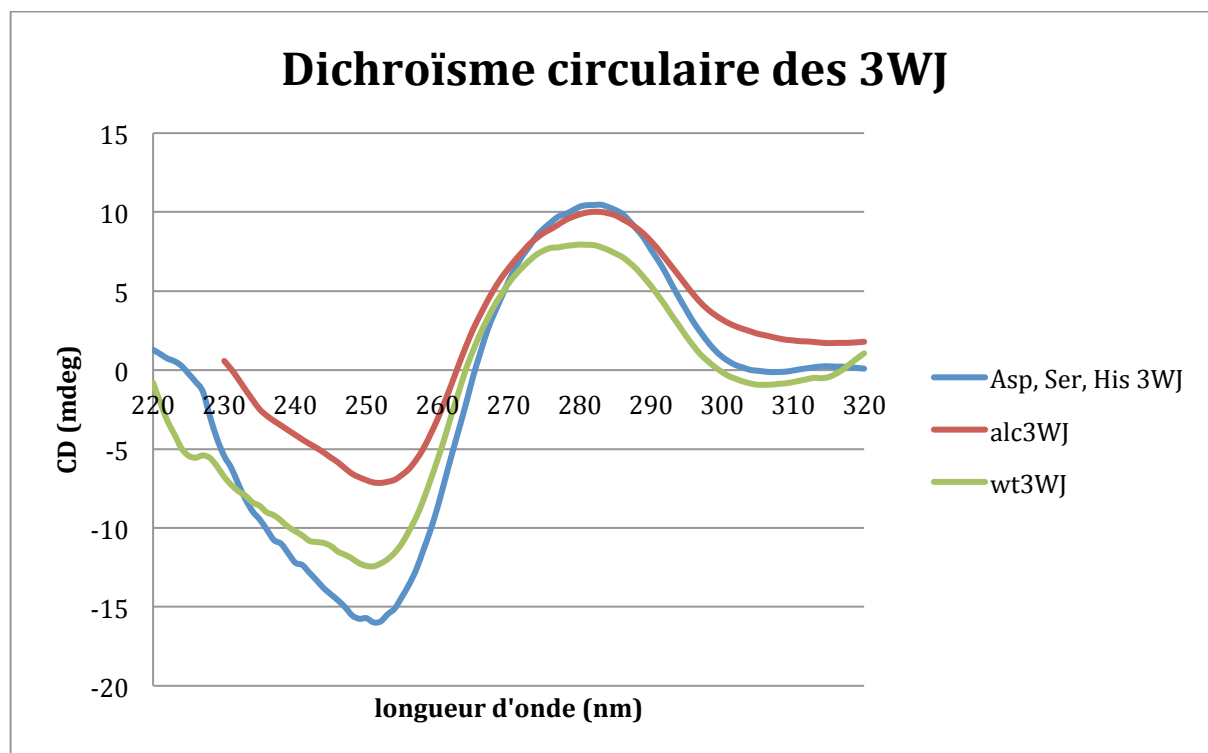
Les valeurs des  $T_m$  déterminées pour toutes les semi-jonctions suggèrent que ces structures sont sensiblement moins stables par rapport aux jonctions complètes, nous indiquant des valeurs, si déterminables, beaucoup plus basses par rapport aux valeurs déterminées pour les trois 3WJ de 43°C avec des  $\Delta T_m$  allant de -2°C à -11°C. Ceci se traduit par une stabilité moins importante des semi-jonctions nous permettant entre autre de certifier la formation des jonctions trois voies étudiées.

### 1.4.c) Dichroïsme circulaire (CD)

Les spectres dichroïques des trois jonctions trois voies wt3WJ, alc3WJ et Asp, His, Ser3WJ ont été enregistrés (Figure 62). Les courbes présentent un maximum vers 280 nm, un point d'inflexion à 260 nm et un minimum à 250 nm. Ces valeurs sont typiques des doubles hélices ADN de type B<sup>11, 12</sup>. Nous observons la même tendance pour les trois courbes indiquant que en présence ou pas de nucléotides modifiés, et quelle que soit la modification, les brins se structurent entre eux de la même manière. Un léger shift du maximum des courbes relatives aux CD des jonctions alc3WJ et Asp, Ser, His3WJ que l'on retrouve à 283 nm, comparées au maximum de la jonction non modifiée wt3WJ à 280 nm est observé. Cette valeur, qui reflète la capacité de stacking entre les bases, montre qu'en



présence de groupements fonctionnels supplémentaire, l'équilibre est légèrement perturbé.



**Figure 62** : Superposition des spectres dichroïques relatifs aux trois jonctions trois voies wt3WJ, alc3WJ et Asp, Ser, His3WJ.

## II) Conclusion

Dans ce chapitre nous avons démontré la capacité d'introduction d'un nucléotide convertible **10a** au sein de séquences oligonucléotidiques. De plus avec les brins modifiés et conjugués post synthèse automatisée, il a été possible de construire une structure jonction trois voies portant au sein de son cœur des groupements chimiques mimant des chaînes latérales des acides aminés impliqués dans le mécanisme catalytique des protéases à serine. Cette structure présente une remarquable stabilité, comparable à celle de la même jonction sans modifications. De ce fait, nous pouvons conclure que les fonctions chimiques introduites ont suffisamment d'espace pour se positionner sans influencer l'appariement des bases.

### III) Références bibliographiques du Chapitre III

- [1] Catry, M., and Madder, A. (2007) Synthesis of Functionalised Nucleosides for Incorporation into Nucleic Acid-Based Serine Protease Mimics, *Molecules* 12, 114-129.
- [2] Duprey, J.-L. H. A., Takezawa, Y., and Shionoya, M. (2013) Metal-Locked DNA Three-Way Junction, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 1212-1216.
- [3] Irvoas, J., Noirot, A., Chouini-Lalanne, N., Reynes, O., and Sartor, V. (2013) DNA three-way junction-ruthenium complex assemblies, *New J. Chem.* 37, 2324-2329.
- [4] Shlyakhtenko, L. S., Potaman, V. N., Sinden, R. R., Gall, A. A., and Lyubchenko, Y. L. (2000) Structure and dynamics of three-way DNA junctions: atomic force microscopy studies, *Nucleic Acids Res.* 28, 3472-3477.
- [5] Sabir, T., Toulmin, A., Ma, L., Jones, A. C., McGlynn, P., Schröder, G. F., and Magennis, S. W. (2012) Branchpoint Expansion in a Fully Complementary Three-Way DNA Junction, *J. Am. Chem. Soc.* 134, 6280-6285.
- [6] Goodman, R. P., Berry, R. M., and Turberfield, A. J. (2004) The single-step synthesis of a DNA tetrahedron, *Chem. Commun.*, 1372-1373.
- [7] Barth, A., Kobbe, D., and Focke, M. (2016) DNA-DNA kissing complexes as a new tool for the assembly of DNA nanostructures, *Nucleic Acids Res.* 44, 1502-1513.
- [8] Trafelet, H., Parel, S. P., and Leumann, C. J. (2003) Oligodeoxynucleotide Duplexes Containing (5' S)-5' -C-Alkyl-Modified 2' -Deoxynucleosides: Can an Alkyl Zipper across the DNA Minor-Groove Enhance Duplex Stability?, *Helv. Chim. Acta* 86, 3671-3687.
- [9] Wang, G., Middleton, P. J., Lin, C., and Pietrzkowski, Z. (1999) Biophysical and biochemical properties of oligodeoxynucleotides containing 4' -C- and 5' -C-substituted thymidines, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 885-890.
- [10] Banuls, V., Escudier, J.-M., Zedde, C., Claparols, C., Donnadieu, B., and Plaisancié, H. (2001) Stereoselective Synthesis of (5' S)-5' -C-(5-Bromo-2-penten-1-yl)-2' -deoxyribofuranosyl Thymine, a New Convertible Nucleoside, *Eur. J. Org. Chem.*, 4693-4700.
- [11] Kypr, J., Kejnovská, I., Renčíuk, D., and Vorlíčková, M. (2009) Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA, *Nucleic Acids Res.* 37, 1713-1725.

- [12] Bishop, G. R., and Chaires, J. B. (2001) Characterization of DNA Structures by Circular Dichroism, In *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc.

Conclusion générale et perspectives

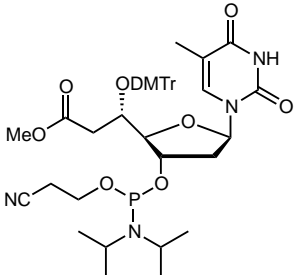
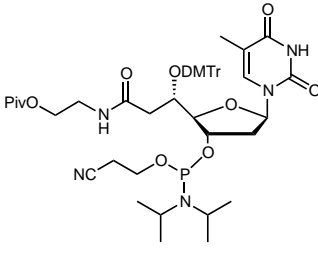
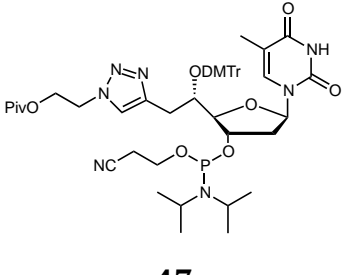
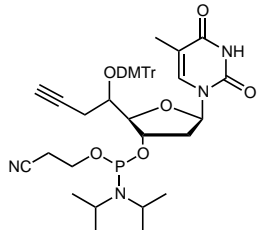
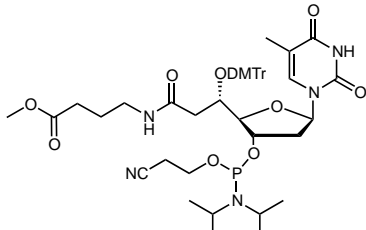
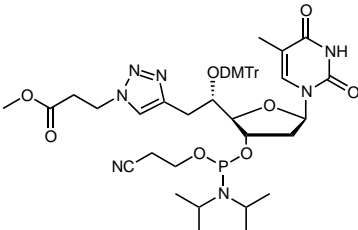
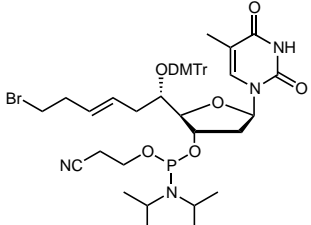
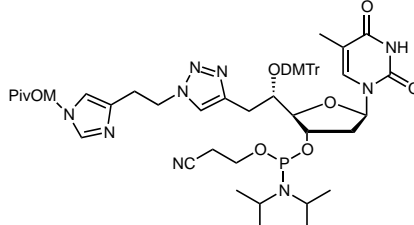
## **Conclusion générale et perspectives**



## Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail nous avons synthétisé huit nouveaux nucléotides modifiés, dont trois convertibles et cinq fonctionnalisés (Tableau 10). La synthèse du phosphoramidite manquant, le fonctionnalisé amide-His est à reprendre.

**Tableau 10** : Phosphoramidites convertibles et fonctionnalisés synthétisés.

Nucléotides convertibles	Nucléotides fonctionnalisés	
	Fonctionnalisés amides	Fonctionnalisés triazoles
 <p style="text-align: center;"><b>7</b> convertible ester</p>	 <p style="text-align: center;"><b>32</b> fonctionnalisé amide-Ser</p>	 <p style="text-align: center;"><b>47</b> fonctionnalisé triazole-Ser</p>
 <p style="text-align: center;"><b>10a/10b</b> convertibles alcyne</p>	 <p style="text-align: center;"><b>35</b> fonctionnalisé amide-Asp</p>	 <p style="text-align: center;"><b>50</b> fonctionnalisé triazole-Asp</p>
 <p style="text-align: center;"><b>19</b> convertible linéaire bromé</p>	 <p style="text-align: center;"><b>53</b> fonctionnalisé triazole-His</p>	

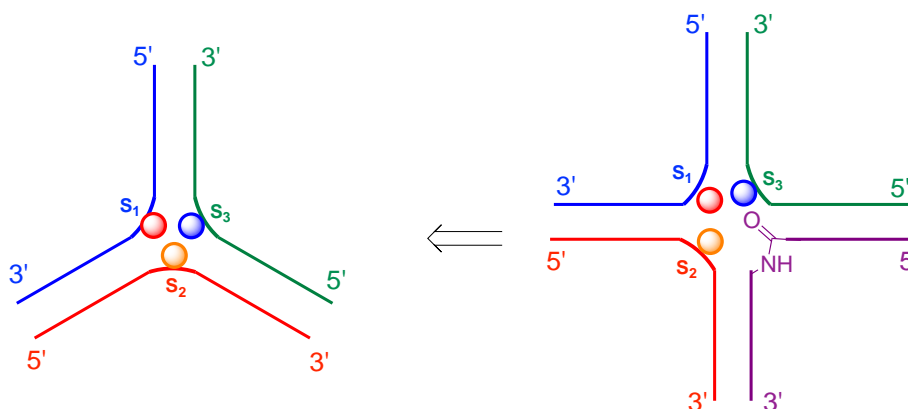
Le convertible alcyne **10a** a fait preuve d'un très bon taux d'incorporation au sein de séquences oligonucléotidiques choisies, et a permis par CuAAC l'obtention de séquences

## Conclusion générale et perspectives

portant les modifications rappelant les chaînes latérales des acides aminés par conjugaison. Grâce à ces séquences il a été possible d'obtenir une des structures secondaires envisagées, la jonction trois voies. La formation de cette dernière a été confirmée par les valeurs de  $T_m$  enregistrées et par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cette structure montre une très bonne stabilité avec et sans groupements chimiques supplémentaires. Ce dernier résultat nous paraît très encourageant car nous laisse supposer que les modifications ont suffisamment de place pour s'installer au sein de la cavité centrale de la jonction trois voies.

A la suite de ce travail, les autres jonctions trois voies qu'il est possible d'obtenir par une combinaison différente des séquences utilisées (Figure 55, chapitre III) sont à réaliser. De plus, en combinant les phosphoramidites convertibles et fonctionnalisés synthétisés (Tableau 10), il sera possible d'obtenir des structures de type duplex, bulge ou épingle à cheveux dont les propriétés physico-chimiques restent à évaluer. Il sera alors intéressant d'étudier l'influence des liens triazole, amide, ou amine sur la stabilité des structures obtenues et sur leurs propriétés catalytiques.

Dans un premier temps, afin de contourner le problème de reconnaissance jonction-substrat, il serait envisageable d'obtenir une structure de type jonction quatre voies dans laquelle le quatrième brin porterait un lien de type amide au niveau de la cavité (Figure 63). Ce dernier brin, mime de la liaison peptidique à couper, se retrouverait alors à proximité des trois fonctions chimiques introduites qui miment Asp, Ser et His. Il s'agira alors de vérifier si ces trois fonctions coopèrent et sont capables de couper le lien amide.



**Figure 63** : Approche envisageable afin de tester la capacité de catalyse de la jonction trois voies modifiée synthétisée.

## Conclusion générale et perspectives

Enfin, la visualisation de ces systèmes par modélisation moléculaire serait un outil supplémentaire précieux qui nous permettrait de prévoir le positionnement des modifications au sein des structures formées.





**Chapitre IV : Partie expérimentale**



## Chapitre IV : Partie expérimentale

Les solvants organiques anhydres utilisés tels que le dichlorométhane, l'acétonitrile et le DMF ont été séchés sur purificateur de solvants MBraun-SPS 800. Les réactions ont été réalisées en conditions anhydres sous atmosphère inerte d'azote ou d'argon.

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées en utilisant des plaques de silice déposées sur aluminium DC-Fertigfolien Alugram Xtra SIL G/UV254 (0,2 mm) Macherey-Nagel, observées sous lumière UV, puis révélées par une solution éthanolique d'acide phosphomolybdique à 5%.

Les séparations par chromatographie liquide à moyenne pression ont été réalisées sur un appareil Waters 600 utilisant un système de compression axiale ou des colonnes « prépackées » avec de la silice 15-40  $\mu\text{m}$  Merck. La composition des éluants est exprimée en rapport v/v.

La chromatographie liquide analytique à haute pression (HPLC) en phase directe a été réalisée en utilisant un appareil Waters 2695 lié à un détecteur PDA 996 ou 2996. La colonne utilisée est une colonne de silice Sunfire (L = 15 cm,  $\varnothing$  = 4,6 mm, 7 $\mu\text{m}$ ).

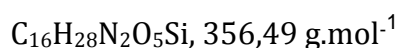
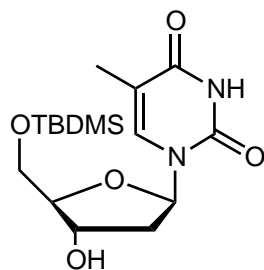
Les spectres RMN ont été enregistrés sur des appareils Bruker Avance 300 et 500 dans des solvants deutérés aux fréquences 300 et 500 MHz pour le noyau  $^1\text{H}$ , 75 et 125 MHz pour les noyaux  $^{13}\text{C}$  et 121 et 202 MHz pour les noyaux  $^{31}\text{P}$ . Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) à partir du signal de référence du tétraméthylsilane.

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur un appareil DSQ II ThermoFisher pour la DCI- $\text{NH}_3$  basse résolution et sur un appareil GCT Premier Waters pour la DCI- $\text{CH}_4$  haute résolution. Un appareil Xevo G2 QTOF Waters a été utilisé pour l'ESI de haute résolution. Un appareil MALDI-TOF Waters Micro MX a été également utilisé pour les analyses de masse (matrice THAP ou HPA).

## I) Les nucléotides convertibles

### **1** : 5'-O-(*tert*-butyldiméthylsilyl)-thymidine

Escudier J.-M. *et al* (1996) , *Tetrahedron Lett.* 37, 4689-4692.



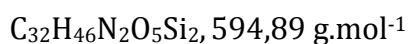
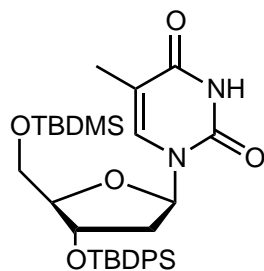
La thymidine commerciale (42,92 g, 0,177 mol) et le chlorure de *tert*-butyldiméthylchlorosilyle (29,41 g, 0,195 mol) sont solubilisés dans 170 mL de pyridine. Le mélange est laissé sous agitation pendant 16 heures à température ambiante. Avant hydrolyse avec une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl (100 mL), le milieu réactionnel est dilué avec 500 mL d'éther diéthylique. La phase organique est lavée à l'eau (2 x) puis avec une solution aqueuse de NaCl saturée (1 x) avant d'être séchée sur MgSO<sub>4</sub>. Après évaporation, le composé **1** est obtenu sous forme d'une mousse blanche (environ 42 g) avec un rendement quantitatif sans purification.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 9,16 (1H, s, NH base) ; 7,51 (1H, s, H<sub>6</sub>) ; 6,38 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 8,2\text{Hz}$ ,  $J_{H1'-H2'b} = 5,7\text{Hz}$ , H<sub>1'</sub>) ; 4,46 (1H, td,  $J_{H3'-H2'a} = 5,7\text{Hz}$ ,  $J_{H3'-H2'b} = 2,4\text{Hz}$ , H<sub>3'</sub>) ; 4,05 (1H, q,  $J = 2,5\text{Hz}$ , H<sub>4'</sub>) ; 3,85 (2H, m, H<sub>5'</sub>) ; 2,23 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,91 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 0,91 (9H, s, tBu-Si) ; 0,10 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 150,6 ; 135,5 ; 111,0 ; 87,4 ; 85,1 ; 72,6 ; 63,6 ; 41,1 ; 25,9 ; 18,4 ; 12,6 ; -5,4 ; -5,5.

**2 : 3'-O-(tert-butyldiphénylsilyl)-5'-O-(tert-butyldiméthylsilyl)-thymidine**

Escudier J.-M. *et al* (1996) , *Tetrahedron Lett.* 37, 4689-4692.

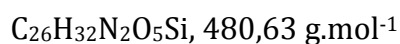
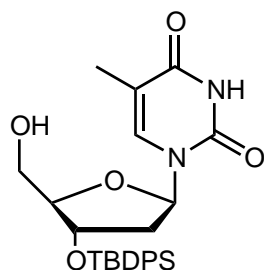


Le composé **1** (90 g, 0,252 mol), l'imidazole (85 g, 1,25 mol) et le chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle (60,48 g, 0,220 mol) sont solubilisés dans 350 mL de DMF. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 12 heures puis hydrolysé par ajout d'une solution aqueuse saturée de NH<sub>4</sub>Cl et enfin dilué à l'éther diéthylique. La phase organique a été lavée avec de l'eau distillée (3 x), avec une solution de NaCl saturée (1 x), puis séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée à sec. 125 g de produit propre **2** sont obtenus avec un rendement de 85% sans purification ultérieure.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 8,10 (1H, s, NH base) ; 7,70-7,37 (10H, m, Ph) ; 7,69 (1H, d, *J* = 1,3 Hz, H<sub>6</sub>) ; 6,49 (1H, dd, *J*<sub>H1'-H2'a</sub> = 9,1 Hz ; *J*<sub>H1'-H2'b</sub> = 5,4 Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,33 (1H, d, *J*<sub>H3'-H4'</sub> = 5,5 Hz, H<sub>3'</sub>) ; 3,99 (1H, d, *J*<sub>H4'-H3'</sub> = 5,5 Hz, H<sub>4'</sub>) ; 3,20 et 3,13 (2H, partie AB d'un système ABX, *J* = 11,4 Hz ; 2,2 Hz ; 2,0 Hz ; H<sub>5'</sub>) ; 2,30 (1H, partie A d'un système ABX(Y), *J*<sub>H2'a-H2'b</sub> = 13,0 Hz ; *J*<sub>H2'-H1'</sub> = 5,1 Hz ; *J*<sub>H2'-H3'</sub> = 1,2 Hz, H<sub>2'</sub>) ; 1,86 (4H, m, H<sub>2'</sub> et Me<sub>7</sub>) ; 1,08 (9H, s, tBu-Si) ; 0,78 (9H, s, tBu-Si) ; -0,08 et -0,12 (6H, 2s, CH<sub>3</sub>-Si).

**3 : 3'-O-(tert-butyldiphénylsilyl)-thymidine**

Escudier J.-M. *et al* (1996) , *Tetrahedron Lett.* 37, 4689-4692.

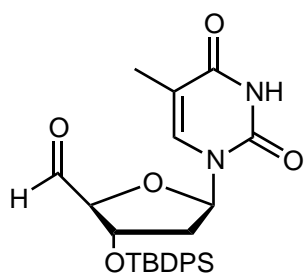


Le composé **2** (125 g, 0,21 mol) est solubilisé dans du méthanol (400 mL) et traité avec de l'acide *para*-toluènesulfonique (3,4 g, 0,02 mol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 2 heures puis hydrolysé par ajout d'une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub>. Après évaporation du méthanol présent, le milieu est extrait à l'acétate d'éthyle (3 x). Les phases organiques regroupées sont ensuite lavées avec une solution aqueuse de NaCl saturée, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée à sec. Le produit **3** (98 g) sous forme d'une mousse blanche a été obtenu avec un rendement de 98% sans purification ultérieure.

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 8,06 (1H, s, NH base) ; 7,70-7,39 (10H, m, Ph) ; 7,30 (1H, d,  $J_{H6-Me7} = 1,2$  Hz, H<sub>6</sub>) ; 6,24 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 10,0$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 6,3$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,47 (1H, ddd,  $J_{H3'-H2'a} = 3$  Hz ;  $J_{H3'-H2'b} = 3$  Hz ;  $J_{H3'-H4'} = 6$  Hz ; H<sub>3'</sub>) ; (1H, ddd,  $J_{H4'-H3'} = 6$  Hz ;  $J_{H4'-H5'a} = 5,7$  Hz ;  $J_{H4'-H5'b} = 2,7$  Hz, H<sub>4'</sub>) ; 3,64 et 3,26 (2H, partie AB d'un système ABX,  $J_{H5'a-H5'b} = 12,0$  Hz ;  $J_{H5'a-H4'} = 3,0$  Hz ;  $J_{H5'b-H4'} = 2,4$  Hz, H<sub>5'</sub>) ; 2,27 et 2,16 (2H, partie AB d'un système ABX(Y),  $J_{H2'a-H2'b} = 13,3$  Hz ;  $J_{H2'a-H1'} = 7,3$  Hz ;  $J_{H2'b-H1'} = 6,2$  Hz ;  $J_{H2'a-H3'} = 6,1$  Hz et  $J_{H2'b-H3'} = 3,1$  Hz, H<sub>2'</sub>) ; 1,83 (3H, d,  $J_{Me7-H6} = 1,2$  Hz, Me<sub>7</sub>) ; 1,09 (9H, s, tBu-Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ (ppm) : 163,7 ; 150,3 ; 136,8 ; 135,8-127,9 ; 110,9 ; 87,7 ; 86,7 ; 73,0 ; 62,0 ; 40,3 ; 26,9 ; 19,0 ; 12,4.

#### **4 : 3'-O-(*tert*-butyldiméthylsilyl)-5'-oxo-thymidine**



C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Si, 478,61 g.mol<sup>-1</sup>

*Préparation de l'IBX (1-hydroxy-1,2-benziodoxol-3(1H)-one)*

Précautions à prendre : L'IBX est un produit explosif, sa synthèse doit être effectuée en faisant très attention aux montées de températures et en évitant tout choc. Il est utile de surestimer les contenants nécessaires.

## Chapitre IV : Partie expérimentale

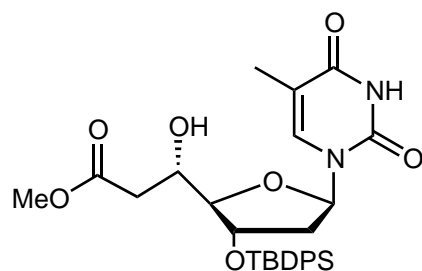
Dans un ballon équipé d'un agitateur mécanique, l'oxone (peroxymonosulfate de potassium) (181 g, 1,19 mol) est solubilisé dans 600 mL d'eau distillée. L'acide 2-iodobenzoïque (50 g, 0,201 mol) est ensuite ajouté et la suspension est chauffée à 70 °C (sans dépasser 75 °C). Après trois heures, le mélange devient homogène et mousseux. Dès que le mélange est revenu à température ambiante, il est ensuite refroidi à 0 °C à l'aide d'un bain de glace. La solution incolore avec un précipité blanc est ensuite filtrée sur verre fritté. Après lavage du résidu avec 600 mL d'eau et 200 mL d'acétone froide, 33 g de poudre blanche cristalline sont obtenus avec un rendement de 59%.

L'IBX (17,5 g, 0,06 mol) synthétisé est ajouté au composé **3** (10 g, 0,02 mol) solubilisé dans 200 mL d'acétonitrile. Après agitation et chauffage à 80 °C pendant 45 minutes, une solution blanche laiteuse est obtenue. Le mélange est laissé revenir à température ambiante puis refroidi à 0 °C afin de faire précipiter l'IBX. Ce dernier est ensuite filtré et rincé avec de l'acétate d'éthyle, et le filtrat est évaporé à sec. 10,45 g de **4** sous forme d'un solide blanc mousseux sont obtenus avec un rendement quantitatif sans autre purification.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 9,10 (1H, s, CHO) ; 8,72 (1H, s, NH base) ; 7,68-7,37 (11H, m, Ph et H<sub>6</sub>) ; 6,52 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 9,0$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 5,3$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,59 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 4,48 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 2,38 (1H, partie A d'un système ABX(Y),  $J_{H2'a-H2'b} = 13,8$  Hz ;  $J_{H2'-H1'} = 4,8$  Hz ;  $J_{H2'-H3'} = 1,2$  Hz, H<sub>2'</sub>) ; 1,91 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 1,71 (1H, m, H<sub>2</sub>) ; 1,10 (9H, s, tBu-Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ (ppm) : 197,6 ; 163,7 ; 150,3 ; 135,9 ; 135,7-127,9 ; 111,4 ; 91,1 ; 87,2 ; 72,6 ; 39,1 ; 26,8 ; 19,0 ; 12,7.

### **5** : 3'-O-(*tert*-butyldiphénylesilyl)-(5'S)-C-(éthanoate de méthyl)-thymidine



C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Si, 552,69 g.mol<sup>-1</sup>



*Synthèse de l'énolate silylé (le diméthyl-*t*-butylsiloxy-1-méthoxy-éthène)*: sous atmosphère inerte d'argon, la diisopropylamine (16,17 g, 160 mmol) et le *n*BuLi (100 mL, 160 mmol) sont solubilisés dans 160 mL de THF anhydre à -78°C, puis l'acétate de méthyle (10,72 g, 145 mmol) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est maintenu sous agitation magnétique à -78°C pendant 1 heure, puis 16 mL de HMPA sont rajoutés. Après 5 minutes d'agitation, le chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle (24,1 g, 160 mmol) en solution dans 20 mL d'éther de pétrole est ajouté goutte à goutte. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à -78°C et sous atmosphère inerte pendant 1 heure puis est ramené à température ambiante avant d'ajouter de l'eau froide et d'effectuer une extraction avec de l'éther de pétrole. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée à sec. 27,23 g de l'énolate silylé ont été récupérés avec un rendement quantitatif sans purification ultérieure.

A une solution de **4** (1,8 g, 3,75 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (10 mL) sous azote, est ajouté à température ambiante le BiCl<sub>3</sub> (54 mg, catalytique). Après deux minutes d'agitation, le ZnI<sub>2</sub> (82 mg, catalytique) est additionné. Le mélange de couleur noir intense est laissé sous agitation durant 30 minutes, puis l'énolate silylé (1,41 g, 7,5 mmol) en solution dans du dichlorométhane (2 mL) est transféré avant de poursuivre l'agitation pendant 2 heures (la couleur de la solution étant devenue orange). Après hydrolyse par une solution aqueuse saturée de NH<sub>4</sub>Cl et dilution avec de l'acétate d'éthyle, la phase organique est lavée avec de l'eau distillée puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl avant d'être séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée. Le produit est repris dans un minimum d'éther diéthylique et précipité dans de l'éther de pétrole à 0 °C. Le composé **5** est obtenu sous forme d'une poudre blanche (1,85 g) avec un rendement de 90%.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 9,19 (1H, s, NH) ; 7,63-7,59 (4H, m, Ph) ; 7,56 (1H, d,  $J_{H6-Me7} = 1,2$  Hz, H<sub>6</sub>) ; 7,42-7,34 (6H, m, Ph) ; 6,38 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 8,2$  Hz et  $J_{H1'-H2'b} = 5,8$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,47 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,77 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,66 (3H, s, OMe) ; 3,55 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 2,55 et 2,27 (2H, partie AB d'un système ABX(Y),  $J_{H6'a-H6'b} = 16,8$  Hz ;  $J_{H6'a-H5'} = 9,6$  Hz ;  $J_{H6'b-H5'} = 3,0$  Hz, H<sub>6'</sub>) ; 2,24 et 2,10 (2H, partie AB d'un système ABX(Y),  $J_{H2'a-H2'b} = 13,3$  Hz ;  $J_{H2'a-H1'} = 8,4$  Hz ;  $J_{H2'b-H1'} = 5,9$ , H<sub>2'</sub>) ; 2,00 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 1,81 (9H, s, *t*Bu-Si).

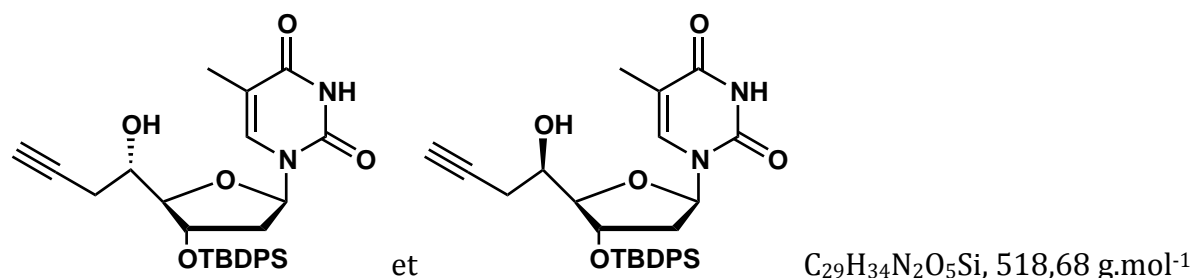
RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz),  $\delta$  (ppm) : 163,9 ; 150,4 ; 144,9 ; 137,6 ; 135,7 ; 133,1 ; 132,9 ; 130,4 ; 130,2 ; 129,9 ; 128,1 ; 127,8 ; 111,0 ; 89,8 ; 87,7 ; 74,3 ; 67,4 ; 66,8 ; 39,6 ; 33,4 ; 26,9 ; 21,7 ; 19,0 ; 12,4.

6 décrit p. 176-177.

7 décrit p. 181.

**8a et 8b** : 1-((2*R*,4*S*,5*R*)-4-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-((*S*)-1-hydroxybut-3-yn-1-yl) tétrahydrofuran-2-yl)-5-méthylpyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione et 1-((2*R*,4*S*,5*R*)-4-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-((*R*)-1-hydroxybut-3-yn-1-yl) tétrahydrofuran-2-yl)-5-méthylpyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione

James, D. et al, (2010) *Tetrahedron Lett.* 51, 1230-1232.



L'aldéhyde 4 (10 g,  $2,1 \cdot 10^{-2}$  mol) est solubilisé sous atmosphère inerte d'azote dans 30 mL de THF avec le zinc en poudre (5 g) préalablement activé. A cette solution, est ajouté goutte à goutte du bromure de propargyle à 80% en masse dans le toluène (7,2 mL, 0,8 mmol). L'addition doit être très lente en raison d'un dégagement gazeux qui se produit. Après la fin de l'addition la réaction est laissée pendant 5 minutes, puis le milieu est filtré afin d'éliminer les sels de zinc. Le filtrat est dilué avec de l'acétate d'éthyle puis hydrolysé avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$ . Le mélange est extrait à l'acétate d'éthyle, lavé avec une solution de  $\text{NaCl}$  saturée, séché sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporé à sec. Le brut récupéré est purifié sur colonne de silice flash en éluant avec un mélange éther diéthylique/éther de pétrole (90/10). Environ 5 g d'un mélange de deux diastéréoisomères en proportion *S/R* 70/30 est récupéré. Leur séparation est réalisée sur colonne HPLC préparative Sunfire 5  $\mu\text{m}$  par multi-injections en éluant avec un mélange acétate d'éthyle/dichlorométhane (5/95) (injections : 2 ml à 200 mg/ml). 2,94

g d'alcyne *S* (**8a**) et 1,95 g d'alcyne *R* (**8b**) ont été récupérés avec un rendement total de 45%.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  (ppm) (*S* **8a**) : 8,06 (1H, s, NH base) ; 7,67-7,63 (4H, m, Ph) ; 7,47-7,36 (7H, m, Ph) ; 7,29 (1H, d,  $J_{\text{H}_6\text{-Me}_7} = 1,1$  Hz,  $\text{H}_6$ ) ; 6,24 (1H, dd,  $J_{\text{H}_{1'}\text{-H}_{2'\text{a}}} = 8,3$  Hz ;  $J_{\text{H}_{1'}\text{-H}_{2'\text{b}}} = 6,5$  Hz,  $\text{H}_{1'}$ ) ; 4,50 (1H, m,  $\text{H}_{3'}$ ) ; 4,01 (1H, dd,  $J_{\text{H}_4\text{-H}_{5'}} = 3,5$  Hz ;  $J_{\text{H}_4\text{-H}_{3'}} = 1,2$  Hz,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 3,77 (1H, ddd,  $J_{\text{H}_{5'}\text{-H}_{4'}} = 7,7$  Hz ;  $J_{\text{H}_{5'}\text{-H}_{6'\text{a}}} = 5,4$  Hz ;  $J_{\text{H}_{5'}\text{-H}_{6'\text{b}}} = 3,5$  Hz,  $\text{H}_{5'}$ ) ; 2,16-1,93 (4H, m,  $\text{H}_{2'}$  et  $\text{H}_{6'}$ ) ; 2,03 (1H, t,  $J_{\text{H}_{8'}\text{-H}_{6'}} = 2,6$  Hz,  $\text{H}_{8'}$ ) ; 1,84 (3H, s,  $\text{Me}_7$ ) ; 1,09 (9H, s, tBu-Si).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz),  $\delta$  (ppm) (*S* **8a**) : 163,8 ; 150,5 ; 137,7 ; 135,85 ; 135,78 ; 133,3 ; 133,1 ; 130,2 ; 128,0 ; 111,1 ; 88,2 ; 88,0 ; 80,5 ; 74,7 ; 70,8 ; 69,7 ; 39,7 ; 27,0 ; 24,4 ; 19,1 ; 12,6.

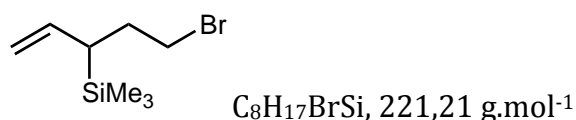
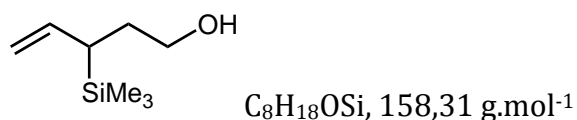
RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  (ppm) (*R* **8b**) : 8,07 (1H, s, NH base) ; 7,35-7,66 (11H, m, Ph et  $\text{H}_6$ ) ; 6,19 (1H, dd,  $J_{\text{H}_{1'}\text{-H}_{2'\text{a}}} = 6,3$  Hz ;  $J_{\text{H}_{1'}\text{-H}_{2'\text{b}}} = 8,3$  Hz,  $\text{H}_{1'}$ ) ; 4,50 (1H, m,  $\text{H}_{3'}$ ) ; 3,85 (1H, dd,  $J_{\text{H}_{4'}\text{-H}_{5'}} = 3,5$  Hz ;  $J_{\text{H}_{4'}\text{-H}_{3'}} = 1,2$  Hz,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 3,77 (1H, m,  $\text{H}_{5'}$ ) ; 1,99-2,24 (4H, m,  $\text{H}_{2'}$  et  $\text{H}_{6'}$ ) ; 2,03 (1H, m,  $\text{H}_{8'}$ ) ; 1,84 (3H, s,  $\text{Me}_7$ ) ; 1,09 (9H, s, tBu-Si).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz),  $\delta$  (ppm) (*R* **8b**) : 163,9 ; 150,6 ; 137,3 ; 136,1 ; 136,0 ; 133,3 ; 133,2 ; 130,3 ; 128,12 ; 120,08 ; 111,3 ; 89,5 ; 87,3 ; 80,8 ; 72,9 ; 71,6 ; 70,4 ; 40,1 ; 27,1 ; 23,5 ; 19,3 ; 12,7.

MS : DCI  $\text{NH}_3$  ( $m/z$ ) : 519,1 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].

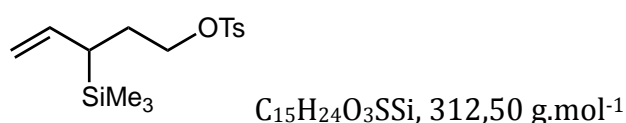
**9** décrit p. 177.

**10** décrit p. 181-182.

**11c :  $\omega$ -bromo-allyltriméthylsilane**- Synthèse de  $\omega$ -hydroxy-allyltriméthylsilane (**11a**)

100 mL de *sec*-BuLi (0,13 mol) sont ajoutés à une solution de TMEDA distillée (19,5 mL, 0,13 mol) dans du THF anhydre à -78°C placée sous atmosphère inerte d'argon. Après 15 minutes d'agitation, au mélange dont la couleur est devenue jaune, est additionné à -78 °C goutte à goutte l'allyltriméthylsilyle (20,6 mL, 0,13 mol). La réaction est laissée sous agitation à -30 °C pendant 30 minutes, puis refroidie à nouveau à -78 °C afin d'ajouter l'oxyde d'éthylène (11,44 g, 0,26 mol) dilué dans 26 mL de THF anhydre. La température du milieu réactionnel est laissée remonter à 0 °C pendant une heure, et est ensuite maintenue constante pendant encore une heure. La solution devenue blanche est alors hydrolysée par ajout d'une solution aqueuse saturée de NH<sub>4</sub>Cl puis diluée à l'éther diéthylique. La phase organique a été lavée à l'eau distillée, puis avec une solution aqueuse saturée en NaCl, séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée à sec. 25 g de produit sont obtenus sous forme d'une huile incolore avec un rendement quantitatif sans purification ultérieure.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 5,54 (1H, m, CH=) ; 4,82 (2H, m, CH<sub>2</sub>=) ; 3,52 (2H, m, CH<sub>2</sub>O) ; 2,90 (1H, s large, OH) ; 1,55 (3H, m, CH<sub>2</sub> et CH-SiMe<sub>3</sub>) ; -0,07 (9H, s, SiMe<sub>3</sub>).

- Synthèse de  $\omega$ -tosyloxy-allyltriméthylsilane (**11b**)

## Chapitre IV : Partie expérimentale

Le composé **11a** (20 g,  $1,26 \cdot 10^{-1}$  mol) est solubilisé dans 160 mL d'éther diéthylique et la solution est refroidie à 0°C à l'aide d'un bain de glace. A ce mélange sont ajoutés le chlorure de tosyle (47,6 g,  $2,5 \cdot 10^{-1}$  mol) et la potasse pilée (35,1 g,  $6,25 \cdot 10^{-1}$  mol). La réaction est laissée sous agitation magnétique à 0°C pendant six heures. Le milieu réactionnel est dilué avec 160 mL d'éther diéthylique, et la phase organique est ensuite lavée trois fois avec de l'eau distillée glacée, puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl et enfin séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée à sec. L'huile de couleur orange obtenue est purifiée sur silice avec une colonne Prochrom en éluant avec un solvant binaire éther de pétrole/éther diéthylique 7/3. 31 g de produit pur sont obtenus sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 79%.

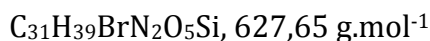
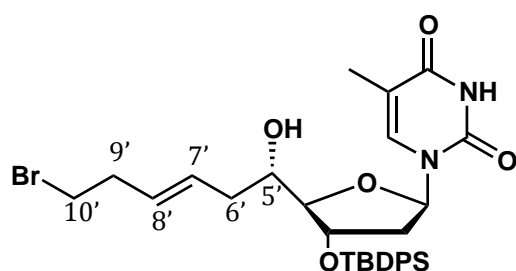
RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 7,76 et 7,33 (4H, 2m, tosyle) ; 5,43 (1H, m, CH=) ; 4,78 (2H, m, CH<sub>2</sub>=) ; 4,01 (2H, m, CH<sub>2</sub>O) ; 2,44 (3H, s, CH<sub>3</sub> tosyle) ; 1,67 (3H, m, CH<sub>2</sub> et CH-SiMe<sub>3</sub>) ; -0,05 (9H, s, SiMe<sub>3</sub>).

Le bromure de lithium (5,83 g, 68 mmol), préalablement séché à la rampe à 50 °C sous 0,01 mm de mercure, est solubilisé dans 450 mL d'un mélange anhydre DMF/acétone 4/1. A cette solution est ajouté sous argon **11b** (13,9 g, 44 mmol) solubilisé dans 50 mL du même mélange de solvants. La réaction est laissée sous agitation magnétique pendant 16 heures. Après évaporation de l'acétone, le milieu est dilué avec de l'éther diéthylique, lavé trois fois à l'eau distillée puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl, et enfin séché sur MgSO<sub>4</sub> et évaporé à sec. 9 g de produit attendu **11c** sont récupérés avec un rendement de 92% sans purification ultérieure.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 5,52 (1H, m, CH=) ; 4,95 (2H, m, CH<sub>2</sub>=) ; 3,38 (2H, m, CH<sub>2</sub>Br) ; 1,93 et 1,64 (3H, 2m, CH<sub>2</sub> et CH-SiMe<sub>3</sub>) ; -0,01 (9H, s, SiMe<sub>3</sub>).

**12 et 13**

A une solution de **4** (4,78 g, 0,01 mol) dans du dichlorométhane anhydre (120 mL) à 0°C, sont ajoutés l'éthérate de trifluorure de bore (6,8 mL, 0,05 mol) et l' $\omega$ -bromoallyltrimethylsilane **11c** (11 g, 0,05 mol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 3 heures. Le milieu est hydrolysé par ajout d'une solution aqueuse saturée en NaHCO<sub>3</sub> et extraite par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et les solvants sont évaporés. Après purification du produit par chromatographie flash sur silice (éluant éther de pétrole/dichlorométhane/acétate d'éthyle : 2/6,4/1,6 puis dichlorométhane/acétate d'éthyle : 8/2) 1,15 g de **12** (18%) et 3,22 g de **13** (82%) sont obtenus avec un rendement de 65%.

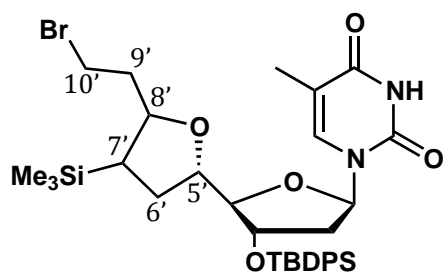
**12 : 3'-O-tert-butylidiphénylsilyl-(5S)'-C-(bromo-1-pent-3-ène)-thymidine**

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 9,15 (1H, s, NH) ; 7,66-7,35 (11H, m, Ph et H<sub>6</sub>) ; 6,33 (1H, dd,  $J_{\text{H}1'-\text{H}2'a} = 6,1 \text{ Hz}$  ;  $J_{\text{H}1'-\text{H}2'b} = 8,1 \text{ Hz}$ , H<sub>1'</sub>) ; 5,41-5,33 (2H, m, H<sub>7'</sub> et H<sub>8'</sub>) ; 4,6 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,82 (1H, s, H<sub>4'</sub>) ; 3,37 (2H, m, H<sub>10'</sub>) ; 3,10 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 2,54 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 2,24-2,08 (4H, m, H<sub>6'</sub> et H<sub>9'</sub>) ; 1,85 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 1,08 (9H, s, tBu).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$  (ppm) : 164,0 et 150,5 (C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>) ; 137,2 (C<sub>6</sub>) ; 135,8 (-CH=, Ph) ; 133,4 et 33,1 (C<sub>q</sub>, Ph) ; 130,1 et 127,9 (-CH=, Ph) ; 130,9 et 129,1 (C<sub>7'</sub> et C<sub>8'</sub>) ; 110,8 (C<sub>5</sub>) ; 88,9 (C<sub>1'</sub>) ; 86,7 (C<sub>3'</sub>) ; 74,8 (C<sub>4'</sub>) ; 70,1 (C<sub>5'</sub>) ; 40,0 (C<sub>2'</sub>) ; 37,5 (C<sub>6'</sub>) ; 35,6 (C<sub>9'</sub>) ; 33,0 (C<sub>10'</sub>) ; 26,9 (CH<sub>3</sub> tBu-Si) ; 19,0 (C<sub>q</sub>, tBu) ; 12,5 (C<sub>7</sub>).

MS : DCI NH<sub>3</sub> (m/z) : 646 [MNH<sub>4</sub><sup>+</sup>] ; 629,0 [M+H<sup>+</sup>].

**13 : 5-(3'-(2''-bromo éthyl)-4'4'triméthylsilyl-2'-oxacyclopentyl)-4-*tert*-butyldiphénylsiloxy-2-thyminy-1-oxacyclopentane**



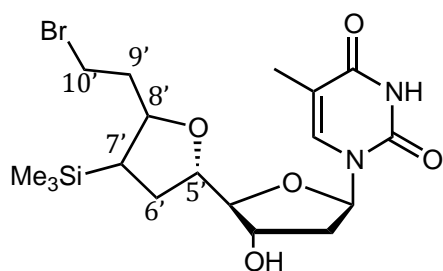
$C_{34}H_{47}BrN_2O_5Si_2$ , 699,83 g.mol<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 8,92 (1H, s, NH) ; 7,68-7,62 (4H, m, Ph) ; 7,46-7,35 (5H, m, phényle et H<sub>6</sub>) ; 6,39 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 7,4$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 6,0$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,37 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,82 (1H, t,  $J = 3,2$  Hz, H<sub>4'</sub>) ; 3,64 (1H, td,  $J_{H8'-H9'} = 9,5$  Hz ;  $J_{H8'-H7'} = 2,5$  Hz, H<sub>8'</sub>) ; 3,43-3,31 (3H, m, H<sub>10'</sub> et H<sub>5'</sub>) ; 2,35 (1H, partie AB d'u système ABX(Y),  $J_{H2'a-H2'b} = 13,5$  Hz ;  $J_{H2'a-H1'} = 6,0$  Hz ;  $J_{H2'a-H3'} = 3,5$  Hz, H<sub>2'a</sub>) ; 2,04 (1H, m, H<sub>2'b</sub>) ; 1,94-1,76 (8H, m, Me<sub>7</sub>, H<sub>6'</sub>, H<sub>7'</sub> et H<sub>9'</sub>) ; 1,08 (9H, s, tBu-Si) ; -0,01 (9H, s, Me<sub>3</sub>-Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 163,8 ; 150,3 ; 135,8 ; 135,5 ; 133,2 ; 133,1 ; 130,1 ; 127,9 ; 110,7 ; 87,5 ; 84,7 ; 80,2 ; 7,3 ; 73,9 ; 40,5 ; 39,5 ; 31,6 ; 30,6 ; 30,5 ; 26,9 ; 19,1 ; 12,6 ; -2,6.

**MS** : DCI NH<sub>3</sub> (m/z) : 701,0 [M+H<sup>+</sup>], 718,0 [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>].

**14 : 3'-(2''-bromoéthyl)-4'-triméthylsilyl-(2'-oxacyclopentyl)-4-hydroxy-2-thyminy-1-oxacyclopentane**



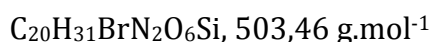
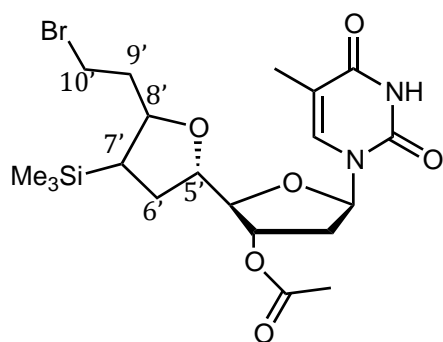
$C_{18}H_{29}BrN_2O_5Si$ , 461,42 g.mol<sup>-1</sup>

A une solution de **13** (1,88 g, 2,7 mmol) dans le méthanol (50 mL) dans un flacon en teflon sous argon est ajouté le  $\text{NH}_4\text{F}\cdot\text{HF}$  (1,7 mL, 19 mmol). La réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant 12 heures puis est arrêtée par ajout de 5 g de silice et laissée sous agitation magnétique pendant environ 30 minutes. Le milieu réactionnel est dilué avec avec 300 mL de dichlorométhane, filtré sur célite et rincé avec 100 mL d'un mélange dichlorométhane/méthanol à 10% de méthanol. Après évaporation à sec, le produit brut est purifié sur colonne Prochrom (150 g de silice) en éluant avec un mélange de solvants (dichlorométhane/acétate d'éthyle 80/20). 1,01 g de produit **14** sont récupérés avec un rendement de 81%.

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 7,46 (1H, d,  $J_{\text{H}_6-\text{Me}_7} = 1,0$  Hz,  $\text{H}_6$ ) ; 6,32 (1H, t,  $J_{\text{H}_{1'}-\text{H}_{2'}} = 6,7$  Hz,  $\text{H}_{1'}$ ) ; 4,43 (1H, m,  $\text{H}_{3'}$ ) ; 3,88 (3H, m,  $\text{H}_{4'}$ ,  $\text{H}_{5'}$  et  $\text{H}_{8'}$ ) ; 3,51 (2H, t,  $J_{\text{H}_{10'}-\text{H}_{9'}} = 6,7$  Hz,  $\text{H}_{10'}$ ) ; 2,36 (1H, m,  $\text{H}_{2'a}$ ) ; 2,24-1,72 (8H, m,  $\text{Me}_7$ ,  $\text{H}_{2'b}$ ,  $\text{H}_{9'}$  et  $\text{H}_{6'}$ ) ; 1,05 (1H, td,  $J_{\text{H}_{7'}-\text{H}_6} = 3,7$  Hz ;  $J_{\text{H}_{7'}-\text{H}_{8'}} = 3,1$  Hz,  $\text{H}_{7'}$ ) ; 0,05 (9H, m,  $\text{Me}_3\text{-Si}$ ).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz),  $\delta$  (ppm) : 164,9 ( $\text{C}_2$ ) ; 151,1 ( $\text{C}_4$ ) ; 136,3 ( $\text{C}_6$ ) ; 110,9 ( $\text{C}_5$ ) ; 88,1 ( $\text{C}_4'$ ) ; 85,7 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 80,5 ( $\text{C}_5'$ ) ; 78,5 ( $\text{C}_8'$ ) ; 73,0 ( $\text{C}_3'$ ) ; 40,9 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 40,0 ( $\text{C}_{9'}$ ) ; 31,9 ( $\text{C}_{7'}$ ) ; 31,40 ( $\text{C}_6'$ ) ; 31,41 ( $\text{C}_{10'}$ ) ; 13,0 ( $\text{C}_7$ ) ; -2,5 ( $\text{Me}_3\text{-Si}$ ).

**15 : (2*R*,2'*S*,3*S*,5*R*)-5'-(2-bromoéthyl)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)-4'-(triméthylsilyl)octahydro-[2,2'-bifuran]-3-yl acetate**



A **14** (1,03 g, 2,24 mmol) en solution dans le dichlorométhane anhydre (30 mL) est ajouté la pyridine anhydre (3,3 mL) puis l'anhydride acétique distillé (2,5 mL). Le milieu



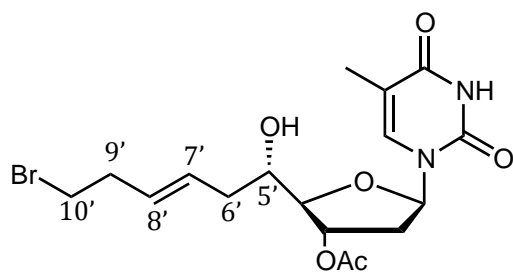
est laissé sous agitation magnétique à température ambiante pendant 20 heures. Après évaporation des solvants, 1,17 g de mousse jaune sont obtenus avec un rendement quantitatif sans purification ultérieure.

**RMN  $^1\text{H}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz),  $\delta$  (ppm) : 8,92 (1H, s, NH base) ; 7,46 (1H, s, H<sub>6</sub>) ; 6,31 (1H, dd,  $J_{\text{H}1'-\text{H}2'a} = 9,0$  Hz ;  $J_{\text{H}1'-\text{H}2'b} = 8,9$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,23 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 4,0-3,72 (3H, m, H<sub>4'</sub>, H<sub>5'</sub> et H<sub>8'</sub>) ; 3,47 (2H, m, H<sub>10'</sub>) ; 2,34 (1H, m, H<sub>2'a</sub>) ; 2,20-1,68 (5H, m, H<sub>2'b</sub>, H<sub>6'</sub>, H<sub>9'</sub>) ; 2,07 (3H, s, MeCOO) ; 1,90 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 0,01 (9H, s, Me<sub>3</sub>-Si).

**RMN  $^{13}\text{C}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz),  $\delta$  (ppm) : 170,6 (C=O Ac) ; 164,3 (C<sub>2</sub>) ; 150,8 (C<sub>4</sub>) ; 135,1 (C<sub>6</sub>) ; 111,2 (C<sub>5</sub>) ; 84,9 (C<sub>1'</sub>) ; 84,5 (C<sub>5'</sub>) ; 80,5 (C<sub>8'</sub>) ; 77,7 (C<sub>3'</sub>) ; 42,2 (C<sub>2'</sub>) ; 39,4 (C<sub>9'</sub>) ; 37,1 (C<sub>7'</sub>) ; 31,9 (C<sub>6'</sub>) ; 30,4 (C<sub>10'</sub>) ; 21,0 (Me Ac) ; 12,6 (C<sub>7</sub>) ; -2,6 (Me<sub>3</sub>-Si).

**MS** : DCI NH<sub>3</sub> (m/z) : 503 [M-H<sup>+</sup>] ; 520,0 [M-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>].

**16 : (2R,3S,5R)-2-((S,E)-6-bromo-1-hydroxyhex-3-en-1-yl)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tétrahydrofuran-3-yl acétate**



$\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{BrN}_2\text{O}_6$ , 431,28 g.mol<sup>-1</sup>

A **15** (1,17 g, 2,71 mmol) en solution dans le dichlorométhane (35 mL) à 0°C est ajouté le tétrachlorure de titane (4,7 mL, 4,66 mmol). Après 15 minutes de réaction, le milieu est neutralisé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO<sub>3</sub> puis dilué par de l'acétate d'éthyle, et la phase organique est lavée à l'eau distillée. La phase aqueuse est traitée avec l'acide chlorhydrique 1M jusqu'à devenir limpide et réextraite à l'acétate d'éthyle. Après un dernier lavage avec une solution aqueuse saturée en NaCl, la phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée. 841 mg de produit désiré **16** sont obtenus sous forme d'une mousse blanche avec un rendement de 72% sans purification ultérieure.

## Chapitre IV : Partie expérimentale

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 250 MHz),  $\delta$  (ppm) : 9,71 (1H, s, NH base) ; 7,72 (1H, s,  $\text{H}_6$ ) ; 6,31 (1H, dd,  $J_{\text{H}1'-\text{H}2'a} = 8,0$  Hz ;  $J_{\text{H}1'-\text{H}2'b} = 5,5$  Hz,  $\text{H}_1'$ ) ; 5,50 (2H, m,  $\text{H}_7'$ ,  $\text{H}_8'$ ) ; 5,33 (1H, m,  $\text{H}_3'$ ) ; 3,96 (1H, m,  $\text{H}_4'$ ) ; 3,87 (1H, td,  $J_{\text{H}5'-\text{H}4} = 6,0$  Hz ;  $J_{\text{H}5'-\text{H}6'} = 1,5$  Hz,  $\text{H}_5'$ ) ; 3,36 (2H, m,  $\text{H}_{10'}$ ) ; 2,64-2,24 (5H, m,  $\text{H}_2'$ ,  $\text{H}_6'$  et  $\text{H}_8'$ ) ; 2,07 (3H, s, MeCOO) ; 1,89 (3H, s, Me $_7$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 63 MHz),  $\delta$  (ppm) : 170,7, 164,2 ; 150,8 ; 145,9 ; 136,5 ; 131,4 ; 128,9 ; 111,3 ; 86,2 ; 85,6 ; 76,3 ; 70,5 ; 44,7 ; 37,3 ; 36,8 ; 35,6 ; 33,2 ; 21,1 ; 12,6.

IR ( $\text{CHCl}_3$ ) :  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3044-2934 (CH) ; 1692 (C=O) ; 1469 (C=C).

**17** décrit p. 178-179.

**I.1) Protocole général de protection de l'hydroxyle en position 5' avec le chlorure de DMTr (Etape 1), et déprotection de l'hydroxyle en position 3' (Etape 2) :**

Obtention des produits **6**, **9a**, **9b** et **17**

**(Etape 1)** Le nucléoside de départ, AgNO<sub>3</sub> et DMTrCl sont pesés et mis à sécher une heure avant leur utilisation.

A AgNO<sub>3</sub> placé sous argon est ajouté le nucléoside de départ solubilisé dans du THF anhydre. La collidine et le DMTrCl solubilisé dans du THF anhydre sont ensuite ajoutés. La solution dont la couleur passe de jaune à rouge après 20 minutes de réaction, est maintenue sous agitation à température ambiante pendant 16 heures. Les sels d'argent formés sont filtrés avant d'hydrolyser le filtrat avec une solution aqueuse saturée de NH<sub>4</sub>Cl. Le milieu est dilué à l'acétate d'éthyle, la phase organique est lavée à l'eau puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl avant d'être séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée à sec. Le produit protégé en position 5'C obtenu est utilisé tel quel pour l'étape suivante pour former les produits **6** et **9a/9b**. Dans le cas du composé **17** celui ci est purifié sur colonne de silice HPLC en éluant avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol 50/50 et a été obtenu avec un rendement de 57%.

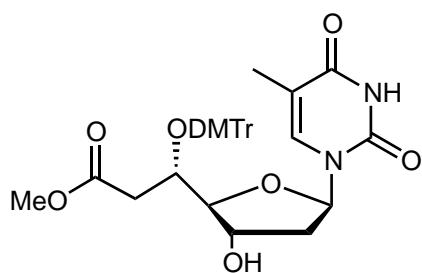
**(Etape 2)** Au produit protégé lors de l'étape **1** solubilisé dans du THF anhydre, est ajouté sous atmosphère d'argon une solution de TBAF (1M dans le THF). La réaction est laissée sous agitation pendant 16 heures à température ambiante. Le produit désiré est récupéré pur après évaporation du solvant et purification sur colonne de silice en éluant avec un mélange binaire de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle (5/5).

P.*	Etape (1)					Etape (2)		Rdt* (%)
	Nucléoside de départ	AgNO <sub>3</sub>	DMTrCl	Collidine	THF (mL)	TBAF (mL)	THF (mL)	
<b>6</b>	<b>5</b> , 2 g, 3,62 mmol	1,54 g, 9,06 mmol	3,1 g, 9,06 mmol	4,8 mL, 36,2 mmol	80 + 20	3,2	30	92
<b>9a</b>	<b>8a</b> 700 mg, 1,35 mmol	570 mg, 3,37 mmol	1,14 g, 3,37 mmol	1,7 mL, 1,28 mmol	35 + 5	1,7	15	68
<b>9b</b>	<b>8b</b> 630 mg, 1,22 mmol	518 mg, 3,05 mmol	1,03 g, 3,05 mmol	1,5 mL, 12,2 mmol	30 + 5	1,4	10	72
<b>17</b>	<b>16</b> 266 mg, 0,62 mmol	209 mg, 1,23 mmol	522 mg, 1,54 mmol	0,8 mL, 6,17 mmol	18 + 2			57

\*P. = Produit obtenu

\*global sur les étapes (1) et (2) pour **6**, **9a** et **9b**, et pour l'étape (1) pour **17**.

**6** : (S)-méthyl 3-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-3-((2S,3S,5R)-3-hydroxy-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)propanoate

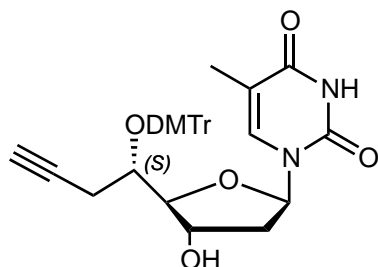


C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, 616,66 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 250 MHz), δ (ppm) : 8,88 (1H, s, NH base) ; 7,49-7,15 (10H, m, Ph, DMTr et H<sub>6</sub>) ; 6,62-6,76 (4H, m, DMTr) ; 6,22 (1H, t, J<sub>H1'-H2'</sub> = 7,5 Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,44 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 4,23 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,77 (6H, s, OMe DMTr) ; 3,46 (3H, s, OMe ester) ; 2,61-2,19 (5H, m, H<sub>2'</sub>, H<sub>6'</sub> et H<sub>5'</sub>) ; 1,65 (3H, s, Me<sub>7</sub>).

MS : ESI MeOH (m/z) : 617,5 [M-H<sup>+</sup>].

**9a** : 1-((2*R*,4*S*,5*S*)-5-((*S*)-1-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)but-3-yn-1-yl)-4-hydroxytétrahydrofuran-2-yl)-5-méthylpyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione



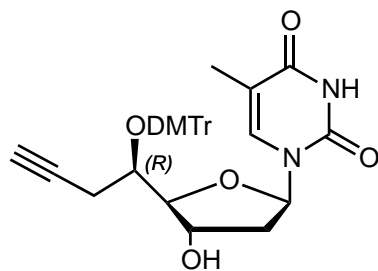
C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 582,64 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 7,44-7,21 (10H, m, H<sub>6</sub> et DMTr) ; 6,89-6,77 (4H, m, DMTr) ; 6,27 (1H, dd, *J*<sub>H1'-H2'a</sub> = 6,8 Hz ; *J*<sub>H1'-H2'b</sub> = 6,3 Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,65-4,59 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,92 (1H, dd, *J*<sub>H4'-H5'</sub> = 4,4 Hz ; *J*<sub>H4'-H3'</sub> = 3,6 Hz, H<sub>4'</sub>) ; 3,78 (6H, m, OMe DMTr) ; 3,73-3,67 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 2,37-2,22 (4H, m, H<sub>2'</sub> et H<sub>6'</sub>) ; 1,96 (1H, t, *J*<sub>H8'-H6'</sub> = 2,4 Hz, H<sub>8'</sub>) ; 1,81 (3H, d, *J*<sub>Me7-H6</sub> = 1.0 Hz, Me<sub>7</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>; 75 MHz), δ (ppm) : 159,1 (C<sub>4</sub>) ; 146,2 (C<sub>2</sub>) ; 135,7(C<sub>6</sub>) ; 136,2-136,0-130,5-128,3-127,9-127,1-113,3 (C Ph) ; 111,0 (C<sub>5</sub>) ; 88,9 (C<sub>8'</sub>) ; 87,6 (C<sub>q</sub> DMTr); 87,2 (C<sub>4'</sub>) ; 84,6 (C<sub>1'</sub>) ; 80,7 (C<sub>7'</sub>) ; 72,5 (C<sub>3'</sub>) ; 70,0 (C<sub>5'</sub>) ; 54,5 (OMe DMTr) ; 40,9 (C<sub>2'</sub>) ; 21,8 (C<sub>6'</sub>) ; 12,4 (C<sub>7</sub>).

MS : ESI MeOH (m/z) : 582,1 [M-H<sup>+</sup>].

**9b : 1-((2*R*,4*S*,5*S*)-5-((*R*)-1-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)but-3-yn-1-yl)-4-hydroxytétrahydrofuran-2-yl)-5-méthylpyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione**



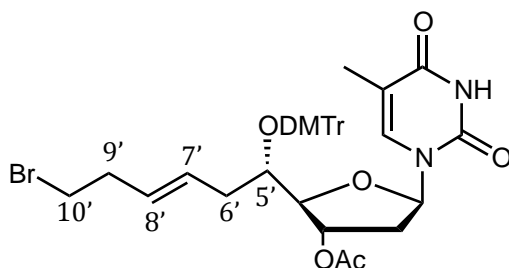
$C_{34}H_{34}N_2O_7$ , 582,64 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 10,0 (1H, s, NH base) ; 7,75-7,52 (6H, m, DMTr), 7,02 (1H, m, H<sub>6</sub>) ; 6,80 (6H, m, DMTr), 6,49 (1H, m, H<sub>1'</sub>), 4,70 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 4,46 (1H, m, H<sub>4'</sub>), 3,60 (1H, m, H<sub>5'</sub>), 3,40 (6H, s, OMe DMTr), 2,40 (4H, m, H<sub>2'</sub>, H<sub>6'</sub>), 1,82 (1H, m, H<sub>8'</sub>) 1.81 (3H, m, Me<sub>7</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ (ppm) : 159,1 (C<sub>4</sub>) ; 146,4 (C<sub>2</sub>) ; 135,0 (C<sub>6</sub>) ; 136,5-136,3-135,0-130,5-128,2-127,9-127,0-127,0-113,4 (C Ph) ; 111,0 (C<sub>5</sub>) ; 87,5 (C<sub>8'</sub>) ; 87,4 (C<sub>4'</sub>) ; 84,2 (C<sub>1'</sub>) ; 80,7 (C<sub>q</sub> DMTr) ; 72,4 (C<sub>3'</sub>) ; 71,4 (C<sub>7'</sub>) ; 71,3 (C<sub>5'</sub>) ; 54,5 (OMe DMTr) ; 39,7 (C<sub>2'</sub>) ; 22,0 (C<sub>6'</sub>) ; 12,1 (C<sub>7</sub>).

MS : ESI MeOH (m/z) : 582,1 [M-H<sup>+</sup>].

**17: (2*R*,3*S*,5*R*)-2-((*S*,*E*)-1-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-6-bromohex-3-én-1-yl)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-3-yl acétate**



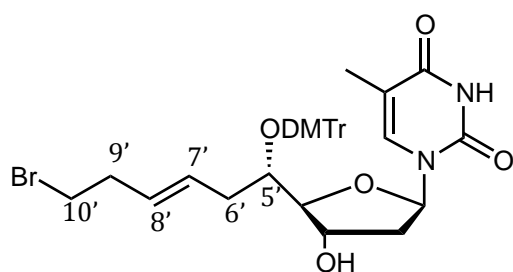
$C_{38}H_{41}BrN_2O_8$ , 733,64 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz), δ (ppm) : 7,91 (1H, s, H<sub>6</sub>) ; 7,27 (9H, m, DMTr) ; 6,79 (4H, m, DMTr) ; 6,36 (1H, t,  $J_{H1'-H2'} = 7,3$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,13 (3H, m, H<sub>7'</sub>, H<sub>8'</sub> et H<sub>3'</sub>) ; 3,94 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ;

3,73 (6H, s, OMe DMTr) ; 3,36 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,21 (2H, t,  $J_{H_{10'}}$ -H<sub>9'</sub> = 6,8 Hz, H<sub>10'</sub>) ; 3,35 (4H, m, H<sub>6'</sub> et H<sub>9'</sub>) ; 2,13 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,97 (3H, s, MeCOO) ; 1,87 (3H, s, Me<sub>7</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ (ppm) : 170,1 ; 164,1 ; 158,7 ; 158,7 ; 145,9 ; 136,4 ; 136,0 ; 135,0 ; 130,3 ; 129,2 ; 128,3 ; 128,1 ; 127,9 ; 127,8 ; 127,6 ; 127,1 ; 126,8 ; 121,1 ; 113,1 ; 111,7 ; 87,5 ; 84,6 ; 83,9 ; 75,1 ; 74,4 ; 55,1 ; 38,2 ; 35,6 ; 35,0 ; 32,7 ; 12,5.

**18** : 1-((2*R*,4*S*,5*S*)-5-((*S*,*E*)-1-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-6-bromohex-3-en-1-yl)-4-hydroxytétrahydrofuran-2-yl)-5-méthylpyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione



C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 691,61 g.mol<sup>-1</sup>

A **17** (260 mg, 3,54 10<sup>-1</sup> mmol) en solution dans un mélange méthanol/eau 4/1 (10 mL) est ajouté du carbonate de potassium (100 mg, 0,71 mmol). Le milieu est agité à température ambiante pendant trois heures puis extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée à l'eau distillée et avec une solution saturée en NaCl, puis séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée à sec. 211 mg de produit attendu **18** sont obtenus sous forme d'une mousse blanche avec un rendement de 86% sans purification ultérieure.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 250 MHz), δ (ppm) : 7,94 (1H, s, H<sub>6</sub>), 7,29 (9H, m, DMTr) ; 6,83 (4H, m, DMTr) ; 6,38 (1H, t,  $J_{H_{1'}}$ -H<sub>2'</sub> = 6,9 Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,16 (2H, m, H<sub>7'</sub> et H<sub>8'</sub>) ; 4,35 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,80 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,77 (6H, s, OMe DMTr) ; 3,26 (3H, m, H<sub>5'</sub> et H<sub>10'</sub>) ; 3,35 (4H, m, H<sub>6'</sub> et H<sub>9'</sub>) ; 2,16 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,81 (3H, s, Me<sub>7</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 63 MHz), δ (ppm) : 164,1 ; 158,7 ; 150,6 ; 146,0 ; 136,5 ; 136,1 ; 135,7 ; 130,4 ; 130,3 ; 130,2 ; 128,6 ; 128,1 ; 127,8 ; 127,1 ; 113,2 ; 111,4 ; 87,3 ; 84,3 ; 74,2 ; 72,0 ; 55,3 ; 41,2 ; 35,8 ; 35,7 ; 35,1 ; 32,7 ; 12,5.

MS : DCI NH<sub>3</sub> (m/z) : 691,0 [M+H<sup>+</sup>] ; 710,0 [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>].

**19** décrit p. 183.

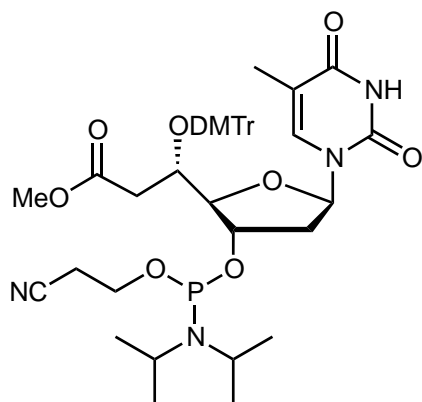
### I.2) Protocole général de formation des phosphoramidites :

Au nucléoside en solution dans du THF anhydre à température ambiante, sont ajoutés sous argon la diisopropyléthylamine (DIPEA) et le (2-cyanoéthyl)(*N,N*-diisopropylamino)-chlorophosphite. Après 35 minutes, le chlorhydrate formé est filtré. Le filtrat est repris dans de l'acétate d'éthyle saturé en argon, lavé avec une solution aqueuse glacée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10% (deux fois) et séché sur MgSO<sub>4</sub>. Le produit dilué dans un minimum d'éther diéthylique est précipité dans de l'éther de pétrole à 0°C. Le précipité est repris dans de l'acétate d'éthyle et évaporé à la rampe à vide.

Produit obtenu	Nucléoside de départ	THF	DIPEA 4 eq.	Chlorophosphite 2 eq.	Rdt (%)
<b>7</b>	<b>6</b> , 950 mg, 1,54 mmol	8 mL	1 mL, 6,17 mmol	0,68 ml, 3,08 mmol	58
<b>10a</b>	<b>9a</b> , 990 mg, 1,69 mmol	12 mL	0,88 g, 6,8 mmol	0,81 g, 3,34 mmol	71
<b>10b</b>	<b>9b</b> , 390 mg, 0,67 mmol	10 mL	0,34 g, 2,6 mmol	0,32 g, 1,34 mmol	71
<b>19</b>	<b>18</b> , 731 mg, 1,06 mmol	8 mL	0,75 mL, 1,06 mmol	496 mg, 2,11 mmol	74



**7 : (3*S*)-méthyl 3-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-3-(((2*R*,3*S*,5*R*)-3-(((2-cyanoéthyl)(diisopropylamino)phosphino)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)propanoate**



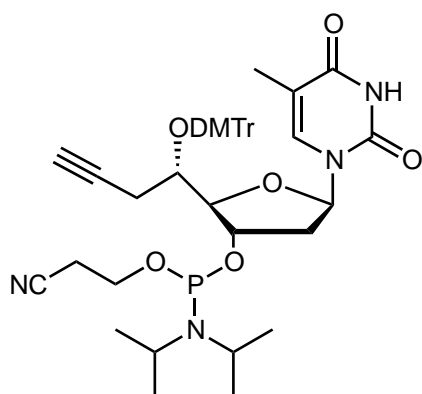
$C_{43}H_{53}N_4O_{10}P$ , 816,88 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 7,95-7,57 (2H, m, DMTr) ; 7,50-7,44 (4H, m, DMTr, H<sub>6</sub>) ; 7,16-7,04 (4H, m, DMTr) ; 6,79-6,74 (4H, m, DMTr) ; 6,54 (1H, m, H<sub>1'</sub>) ; 4,70 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 4,33 (1H, m) ; 4,23 (1H, m) ; 3,48-3,45 (2H, m) ; 3,31 (6H, m, OMe DMTr) ; 3,30 (3H, s, OMe Ac) ; 3,29-3,16 (2H, m) ; 3,19-3,15 (4H, m) ; 2,90 (4H, m) ; 1,15-1,10 (12H, m, *i*Pr)

RMN <sup>31</sup>P (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 81 MHz), δ (ppm) : 150,1 ; 148,6.

MS: ESI MeOH (m/z) : 839,5 [M+Na<sup>+</sup>].

**10a : 3-(((2*R*,3*S*,5*R*)-2-((*S*)-1-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)but-3-yn-1-yl)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-3-yl)oxy)(diisopropylamino)phosphino)propanenitrile**



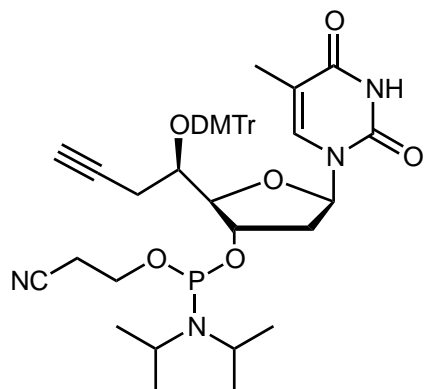
$C_{43}H_{51}N_4O_8P$ , 782,86 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 7,65 (1H, br s, NH) ; 7,95-7,54 (2H, m, DMTr) ; 7,46-7,39 (4H, m, DMTr, H<sub>6</sub>) ; 7,12-7,00 (4H, m, DMTr) ; 6,77-6,72 (4H, m, DMTr) ; 6,55 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 7,6$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 6,0$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,85-4,72 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 4,60-4,59 (1H, dd,  $J_{H4'-H5'} = 3,3$  Hz ;  $J_{H4'-H3'} = 2,5$  Hz, H<sub>4'</sub>) ; 3,74-3,88 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,50-3,41 (2H, m) ; 3,31 (6H, m, DMTr) ; 3,28-3,17 (2H, m) ; 2,64-2,33 (4H, m) ; 1,77 (4H, m) ; 1,10-1,00 (12H, m, *i*Pr).

RMN <sup>31</sup>P (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 81 MHz), δ (ppm) : 149,7 ; 148,8.

MS : DCI NH<sub>3</sub> (m/z) 783,1 [M+H<sup>+</sup>].

**10b** : (2*R*,3*S*,5*R*)-2-((*R*)-1-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)but-3-yn-1-yl)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-3-yl (2-cyanoéthyl) diisopropylphosphoramidite



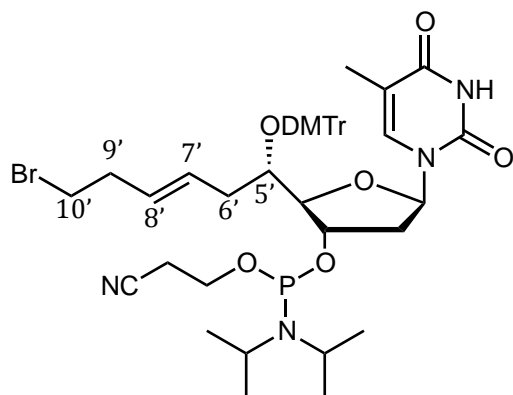
C<sub>43</sub>H<sub>51</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>P, 782,86 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 7,73-7,67 (2H, m, DMTr) ; 7,59-7,50 (4H, m, DMTr) ; 7,22-7,19 (2H, m, DMTr et H<sub>6</sub>) ; 7,09-7,00 (2H, m, DMTr) ; 6,81-6,76 (4H, m, DMTr) ; 6,49 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 8,6$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 5,8$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,16-5,10 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 4,68-4,63 (1H, m) ; 3,79-3,72 (1H, m) ; 3,58-3,44 (2H, m) ; 3,37-3,32 (2H, m) ; 3,29 (6H, m, DMTr) ; 2,65-2,27 (4H, m) ; 2,12-1,76 (4H, m) ; 1,23-1,10 (12H, m, *i*Pr).

RMN <sup>31</sup>P (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 81 MHz), δ (ppm) : 148,3 ; 148,2.

MS : DCI NH<sub>3</sub> (m/z) : 783,1 [M+H<sup>+</sup>].

**19** : 3-(((2*R*,3*S*,5*R*)-2-((*S*,*E*)-1-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-6-bromohex-3-en-1-yl)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-3-yl)oxy)(diisopropylamino)phosphino)propanenitrile



$C_{45}H_{56}BrN_4O_8P$ , 891,83 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 250 MHz), δ (ppm) : 7,95 (1H, s, H<sub>6</sub>) ; 7,66-6,76 (13H, m, DMTr) ; 6,65 (1H, t,  $J_{H1'-H2'}$  = 6,8 Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,1 (2H, m, H<sub>7'</sub> et H<sub>8'</sub>) ; 4,69 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 4,25 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,46 (2H, m) ; 3,30 (6H, s, MeO DMTr) ; 3,18 (2H, m) ; 2,87 (2H, m) ; 2,57-2,12 (6H, m) ; 1,84 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 1,72 (2H, m) ; 1,23 (2H, m) ; 1,05 (9H, s, tBu).

RMN <sup>13</sup>C (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 63 MHz), δ (ppm) : 164,3 ; 159,4 ; 151,2 ; 151,0 ; 147,0 ; 137,0 ; 136,6 ; 131,0 ; 130,7 ; 128,7 ; 128,1 ; 127,4, 113,6 ; 111,5 ; 111,4 ; 87,8 ; 86,7 ; 84,7 ; 75,1 ; 74,7 ; 73,8 ; 58,7 ; 58,4 ; 54,9 ; 45,4 ; 43,6 ; 40,6 ; 35,9 ; 35,6 ; 32,8 ; 32,4 ; 24,6 ; 22,8 ; 20,0 ; 19,9.

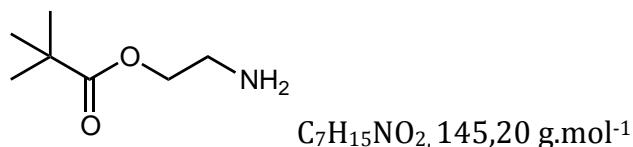
RMN <sup>31</sup>P (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 81 MHz), δ (ppm) : 148,9 ; 148,6.

MS : ESI MeOH (m/z) : 913,3 [M+Na<sup>+</sup>] ; 929,2 [M+K<sup>+</sup>].

## II) Les nucléotides fonctionnalisés

### II.1) Les nucléotides fonctionnalisés amides

#### **20** : 2-aminoéthyl pivalate



L'éthanolamine (2,5 g,  $3,1 \cdot 10^{-2}$  mol) est préalablement chlorohydratée par ajout d'une solution 4M d'acide chlorhydrique dans le dioxane (10 mL) puis ajoutée goutte à goutte à de l'éther diéthylique afin de la faire précipiter. A ce composé séché sous pression réduite est ajouté le chlorure de pivaloyle (4 mL,  $3,1 \cdot 10^{-2}$  mol) (sans solvant). Le mélange non totalement homogène est chauffé à 90 °C pendant deux heures. Après une heure de réaction le mélange prend en masse. Après refroidissement à température ambiante le composé **20** est séché sous pression réduite pour conduire à un solide blanc-jaune avec un rendement quantitatif.

RMN  $^1\text{H}$  (MeOD; 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 2,86 (2H, t,  $J = 5,1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-O}$ ) ; 1,89 (2H, t,  $J = 5,1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ) ; -0,25 (9H, s, tBu Piv).

#### **II.1.a) Protocole général d'addition nucléophile catalysée par l' $\text{AlMe}_3$**

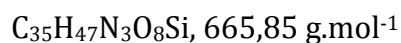
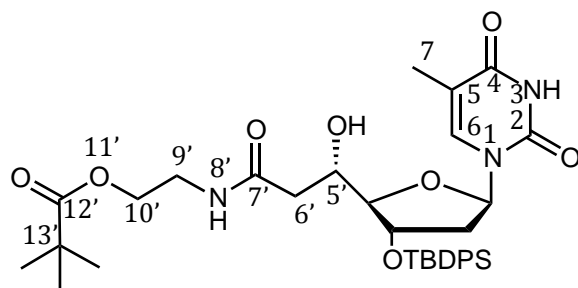
L'amine nucléophile est solubilisée dans du dichlorométhane anhydre dans un ballon bicol équipé d'un réfrigérant. Le système est placé sous argon et refroidi à 0°C à l'aide d'un bain de glace. Le triméthylaluminium (5 eq.) est ensuite ajouté goutte à goutte. De la fumée d'HCl se dégage et le milieu est laissé sous agitation magnétique, jusqu'à disparition de celle-ci. L'ester **5** solubilisé dans du dichlorométhane est ensuite ajouté à température ambiante. La réaction est laissée à 40°C pendant 16 heures. Le milieu est hydrolysé avec une solution 1M de HCl et le dichlorométhane est évaporé. La solution obtenue est extraite à l'acétate d'éthyle et les phases organiques regroupées sont ensuite

lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et évaporées à sec. Le brut est purifié sur colonne de silice en éluant avec un mélange acétate d'éthyle / dichlorométhane 50 / 50 en gradient jusqu'à un rapport 80 / 20.

Produit obtenu	Nucléophile (Quantité)	(AlMe <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (2M)	Rdt* (%)	Aspect du produit
<b>21</b> 439 mg	Aminoalcool protégé <b>20</b> (900 mg, 1,65 mmol)	4,2 mL	40	Huile orange
<b>22</b> 507 mg	Acide 4-aminobutyrique (900 mg, 1,65 mmol)	4,1 mL	61	Huile orange
<b>23</b> 1,35 g	Histamine (2 g, 3,68 mmol)	13 mL	58	Huile jaune

\*le rendement est calculé sur la quantité de produit désiré obtenu, le restant est constitué d'ester de départ **5** n'ayant pas réagit.

**21 : 3-((S)-3-((2R,3S,5R)-3-((tert-butyl)diphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl) tétrahydrofuran-2-yl)-3-hydroxypropanamido)éthyl pivalate**



RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 8,30 (1H, bs, NH base) ; 7,59-7,62 (5H, m, Ph et H<sub>6</sub>) ; 7,43-7,35 (6H, m, Ph) ; 6,37 (1H, dd, J<sub>H1'-H2'a</sub> = 8,5 Hz ; J<sub>H1'-H2'b</sub> = 5,9 Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,97 (1H, t, J<sub>NH8'-H9'</sub> = 5,6 Hz, NH<sub>8'</sub>) ; 4,50 (1H, td, J<sub>H3'-H2'</sub> = 5,1 Hz ; J<sub>H3'-H4'</sub> = 1,6 Hz, H<sub>3'</sub>) ; 4,13 (2H, t, J<sub>H10'-H9'</sub> = 5,4 Hz, H<sub>10'</sub>) ; 3,73 (1H, dd, J<sub>H4'-H5'</sub> = 1,7 Hz ; J<sub>H4'-H3'</sub> = 1,6 Hz, H<sub>4'</sub>) ; 3,54 (1H, ddd, J<sub>H5'-H4'</sub> = 10,3 Hz ; J<sub>H5'-H6'a</sub> = 2,9 Hz ; J<sub>H5'-H6'b</sub> = 1,8 Hz, H<sub>5'</sub>) ; 3,48 (2H, m, H<sub>9'</sub>) ; 2,44 (1H, dd,

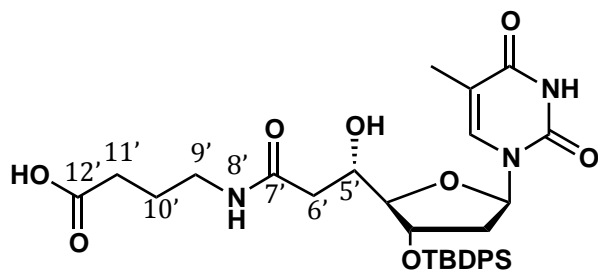
## Chapitre IV : Partie expérimentale

$J_{H6'b-H6'a} = 15,7$  Hz,  $J_{H6'b-H5'} = 10,1$ ,  $H_{6'b}$ ) ; 2,13 (2H, m,  $H_2'$ ) ; 2,09 (1H, dd,  $J_{H6'a-H6'b} = 15,7$  Hz ;  $J_{H6'a-H5'} = 2,9$  Hz,  $H_{6'a}$ ) ; 1,83 (3H, s,  $Me_7$ ) ; 1,17 (9H, s, tBu Piv) ; 1,06 (9H, s, tBu-Si).

RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz),  $\delta$  (ppm) : 178,8 ( $C_{12}'$ ) ; 172,5 ( $C_7'$ ) ; 163,9 ( $C_2$ ) ; 150,6 ( $C_4$ ) ; 137,1 - 136,2 - 135,9 - 135,8 - 135,7 - 133,3 - 130,1 - 127,9 (C Ph) ; 111,0 ( $C_5$ ) ; 89,8 ( $C_4'$ ) ; 86,2 ( $C_{1'}$ ) ; 74,7 ( $C_{3'}$ ) ; 68,1 ( $C_5'$ ) ; 62,8 ( $C_{10}'$ ) ; 54,3 ( $C_{13}'$ ) ; 40,0 ( $C_2'$ ) ; 38,9 ( $C_9'$ ) ; 38,8 ( $C_6'$ ) ; 27,2 (tBu-Si) ; 26,9 (tBu-Piv) ; 19,1 ( $C_{quat}$  tBu Si) ; 12,6 ( $C_7$ ).

MS : ESI MeOH (m/z) : 666,7 [ $M-H^+$ ].

### **22 : acide 4-((S)-3-((2R,3S,5R)-3-((tert-butyl)diphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)-3-hydroxypropanamido)butanoïque**



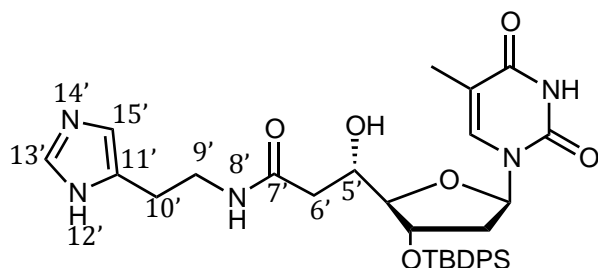
$C_{32}H_{41}N_3O_8Si$ , 623,77 g.mol $^{-1}$

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 8,62 (1H, bs, NH base) ; 7,67-7,58 (5H, m, Ph et  $H_6$ ) ; 7,41-7,36 (6H, m, Ph) ; 6,55 (1H, t,  $J_{NH8'-H9'} = 6,5$  Hz,  $N_{H8'}$ ) ; 6,33 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 8,3$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 6,1$ Hz,  $H_{1'}$ ) ; 4,49 (1H, m,  $H_{3'}$ ) ; 3,77 (1H, m,  $H_{4'}$ ) ; 3,60 (1H, m,  $H_{5'}$ ) ; 3,26 (2H, m,  $H_9'$ ) ; 2,44-2,31 (4H, m,  $H_{6'}$  et  $H_{11'}$ ) ; 2,16-2,01 (2H, m,  $H_2'$ ) ; 1,82 (2H, m,  $H_{10'}$ ) ; 1,78 (3H, d,  $J_{Me7-H6} = 0,9$  Hz,  $Me_7$ ) ; 1,05 (9H, s, tBu).

RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz),  $\delta$  (ppm) : 177,5 ( $C_{12}'$ ) ; 172,7 ( $C_7'$ ) ; 164,8 ( $C_2$ ) ; 150,7 ( $C_4$ ) ; 137,7 - 135,8 - 135,7 - 133,2 - 133,14 - 130,10 - 130,09 - 128,0 - 127,9 (C Ph) ; 110,9 ( $C_5$ ) ; 90,0 ( $C_4'$ ) ; 86,3 ( $C_{1'}$ ) ; 74,6 ( $C_{3'}$ ) ; 68,0 ( $C_5'$ ) ; 40,3 ( $C_2'$ ) ; 39,0 ( $C_9'$ ) ; 39,0 ( $C_6'$ ) ; 31,6 ( $C_{11'}$ ) ; 26,9 (tBu-Si) ; 24,1 ( $C_{10}'$ ) ; 12,4 ( $C_7$ ).

MS : DCI  $NH_3$  (m/z) : 624,3 [ $M+H^+$ ].

**23 : (S)-N-(2-(1H-imidazol-5-yl)éthyl)-3-((2R,3S,5R)-3-((tert-butyl)diphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)-3-hydroxypropanamide**



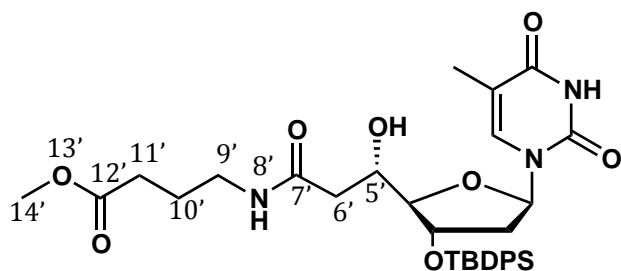
$C_{33}H_{41}N_5O_6Si$ , 631,79 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 7,61-7,59 (5H, m, Ph) ; 7,51 (1H, m, H<sub>13'</sub>) ; 7,41-7,33 (6H, m, Ph et H<sub>6</sub>) ; 7,00 (1H, bs, N<sub>H8'</sub>) ; 6,71 (1H, m, H<sub>15'</sub>) ; 6,29 (1H, m, H<sub>1</sub>), 4,51 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 3,79 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,61 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,51 et 3,29 (2H, 2m, H<sub>9'</sub>) ; 2,71 (2H, m, H<sub>10'</sub>), 2,36 (1H, partie A d'un système ABX(Y), J<sub>H6'a-H6'b</sub> = 14,8 Hz ; J<sub>H6'a-H5'</sub> = 10,0 Hz, H<sub>6'a</sub>) ; 2,14-2,01 (3H, 2m, H<sub>2'</sub> et H<sub>6'b</sub>) ; 1,77 (3H, s, Me<sub>7</sub>), 1,00 (9H, s, tBu).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 172,5 (C<sub>7'</sub>) ; 164,4 (C<sub>2</sub>) ; 151,1 (C<sub>4</sub>) ; 135,7 (C<sub>13'</sub>) ; 130,1 (C<sub>15'</sub>) ; 137,7 - 136,0 - 134,8 - 128,0 (C Ph, C<sub>11'</sub>) ; 111,0 (C<sub>5</sub>) ; 90,3 (C<sub>4'</sub>) ; 87,0 (C<sub>1'</sub>) ; 74,9 (C<sub>3'</sub>) ; 68,6 (C<sub>5'</sub>) ; 40,0 (C<sub>6'</sub>) ; 39,9 (C<sub>2'</sub>) ; 39,6 (C<sub>9'</sub>) ; 26,2 (C<sub>10'</sub>), 27,1 (tBu-Si) ; 19,1 (C<sub>q</sub>tBu) ; 12,6 (Me<sub>7</sub>).

MS: ESI MeOH Haute résolution 632,2903 m/z [M-H<sup>+</sup>] (100%) ppm = -0,2.

**24 : méthyl 4-((S)-3-((2R,3S,5R)-3-((tert-butyl)diphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)-3-hydroxypropanamido)butanoate**



$C_{33}H_{43}N_3O_8Si$ , 637,80 g.mol<sup>-1</sup>

## Chapitre IV : Partie expérimentale

La résine Amberlite IR 120 (400 mg) préalablement activée (2 lavages successifs respectivement avec de l'eau, de l'isopropanol et de l'acide chlorhydrique aqueux 0,5M, puis lavage à l'eau jusqu'à neutralité et enfin séchage sous pression réduite) est introduite dans un ballon ainsi que le méthanol (8 mL). Le produit **22** (614 mg, 1 mmol) est alors ajouté et la réaction est laissée sous agitation magnétique la nuit en chauffant à 80 °C. Le milieu est filtré et la résine rincée au méthanol. Le filtrat est évaporé à sec et 590 mg de produit pur sont récupérés avec un rendement de 94%.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 8,54 (1H, bs, NH base) ; 7,66-7,59 (6H, m, Ph et  $\text{H}_6$ ) ; 7,43-7,35 (5H, m, Ph) ; 6,39 (1H, dd,  $J_{\text{H}1'-\text{H}2'a} = 8,6$  Hz ;  $J_{\text{H}1'-\text{H}2'b} = 5,9$ Hz,  $\text{H}_{1'}$ ) ; 6,01 (1H, t,  $J_{\text{NH}8'-\text{H}9'} = 5,6$  Hz,  $\text{NH}_{8'}$ ) ; 4,50 (1H, m,  $\text{H}_{3'}$ ) ; 3,73 (1H, m,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 3,71 (3H, s,  $\text{H}_{13'}$ ) ; 3,58 (1H, m,  $\text{H}_{5'}$ ) ; 3,30 (2H, md,  $\text{H}_{9'}$ ) ; 2,39 (2H, t,  $J_{\text{H}11'-\text{H}10'} = 7,1$  Hz,  $\text{H}_{11'}$ ) ; 2,21-2,01 (4H, m,  $\text{H}_{2'}$  et  $\text{H}_{6'}$ ) ; 1,83 (3H, s,  $\text{Me}_7$ ) ; 1,80 (2H, m,  $\text{H}_{10'}$ ) ; 1,06 (9H, s, tBu-Si).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz),  $\delta$  (ppm) : 174,0 ( $\text{C}_{12'}$ ) ; 172,7 ( $\text{C}_7$ ) ; 163,9 ( $\text{C}_2$ ) ; 150,6 ( $\text{C}_4$ ) ; 137,3 - 135,8 - 135,8 - 135,6 - 134,9 - 133,4 - 133,22 - 133,17 - 130,1 - 129,7 - 129,6 - 128,0 - 127,7 (C Ph) ; 111,2 ( $\text{C}_5$ ) 90,02 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 86,2 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 74,9 ( $\text{C}_{\text{H}3'}$ ) ; 68,3 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 52,0 (O-Me) ; 40,3 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 39,1 ( $\text{C}_{9'}$ ) ; 38,9 ( $\text{C}_{6'}$ ) ; 31,6 ( $\text{C}_{11'}$ ) ; 27,1 (tBu-Si) ; 24,6 ( $\text{C}_{10'}$ ) ; 19,2 ( $\text{C}_{\text{quat}}$  tBu-Si) ; 12,7 ( $\text{C}_7$ ).

MS : ESI MeOH (m/z) : 638,2 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ].



**II.1.b) Protocole général de protection de l'hydroxyle en position 5' avec le chlorure de DMTr (Etape 1) et déprotection de l'hydroxyle en position 3' (Etape 2)**

La procédure décrite page 174 est reproduite à l'identique pour obtenir les produits **25**, **26**, **31** et **34**.

P.*	Etape 1 <sup>o</sup>					Etape 2		Rdt* (%)
	Nucléoside de départ	AgNO <sub>3</sub>	DMTrCl	Collidine	THF (mL)	TBAF (mL)	THF (mL)	
<b>25</b> 200 mg <b>et</b> <b>26</b> 100 mg	<b>23</b> , 501,5 mg 0,8 mmol	340 mg 2 mmol	678 mg 2 mmol	1,04 mL 7,95 mmol	20 + 2			20 et 80
<b>31</b> 148,6 mg	<b>21</b> 278,5 mg 0,42 mmol	178 mg 0,1 mmol	356 mg 0,11 mmol	554 µL 4,19 mmol	12 + 2	0,770	7	46
<b>34</b> 469 mg	<b>24</b> 590 mg 0,93 mmol	336 mg 1,97 mmol	836 mg 2,46 mmol	1,27 mL 9,71 mmol	20 + 5	0,350	6	72

\*P. = Produit final obtenu.

<sup>o</sup>Les composés **30** et **33** sont les produits de l'étape 1

\*global sur les étapes (1) et (2) pour **31** et **34**, et pour l'étape (1) pour **25** et **26**.

**27** décrit p. 194-195.

**28** décrit p. 195-196.

**29** décrit p. 197-198.

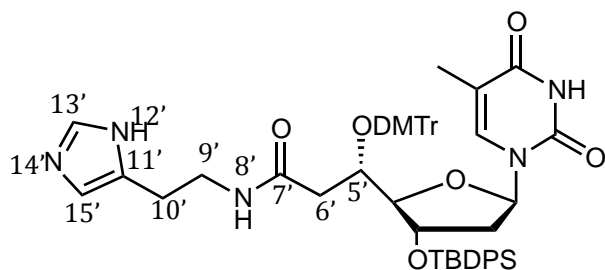
**30** décrit p. 191.

**32** décrit p. 199.

**33** décrit p. 192-193.

**25 et 26 :**

**25 : (S)-N-(2-(1*H*-imidazol-5-yl)éthyl)-3-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-3-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)propanamide et**

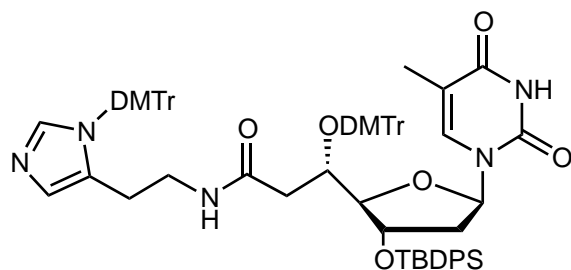


$C_{54}H_{59}N_5O_8Si$ , 934,16 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 8,00 (1H, s, NH base) ; 7,81 (NH<sub>12'</sub>) ; 7,61-7,58 (5H, m, Ph) ; 7,40-7,27 (13H, m, Ph, H<sub>13'</sub>, et H<sub>6</sub>) ; 7,00-6,76 (8H, m, DMTr) ; 6,75 (1H, bs, NH<sub>8'</sub>) ; 6,56 (1H, s, H<sub>15'</sub>) ; 6,45 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 8,7$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 5,8$  Hz, H<sub>1'</sub>), 4,48 (1H, m, H<sub>3'</sub>), 3,79 (6H, s, OMe DMTr) ; 3,75 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,57 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,41-3,31 (2H, m, H<sub>9'</sub>) ; 2,72-2,59 (2H, m, H<sub>10'</sub>), 2,46-2,35 (2H, m, H<sub>6'</sub>) ; 2,24-2,18 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,79 (3H, s, Me<sub>7</sub>), 1,05 (9H, s, tBu-Si).

MS : ESI MeOH (m/z) : 972,5 [M+K<sup>+</sup>].

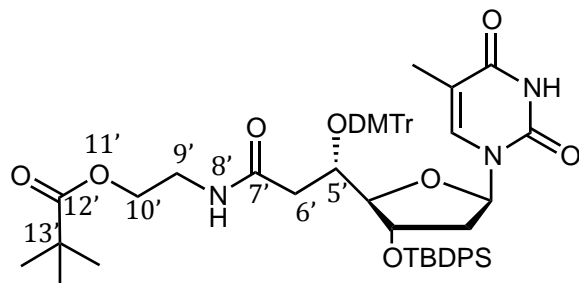
**26 : (S)-3-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-N-(2-(1-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthyl)-1*H*-imidazol-5-yl)éthyl)-3-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)propanamide**



$C_{75}H_{77}N_5O_{10}Si$ , 1236,53 g.mol<sup>-1</sup>

MS : ESI MeOH m/z : 1237 [M+H<sup>+</sup>].

**30 : 3-((S)-3-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-3-((2R,3S,5R)-3-((tert-butyl)diphénylesilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl) tétrahydrofuran-2-yl)-3-hydroxypropanamido)éthyl pivalate**



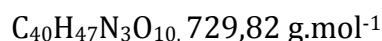
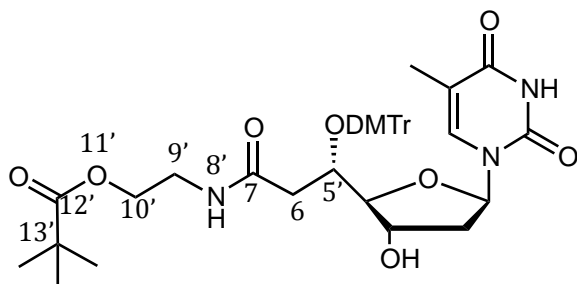
$C_{56}H_{65}N_3O_{10}Si$ , 968,21 g.mol<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 8,17 (1H, s, NH base) ; 7,69 (1H, d,  $J_{H_6-Me_7} = 0,9$  Hz, H<sub>6</sub>) ; 7,54-7,28 (13H, m, Ph et DMTr) ; 7,18-7,04 (10H, m, Ph et DMTr) ; 6,70 (4H, m, DMTr) ; 6,49 (1H, dd,  $J_{H_{1'}-H_{2'a}} = 9,0$  Hz ;  $J_{H_{1'}-H_{2'b}} = 5,7$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,54 (1H, t,  $J_{NH_8'-H_{9'}} = 5,5$  Hz, NH<sub>8'</sub>) ; 4,36 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 4,12 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,99 (2H, m, H<sub>10'</sub>) ; 3,90 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,76 et 3,75 (6H, 2s, 2 OMe DMTr) ; 3,28 (2H, m, H<sub>9'</sub>) ; 2,27-1,96 (4H, m, H<sub>6'</sub> et H<sub>2'</sub>) ; 1,62 (3H, d,  $J_{Me_7-H_6} = 0,9$  Hz, Me<sub>7</sub>) ; 1,15 (9H, s, tBu-Piv) ; 0,96 (9H, s, tBu-Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 179,9 (C<sub>12'</sub>) ; 169,7 (C<sub>7'</sub>) ; 163,4 (C<sub>2</sub>) ; 158,9 (C<sub>qDMTr</sub>) ; 150,2 (C<sub>4</sub>) ; 135,7 - 135,5 - 135,4 - 135,3 - 130,5 - 130,4 - 128,4 - 127,9 - 127,82 - 127,79 (C Ph) ; 113,1 (C<sub>MetaDMTr</sub>) ; 111,4 (C<sub>5</sub>) ; 87,64 (C<sub>qDMTr</sub>) ; 89,1 (C<sub>4'</sub>) ; 84,2 (C<sub>1'</sub>) ; 74,4 (C<sub>5'</sub>) ; 71,9 (C<sub>3'</sub>) ; 62,7 (C<sub>H10'</sub>) ; 55,3 (OMe DMTr) ; 41,1 (C<sub>2'</sub>) ; 39,1 (C<sub>6'</sub>) ; 38,7 (C<sub>9'</sub>) ; 27,2 (tBu-Piv) ; 26,8 (tBu-Si) ; 18,9 (C<sub>qtBu-Si</sub>) ; 12,1 (C<sub>7</sub>).

**MS** : APCI négative MeOH, m/z 967,20 [M-H]<sup>-</sup>.

**31 : 2-((*S*)-3-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-3-((*2S,3S,5S*)-3-hydroxy-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)-3-propanamido)éthyl pivalate**

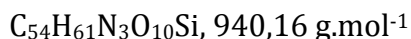
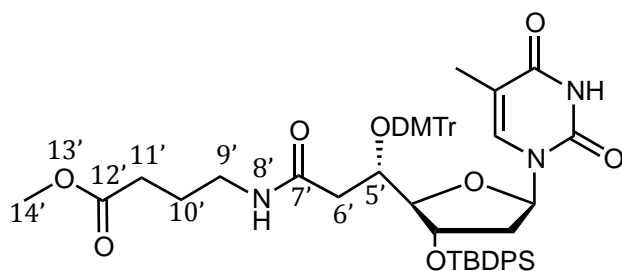


RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 8,98 (1H, s, NH base) ; 7,94-7,25 (10H, m, Ph et H<sub>6</sub>) ; 6,85 (4H, m, DMTr) ; 6,29 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 6,8$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 6,8$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,83 (1H, t,  $J_{NH8'-H9'} = 5,8$  Hz, NH<sub>8'</sub>) ; 4,34 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 4,12 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 4,03 (2H, m, H<sub>10'</sub>) ; 3,87 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,82 et 3,81 (6H, 2s, 2 OMe DMTr) ; 3,43 (2H, m, H<sub>9'</sub>) ; 2,38-1,23 (4H, m, H<sub>6'</sub> et H<sub>2'</sub>) ; 1,83 (3H, Me<sub>7</sub>) ; 1,18 (9H, s, tBu-Piv).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 171,1 (C<sub>12'</sub>) ; 163,9 (C<sub>7'</sub>) ; 159,1 (C<sub>2</sub>) ; 150,4 (C<sub>qDMTr</sub>) ; 145,4 (C<sub>4</sub>) ; 136,3 (C<sub>6</sub>) ; 135,7 – 135,5 – 135,4 – 130,5 – 128,4 – 127,9 – 127,7 (C Ph) ; 113,4 (C<sub>metaDMTr</sub>) ; 111,2 (C<sub>5</sub>) ; 87,6 (C<sub>qDMTr</sub>) ; 87,9 (C<sub>4'</sub>) ; 84,7 (C<sub>1'</sub>) ; 71,9 (C<sub>3'</sub>) ; 71,5 (C<sub>5'</sub>) ; 63,0 (C<sub>10'</sub>) ; 55,4 (OMe DMTr) ; 40,6 (C<sub>6'</sub>) ; 39,1 (C<sub>9'</sub>) ; 38,8 (C<sub>2'</sub>) ; 29,9 (C<sub>qtBu-Piv</sub>) 27,3 (tBu-Piv) ; 12,4 (C<sub>7</sub>).

MS : ESI MeOH, haute résolution (m/z) : 752,3137 [M+Na<sup>+</sup>] (100%) ppm = -2,9.

**33 : méthyl 4-((*S*)-3-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-3-((*2R,3S,5R*)-3-((*tert*-butyldiphénylesilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(*2H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)propanamido)butanoate**

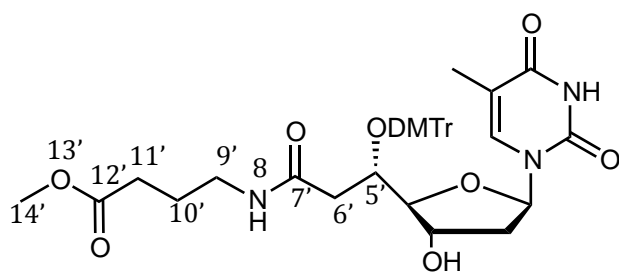


RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 8,79 (1H, bs, NH base) ; 8,17 (1H, s, H<sub>6</sub>) ; 7,68 -7,05 (19H, m, Ph, DMTr) ; 6,69 (4H, m, DMTr) ; 6,50 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 9,0$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 5,5$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,53 (1H, t,  $J_{NH8'-H9'} = 5,6$  Hz, NH<sub>8'</sub>) ; 4,36 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 4,14 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,85 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,75 (3H, s, OMe DMTr) ; 3,74 (3H, s, OMe DMTr) ; 3,64 (3H, s, OMe ester) ; 3,58 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,05 (2H, m, H<sub>9'</sub>) ; 2,22 (2H, m, H<sub>11'</sub>) ; 2,16-1,96 (4H, m, H<sub>2'</sub> et H<sub>6'</sub>) ; 1,66 (2H, m, H<sub>10'</sub>) ; 1,67 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 0,99 (9H, s, tBu-Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 173,4 (C<sub>12'</sub>) ; 169,8 (C<sub>7</sub>) ; 163,8 (C<sub>2</sub>) ; 158,9 (C<sub>q</sub> DMTr) ; 150,5 (C<sub>4</sub>) ; 135,8 (C<sub>6</sub>) ; 130,6 - 130,5 - 130,0 - 128,5 - 128,0 - 127,9 - 127,4 - 121,3 (C Ph) ; 113,3 (C<sub>meta</sub> DMTr) ; 111,5 (C<sub>5</sub>) ; 89,1 (C<sub>4'</sub>) ; 87,5 (C<sub>qDMTr</sub>) ; 84,3 (C<sub>1'</sub>) ; 74,4 (C<sub>3'</sub>) ; 72,1 (C<sub>5'</sub>) ; 55,4 (OMe DMTr) ; 51,8 (OMe ester) ; 41,2 (C<sub>2'</sub>) ; 39,4 (C<sub>6'</sub>) ; 38,7 (C<sub>9'</sub>) ; 31,4 (C<sub>11'</sub>) ; 27,0 (tBu-Si) ; 24,8 (C<sub>10'</sub>) ; 19,1 (C<sub>qtBu-Si</sub>) ; 12,7 (Me<sub>7</sub>).

MS : APCI négative MeOH (m/z) : 938,90 [M-H]<sup>-</sup>.

**34 : méthyl 4-((S)-3-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-3-((2R,3S,5R)-3-hydroxy-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)propanamido)**



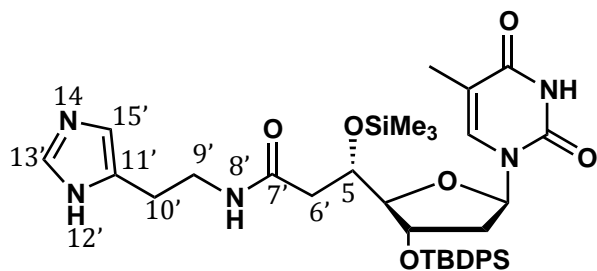
C<sub>38</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>, 701,76 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub> 300 MHz), δ (ppm) : 8,19 (1H, s, NH base) ; 7,31 (1H, d,  $J_{H6-Me7} = 1,2$  Hz, H<sub>6</sub>) ; 7,49-7,23 (9H, m, DMTr) ; 6,81 (4H, m, DMTr) ; 6,21 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 6,8$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 6,7$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,46 (1H, t,  $J_{NH8'-H9'} = 5,6$  Hz, NH<sub>8'</sub>) ; 4,29 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 4,03 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,84 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,78 et 3,76 (6H, 2s, OMe DMTr) ; 3,64 (3H, s, OMe ester) ; 3,16 (2H, m, H<sub>9'</sub>) ; 2,28 (2H, m, H<sub>11'</sub>) ; 2,30-2,15 (4H, m, H<sub>6'</sub> et H<sub>2'</sub>) ; 1,81 (3H, d,  $J_{Me7-H6} = 1,2$  Hz, Me<sub>7</sub>) ; 1,74 (2H, m, H<sub>10'</sub>).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz),  $\delta$  (ppm) : 171,0 ( $\text{C}_{12'}$ ) ; 164,0 ( $\text{C}_2$ ) ; 159,1 ( $\text{C}_q$  DMTr) ; 150,4 ( $\text{C}_4$ ) ; 139,7 ( $\text{C}_{7'}$ ) ; 136,0 ( $\text{C}_6$ ) ; 136,0 – 135,9 – 130,8 – 130,7 – 129,3 – 128,6 – 128,1 – 128,0 – 127,9 – 127,4 – 127,2 (C Ph) ; 113,4 ( $\text{C}_{\text{metaDMTr}}$ ) ; 111,2 ( $\text{C}_5$ ) ; 87,8 ( $\text{C}_{4'}$ ) ; 87,5 ( $\text{C}_{q\text{DMTr}}$ ) ; 84,7 ( $\text{C}_{1'}$ ) ; 72,0 ( $\text{C}_{3'}$ ) ; 71,4 ( $\text{C}_{5'}$ ) ; 55,5 (OMe DMTr) ; 51,9 (OMe ester) ; 40,6 ( $\text{C}_{6'}$ ) ; 39,1 ( $\text{C}_{9'}$ ) ; 39,0 ( $\text{C}_{2'}$ ) ; 31,5 ( $\text{C}_{11'}$ ) ; 24,7 ( $\text{C}_{10'}$ ) ; 12,6 ( $\text{C}_7$ ).

MS : APCI négative MeOH (m/z) 700,70 [M-H].

**27 : (S)-N-(2-(1H-imidazol-5-yl)éthyl)-3-((2S,3S,5R)-3-((tert-butylidiphénylesilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)-3-((triméthylesilyl)oxy)propanamide**



$\text{C}_{36}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_6\text{Si}_2$ , 703,98 g.mol $^{-1}$

Le composé **23** (1 g, 1,58 mmol) est solubilisé dans de la pyridine (8 mL), et à cette solution sont ajoutés la bis(triméthylesilyl)amine (HMDS) (255 mg, 1,58 mmol) et le chlorure de triméthylesilyle (TMSCl) (430 mg, 3,96 mmol). La réaction est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 12 heures. Le milieu réactionnel est hydrolysé par ajout d'eau distillée et extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques regroupées sont lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchées sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporées à sec. Le brut obtenu est purifié sur colonne en éluant avec de l'acétate d'éthyle puis avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol 90/10. 677 mg du produit attendu sont isolés avec un rendement de 61%.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 7,74 (1H, d,  $J_{\text{H}_6-\text{Me}7} = 1,1$  Hz,  $\text{H}_6$ ) ; 7,71 (1H, s,  $\text{H}_{15'}$ ) ; 7,65-7,37 (10 H, m, Ph) ; 6,67 (1H, s,  $\text{H}_{13'}$ ) ; 6,57 (1H, dd,  $J_{\text{H}_{1'-\text{H}_{2'a}} = 9,3$  Hz ;  $J_{\text{H}_{1'-\text{H}_{2'b}} = 5,5$  Hz,  $\text{H}_{1'}$ ) ; 4,08 (1H, m,  $\text{H}_{3'}$ ) ; 3,82-3,70 (2H, m,  $\text{H}_{5'}$  et  $\text{H}_{9'a}$ ) ; 3,65 (1H, s,  $\text{H}_{4'}$ ) ; 3,21 (1H, m,  $\text{H}_{9'b}$ ) ; 2,76 (2H, m,  $\text{H}_{10'}$ ) ; 2,48 (1H, partie A d'un système ABX(Y),  $J_{\text{H}_{6'a}-\text{H}_{6'b}} = 13,7$  Hz ;  $J_{\text{H}_{6'a}-\text{H}_{5'}} =$

## Chapitre IV : Partie expérimentale

9,7 Hz, H<sub>6'</sub>) ; 2,31-2,21 (2H, m, H<sub>6'b</sub> et H<sub>2'a</sub>) ; 1,78 (3H, d,  $J_{\text{Me7-H6}} = 1,1$  Hz, Me<sub>7</sub>) ; 1,70 (1H, m, H<sub>2'b</sub>) ; 1,05 (9H, s, tBu-Si) ; 0,18 (9H, s, SiMe<sub>3</sub>).

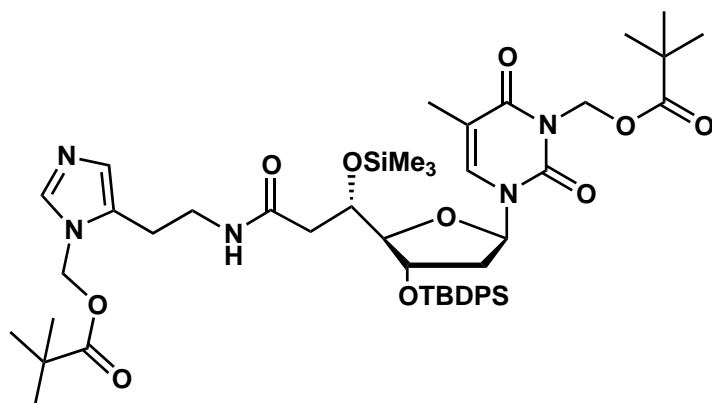
RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$  (ppm) : 169,8 (C<sub>7'</sub>) ; 165,1 (C<sub>2</sub>) ; 151,1 (C<sub>4</sub>) ; 137,6 (C<sub>15'</sub>) ; 135,2 (C<sub>6</sub>) ; 138,0 – 136,9 – 136,3 – 136,2 – 136,1 – 136,0 – 135,9 – 135,7 – 133,2 – 132,8 (C Ph) ; 114,7 (C<sub>13'</sub>) ; 110,6 (C<sub>5</sub>) ; 89,4 (C<sub>4'</sub>) ; 85,4 (C<sub>1'</sub>) ; 76,3 (C<sub>3'</sub>) ; 70,3 (C<sub>5'</sub>) ; 60,6 (C<sub>9'</sub>) ; 41,5 (C<sub>6'</sub>) ; 39,9 (C<sub>11'</sub>) ; 39,8 (C<sub>2'</sub>) ; 27,0 (tBu-Si) ; 26,9 (C<sub>10'</sub>) ; 12,6 (Me<sub>7</sub>) ; 0,1 (SiMe<sub>3</sub>).

MS : DCI NH<sub>3</sub>, haute résolution (m/z) : 704,5 [M+H<sup>+</sup>] (100%) ppm = -0,3.

### **28a** et **28b** :

Le produit **27** (500 mg, 7,10 10<sup>-1</sup> mmol) est solubilisé dans du DMF (20 mL) et le K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (292 mg, 2,11 mmol) ainsi que le chlorométhylpivalate (122  $\mu$ l, 0,85 mmol) sont ajoutés. La réaction est laissée à température ambiante pendant 6 heures. Le milieu réactionnel est ensuite hydrolysé par ajout d'eau distillée puis extrait à l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée à sec. Le brut obtenu est purifié sur colonne de silice flash en éluant avec un mélange de solvants dichlorométhane/acétate d'éthyle 50/50, puis avec de l'acétate d'éthyle pur, et enfin avec un mélange acétate d'éthyle/méthanol 80/20. 348 mg de produits doublement protégé **28a** et **28b** en rapport 50/50 sont récupérés avec un rendement de 60%.

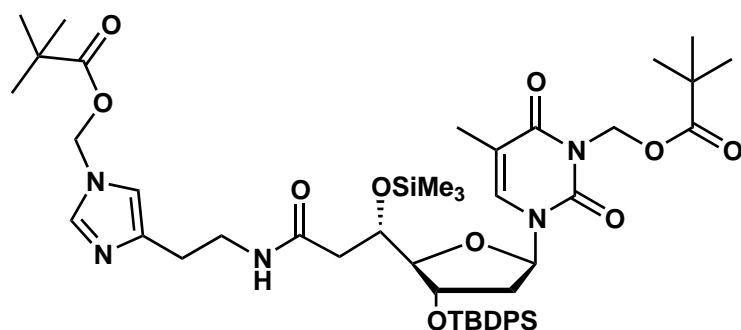
**28a** : (3-((2*R*,4*S*,5*S*)-4-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-((*S*)-3-oxo-3-((2-(1-((pivaloyloxy)méthyl)-1*H*-imidazol-5-yl)éthyl)amino)-1-((triméthylsilyl)oxy)propyl)tétrahydrofuran-2-yl)-5-méthyl-2,6-dioxo-3,6-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)méthyl pivalate



$C_{48}H_{69}N_5O_{10}Si_2$ , 932,26 g.mol<sup>-1</sup>

MS : ESI MeOH (m/z) : 932,5 [M+H<sup>+</sup>].

**28b** : (3-((2*R*,4*S*,5*S*)-4-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-((*S*)-3-oxo-3-((2-(1-((pivaloyloxy)méthyl)-1*H*-imidazol-4-yl)éthyl)amino)-1-((triméthylsilyl)oxy)propyl)tétrahydrofuran-2-yl)-5-méthyl-2,6-dioxo-3,6-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)méthyl pivalate

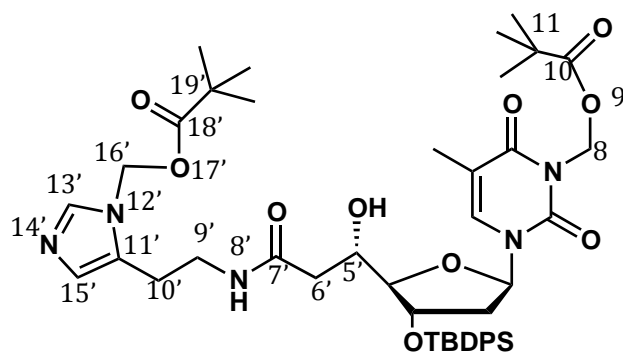


$C_{48}H_{69}N_5O_{10}Si_2$ , 932,26 g.mol<sup>-1</sup>

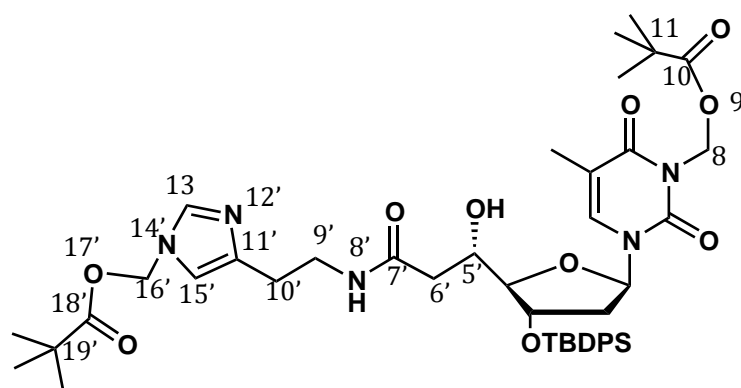
MS : ESI MeOH (m/z) : 932,5 [M+H<sup>+</sup>].



**29a** et **29b** : (3-((2*R*,4*S*,5*R*)-4-((*tert*-butyldiphénylesilyl)oxy)-5-((*S*)-1-hydroxy-3-oxo-3-((2-(1-((pivaloyloxy)méthyl)-1*H*-imidazol-5-yl)éthyl)amino)propyl)tétrahydrofuran-2-yl)-5-méthyl-2,6-dioxo-2,3-dihydropyrimidin-1(6*H*)-yl)méthyl pivalate



$C_{45}H_{61}N_5O_{10}Si$ , 860,08 g mol<sup>-1</sup>



$C_{45}H_{61}N_5O_{10}Si$ , 860,08 g mol<sup>-1</sup>

Le mélange de composés **28a** et **28b** (110 mg, 1,34 10<sup>-1</sup> mmol) est solubilisé dans du méthanol. A ce mélange à température ambiante l'APTS (100 mg, 5,81 10<sup>-1</sup> mmol) est ajouté, la solution vire instantanément au rose pale. Après avoir laissé réagir pendant 16 heures, le milieu est filtré puis le solvant est évaporé et 85 mg de produits attendus **29a** et **29b** sont récupérés en mélange avec un rendement de 74%.

MS : ESI MeOH (m/z) : 860,4 [M+H<sup>+</sup>].

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 7,84 (1H, d,  $J_{H6-Me7} = 1,1$  Hz, H<sub>6</sub>**29a**) ; 7,68 (1H, d,  $J_{H6-Me7} = 1,1$  Hz, H<sub>6b</sub>**29b**) ; 7,63-7,59 (10H, m, Ph **29a** et **29b**) ; 7,50 (1H, s, H<sub>13'</sub>**29a**) ; 7,49 (1H, s, H<sub>13'b</sub>**29b**) ; 7,43-7,37 (10H, m, Ph **29a** et **29b**) ; 6,84 (1H, s, H<sub>15'</sub>**29a**) ; 6,83 (1H, s, H<sub>15'b</sub>**29b**) ; 6,78 (1H, m, N<sub>H8'</sub>**29a**) ; 6,83 (1H, t,  $J_{NH8'-H9'} = 5,3$  Hz, N<sub>H8'</sub>**29b**) ; 6,52 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a}$

## Chapitre IV : Partie expérimentale

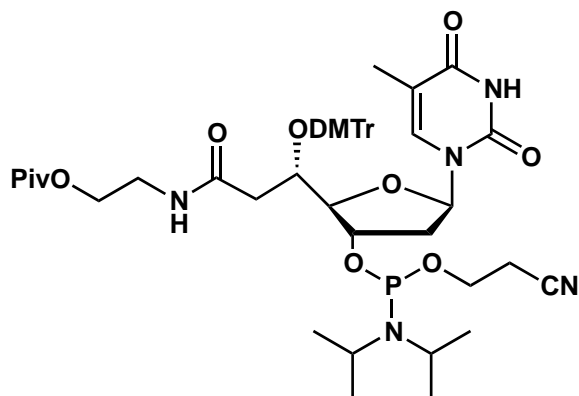
= 8,6 Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 5,7$  Hz,  $H_{1'29a}$ ) ; 6,43 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 8,6$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 5,7$  Hz,  $H_{1'29b}$ ) ; 5,92 (4H, m,  $H_8$  **29a** et **29b**) ; 5,77 (4H, m,  $H_{16'}$  **29a** et **29b**) ; 4,51 (1H, m,  $H_{3'29a}$ ) ; 4,49 (1H, m,  $H_{3'29b}$ ) ; 3,76 (1H, m,  $H_{4'29a}$ ) ; 3,71 (1H, m,  $H_{4'29b}$ ) ; 3,57 (1H, m,  $H_{5'29a}$ ) ; 3,53 (1H, m,  $H_{5'29b}$ ) ; 3,49 (2H, m,  $H_{9'29a}$ ) ; 3,47 (2H, m,  $H_{9'29b}$ ) ; 2,82 (2H, dd,  $J_{H10'-H9'a} = 6,8$  Hz ;  $J_{H10'-H9'b} = 6,8$  Hz,  $H_{10'29a}$ ) ; 2,67 (2H, m,  $H_{10'29b}$ ) ; 2,39 (4H, m,  $H_{6'29a}$  et  $H_{6'29b}$ ) ; 2,23 (1H, m,  $H_{2'29a}$ ) ; 2,19 (1H, m,  $H_{2'29b}$ ) ; 2,08 (1H, m,  $H_{2'29b}$ ) ; 1,99 (1H, m,  $H_{2'29a}$ ) ; 1,86 (3H, d,  $J_{Me7-H6} = 1,1$  Hz,  $Me_{729a}$ ) ; 1,85 (3H, d,  $J_{Me7-H6} = 1,1$  Hz,  $Me_{729b}$ ) ; 1,17 et 1,15 (9H et 9H, 2s, tBu-Piv**29a**) ; 1,16 et 1,35 (9H et 9H, 2s, tBu-Piv**29b**) ; 1,06 (18H, s, tBu-**Si****29a** et **29b**).

### II.1.c) Protocole général de formation des phosphoramidites

La procédure décrite page 180 est reproduite à l'identique pour obtenir les produits **32** et **35**.

Produit obtenu	Nucléoside de départ	THF	DIPEA	chlorophosphite	Rdt (%)
<b>32</b>	<b>31</b> , 148 mg, 2,04 mmol	1,5 mL	141 $\mu$ L, 0,81 mmol	96 mg, 0,41 mmol	46
<b>35</b>	<b>34</b> , 300 mg, 0,43 mmol	3 mL	300 $\mu$ L, 1,71 mmol,	202 mg, 0,86 mmol.	42

**32** : 2-((3*S*)-3-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-3-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-(((2-cyanoéthoxy)(diisopropylamino)phosphino)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)propanamido)éthyl pivalate

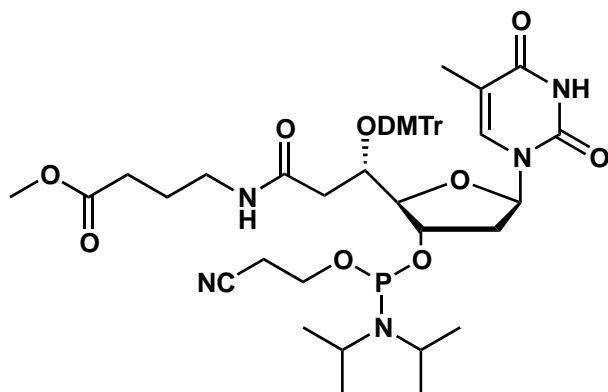


$C_{49}H_{64}N_5O_{11}P$ , 930,03 g.mol<sup>-1</sup>

MS : ESI MeOH, haute résolution (m/z) : 952,4238 [M+Na<sup>+</sup>] (100%) ppm = -2,6.

RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz), δ (ppm) : 150,2 et 148,7.

**35** : méthyl 4-((3*S*)-3-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-3-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-(((2-cyanoéthoxy)(diisopropylamino)phosphanyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)propanamido)butanoate

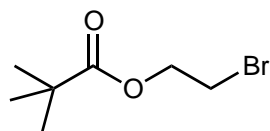


$C_{47}H_{60}N_5O_{11}P$ , 901,98 g.mol<sup>-1</sup>

MS: ESI MeOH, haute résolution (m/z) : 924,3925 [M+Na<sup>+</sup>] (100%) ppm = -1,9.

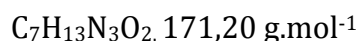
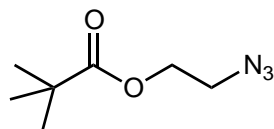
RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz), δ (ppm) : 150,1 et 148,8.

## II.2) Les nucléotides fonctionnalisés triazoles

**36 : 2-bromoéthyl pivalate**

Le bromoéthanol commercial (10 g, 5,67 mL,  $8.10^{-2}$  mol) est dissout dans de la pyridine (50 mL) préalablement distillée sur KOH. Le système est placé sous atmosphère inerte d'argon et refroidi à  $0^\circ\text{C}$  à l'aide d'un bain de glace. Au mélange est ajouté le chlorure de pivaloyle (19,3 g, 0,16 mmol). Cet ajout provoque un dégagement d'acide chlorhydrique. La réaction est laissée sous agitation pendant 12 heures en laissant le bain de glace afin que la température remonte à température ambiante lentement. Le milieu réactionnel est hydrolysé par ajout de glace, et laissé sous agitation pendant une heure. Ce dernier est ensuite dilué avec du dichlorométhane et lavé avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$  puis plusieurs fois à l'eau. Les phases organiques regroupées sont séchées sur  $\text{MgSO}_4$  et évaporées à sec. 11 g d'un liquide incolore sont obtenus avec un rendement de 63% utilisés tel quel dans l'étape qui suit.

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 4,39 (2H, t,  $J_{\text{CH}_2\text{Br}-\text{CH}_2\text{O}} = 6,2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{Br}$ ) ; 3,54 (2H, t,  $J_{\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{Br}} = 6,5$  Hz,  $\text{CH}_2-\text{O}$ ) ; 1,25 (9H, s, tBu).

**37 : 2-azidoéthyl pivalate**

Le composé **36** (2,26 g,  $1,3 \cdot 10^{-2}$  mol) avec l'azoture de sodium (1 g,  $1,5 \cdot 10^{-2}$  mol) sont solubilisés dans le diméthylformamide (5 mL). Le mélange est laissé à  $50^\circ\text{C}$  pendant 12 heures. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec de l'éther diéthylique et lavé deux fois avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaHCO}_3$ , deux fois avec de l'eau distillée, et

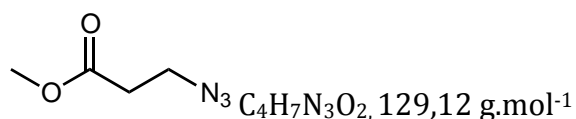
une fois avec une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée sur MgSO<sub>4</sub> et évaporée à sec. Le produit désiré est obtenu avec un rendement quantitatif.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 4,19 (2H, t, *J* = 6,5 Hz, CH<sub>2</sub>-O) ; 3,42 (2H, t, *J* = 5,1 Hz ; CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>) ; 1,20 (9H, s, tBu).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 178,2 (C=O) ; 63,3 (CH<sub>2</sub>-O) ; 4,9 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>) ; 38,8 (C<sub>q</sub> tBu) ; 27,1 (CH<sub>3</sub> tBu).

IR (ATR) : ν (cm<sup>-1</sup>) 1740,1 (C=O) ; 2103,7 (N<sub>3</sub>).

### **38 : méthyl 3-azidopropanoate**



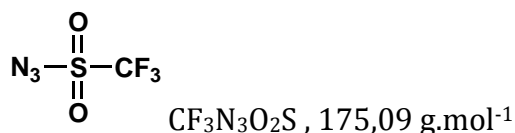
L'azoture de sodium (1,22 g, 0,19 mmol) est solubilisé dans 20 mL de diméthylformamide. A cette solution est ajouté le 3-bromopropanoate de méthyle commercial (1,12 g, 6,71 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à 50°C pendant 12 heures. Après avoir refroidit le milieu réactionnel à température ambiante il est dilué avec de l'éther diéthylique et lavé trois fois à l'eau afin d'éliminer le diméthylformamide, puis séché sur MgSO<sub>4</sub> et évaporé à sec. 850 mg de produit sont récupérés, sous forme d'une huile jaune, avec un rendement quantitatif sans purification ultérieure.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 3,67 (3H, s, OMe) ; 3,53 (2H, t, *J*<sub>CH<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>O</sub> = 6,5 Hz, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>) ; 2,53 (2H, t, *J*<sub>CH<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>N</sub> = 6,5 Hz, CH<sub>2</sub>-C=O).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 171,1 (C=O) ; 51,7 (CH<sub>3</sub>) ; 46,5 (CH<sub>2</sub>-N) ; 33,5 (CH<sub>2</sub>-C).

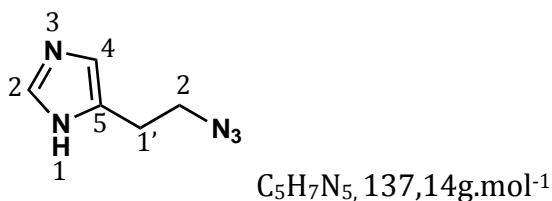
IR (ATR) : ν (cm<sup>-1</sup>) 1733,3 (C=O) ; 2107,5 (N<sub>3</sub>).

### **39 : Azoture de trifluorométhanesulfonyle**



L'azoture de sodium (11,99 g, 184 mmol) est solubilisé dans du dichlorométhane anhydre (30 mL). Le mélange est placé dans un bain de glace et l'anhydride triflique (10 g, 35 mmol) est additionné à froid par petites portions. Le mélange est laissé sous forte agitation à température ambiante pendant 2 heures, puis le produit est extrait avec du dichlorométhane (2 x 25 mL) et lavé à l'eau distillée (1 x 25 mL). Le composé **39** est laissé en solution dans le dichlorométhane et utilisé tel quel pour l'étape suivante.

#### **40 : 5-(2-azidoéthyl)-1H-imidazole**



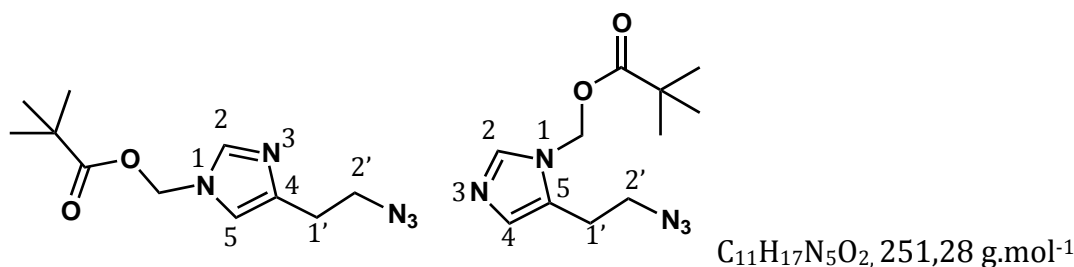
L'histamine dihydrochlorée (3,62 g, 19,6 mmol) est solubilisée dans du méthanol (120 mL) et 60 mL d'eau en présence de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (9,18g, 66,4 mmol) et de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (49,4 mg, 0,20 mmol). La solution du composé **39** est ajoutée en totalité au mélange précédemment décrit. La réaction est laissée sous forte agitation à température ambiante durant une nuit. Après 16 heures le produit est extrait avec du dichlorométhane puis la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et séchée sur  $\text{MgSO}_4$ . Le brut obtenu est purifié sur colonne de silice en éluant avec un gradient acétate d'éthyle jusqu'à acétate d'éthyle / méthanol 70/30. Le produit **40** est obtenu avec un rendement de 94%.

RMN <sup>1</sup>H ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 7,62 (1H, s, H<sub>2</sub>) ; 6,89 (1H, s, H<sub>4</sub>) ; 3,47 (2H, t,  $J_{\text{H}_2'-\text{H}_1'} = 6,6$  Hz, H<sub>2'</sub>) ; 2,78 (2H, t,  $J_{\text{H}_1'-\text{H}_2'} = 6,6$  Hz, H<sub>1'</sub>).

MS : ESI MeOH (m/z) : 138,1 [M+H<sup>+</sup>].

IR (ATR) :  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 2100,7 (N<sub>3</sub>).

**41a et 41b** : (4-(2-azidoéthyl)-1*H*-imidazol-1-yl)méthyl pivalate et (5-(2-azidoéthyl)-1*H*-imidazol-1-yl)méthyl pivalate



Le composé **40** (2,54 g, 18,4 mmol) ainsi que le K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8,10 g, 0,59 mmol) sont solubilisés dans du diméthylformamide (100 mL) avant d'ajouter le chlorure de pivaloyloxyméthyle (7 mL). La réaction est laissée sous agitation magnétique à température ambiante pendant 12 heures. Le milieu réactionnel est alors filtré et le diméthylformamide évaporé. Le produit récupéré est solubilisé dans de l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau distillée et avec une solution aqueuse saturée de NaCl, séché sur MgSO<sub>4</sub> et évaporé à sec. Le brut est purifié sur colonne de silice flash en éluant avec un gradient acétate d'éthyle/dichlorométhane (20/80) jusqu'à 100% d'acétate d'éthyle. Le produit attendu est récupéré avec un rendement quantitatif.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 7,40 (1H, s, H<sub>2</sub>) ; 6,73 (1H, s, H<sub>4</sub>) ; 5,60 (2H, s, H<sub>6</sub>) ; 3,33 (2H, t,  $J_{H1'-H2'} = 6,8$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 2,61 (2H, t,  $J_{H2'-H1'} = 6,8$  Hz, H<sub>2'</sub>) ; 0,95 (9H, s, tBu).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$  (ppm) : 176,7 (C<sub>7</sub>) ; 138,6 (C<sub>3</sub>) ; 137,2 (C<sub>5</sub>) ; 116,0 (C<sub>4</sub>) ; 66,8 (C<sub>6</sub>) ; 37,8 (C<sub>8</sub>) ; 27,2 (C<sub>2</sub>) ; 25,9 (C<sub>9</sub>).

MS : DCI NH<sub>3</sub> (m/z) : 252,1 [M+H<sup>+</sup>].

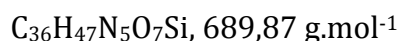
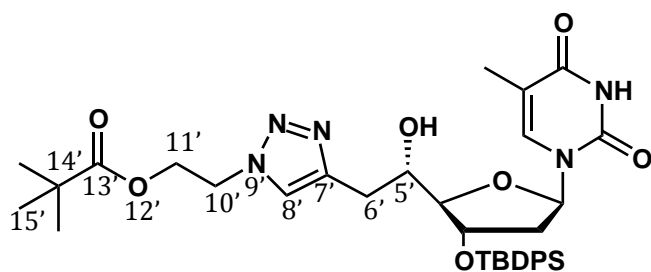
IR (ATR) :  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 1740,6 (C=O) ; 2102,5 (N<sub>3</sub>).

**II.2.a) Protocole général de cyclo-addition de Huisgen catalysée par du cuivre I (CuAAC)**

L'alcyne **8a** est solubilisé dans de l'isopropanol et l'azoture ainsi que l'ascorbate de sodium (300 mg, 1,5mmol), l'acétate de cuivre et l'eau sont ajoutés. Le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant une heure, puis dilué avec de l'acétate d'éthyle. Après lavages avec une solution d'EDTA saturée (4 x), avec de l'eau (3 x), et avec une solution saturée de NaCl (1 x), le produit est séché sur MgSO<sub>4</sub> et évaporé à sec. Les bruts sont obtenus très propres, avec des rendements quantitatifs, et sont utilisés tels quels dans l'étape suivante.

Produit obtenu	Nucléoside de départ <b>8a</b>	<i>i</i> PrOH	Azoture (quantité)	Eau	Cu(OAc) <sub>4</sub>	Asc.Na
<b>42</b>	100 mg 1,93 mmol	5 mL	<b>37</b> , 50 mg, 0,3 mmol	5mL	46 mg, 2,3 mmol	45 mg, 2,3 mmol
<b>43</b>	100 mg 1,93 mmol	5 mL	<b>38</b> , 38 mg, 0,3 mmol	5mL	46 mg, 2,3 mmol	45 mg, 2,3 mmol
<b>44</b>	646,8 mg 1,25 mmol	30 mL	<b>41</b> , 475 mg, 1,88 mmol	30 mL	272 mg, 1,5 mmol	300 mg, 1,5 mmol

**42:** 2-(4-(2-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl) tétrahydrofuran-2-yl)-2-hydroxyéthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthyl pivalate



RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 9,33 (1H, bs, NH base) ; 7,68 (1H, s, H<sub>6</sub>) ; 7,60-7,33 (11H, Ph et H<sub>8</sub>) ; 6,40 (1H, dd, *J*<sub>H1'-H2'a</sub> = 8,0 Hz ; *J*<sub>H1'-H2'b</sub> = 6,3 Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,56 (2H, m, H<sub>10'</sub>) ;

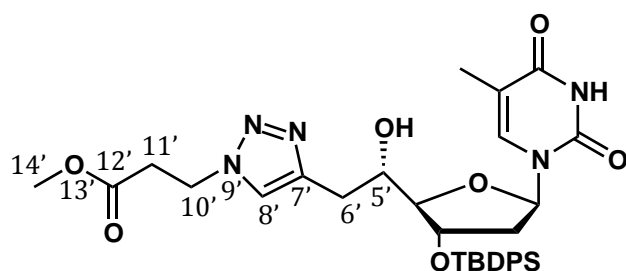


4,50 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 4,41 (2H, m, H<sub>11'</sub>) ; 3,87 (1H, bs, H<sub>4'</sub>) ; 3,57 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 2,78 (1H, partie A d'un système ABX(Y), J<sub>H6'a-H6'b</sub> = 15 Hz ; J<sub>H6'a-H5'</sub> = 9 Hz, H<sub>6'a</sub>) ; 2,74 (1H, partie B d'un système ABX(Y), J<sub>H6'b-H6'a</sub> = 15 Hz ; J<sub>H6'b-H5'</sub> = 3 Hz, H<sub>6'b</sub>) ; 2,17 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,81 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 1,12 (9H, s, tBu-Piv) ; 1,04 (9H, s, tBu-Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 178,1 (C<sub>13'</sub>) ; 164,3 (C<sub>4</sub>) ; 150,8 (C<sub>2</sub>) ; 145,2 (C<sub>7'</sub>) ; 137,4 (C<sub>6</sub>) ; 137,4 – 136,1 – 135,9 – 135,8 – 133,5 – 133,2 – 130,2 – 128,0 (C Ph) ; 122,54 (C<sub>8'</sub>) ; 111,1 (C<sub>5</sub>) ; 89,6 (C<sub>4'</sub>) ; 86,4 (C<sub>1'</sub>) ; 75,1 (C<sub>3'</sub>) ; 70,4 (C<sub>5'</sub>) ; 62,4 (C<sub>11'</sub>) ; 49,2 (C<sub>10'</sub>) ; 40,2 (C<sub>2'</sub>) ; 30,2 (C<sub>6'</sub>) ; 27,2 (tBu-Piv) ; 27,1 (tBu-Si) ; 19,2 (C<sub>q</sub> tBu) ; 12,6 (C<sub>7</sub>).

MS : ESI MeOH, haute résolution (m/z) : 690,3321 [M+H<sup>+</sup>] (100%) ppm = -0,3.

**43: méthyl 3-(4-(2-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl) tétrahydrofuran-2-yl)-2-hydroxyéthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate**



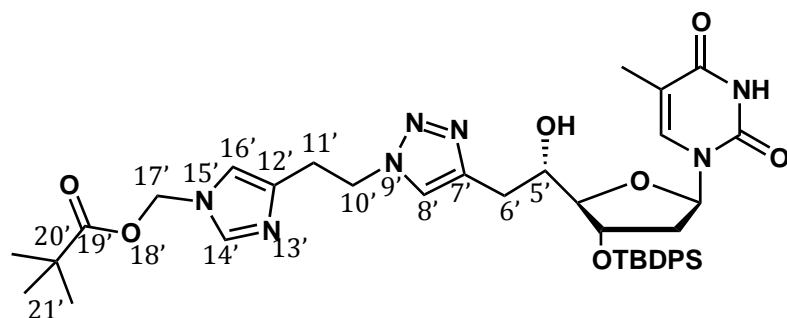
C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Si, 647,79 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 9,21 (1H, s, NH base) ; 7,34-7,70 (12H, m, Ph, H<sub>8'</sub>, H<sub>6</sub>) ; 6,42 (1H, dd, J<sub>H1'-H2'a</sub> = 8,2 Hz ; J<sub>H1'-H2'a</sub> = 6,0 Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,59 (2H, t, J<sub>H10'-H11'</sub> = 6,4 Hz, H<sub>10'</sub>) ; 4,52 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,88 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,57 (3H, s, H<sub>14'</sub>) ; 3,54 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 2,86 (2H, t, J<sub>H11'-H10'</sub> = 6,4 Hz, H<sub>11'</sub>) ; 2,62-2,67 (2H, m, H<sub>6'</sub>) ; 2,15-2,21 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,83 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 1,06 (9H, s, tBu-Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 171,0 (C<sub>12'</sub>) ; 164,0 (C<sub>4</sub>) ; 150,6 (C<sub>7'</sub>) ; 137,0 (C<sub>6</sub>) ; 133,1-150,6 (C<sub>2</sub>-C<sub>7'</sub>) ; 135,7 – 133,1 – 130,0 – 127,9 – 124,8 – 122,7 (C Ph et C<sub>8'</sub>) ; 110,9 (C<sub>5</sub>) ; 89,5 (C<sub>4'</sub>) ; 86,2 (C<sub>1'</sub>) ; 75,0 (C<sub>3'</sub>) ; 70,3 (C<sub>5'</sub>) ; 52,2 (C<sub>14'</sub>) ; 45,4 (C<sub>10'</sub>) ; 40,1 (C<sub>2'</sub>) ; 29,9 (C<sub>6'</sub>) ; 29,7 (C<sub>11'</sub>) ; 26,9 (tBu-Si) ; 19,1 (C<sub>q</sub> tBu-Si) ; 12,5 (C<sub>7</sub>).

MS : DCI NH<sub>3</sub> (m/z) : 648,3 [M-H<sup>+</sup>].

**44** : (5-(2-(4-(2-((2*R*,3*S*,5*S*)-3-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)tétrahydrofuran-2-yl-5-*t*)-2-hydroxyéthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthyl)-1*H*-imidazol-1-yl)méthyl pivalate



C<sub>40</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub>Si, 769,96 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 8,59 (1H, s, NH base) ; 7,71-7,35 (13H, m, Ph, H<sub>16'</sub>, H<sub>8'</sub> et H<sub>6'</sub>) ; 7,19 (1H, s, H<sub>14'</sub>) ; 6,43 (1H, dd, J<sub>H1'-H2'a</sub> = 8,24 Hz ; J<sub>H1'-H2'b</sub> = 6,0Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,74 (2H, s, H<sub>17'</sub>) ; 4,64 (2H, t, J<sub>H11'-H10'</sub> = 7,0 Hz, H<sub>11'</sub>) ; 4,52 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,89 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,54 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,12 (2H, t, J<sub>H10'-H11'</sub> = 7,0 Hz, H<sub>10'</sub>) ; 2,56-2,86 (2H, m, H<sub>6'</sub>) ; 2,17(2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,85 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 1,14 (9H,s, tBu-PivOM) ; 1,07 (9H, s, tBu-Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 163,7 (C<sub>19'</sub>) ; 150,6 (C<sub>4</sub>), 144,7 (C<sub>2</sub>) ; 133,7 (C<sub>7'</sub>) ; 133,2 (C<sub>12'</sub>) ; 137,2 - 135,9 - 133,5 - 133,2 - 130,2 - 128,0 (C Ph, C<sub>6</sub>, C<sub>8'</sub>, C<sub>16'</sub>) ; 111,1 (C<sub>5</sub>) ; 89,7 (C<sub>4'</sub>) ; 86,3 (C<sub>1'</sub>) ; 75,2 (C<sub>3'</sub>) ; 70,6 (C<sub>5'</sub>) ; 67,7 (C<sub>11'</sub>) ; 49,7 (C<sub>17'</sub>) ; 40,2 (C<sub>2'</sub>) ; 30,1 (C<sub>10'</sub>) ; 29,9 (C<sub>20'</sub>) ; 29,3 (C<sub>6'</sub>) ; 26,9 (tBu-PivOM) ; 19,2 (C<sub>q</sub> tBu) ; 12,6 (Me<sub>7</sub>).

MS : ESI MeOH (m/z) : 770,4 [M+H<sup>+</sup>].

***1.2.b) Protocole général de protection de l'hydroxyle en position 5' avec le chlorure de DMTr (Etape 1) et déprotection de l'hydroxyle en position 3' (Etape 2)***

La procédure décrite page 174 est reproduite à l'identique pour obtenir les produits **46**, **49**, et **52**.

Produit obtenu	Etape (1)					Etape (2)		Rdt* (%)
	Nucléoside de départ	AgNO <sub>3</sub> (mg) (mmol)	DMTrCl (mg) (mmol)	Collidine	THF (mL)	TBAF (mL)	THF (mL)	
<b>46</b>	<b>42</b> 600 mg 0,87 mmol	493 2,90	983 2,90	1,4 mL 8,70 mmol	25 + 5	0,516	60	45
<b>49</b>	<b>43</b> 500 mg 0,79 mmol	335 1,97	670 1,97	1,04 mL 7,88 mmol	22 + 5	0,126	10	46
<b>52</b>	<b>44</b> 363 mg 0,47 mmol	200 1,18	400 1,18	0,571 mL 4,71 mmol	8 + 2	0,97	11	72

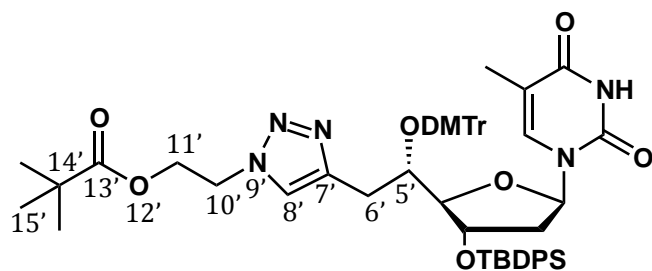
\*global sur les étapes (1) et (2).

Les composés **45**, **48** et **51** sont les produits des étapes 1.

**47** décrit p. 214.

**50** décrit p. 215.

**45: 2-(4-(2-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-2-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthyl pivalate**



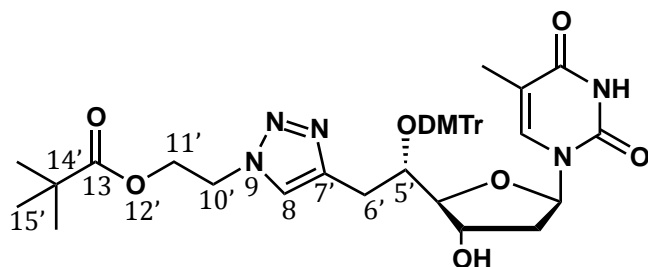
$C_{57}H_{65}N_5O_9Si$ , 992,24 g.mol<sup>-1</sup>

**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 8,72 (1H, bs, NH base) ; 7,90 (1H, d,  $J_{H_6-Me_7} = 1,0$  Hz, H<sub>6</sub>) ; 7,47-7,15 (20H, m, Ph, DMTr et H<sub>8'</sub>) ; 6,51 (1H, dd,  $J_{H_{1'}-H_{2'a}} = 8,8$  Hz ;  $J_{H_{1'}-H_{2'b}} = 5,6$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,47 (2H, m, H<sub>10'</sub>) ; 4,35 (3H, m, H<sub>11'</sub> et H<sub>3'</sub>) ; 3,83 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,78 et 3,77 (6H, 2s, OMe DMTr) ; 3,64 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 2,86 et 2,82 (2H, protons A et B d'un système ABX(Y),  $J_{H_{6'a}-H_5'} = 11,1$  Hz ;  $J_{H_{6'a}-H_{6'b}} = 14,1$  Hz ;  $J_{H_{6'b}-H_5'} = 3,6$  Hz, H<sub>6'</sub>) ; 2,20 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,71 (3H, d,  $J_{Me_7-H_6} = 1,0$  Hz, Me<sub>7</sub>) ; 1,15 (9H, s, tBu-Piv) ; 0,91 (9H, s, tBu-Si).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 178,1 (C<sub>13'</sub>) ; 163,9 (C<sub>2</sub>) ; 158,9 et 158,8 (C<sub>q</sub> et HmetaDMTr) ; 150,5 (C<sub>4</sub>) ; 145,6 (C Ph) ; 143,9 (C<sub>7'</sub>) ; 136,1 (C<sub>6</sub>) ; 135,7 – 135,2 – 133,3 – 133,0 – 130,7 – 130,5 – 130,1 – 129,9 – 129,3 – 128,5 – 127,9 – 127,3 – 127,2 (C Ph) ; 122,4 (C<sub>8'</sub>) ; 135,2 (C<sub>metaDMTr</sub>) ; 111,5 (C<sub>5</sub>) ; 87,8 (C<sub>4'</sub>) ; 84,6 (C<sub>1'</sub>) ; 74,9 (C<sub>3'</sub>) ; 74,4 (C<sub>5'</sub>) ; 62,5 (C<sub>11'</sub>) ; 60,6 (C<sub>qDMTr</sub>) ; 55,4 (OMe DMTr) ; 49,1 (C<sub>10'</sub>) ; 41,7 (C<sub>2'</sub>) ; 29,9 (C<sub>6'</sub>) ; 28,6 (C<sub>qPiv</sub>) ; 27,2 (tBuPiv) ; 26,9 (tBuSi) ; 19,0 (C<sub>qtBuSi</sub>) ; 12,3 (Me<sub>7</sub>).

**MS** : ESI négatif MeOH (m/z) : 991,5 [M-H]<sup>-</sup>.

**46: 2-(4-(2-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-2-((2*S*,3*S*,5*R*)-3-hydroxy-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)éthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthyl pivalate**



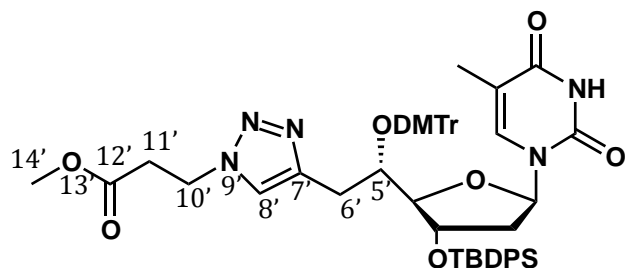
$C_{41}H_{47}N_5O_9$ , 753,84 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 9,57 (1H, s, NH base) ; 7,76 (1H, d,  $J_{H_6-Me_7} = 1,0$  Hz, H<sub>6</sub>) ; 7,47-7,18 (9H, m, Ph et DMTr) ; 7,16 (1H, s, H<sub>8</sub>) ; 6,80 (4H, m, H<sub>metaDMTr</sub>) ; 6,27 (1H, dd,  $J_{H_{1'}-H_{2'a}} = 7,3$  Hz ;  $J_{H_{1'}-H_{2'b}} = 6,5$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,49 (2H, m, H<sub>10'</sub>) ; 4,35 (2H, m, H<sub>11'</sub>) ; 4,23 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,87 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,75 et 3,74 (6H, 2s, OMe DMTr) ; 3,72 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 2,76 et 2,71 (2H, partie A et B d'un système ABX(Y),  $J_{H_{6'a}-H_{6'b}} = 14,4$  Hz ;  $J_{H_{6'b}-H_{5'}} = 2,7$  Hz,  $J_{H_{6'a}-H_{5'}} = 9,0$  Hz, H<sub>6'</sub>) ; 2,23 (2H, m, H<sub>2</sub>) ; 1,79 (3H, d,  $J_{Me_7-H_6} = 1,0$  Hz, Me<sub>7</sub>) ; 1,07 (9H, s, tBu-Piv).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 178,21 (C<sub>13'</sub>) ; 164,32 (C<sub>2</sub>) ; 158,93 (C<sub>qMetaDMTr</sub>) ; 150,65 (C<sub>4</sub>) ; 145,80 (C Ph) ; 143,98 (C<sub>7'</sub>) ; 136,19 (C<sub>6</sub>) ; 136,4 – 136,2 – 130,6 – 128,5 – 128,0 – 127,3 (C Ph) ; 122,98 (C<sub>8</sub>) ; 113,33 (C<sub>metaDMTr</sub>) ; 111,36 (C<sub>5</sub>) ; 87,47 (C<sub>qDMTr</sub>) ; 87,15 (C<sub>4'</sub>) ; 84,28 (C<sub>1'</sub>) ; 73,61 (C<sub>5'</sub>) ; 71,63 (C<sub>3'</sub>) ; 62,36 (C<sub>10'</sub>) ; 55,39 (OMe DMTr) ; 49,32 (C<sub>11'</sub>) ; 40,79 (C<sub>2'</sub>) ; 27,99 (C<sub>6'</sub>) ; 27,17 (tBu-Piv) ; 12,50 (Me<sub>7</sub>).

MS : ESI MeOH, haute résolution (m/z) : 776,3267 [M-Na<sup>+</sup>] (100%) ppm = -0,5.

**48** : méthyl 3-(4-(2-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-2-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)éthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate



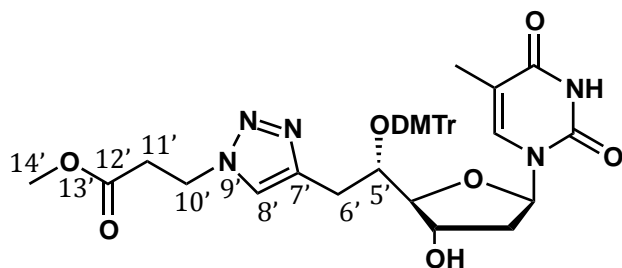
$C_{54}H_{59}N_5O_9Si$ , 950,16 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 7,93 (1H, s, NH base) ; 7,18-7,48 (21H, m, Ph, H<sub>8'</sub>, H<sub>6</sub>, DMTr) ; 6,74 (4H, m, DMTr) ; 6,53 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 8,9$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 6,1$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,53 (2H, t,  $J_{H10'-H11'} = 6,6$  Hz, H<sub>10'</sub>) ; 4,36 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,90 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,81 (6H, s, OMe DMTr) ; 3,70 (3H, s, H<sub>14'</sub>) ; 3,55-3,60 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 2,89 (2H, t,  $J_{H11'-H10'} = 6,5$ Hz, H<sub>11'</sub>) ; 2,27-2,78 (2H, m, H<sub>6'</sub>) ; 2,08-2,21 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,74 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 0,95 (9H, s, tBu-Si).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$  (ppm) : 171,9 (C<sub>12'</sub>) ; 164,6 (C<sub>4</sub>) ; 158,8-158,9 (C-O DMTr) ; 151,2 (C<sub>7'</sub>) ; 137,3 (C<sub>6</sub>) ; 133,1 (C<sub>2</sub>) ; 136,0 – 135,9 – 135,7 – 135,4 – 133,3 – 133,1 – 130,6 – 130,5 – 130,0 – 129,8 – 128,4 – 127,9 – 127,3 (C Ph, C<sub>8'</sub>) ; 111,4 (C<sub>5</sub>) ; 87,73 (C<sub>4'</sub>) ; 87,69 (C<sub>qDMTr</sub>) ; 84,6 (C<sub>1'</sub>) ; 74,9 (C<sub>3'</sub>) ; 74,5 (C<sub>5'</sub>) ; 55,4 (OMe DMTr) ; 52,2 (C<sub>14'</sub>) ; 45,3 (C<sub>10'</sub>) ; 34,4 (C<sub>2'</sub>) ; 30,9 (C<sub>11'</sub>) ; 27,1 (C<sub>6'</sub>) ; 26,7 (CH<sub>3</sub> tBu) ; 18,8 (C<sub>q</sub> tBu-Si) ; 12,2 (Me<sub>7</sub>).

MS : APCI négative MeOH (m/z) 949,10 [M-H]<sup>-</sup>.

**49 : méthyl 3-(4-(2-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-2-((2*S*,3*S*,5*R*)-3-hydroxy-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate**



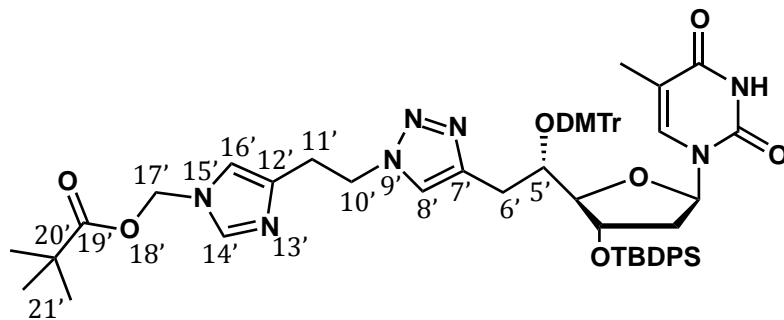
$C_{38}H_{41}N_5O_9$ , 711,76 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 9,50 (1H, bs, NH base) ; 7,73 (1H, d,  $J_{H_6-Me_7} = 1,1$  Hz, H<sub>6</sub>) ; 7,46-7,8 (10H, m, Ph, DMTr et H<sub>8'</sub>) ; 6,80 (4H, m, H<sub>metaDMTr</sub>), 6,26 (1H, dd,  $J_{H_{1'}-H_{2'a}} = 7,2$  Hz ;  $J_{H_{1'}-H_{2'b}} = 6,4$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 4,49 (2H, t,  $J_{H_{10'}-H_{11'}} = 6,4$  Hz, H<sub>10'</sub>) ; 4,23 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,85 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,76 (1H, bs, H<sub>4'</sub>) ; 3,75 et 3,74 (6H, 2s, OMe DMTr) ; 3,63 (3H, s, OMe ester) ; 2,86 (2H, t,  $J_{H_{11'}-H_{10'}} = 6,4$  Hz, H<sub>11'</sub>) ; 2,70 et 2,74 (2H, protons A et B d'un système ABX(Y),  $J_{H_{6'a}-H_{6'b}} = 14,5$  Hz ;  $J_{H_{6'a}-H_{5'}} = 9,2$  Hz ;  $J_{H_{6'b}-H_{5'}} = 2,7$  Hz, H<sub>6'</sub>) ; 2,23 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,79 (3H, d,  $J_{Me_7-H_6} = 1,1$  Hz, Me<sub>7</sub>).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 171,1 (C<sub>12'</sub>) ; 164,3 (C<sub>2</sub>) ; 159,0 (C<sub>q</sub> DMTr) ; 150,6 (C<sub>4</sub>) ; 145,9 (C Ph) ; 143,6 (C<sub>7'</sub>) ; 136,1 (C<sub>6</sub>) ; 136,4 - 136,3 - 136,1 - 130,6 - 128,5 - 128,0 - 127,2 - 123,5 - 121,4 (C Ph) ; 123,5 (C<sub>8'</sub>) ; 113,3 (C<sub>HmetaDMTr</sub>) ; 87,4 (C<sub>qDMTr</sub>) ; 87,2 (C<sub>4'</sub>) ; 84,2 (C<sub>1'</sub>) ; 73,6 (C<sub>5'</sub>) ; 71,5 (C<sub>3'</sub>) ; 55,4 (OMe DMTr) ; 52,3 (OMe ester) ; 45,5 (C<sub>10'</sub>) ; 40,8 (C<sub>2'</sub>) ; 34,5 (C<sub>11'</sub>) ; 27,9 (C<sub>6'</sub>) ; 12,5 (Me<sub>7</sub>).

MS : ESI MeOH, haute résolution (m/z) : 734,2802 [M+Na<sup>+</sup>] (100%) ppm = 0,5.

**51** : (5-(2-(4-(2-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-2-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-((*tert*-butyldiphénylsilyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthyl)-1*H*-imidazol-1-yl)méthyl pivalate



$C_{61}H_{69}N_7O_9Si$ , 1072,33 g.mol<sup>-1</sup>

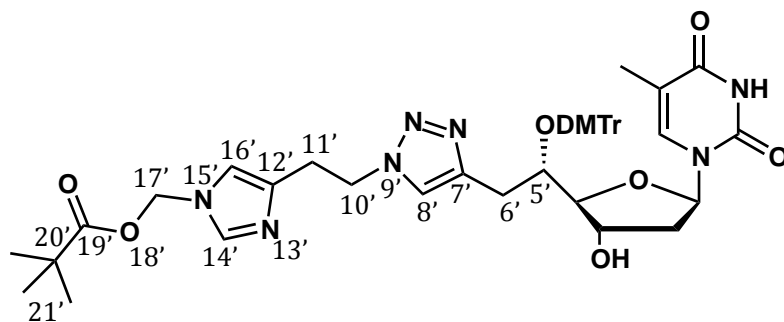
**RMN <sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz),  $\delta$  (ppm) : 8,91 (1H, s, NH base) ; 7,87 (1H, s, H<sub>6</sub>) ; 7,60-7,08 (21H, m, Ph, DMTr, H<sub>14'</sub> et H<sub>16'</sub>) ; 6,82 (1H, s, H<sub>8'</sub>) ; 6,67 (4H, m, H<sub>meta</sub> DMTr) ; 6,48 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 9,0$  Hz et  $J_{H1'-H2'b} = 5,5$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,70 et 5,67 (2H, système AB,  $J_{H17'a-H17'b} = 10,8$  Hz, H<sub>17'</sub>) ; 4,52 (2H, t,  $J_{H10'-H11'} = 6,9$  Hz, H<sub>10'</sub>) ; 4,29 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,83 (1H, m, H<sub>4'</sub>) ; 3,75 et 3,74 (6H, 2s, OMe DMTr) ; 3,50 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,02 (2H, t,  $J_{H11'-H10'} = 6,9$  Hz, H<sub>11'</sub>) ; 2,78 (1H, partie A d'un système ABX(Y),  $J_{H6'a-H6'b} = 14,1$  Hz ;  $J_{H6'a-H5'} = 11,4$  Hz, H<sub>6'a</sub>) ; 2,74 (1H, partie B d'un système ABX(Y),  $J_{H6'b-H6'a} = 14,1$  Hz ;  $J_{H6'b-H5'} = 3,3$  Hz, H<sub>6'b</sub>) ; 2,19 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,73 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 1,10 (9H, s, tBu-Si) ; 0,89 (9H, s, tBu-Piv).

**RMN <sup>13</sup>C** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$  (ppm) : 163,9 (C<sub>4</sub>) ; 158,9 (C<sub>19'</sub>) ; 158,8 (C<sub>q</sub>DMTr) ; 150,5 (C<sub>2</sub>) ; 145,6 (C<sub>q</sub> Ph) ; 143,1 (C<sub>q</sub> Ph) ; 136,1 - 135,7 - 135,4 - 130,6 - 130,5 - 129,9 - 128,5 - 128,0-127,9 - 127,3 - 122,1 - 113,2 (C Ph, C<sub>14'</sub> et C<sub>16'</sub>) ; 111,42 (C<sub>5</sub>) ; 87,8 (C<sub>4</sub>) ; 87,7 (C<sub>q</sub> DMTr) ; 84,61 (C<sub>1'</sub>) ; 74,9 (C<sub>5'</sub>) ; 74,6 (C<sub>3'</sub>) ; 67,8 (C<sub>17'</sub>) ; 55,4 (2 OMe DMTr) ; 49,5 (C<sub>11'</sub>) ; 41,7 (C<sub>2'</sub>) ; 29,4 (C<sub>12'</sub>) ; 28,6 (C<sub>6'</sub>) ; 27,0 (tBu-Piv) ; 26,9 (tBu-Si).

**MS** : ESI MeOH (m/z) : 1072,5 [M+H<sup>+</sup>].

**52** : (5-(2-(4-(2-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-2-((2*S*,3*S*,5*R*)-3-hydroxy-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthyl)-1*H*-imidazol-1-yl)méthyl pivalate





C<sub>45</sub>H<sub>51</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub>, 833,93 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz), δ (ppm) : 10,25 (1H, bs, NH base) ; 7,78 (1H, s, H<sub>6</sub>) ; 7,63 (1H, s, H<sub>16'</sub>) ; 7,42-7,32 (9H, m, DMTr) ; 7,02 (1H, s, H<sub>8'</sub>) ; 6,77 (4H, m, H<sub>meta</sub> DMTr) ; 6,66 (1H, s, H<sub>13'</sub>) ; 6,28 (1H, dd,  $J_{H1'-H2'a} = 6,6$  Hz ;  $J_{H1'-H2'b} = 6,6$  Hz, H<sub>1'</sub>) ; 5,67 (2H, système AB,  $J_{H17'a-H17'b} = 18,3$  Hz, H<sub>17'</sub>) ; 4,54 (2H, t,  $J_{H10'-H11'} = 6,8$  Hz, H<sub>10'</sub>) ; 4,07 (1H, m, H<sub>3'</sub>) ; 3,75 (1H, m, H<sub>5'</sub>) ; 3,74 et 3,73 (6H, 2s, OMe DMTr) ; 3,69 (1H, bs, H<sub>4'</sub>) ; 3,02 (2H, t,  $J_{H11'-H10'} = 6,8$  Hz, H<sub>11'</sub>) ; 2,72 (2H, m, H<sub>6'</sub>) ; 2,25 (2H, m, H<sub>2'</sub>) ; 1,78 (3H, s, Me<sub>7</sub>) ; 1,08 (9H, s, tBu-Piv).

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ (ppm) : 177,84 (C<sub>19'</sub>) ; 164,5 (C<sub>4</sub>) ; 158,9 (C<sub>q</sub> DMTr) ; 150,8 (C<sub>2</sub>) ; 145,9 (C<sub>q</sub> Ph) ; 143,2 (C<sub>7'</sub>) ; 138,28 (C<sub>q</sub> Ph) ; 136,4 (C<sub>12'</sub>) ; 136,1 (C<sub>6</sub>) ; 130,6 - 128,5 - 127,9 - 127,2 (C Ph) ; 123,04 (C<sub>8'</sub>) ; 117,2 (C<sub>14'</sub>) ; 113,3 (C<sub>meta</sub> DMTr) ; 11,3 (C<sub>5</sub>) ; 87,3 (C<sub>4'</sub>) ; 84,2 (C<sub>1'</sub>) ; 73,9 (C<sub>5'</sub>) ; 67,8 (C<sub>3'</sub>) ; 67,8 (C<sub>17'</sub>) ; 55,4 (OMe DMTr) ; 49,7 (C<sub>11'</sub>) ; 40,9 (C<sub>2'</sub>) ; 38,8 (C<sub>q</sub> tBu-Piv) ; 29,2 (C<sub>10'</sub>) ; 28,0 (C<sub>6'</sub>) ; 26,91 (tBu-Piv) ; 12,49 (Me<sub>7</sub>).

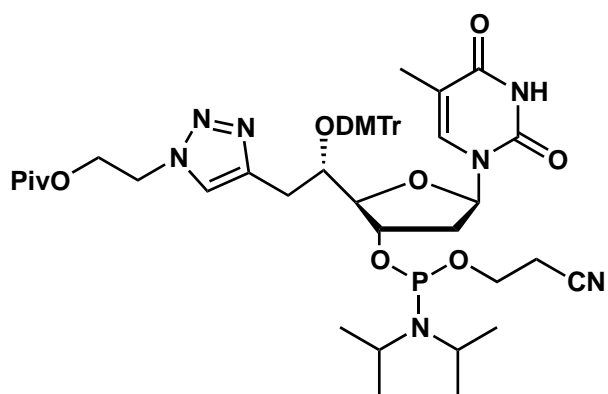
MS : ESI MeOH, haute résolution (m/z) : 856,3645 [M+Na<sup>+</sup>] (100%) ppm = -0,1.

**II.2.c) Protocole général de formation des phosphoramidites**

La procédure décrite page 180 est reproduite à l'identique pour obtenir les produits **47**, **50** et **53**.

Produit obtenu	Nucléoside de départ	THF	DIPEA	chlorophosphite	Rdt (%)
<b>47</b>	<b>46</b> , 291 mg, 0,4 mmol	3 mL	267 µL, 1,54 mmol	182 mg, 0,8 mmol	44
<b>50</b>	<b>49</b> , 500 mg, 0,7 mmol	5 mL	480 µL, 2,81 mmol	331 mg, 1,40 mmol	94
<b>53</b>	<b>52</b> , 242,9 mg, 0,3 mmol	2 mL	203 µL, 1,71 mmol,	140 mg, 5,93 10 <sup>-1</sup> mmol	57

**47:** 2-(4-(2-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-2-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-(((2-cyanoéthoxy)(diisopropylamino)phosphino)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl) tétrahydrofuran-2-yl)éthyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)éthyl pivalate



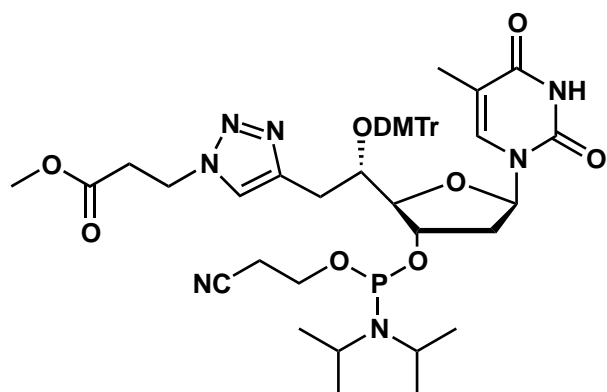
C<sub>50</sub>H<sub>64</sub>N<sub>7</sub>O<sub>10</sub>P, 954,06 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz), δ (ppm) : 150,10 et 148,32.

MS : ESI MeOH, haute résolution (m/z) : 976,4352 [M+Na<sup>+</sup>] (100%) ppm = 0,2.

**50** : méthyl 3-(4-(2-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-2-((2*R*,3*S*,5*R*)-3-(((2-

**cyanoéthoxy)(diisopropylamino)phosphanyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)propanoate**

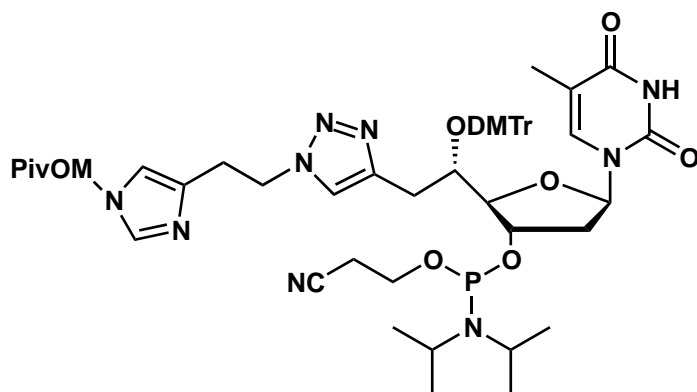


$C_{47}H_{58}N_7O_{10}P$ , 911,98 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz), δ (ppm) : 149,93, 148,33.

MS : ESI négative MeOH (m/z) : 910,4 [M-H]<sup>-</sup>.

**53: (5-(2-(4-(2-(bis(4-méthoxyphényl)(phényl)méthoxy)-2-((2R,3S,5R)-3-((2-cyanoéthoxy)(diisopropylamino)phosphanyl)oxy)-5-(5-méthyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl)tétrahydrofuran-2-yl)éthyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)éthyl)-1H-imidazol-1-yl)méthyl pivalate**



$C_{54}H_{68}N_9O_{10}P$ , 1034,15 g.mol<sup>-1</sup>

RMN <sup>31</sup>P (CDCl<sub>3</sub>, 121 MHz), δ (ppm) : 149,95 et 148,19.

MS : ESI MeOH, haute résolution (m/z) : 1056,4703 [M+Na<sup>+</sup>] (100%) ppm = -2,0.

### III) Oligonucléotides

#### III.1) Synthèse

Les oligonucléotides sont préparés selon la méthode aux phosphoramidites réalisées avec un synthétiseur PerSeptive Biosystems Expedite 8900 ou Applied 394. Les réactifs proviennent de chez Chemgenes. Les billes de CPG (Control Pore Glasses) de la colonne préchargée en nucléotides ont une porosité de 500 Å et l'échelle de synthèse est de 1 µmol ou de 200 nmol.

Le décrochement du support solide de l'oligonucléotide et sa déprotection (élimination des groupements protecteurs présents sur les bases et les phosphodiester) est effectuée à 60°C pendant 30 minutes dans une solution d'ammoniaque concentrée/méthylamine aqueuse à 40% 1 :1 v/v (AMA).

#### III.2) Analyse par HPLC en phase inverse

Chaque oligonucléotide est analysé par HPLC analytique en phase inverse sur une colonne Waters X Bridge OST C18 2,5 µm (4,6 x 50) mm avec un appareil Waters Alliance 2695 et un détecteur à barrettes de diodes (PDA) waters 2996 à 260 nm. Les analyses ont été faites à une température de 40 °C dans les conditions suivantes :

Temps (min)	Flux (mL/min)	TEAA* (%)	CH <sub>3</sub> CN (%)
0	1,00	95	5
15	1,00	80	15
16	1,00	95	5

\* TEAA : acétate de triéthylamine 0,05 M pH 7,0.

### III.3) Purification par HPLC préparative en phase inverse

Les échantillons d'oligonucléotides sont dilués dans 1 mL d'eau et sont injectés en HPLC préparative par fractions de 150  $\mu$ L (pour les synthèses en 1  $\mu$ mol) ou 300  $\mu$ L (pour les synthèses en 200 nmol). Le système est constitué d'une pompe Waters 2545 (Quaternary Gradient Module), d'un détecteur UV/visible Waters 2489 avec une détection à 260 nm, sur une colonne X Bridge OST C18 2,5  $\mu$ m (10id x 50) mm. L'élution est réalisée à 40 °C dans les conditions suivantes :

Temps (min)	Flux (mL/min)	TEAA* (%)	CH <sub>3</sub> CN (%)
0	1,00	95	5
5	1,00	80	20
6	1,00	95	5

\* TEAA : acétate de triéthylamine 0,05 M pH 7,0.

Les fractions collectées sont contrôlées en HPLC analytique dans les mêmes conditions que précédemment.

### III.4) Caractérisation par spectrométrie de masse en MALDI-TOF

La préparation est réalisée selon la technique de la goutte séchée. Les séquences d'ADN sont déposées (1  $\mu$ L à 0,2 mM ou 1 mM) et cristallisées dans 1  $\mu$ L de matrice HPA (25 mg de HPA, 2,5 mg de tartrate d'ammonium, 500  $\mu$ L d'acétonitrile, 500  $\mu$ L d'eau ultrafiltrée). L'analyse est faite à l'aide d'un spectromètre MALDI Micro MX micromass Waters en mode réflectron négatif, avec une puissance laser à 280, un pulse à 2300, un détecteur à 2300 et une suppression à 1500.

### III.5) Dosage par spectrophotométrie UV

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre Varian Cary 300 Bio à effet Peltier piloté par le logiciel CaryWinUV. Les mesures pour déterminer la concentration des

## Chapitre IV : Partie expérimentale

simples brins sont réalisées à 90 °C à 260 nm avec des cuves en quartz de trajet optique de 1 cm. Les coefficients d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) utilisés sont ceux des séquences non modifiées (estimation des  $\epsilon$  obtenue sur le site [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com), tableau ci dessous).

Noms	Séquences	$\epsilon$ en $\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1} \text{L}$
$\text{wtS}_1$	5'-GCG ACC TAT TGC AAG TGG-3'	173600
$\text{wtS}_2$	5'-CCA CTT GCA TGT GTG TGC C-3'	167700
$\text{wtS}_3$	5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	169500

### III.6) Détermination des $T_m$

Les deux brins pour les duplex ou les trois brins pour les jonctions trois voies sont mélangés en quantités équimolaires dans un tampon phosphate ( $\text{NaHPO}_4$ , 10 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) à une concentration permettant d'avoir une absorbance de environ 1 DO. Une mesure d'absorbance est effectuée à 260 nm à 90 °C pour déterminer la concentration à l'aide du même spectrophotomètre et des mêmes cuves que pour la mesure des concentrations des simples brins. La détermination de  $T_m$  est effectuée à 260 nm suivant la rampe de température donnée dans le tableau ci dessous (la première descente de température permet une hybridation optimale des deux brins) :

Température de départ (°C)	Température d'arrivée (°C)	Progression (°C/min)	Intervalle de mesure (°C)	Temps d'arrêt pour la mesure (min)
90	10	1	1	0,1
10	25	1	1	0,2
25	60	0,5	0,5	0,2
60	90	1	1	0,1

Les valeurs des  $T_m$  sont déterminées par le logiciel Carry.

### III.7) Dichroïsme circulaire

Les spectres sont enregistrés sur un appareil Jasco J-815 CD Spectrometer couplé à un contrôleur de température Jasco PTC-4235/15 dans une cuve en quartz de trajet optique de 1 cm. La plage de longueur d'onde balayée s'étend de 200 à 320 nm. La mesure se fait à 20° C par paliers avec un arrêt de 1 seconde tous les 0,1 nm pour permettre la mesure, et un dédoublement de l'enregistrement pour obtenir une mesure moyenne et limiter l'influence du bruit de fond. Les résultats sont présentés en  $\Delta\varepsilon$  par nucléotide (différence d'absorption entre la lumière polarisée droite et gauche). La résolution des mesures est de  $\Delta\varepsilon \pm 0,2 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  (incertitude sur la concentration et précision de l'appareil) avec  $\lambda \pm 0,1 \text{ nm}$  entre 200 et 250 nm et  $\lambda \pm 0,3 \text{ nm}$  entre 250 et 320 nm.

### III.8) Gel natif d'acrylamide (PAGE)

Les oligonucléotides (8 nmol de chaque brin) sont solubilisés dans du tampon phosphate (10 nM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 100 nM NaCl, 1mM EDTA, pH = 7) et chauffée à 90 °C pendant 10 minutes puis laissés revenir à température ambiante lentement. Les analyses PAGE sont effectuées sur un gel de polyacrylamide à 20% (acrylamide/bisacrylamide 29 :1) en utilisant le tampon TBE (Tris Borate EDTA) 1X en tant que tampon d'électrophorèse. 20 mL de gel sont obtenus en mélangeant de l'acrylamide (29/1) (10 mL), du tampon TBE 10X (2 mL), du persulfate d'ammonium (20 mg dans 200  $\mu\text{L}$ ), TEMED (tétraméthyléthylènediamine) (4  $\mu\text{L}$ ) et eau ultrafiltrée (8 mL). Les dépôts sont constituées de 4  $\mu\text{L}$  de solution contenant les oligonucléotides et 2  $\mu\text{L}$  de colorant xylène cyanol et sont laissés migrer pendant 3 heure à 4 °C. Le gel est révélé sous lampe UV à 254 nm avec une plaque CCM pour le contraste et photographié.

### III.9) Procédure de cycloaddition de Huisgen sur les oligonucléotides

Toutes les solutions sont préparées en utilisant des solvants préalablement dégazés par un flux d'argon pendant 20 minutes (eau ultrafiltrée, méthanol et tampon TEAA (acétate de triéthylammonium) pH = 7, 0,5 M). Les milieux réactionnels sont préparés afin d'obtenir une concentration finale en oligonucléotide de 0,1 M dans un mélange eau ultrafiltrée/méthanol 50/50. La phase aqueuse est constituée de 1/5 de tampon TEAA. Les azotures sont solubilisés dans le méthanol. Le cuivre, l'ascorbate de sodium et l'oligonucleotide sont solubilisés dans l'eau. Les solutions aqueuses de cuivre (CuSO<sub>4</sub>) et d'ascorbate de sodium (NaAsc) sont fraîchement préparées et mélangées entre elles (1 : 1) avant d'être introduites dans le milieu réactionnel. Les volumes finaux sont ajustés par ajout de méthanol, tampon et eau afin d'obtenir le volume final souhaité de 500 µL .

Les produits obtenus sont analysés et purifiés par HPLC selon les méthodes décrites auparavant.



## Résumé

Ce projet porte sur la synthèse d'oligonucléotides modifiés décorés par des groupements chimiques rappelant les chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la catalyse enzymatique des protéases à sérine, à savoir l'acide aspartique (Asp), la sérine (Ser) et l'histidine (His) afin d'en mimer l'activité protéolytique.

L'approche synthétique de type phosphoramidite a été mise en oeuvre. De ce fait nous avons synthétisé des phosphoramidites **fonctionnalisés** avec une fonction acide carboxylique rappelant l'Asp, une fonction hydroxyle pour la Ser ou un imidazole pour l'His, correctement protégés pour être ensuite incorporés au sein de séquences oligonucléotidiques, et des phosphoramidites **convertibles**, qui portent une fonction chimique réactive permettant une conjugaison post synthèse supportée et automatisée de l'oligonucléotide. Ces deux types de phosphoramidites offrent la possibilité de les combiner et donc d'obtenir des séquences hautement fonctionnalisées.

Les séquences oligonucléotidiques ont été choisies afin d'apporter un contrôle topologique structurant. Les structures secondaires envisagées sont de type bulge, épingle à cheveux et jonction trois voies car stables grâce aux appariements Watson et Crick entre les bases tout en ayant une flexibilité importante due à la présence de bases non appariées.

Les travaux présentés dans ce manuscrit décrivent la synthèse des phosphoramidites modifiés ainsi que l'incorporation du nucléotide convertible de type alcyne au sein de séquences qui ont été conjuguées par CuAAC, et qui ont permis d'obtenir une jonction trois voies qui a été caractérisée par dichroïsme circulaire, gel de polyacrylamide et par dénaturation thermique.

## Summary

We are interested in the synthesis of modified oligonucleotides decorated by chemical functions mimicking the amino acids side chains involved in enzymatic catalysis of serine proteases, acid aspartic (Asp), serine (Ser) and histidine (His), in order to mimic proteolytic activity.

The phosphoramidite synthetic approach was chosen. We synthesised **functionalized** phosphoramidites bearing either a carboxylic acid function reminding Asp, a hydroxyle function for Ser or an imidazole for His properly protected for their incorporation in oligonucleotides sequences, and **convertible** phosphoramidites, bearing a reactive function that permits a conjugation post automated oligonucleotides solid phase synthesis.

Oligonucleotides sequences have been chosen in order to have a perfect structural control. The envisaged secondary structures are bulge, hairpin and three way junction because of their stability, thanks to Watson et Crick base pairing, and their flexibility thanks to the unpaired bases.

The work presented here regards the synthesis of modified phosphoramidites and their incorporation of the convertible alkyne in sequences then conjugated by CuAAC reaction to form a three way junction whose stability and physico-chemical behavior have been evaluated.