



HAL
open science

Ingénierie et auto-assemblage de systèmes biomoléculaires multivalents

Eline Bartolami

► **To cite this version:**

Eline Bartolami. Ingénierie et auto-assemblage de systèmes biomoléculaires multivalents. Chimie. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, 2015. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-01677002⟩

HAL Id: tel-01677002

<https://theses.hal.science/tel-01677002v1>

Submitted on 7 Jan 2018

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.



HAL Authorization

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **Ecole Nationale Supérieure de Chimie de
Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences Chimiques Balard
Et de l'unité de recherche
IBMM - Institut des Biomolécules Max Mousseron

Spécialité : **Ingénierie Moléculaire**

Présentée par **Eline BARTOLAMI**

**INGENIERIE ET AUTO-ASSEMBLAGE DE
SYSTEMES BIOMOLECULAIRES
MULTIVALENTS**

Soutenue le 25 Novembre 2015 devant le jury composé de

Mme Anne-Marie CAMINADE, DR-CNRS, Toulouse	Présidente
M. Didier BOTURYN, DR-CNRS, Grenoble	Rapporteur
M. Sylvain LADAME, Senior Lecturer, Imperial College London	Rapporteur
M. Pascal DUMY, Professeur, ENSCM	Directeur de thèse
M. Sébastien ULRICH, CR-CNRS, Montpellier	Co-encadrant

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **Ecole Nationale Supérieure de Chimie de
Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences Chimiques Balard
Et de l'unité de recherche
IBMM - Institut des Biomolécules Max Mousseron

Spécialité : **Ingénierie Moléculaire**

Présentée par **Eline BARTOLAMI**

**INGENIERIE ET AUTO-ASSEMBLAGE DE
SYSTEMES BIOMOLECULAIRES
MULTIVALENTS**

Soutenue le 25 Novembre 2015 devant le jury composé de

Mme Anne-Marie CAMINADE, DR-CNRS, Toulouse	Présidente
M. Didier BOTURYN, DR-CNRS, Grenoble	Rapporteur
M. Sylvain LADAME, Senior Lecturer, Imperial College London	Rapporteur
M. Pascal DUMY, Professeur, ENSCM	Directeur de thèse
M. Sébastien ULRICH, CR-CNRS, Montpellier	Co-encadrant

A Regis,

Résumé

Les systèmes naturels ont montré l'intérêt de la multiplication des interactions pour une cible, permettant d'améliorer l'affinité et de moduler la spécificité de reconnaissance. Il est ainsi important pour des applications biologiques de concevoir des systèmes multivalents et biocompatibles. Le travail entrepris au cours de ce doctorat porte sur le développement de nouvelles méthodologies pour accéder à des systèmes multivalents originaux.

Ainsi, nous avons conçu, par synthèse multi-étapes, une nouvelle plate-forme fonctionnalisée, basée sur un châssis α -PNA pour la reconnaissance multivalente d'oligonucléotides. Ce nouveau système peut potentiellement être impliqué dans la reconnaissance sélective multipoint d'ADN.

En parallèle, nous avons préparé des clusters multivalents d'iminosucres sur des châssis peptidiques, construits à partir de ligations click sans métaux, pour l'inhibition enzymatique de glycosidase. En effet, des systèmes multivalents ont été récemment développés en tant qu'inhibiteurs de glycosidase. Cependant, leur méthodologie de synthèse repose quasiment exclusivement sur la ligation azoture-alcyne catalysée au cuivre, ce qui limite son application biologique en raison de sa toxicité. Nos travaux ont ainsi conduit à l'identification d'inhibiteurs efficaces d' α -mannosidases par une approche synthétique sans métaux.

Dans le contexte de la vectorisation d'oligonucléotides, il existe un besoin de concevoir des systèmes dynamiques qui permettent un relargage contrôlé. Nous avons appliqué une stratégie d'auto-assemblage, par ligation click de type acylhydrazone, pour la génération *in situ* de clusters biomoléculaires à partir de châssis peptidiques et de ligands d'acides aminés modifiés. Etant donné le caractère dynamique de la ligation qui confère une adaptabilité au système, nous avons démontré que a) la présence d'une cible permet d'assister la formation des clusters par sélection de certains composants et b) l'ADN peut être relargué par échange de ligands. Cette technique efficace et rapide d'auto-assemblage de fragments a ensuite permis de réaliser un criblage pour sonder l'effet de l'architecture et de la valence sur la complexation. Ce projet a finalement conduit à l'identification de vecteurs efficaces pour la transfection de siARN sur cellules.

Enfin, dans un dernier projet, nous avons exploité diverses techniques orthogonales et chimiosélectives de ligations click dans le but de générer des nanostructures peptidiques. Deux cages ont ainsi été obtenues par la formation de ligations acylhydrazones et thiol-maléimides selon une approche one-pot.

En résumé, ces travaux d'ingénierie et d'auto-assemblage de systèmes biomoléculaires multivalents ont permis le développement de méthodes innovantes pour répondre à des besoins d'actualité et permettre la construction de systèmes multivalents destinés à la reconnaissance d'oligonucléotides, la vectorisation et l'inhibition enzymatique.

Abstract

Natural systems are inspiring in showing that the combination of multiple interactions enables improvement in binding affinity and selectivity for a target. Thus, the design of synthetic and biocompatible multivalent systems is of great importance for biological applications. The work described in this PhD thesis aims at developing novel methodologies for generating functional multivalent systems.

In order to engineer multivalent systems for the recognition of oligonucleotides, we elaborated a multi-step synthesis of functionalized α -PNA scaffolds bearing side-groups. This new scaffold can potentially serve for the multi-point sequence-selective recognition of DNA. Multivalent nanoconstructs are emerging tools for enzyme inhibition. In this context, we prepared multivalent clusters of iminosugars – by metal-free click ligations on peptide scaffolds – as candidates for glycosidases inhibition. Although such enzyme inhibitors based on iminosugar clusters were recently reported, their synthesis relies almost exclusively on copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, which notorious toxicity represents a serious limitation for biological applications. Our approach demonstrates that iminosugar clusters can be prepared in a metal-free fashion and exhibit strong multivalent effects for the inhibition of α -mannosidases.

Multivalent biomolecular systems are also candidates for gene delivery application. In this context, the design of dynamic systems is of interest for achieving controlled release. We implemented a self-assembly strategy, using the acylhydrazone click ligation, for the *in situ* generation of biomolecular clusters starting from peptide scaffolds and modified amino acids building blocks. We showed that, whereas both compounds are ineffective for DNA complexation, the mixed system spontaneously expresses cationic clusters that effectively complex DNA. We further demonstrated that, given the dynamic character of the acylhydrazone ligation, the system is able to a) adapt to the presence of the DNA target by selecting the optimal building blocks for the cluster self-assembly, and b) trigger DNA release by component exchange. This modular and versatile self-assembly approach was further exploited to perform a fragments screening varying molecular structure and valency. Thereby, we identified new and effective vectors for the transfection of siRNA in living cells.

The last project described in this manuscript deals with the generation of cage-type peptide nanoconstructs by using a set of orthogonal and chemoselective click ligations. Two cages, based on acylhydrazone ligation on one side and thiol-maleimide on the other, were obtained successfully in one-pot.

In summary, this work has led to the development of novel methodologies for the engineering and self-assembly of multivalent biomolecular nanoconstructs for diverse biological applications such as oligonucleotide recognition, delivery and enzyme inhibition.

Table des matières

Chapitre 1 : Reconnaissance multivalente de biomolécules en milieux aqueux	1
I. Concept.....	2
A. <i>Inspiration</i>	2
B. <i>Description de la multivalence</i>	2
C. <i>Mécanismes de la reconnaissance multivalente</i>	4
II. Conception	6
A. <i>Plate-formes non organisées</i>	6
B. <i>Plate-formes pré-organisées</i>	8
C. <i>Stratégie de bioconjugaison</i>	10
III. Applications.....	22
A. <i>Clusters multivalents pour la reconnaissance de biomolécules</i>	22
B. <i>Clusters multivalents pour l'inhibition enzymatique</i>	26
IV. Projet de Recherche.....	28
V. Références.....	30
Chapitre 2 : Reconnaissance multivalente d'ADN par des systèmes biomoléculaires auto-assemblés	37
I. Contexte	38
A. <i>L'acide désoxyribonucléique</i>	38
B. <i>Reconnaissance de l'ADN</i>	39
C. <i>Multivalence auto-assemblée</i>	44
D. <i>Positionnement du projet</i>	47
II. Complexation dynamique de l'ADN par des clusters auto-assemblés.....	48
A. <i>Conception</i>	48
B. <i>Synthèse et préparation des composés</i>	48
C. <i>Etude de la complexation des clusters hydrazones (cRAFT(Hyd)₄)</i>	62
D. <i>Etude d'une bibliothèque combinatoire dynamique</i>	72
E. <i>Etude cinétique de formation des clusters</i>	81
F. <i>Modulation de la reconnaissance d'ADN par échange des ligands</i>	82
III. Conclusion.....	87
IV. Références.....	88
Chapitre 3 : Clusters biomoléculaires multivalents pour la vectorisation d'oligonucléotides	91
I. Systèmes multivalents cationiques comme vecteur d'acides nucléiques	92
A. <i>Challenge de la vectorisation</i>	92
B. <i>Les polymères et les dendrimères comme outils de vectorisation</i>	92
C. <i>Les clusters comme outils de vectorisation</i>	95
D. <i>Positionnement du projet</i>	96
II. Détermination efficace de nouveaux systèmes complexant l'ADN	97

A.	<i>Synthèse et préparation des composés</i>	97
B.	<i>Etude de la complexation des clusters hydrazones avec l'ADN de thymus de veau</i>	101
C.	<i>Etude par électrophorèse sur gel d'agarose</i>	103
III.	Vectorisation de siARN	109
IV.	Conclusion	113
V.	Références	115
	Chapitre 4 : Inhibition enzymatique multivalente par des clusters peptidiques d'iminosucres	119
I.	Contexte	120
A.	<i>Anhydrase carbonique</i>	121
B.	<i>Glycosidase</i>	125
C.	<i>Positionnement du projet</i>	130
II.	Synthèse et préparation des composés	131
A.	<i>Conception</i>	131
B.	<i>Synthèse des peptides modifiés</i>	132
C.	<i>Synthèse des iminosucres</i>	134
D.	<i>Synthèse des clusters</i>	137
III.	Tests d'inhibition enzymatique	143
IV.	Conclusion	148
V.	Références	149
	Chapitre 5 : Synthèse d'α-PNA portant des triazines fonctionnalisées comme analogues de nucléobases	153
I.	Contexte	154
A.	<i>Les analogues d'acide nucléique</i>	154
B.	<i>Positionnement du projet</i>	157
II.	Construction de châssis multivalents pour la reconnaissance d'oligonucléotides	158
A.	<i>Conception</i>	158
B.	<i>Synthèse des motifs diaminotriazines</i>	159
C.	<i>Synthèse peptidique</i>	163
III.	Conclusion	168
IV.	Références	170
	Chapitre 6 : Auto-assemblage de cages peptidiques par ligations click	173
I.	Contexte	174
A.	<i>Cages</i>	174
B.	<i>Cages assemblées à partir de macromolécules biologiques</i>	177
C.	<i>Cages formées à partir d'ADN</i>	177
D.	<i>Cages formées à partir de peptides</i>	178
E.	<i>Positionnement du projet</i>	179
II.	Synthèse des espaceurs et des peptides cycliques	180

A. Conception.....	180
B. Synthèse des peptides cycliques (RAFT).....	180
C. Préparation des espaceurs	181
III. Formation d'une cage peptidique par amination réductrice	183
IV. Cage oxazolidine	184
V. Cage acylhydrazone - oxime	185
VI. Cage pont disulfure - acylhydrazone	189
VII. Cage acylhydrazone - thiol-maléimide.....	191
A. Synthèse séquentielle	192
B. Ligations simultanées.....	197
VIII. Conclusion.....	199
IX. Références.....	201
Chapitre 7 : Partie Expérimentale – Experimental Part	205
I. Materials and Methods.....	206
A. Synthesis	206
B. Purification and Characterizations.....	209
C. Biophysical techniques and assays.....	210
D. Biological assays	213
II. Multivalent clusters for DNA recognition	214
A. Peptide scaffolds.....	214
B. Hydrazide building blocks	217
C. Clusters.....	222
III. Iminosugar clusters for the inhibition of glycosidases	227
A. Peptide scaffolds.....	227
B. Modified iminosugars	229
C. Clusters.....	237
IV. Functionalized α-PNAs	239
A. Modified amino acids	239
B. α -PNAs	244
V. Peptide-based cages.....	244
A. Peptide scaffolds.....	244
B. Bifunctional spacers.....	246
C. Cages	249
VI. References.....	251
Conclusion et communication portant sur ses travaux	253
Abréviations	255
Remerciements	258

Chapitre 1

***Reconnaissance multivalente de
biomolécules en milieux aqueux***

Chapitre 1 : Reconnaissance multivalente de biomolécules en milieux aqueux

I. Concept.....	2
A. <i>Inspiration</i>	2
B. <i>Description de la multivalence</i>	2
1. Description qualitative	2
2. Description quantitative	3
C. <i>Mécanismes de la reconnaissance multivalente</i>	4
II. Conception	6
A. <i>Plate-formes non organisées</i>	7
1. Les aromatiques.....	7
2. Les porphyrines.....	7
3. Les polymères.....	7
4. Les dendrimères	7
5. Les nanoparticules	7
6. Les fullerènes.....	8
B. <i>Plate-formes pré-organisées</i>	8
1. Les calixarènes	8
2. Les cyclodextrines.....	9
3. Les dérivés d'acides nucléiques.....	9
4. Les peptides.....	9
C. <i>Stratégie de bioconjugaison</i>	10
1. Ligations click.....	10
a. <i>Ligation azoture-alcyne catalysée au cuivre</i>	11
b. <i>Thiol-ène</i>	12
c. <i>Réactions de condensation de carbonyles</i>	12
d. <i>Thiol-maléimide</i>	14
e. <i>Ponts disulfures</i>	15
f. <i>Ligations orthogonales</i>	15
2. Auto-assemblage pour générer des structures multivalentes	17
a. <i>Auto-assemblage par des interactions supramoléculaires</i>	17
b. <i>Auto-assemblage basé sur la chimie covalente dynamique</i>	20
3. Chimie combinatoire dynamique	21
III. Applications.....	22
A. <i>Clusters multivalents pour la reconnaissance de biomolécules</i>	22
B. <i>Clusters multivalents pour l'inhibition enzymatique</i>	26
IV. Projet de Recherche.....	28
V. Références.....	30

I. Concept

A. Inspiration

La multivalence est une approche communément utilisée par les mécanismes biologiques.^[1] Parmi les thèmes les plus étudiés, l'interaction du virus de la grippe avec la membrane cellulaire qui est mise en œuvre par le biais d'une reconnaissance carbohydate-protéine.^[2] Le même mode de reconnaissance est utilisé par la plupart des systèmes pour se lier à la membrane cellulaire et plus particulièrement à la classe de lectines Con A.^[3] Un intérêt certain s'est alors développé pour les molécules synthétiques mimant les reconnaissances multivalentes interfaciales protéine-sucre, protéine-protéine ou encore protéine-acide nucléique. La multivalence est indispensable dans les solvants polaires et protiques, comme l'eau, car ces solvants entre en compétition pour former des interactions faibles.^[4] La multivalence facilite alors la reconnaissance de la surface complexe d'une biomolécule par exemple (Figure 1). Ainsi, dans le cas d'une reconnaissance multivalente, la constante d'association globale K_n^{multi} est augmentée par rapport à celle d'une interaction unique K^{mono} .

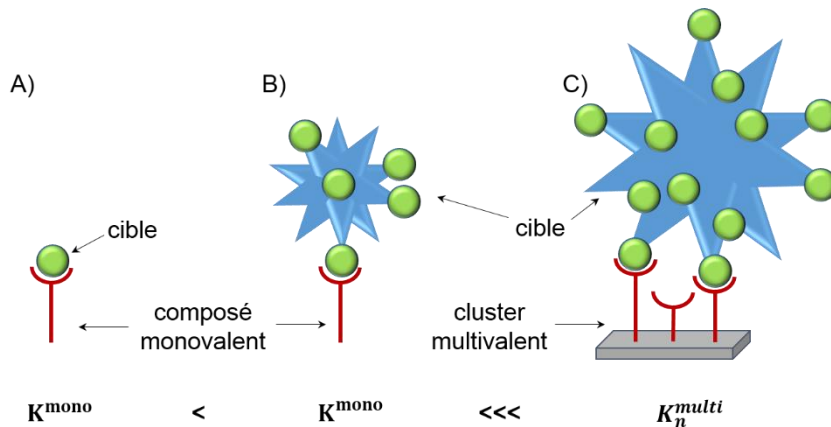


Figure 1. Motifs de liaisons et activité relative d'interaction de systèmes de reconnaissance avec leur cible. Avec A) Un composé présentant une unique interaction pour une cible monovalente (K^{mono} faible), B) Une molécule monovalente formant une interaction avec une cible possédant plusieurs sites de reconnaissance (K^{mono} augmentée), C) Cluster multivalent complexant de manière multivalente avec la cible

B. Description de la multivalence

1. Description qualitative

La multivalence repose sur la création de multiples interactions faibles mettant en œuvre des liaisons non covalentes. Le composé monovalent initial est transformé pour construire un cluster de plus grande valence. Les liaisons hydrogènes,^[5] les coordinations métal-ligand,^[6] les interactions de types π - π ,^[7] ioniques ou encore les interactions hydrophobes sont autant

de possibilités offertes aux systèmes pour être stabilisés. De multiples interactions faibles, en se combinant, aboutissent à une force d'association globale importante. Les clusters ainsi préparés sont des prétendants au ciblage et à la thérapie.

2. Description quantitative

La multivalence confère aux clusters des propriétés thermodynamiques uniques, plus complexes que dans le cas d'une reconnaissance monovalente. Différentes théories ont été postulées pour tenter d'expliquer ces effets, mais les phénomènes ne sont à ce jour pas tous compris.^[8] Ces théories sont soit basées sur l'additivité des composantes thermodynamiques, soit sur la non-additivité et la présence d'un facteur supplémentaire (cas de coopérativité). Dans le cas d'une interaction n-valente, l'énergie libre globale $\Delta G_n^{\text{multi}}$ peut être exprimée selon l'équation thermodynamique classique définie pour les réactions à l'équilibre (Équation 1).

$$\text{Équation 1. } \Delta G_n^{\text{multi}} = \Delta H_n^{\text{multi}} - T\Delta S_n^{\text{multi}}$$

La première théorie suppose que dans le cas de figure où les ligands peuvent facilement atteindre leur cible et les récepteurs sont indépendants, l'enthalpie du système multivalent $\Delta H_n^{\text{multi}}$ peut être assimilée à la somme des enthalpies des ligands monovalents ΔH^{mono} (Équation 2). Si au contraire, la distance entre deux récepteurs ou la présentation des ligands ne sont pas optimales, la valeur de l'enthalpie pourra être différente de la somme des constituants.

$$\text{Équation 2. } H_n^{\text{multi}} = \sum_n \Delta H^{\text{mono}}$$

Concernant l'entropie globale d'un système multivalent $\Delta S_n^{\text{multi}}$, sa valeur correspond à la somme de plusieurs composantes : l'entropie translationnelle $\Delta S_{n,\text{trans}}^{\text{multi}}$, rotationnelle $\Delta S_{n,\text{rot}}^{\text{multi}}$, conformationnelle $\Delta S_{n,\text{conf}}^{\text{multi}}$ et de solvation $\Delta S_{n,\text{solv}}^{\text{multi}}$ (Équation 3). La composante translationnelle correspond à la capacité du ligand à se déplacer dans les trois directions de l'espace. L'entropie rotationnelle est issue de la rotation du ligand sur lui-même. La composante de conformation correspond quant à elle aux restrictions conformationnelles imposées à la fois aux ligands et aux récepteurs. Enfin, l'entropie de solvation est induite par la présence du solvant du milieu. Ces différentes composantes expliquent le rôle de l'architecture du cluster multivalent sur l'énergie libre du complexe. Ainsi, un système pré-organisé présentera des caractéristiques thermodynamiques totalement différentes de celles d'une plate-forme non organisée.

$$\text{Équation 3. } \Delta S_n^{\text{multi}} = \Delta S_{n,\text{trans}}^{\text{multi}} + \Delta S_{n,\text{rot}}^{\text{multi}} + \Delta S_{n,\text{conf}}^{\text{multi}} + \Delta S_{n,\text{solv}}^{\text{multi}}$$

La constante d'association globale K_n^{multi} également appelée avidité, est caractéristique des interactions multivalentes. Elle est différenciée de la constante d'association monovalente K^{mono} , appelée affinité, qui est généralement moindre, dû à un effet de multivalence. Cet effet de multivalence a été défini par un paramètre β exprimant l'augmentation de l'affinité d'un ligand multivalent par rapport à son homologue monovalent (Équation 4). L'effet de multivalence représente la différence induite sur la reconnaissance globale d'une cible par rapport à celle d'un système monovalent. Il peut alors être positif ou négatif. Dans le cas d'un effet multivalent positif, la puissance relative est supérieure à 1, c'est l'effet recherché pour accroître la constante d'association du complexe. Lorsque β est inférieur à 1, l'effet de la multivalence est négatif.

$$\text{Équation 4 : } \beta = \frac{K_n^{\text{multi}}}{K^{\text{mono}}}$$

Ce paramètre β est proportionnel à la puissance relative (rp) d'un inhibiteur multivalent. La puissance relative correspond à l'inhibition d'un cluster multivalent par rapport à celle d'un système monovalent.

Ainsi, dans cette théorie, la multivalence est régie par l'additivité de l'enthalpie et l'additivité partielle de l'entropie corrigée par l'impact des composantes translationnelle, rotationnelle, conformationnelle et de solvatation.

Dès 1981, la théorie d'additivité est remise en question.^[9] Cette seconde théorie est une évolution du modèle initial. L'énergie libre de connexion $\Delta G_{\text{connect}}$ est alors introduite. Ce composant correspond à l'écart d'énergie libre causé par l'interaction des ligands.^[3h]

Ces théories permettent de prédire les tendances de la balance entropique/enthalpique pour un phénomène de reconnaissance multivalente.

Outre la place tenue par la thermodynamique pour expliquer les interactions, cette partie a permis d'évoquer le rôle essentiel tenu par l'architecture dans le processus de reconnaissance de systèmes multivalents. Basées sur ces connaissances, de nombreuses investigations ont été réalisées pour étudier les différents châssis multivalents pouvant être construits.

C. Mécanismes de la reconnaissance multivalente

La structure des systèmes multivalents jouent un rôle important dans le choix du mécanisme de reconnaissance.^[10] Selon l'architecture de la cible et de son site actif, le mode de

reconnaissance va être différent. Quatre mécanismes d'interactions sont principalement décrits (Figure 2) :^[11]

- La chélation du récepteur par son ligand
- La présence d'un site de reconnaissance secondaire
- L'effet de groupe sur la reconnaissance ("clustering")
- La création de nouvelles liaisons par effet statistique

La reconnaissance par un mode d'association de type chélate repose sur une interaction avec des protéines possédant plusieurs sites identiques et donc implique des clusters homotopiques. Le mécanisme basé sur la présence d'un site secondaire, quant à lui, nécessite un cluster hétérotopique. Le site secondaire est, en effet, de nature différente du site principal. Le mode de reconnaissance reposant sur l'effet de groupe, requiert la présence d'une cible possédant des sites actifs proches les uns des autres pour permettre une agrégation. Des interactions existent entre les cibles elles-mêmes et entre les complexes générés. Finalement, l'effet statistique est pour sa part, basé sur un mécanisme cinétique. Il induit alors une diminution de la constante de dissociation.

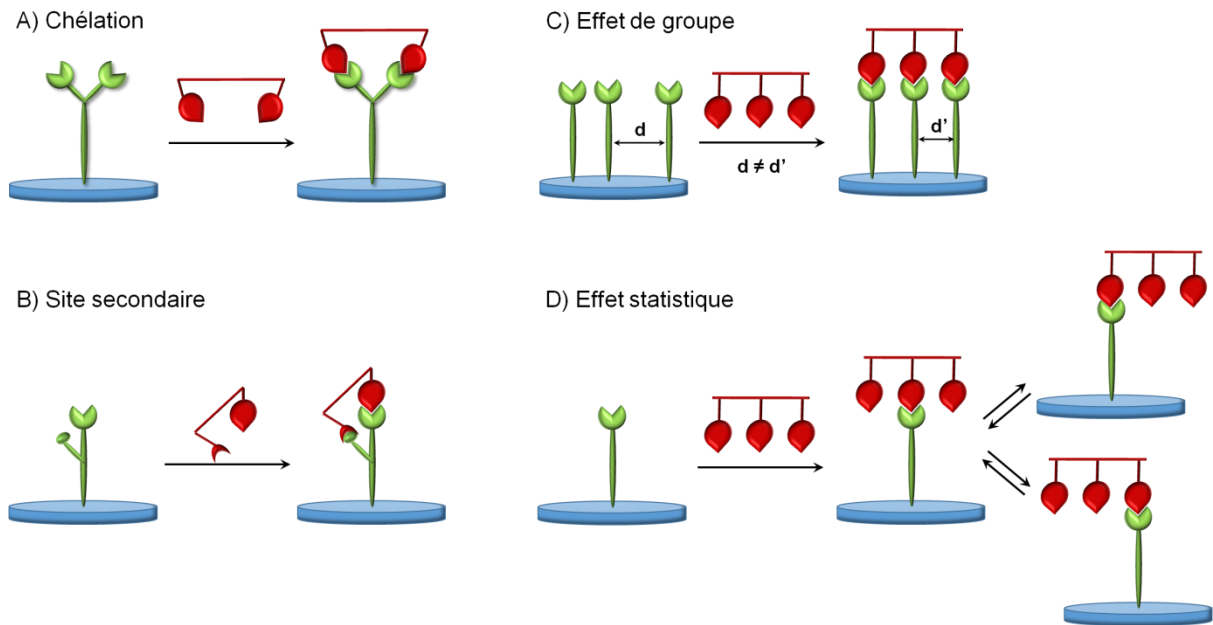


Figure 2. Mécanismes de reconnaissance des récepteurs par leurs ligands multivalents via A) la chélation, B) la présence d'un site secondaire, C) l'effet de groupe, D) l'effet statistique

Ces mécanismes sont impliqués dans la sélectivité et l'affinité d'un système pour un autre.^[1b]

^{12]} La multivalence permet d'améliorer ces deux propriétés. La sélectivité est d'une grande importance autant dans le cas des systèmes synthétiques que des ligands naturels pour la

reconnaissance de biomolécules telles que les acides nucléiques.^[13] Les protéines (Cyt C, p53...) sont des cibles également largement étudiées du fait de leur implication dans un certain nombre de dysfonctionnements biologiques.^[14] La reconnaissance spécifique de ces protéines reste un challenge car elles présentent une importante surface de solvatation (750-1500 Å).^[15]

II. Conception

La forme, la valence, l'orientation et la flexibilité des plate-formes vont influencer leur capacité d'interactions. Les aromatiques, les calixarènes, certains petits peptides linéaires ou cycliques, les cyclodextrines ou encore les foldamères, sont des plate-formes présentant peu de groupements fonctionnels. Au contraire, les oligonucléotides, les dendrimères, les porphyrines, les polymères, ainsi que les nanoparticules possèdent généralement une valence plus grande. Au sein même de ces systèmes, certains d'entre eux vont être pré-organisés (Figure 3).^[14; 16]

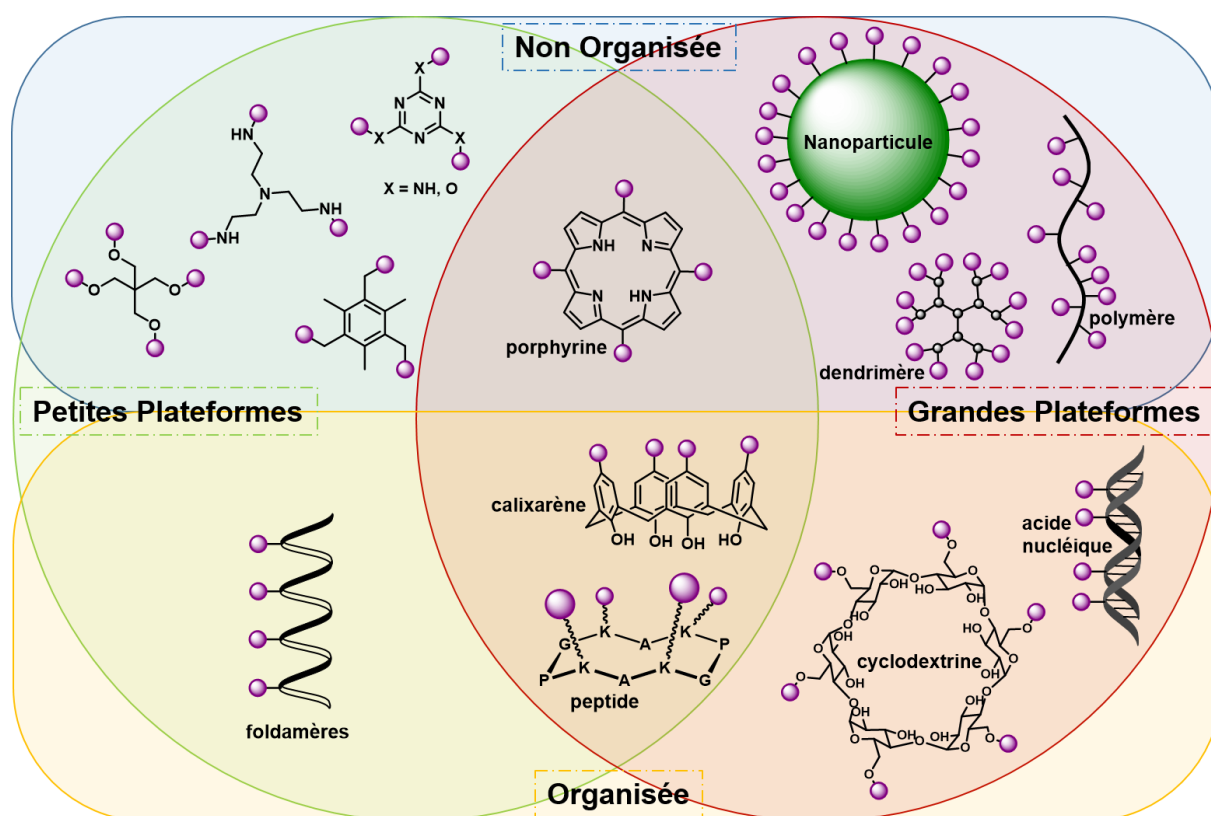


Figure 3. Plate-formes utilisées pour la préparation de systèmes multivalents selon leur taille (petite dans le cercle vert et grande dans le rouge) et la présence éventuelle de pré-organisation spatiale des groupements fonctionnels (organisée dans le rectangle orange, non-organisée dans le bleu)

A. Plate-formes non organisées

1. Les aromatiques

Les systèmes aromatiques se caractérisent par leur structure plane et sont faciles d'accès. Leur valence réduite présente cependant un inconvénient pour les études relatives à la multivalence. Les naphthalènes ainsi que les anthracènes sont des composés bis- et tri-aromatiques qui peuvent être fonctionnalisés par des groupes de nature variée et à différentes positions.^[17]

2. Les porphyrines

Les porphyrines sont des plate-formes rigides qui présentent quatre sites fonctionnalisables pour créer des systèmes multivalents variés et permettre la reconnaissance d'un large panel de molécules.^[18] Elles ne présentent aucune pré-organisation. Ces plate-formes sont largement connues du fait de leur présence dans les systèmes biologiques.

3. Les polymères

Les polymères sont des systèmes de taille importante qui offrent la possibilité de créer des complexes de valence considérable. L'avantage majeur de ces macromolécules repose sur l'importante valence qui peut être générée en les préparant. La polydispersité induite peut cependant être un frein à leur utilisation. Un autre inconvénient provoqué par la taille et la charge de ces systèmes peut être relevé dans le domaine biochimique pour certains de ces polymères : leur cytotoxicité.^[19]

4. Les dendrimères

Ces macromolécules ne présentent aucune pré-organisation particulière. Ces systèmes peuvent être de taille variable selon la valence désirée et la nature des bras dendritiques peut également changer. Ils ont alors naturellement été engagés dans la reconnaissance multivalente supramoléculaire.^[20] Cette reconnaissance a d'ailleurs permis d'utiliser ces molécules pour le transport de composés actifs.^[21] Tout comme dans le cas des polymères, leur taille peut entraîner une toxicité envers les cellules qui peut être expliquée par des difficultés à éliminer ces macromolécules.^[19]

5. Les nanoparticules

Les nanoparticules peuvent être préparées à partir de différents types de matériaux, des métaux comme de l'or,^[22] ou du fer,^[23] de la silice,^[24] la simple organisation de chaînes

lipophiles,^[25] voire même des cyclodextrines^[26] également utilisées seules comme plateformes multivalentes. La diversité de ces systèmes présente un réel avantage. Ils peuvent être utilisés dans un large panel d'applications. Les nanoparticules poreuses peuvent notamment être engagées dans le domaine de l'imagerie mais aussi impliquées dans le transport de composés actifs.^[22b; 23; 27] Cependant, il est une nouvelle fois nécessaire de noter que ces systèmes peuvent présenter une toxicité pour les cellules.

6. Les fullerènes

Durant près d'une vingtaine d'années, de nombreuses recherches ce sont tournées autour des macro-systèmes riches en carbones et plus particulièrement des fullerènes, constitués de 60 atomes de carbone. Cette famille de composés se caractérise par une structure dans les trois dimensions de l'espace et des propriétés électroniques spécifiques. Ces spécificités ont ouvert l'intérêt des scientifiques pour créer de nouveaux matériaux^[28] et des composés biologiquement actifs.^[29] Ce dernier point reste somme toute limité du fait de l'absence de solubilité du système en milieu physiologique. La fonctionnalisation est donc un atout essentiel pour permettre au système d'être miscible au milieu aqueux. Elle offre ainsi la possibilité de générer des clusters de valences élevées.

B. Plate-formes pré-organisées

1. Les calixarènes

Les calixarènes sont des oligomères de phénols dont les cycles aromatiques sont reliés par des ponts méthylènes. L'architecture globale rappelle un panier de basket, avec une face large hydrophobe pouvant être fonctionnalisée par des groupements de reconnaissance, et une face plus étroite qui est généralement O-alkylée, dans le but d'accroître la rigidité du système sous forme de cône. L'alkylation induit alors la pré-organisation du système. Une face plutôt que l'autre ou bien les deux peuvent être fonctionnalisées. Les calixarènes peuvent être formés d'un nombre plus ou moins important de cycles phénoliques. La principale forme rencontrée est le calix[4]arène constitué de quatre cycles phényles. Il est préparé en une seule étape puis facilement purifié. Tout comme dans le cas des fullerènes présentés précédemment, les calixarènes sont peu appliqués à l'approche biomédicale.^[30] Ceci s'explique par leur faible solubilité dans l'eau et leur caractère hydrophobe. Ainsi, la fonctionnalisation de la plate-forme représente un enjeu important pour son implication dans les interactions avec des biomolécules.^[31] La facilité de l'oligomère à être fonctionnalisé est une caractéristique indispensable pour l'étude de la multivalence. La pré-organisation de cette plate-forme représente également un attrait pour la complexation en présentant les groupements fonctionnels sur une même face.

2. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD)^[32] sont une famille d'oligosaccharides cycliques découverte en 1891^[33] et capables d'encapsuler divers composés.^[31a; 34] Le résidu saccharidique, un glucopyranose lié par des liaisons glycosidiques α -(1,4) est généralement répété 6, 7 voire 8 fois pour créer des couronnes respectivement dénommées, α -, β - et γ -CD. Le nombre de résidus glucosidiques impliqués dans la préparation du composé va régir la taille de la cavité de la plate-forme. Dans le cas des trois plate-formes les plus courantes, la profondeur de la cavité atteint les 0,78 nm.^[31a] Les cyclodextrines présentent une bonne solubilité dans l'eau et aucune toxicité envers les systèmes biologiques.^[35] Ces composés peuvent être générés par dégradation enzymatique de l'amidon. Sa production à partir du riz, de pomme de terre ou encore du maïs rend ce produit peu onéreux et donc facile d'accès. Ces plate-formes présentent l'avantage d'être facilement fonctionnalisées. Les cyclodextrines, tout comme les calixarènes sont pré-organisées dans l'espace.

3. Les dérivés d'acides nucléiques

Les dérivés d'oligonucléotides permettent de construire des composés, de structures proches de celles des acides nucléiques. La préparation des systèmes est réalisée par le biais de complémentarité de séquence selon une hybridation de type Watson-Crick ou bien Hoogsteen. Les acides nucléiques peuvent alors jouer le rôle de plate-forme permettant d'assister la construction de ces dérivés multivalents.^[36] Ces plate-formes présentent l'avantage d'être hydrosolubles et pré-organisées. Elles peuvent atteindre une grande valence selon la longueur de leur séquence. Cependant, les acides nucléiques sont peu stables et leur durée de vie est généralement limitée.

4. Les peptides

Des travaux ont été réalisés sur l'architecture et l'organisation structurale des protéines et des peptides pour permettre de générer de nouvelles propriétés fonctionnelles.^[37] Ainsi, des peptides organisés sous forme de plate-formes cycliques ont été préparés en vue de développer des systèmes présentant une direction dans l'espace. L'étude des séquences peptidiques capables d'induire une conformation donnée,^[38] a permis d'aboutir à des molécules organisées selon une architecture contrôlée (Figure 4).^[39]

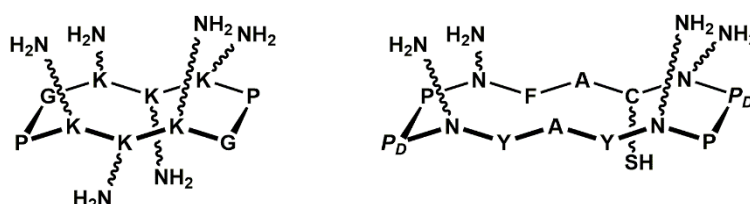


Figure 4. Structures de plate-formes de peptides cycliques. Avec P_D le résidu *D*-proline

Parmi ces macromolécules tridimensionnelles, des châssis appelés RAFT pour "Regioselective addressable functionalized templates" et composés de dix résidus aminés, présentent deux faces différenciées (Figure 5). Les données RMN ont attesté que les plate-formes adoptent en solution une conformation sous forme de deux coudes β , liés entre eux par deux tri-peptides.^[40] Cette architecture sous forme de feuillet β anti-parallèle est rendue possible par la présence de deux enchaînements de résidus aminés, Gly-Pro, permettant d'induire la formation de coudes. Les six autres résidus du décapeptide peuvent être modulés. C'est d'ailleurs par le biais de ces acides aminés que sera fonctionnalisé le système. En modifiant les deux résidus centraux, c'est une face qui sera ornée par des groupements d'intérêt, alors qu'en fonctionnalisant les quatre autres c'est la seconde face du RAFT qui portera les molécules nouvellement couplées. La plate-forme mesure une taille d'environ 5 Å de large et 10 Å de long.

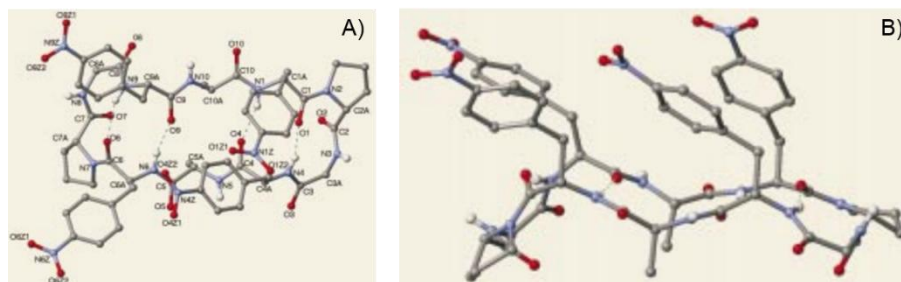


Figure 5. Structure RX du cristal du RAFT cyclique (F(pNO_2)AF(pNO_2)PGF(pNO_2)AF(pNO_2)PG) avec les résidus F(pNO_2) et A modulables selon les propriétés désirées. Avec A) la vue perpendiculaire au feuillet β et B) la vue quasi parallèle au feuillet β

C. Stratégie de bioconjugaison

Bien que la construction de plusieurs systèmes multivalents ait été rapportée dans la littérature scientifique, l'ingénierie moléculaire de systèmes multivalents reste un challenge considérable qui requiert l'utilisation de méthodes de bioconjugaison basées sur les ligations click. En effet, la construction de clusters multivalents implique de bons rendements et une excellente chimiosélectivité. Ces deux critères sont indispensables pour faciliter l'élimination des réactifs et produits secondaires.

1. Ligations click

Les ligations de types click ont été envisagées dans le but de passer outre les limitations de la synthèse étape par étape. Les réactions appartenant à la chimie click doivent répondre à des critères précis : être modulable, être applicable à un large panel de molécules et ne générer que des produits secondaires facilement éliminables.^[41] La mise en œuvre de ces synthèses doit également répondre à plusieurs critères : être réalisable dans des conditions

douces et simples, les réactifs doivent être facilement disponibles et le produit doit pouvoir être isolé aisément. La préparation de liaisons carbone-hétéroatomes de manière click englobe les réactions de substitutions nucléophiles, de condensations de carbonyles et de cycloadditions d'espèces insaturées. La chimie click, quand elle est appliquée aux systèmes vivants, nécessite en outre d'être biocompatible et réagir de façon bio-orthogonale.^[42]

a. *Ligation azoture-alcyne catalysée au cuivre*

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un groupement acétylène et un azoture permettant la préparation de triazole, a été introduite en 1963.^[43] Cette première synthèse nécessitait un chauffage du milieu réactionnel, pour obtenir le produit désiré avec un rendement acceptable incompatible avec les systèmes biologiques. C'est en 2002 que la catalyse au Cu^I a été réalisée (Figure 6).^[44] Cette accélération de la vitesse de réaction semble être expliquée par la formation d'un métallo-cycle de six membres mettant en jeu du Cu^{III} .^[45] L'énergie d'activation de formation du triazole est, grâce au cuivre, réduite d'une valeur de $26,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ à $14,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$. Ainsi cette réaction est devenue très efficace dans l'eau et elle offre de bons résultats en conditions aqueuses. Depuis d'autres propositions ont été faites pour expliquer le mécanisme de catalyse de cuivre, avec par exemple la présence de deux atomes de Cu^I .^[46]

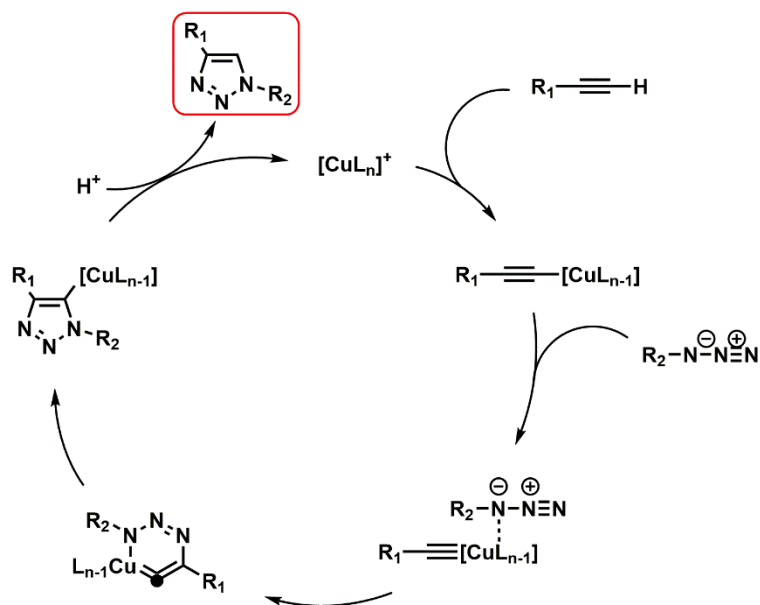


Figure 6. Mécanisme réactionnel de la cycloaddition azoture-alcyne catalysée par le cuivre proposé en 2002^[44a]

Cette ligation click a largement été employée dans la construction d'inhibiteurs enzymatiques. Ainsi, la cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre a permis de fonctionnaliser sélectivement les protéines, de modifier les surfaces virales ou encore de fixer des oligonucléotides.^[43b] Malgré ce large engouement, le cuivre reste un métal toxique

pour les cellules.^[47] D'autres ligations tels que les cyclooctynes ont alors été proposées pour éviter l'emploi du catalyseur. Ces groupements sont en effet plus réactifs et l'utilisation du cuivre n'est pas nécessaire, mais la régiosélectivité de la réaction est alors perdue.

b. Thiol-ène

La ligation thiol-ène est une hydrothiolation d'un alcène terminal, découverte en 1905, et c'est en 1938 que le mécanisme radicalaire a été proposé (Figure 7).^[48] Un radical thiyl est généré par l'action de la lumière et/ou en présence d'un initiateur de radicaux. Le radical est ensuite additionné à l'alcène pour induire la formation d'un radical thioalkyl selon un mécanisme anti-Markovnikov. Le thioalkyl désiré est obtenu par la réaction du produit issu de l'addition avec le radical hydrogène généré à partir du thiol. La propagation radicalaire est alors initiée.

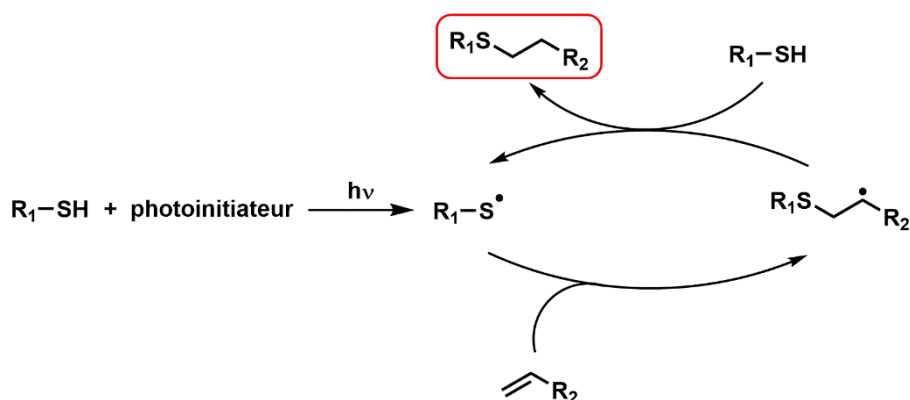


Figure 7. Mécanisme radicalaire de la réaction de thiol-ène impliquant un photoinitiateur

Initialement réservée à la préparation de thioesters,^[49] la thiol-ène fait l'objet ces dernières années d'applications destinées à la préparation de matériaux et de polymères.^[50] La thiol-ène a également été largement utilisée pour la préparation de systèmes multivalents dendritiques ou encore pour la fonctionnalisation de plate-formes telles que des cages de silice,^[51] des calixarènes^[52] ou encore des cyclodextrines.^[53] L'efficacité notable de la thiol-ène pour la construction de ces clusters permet de la définir comme une ligation click.^[54] Cette ligation n'est pas chimiosélective des groupements protecteurs arylés souvent utilisés dans la chimie des sucres. Des étapes de déprotections/protections sont alors indispensables pour modifier la nature de ces groupements avant d'initier la réaction.

c. Réactions de condensation de carbonyles

Les réactions de condensation de carbonyles reposent sur la libération d'une molécule d'eau (Figure 8).

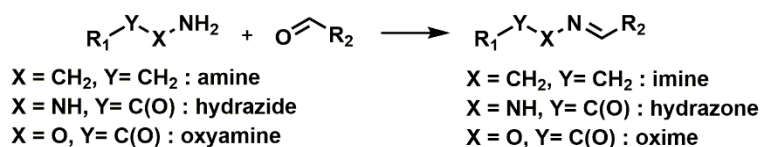


Figure 8. Réaction de condensation de carbonyles

Imine. L'imine est une réaction de condensation impliquant une fonction amine et un aldéhyde. Cette liaison présente des limitations pour être considérée comme une ligation de type click. En effet, lorsque la réaction est réalisée en milieu aqueux, la stabilité du système généré est très réduite. Les molécules d'H₂O vont jouer un rôle nucléophile pour dissocier les composés, et tendre à déplacer l'équilibre vers la régénération de l'aldéhyde et de l'amine initiaux. La formation de cette liaison peut malgré tout être favorisée grâce à la présence de liaisons non covalentes annexes pour stabiliser le système.^[55] L'équilibre peut être fixé en réalisant une réaction de réduction. Pour cela, le milieu est soumis à des conditions réductrices enzymatiques^[56] ou chimiques^[57].

Acylhydrazone. Les ligations acylhydrazones sont des ligations réversibles mettant en œuvre la condensation d'un aldéhyde avec celle d'un hydrazide. Cette ligation click est chimiosélective. Elle est stabilisée par rapport à l'imine. Ainsi il n'est généralement pas nécessaire de soumettre le système à une étape de réduction.^[57b] La présence d'un groupement électroattracteur sur le carbone en position α de l'hydrazide, est même indispensable pour apporter une dynamique au système et autoriser l'hydrolyse. C'est un carbonyle qui va induire un déplacement électronique, déstabilisant la liaison acylhydrazone et la rendant dynamique. La ligation acylhydrazone reste, malgré tout, suffisamment stable pour être réalisée en milieu aqueux. L'hydrazone, quant à elle, ne présente pas ce carbonyle. Le degré de stabilité de la liaison est dépendant de la nature du substituant de l'azote sp² impliqué dans la condensation (Figure 9). Selon la nature de l'atome, un déplacement électronique va permettre de réduire les probabilités d'une attaque nucléophile de l'eau. On parle d'effet α.^[58] Ce substituant qui est un atome de carbone dans le cas de l'imine, est un azote pour l'hydrazone et un oxygène pour l'oxime. Ces hétéroatomes par le biais d'un effet inductif accepteur, permettent de réduire le caractère basique de l'azote impliqué dans la double liaison. Ce caractère inductif accepte des électrons de l'azote et rend moins électrophile le carbone sp², permettant ainsi de diminuer les risques d'attaque de l'eau sur le carbone plan.

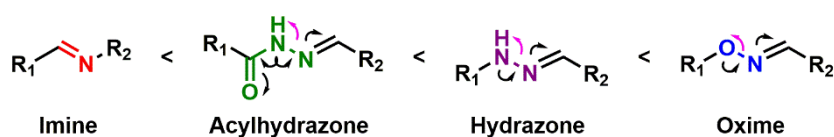


Figure 9. Ordre de stabilité des ligations issues de la condensation de carbonyles selon la nature du substituant de l'azote impliqué dans la liaison. Avec les flèches noires représentant les déplacements d'électrons et les flèches roses l'effet inductif

Oxime. La ligation oxime est également une réaction de condensation mettant dans ce cas en jeu une oxyamine et un aldéhyde.^[59] La génération de l'oxime est réalisée avec de bons rendements en milieu aqueux et pour seul produit secondaire, de l'eau. Tout comme les autres condensations décrites, l'oxime est réalisée en l'absence de métaux mais en présence d'une catalyse acide. Le produit obtenu est plus stable que l'imine et l'acylhydrazone (Figure 9).^[60] Outre le substituant de l'azote sp^2 de la liaison, la présence d'accepteur d'électrons permet de stabiliser l'équilibre thermodynamique en faveur de la formation de l'oxime.^[61] Pour répondre à ce besoin, des aldéhydes aromatiques ou glyoxyliques^[62] sont, depuis quelques années, largement utilisés. Cette ligation a ainsi largement été engagée dans des travaux de recherche nécessitant une bonne chimiosélectivité et notamment pour des réactions sur la surface cellulaire.^[63] La ligation oxime n'est cependant pas bio-orthogonale et ne peut pas être réalisée sélectivement dans le milieu intra-cellulaire.

d. Thiol-maléimide

La ligation thiol-maléimide est une réaction d'addition de type Michael. Elle est formée à partir d'un groupement maléimide et d'un thiol présent notamment sur la chaîne latérale des cystéines. La réaction se caractérise par une cinétique de formation en milieux aqueux relativement rapide et l'absence de produit secondaire généré. L'attaque nucléophile du thiolate sur le maléimide^[64] (Figure 10) requiert une catalyse basique. Cette réaction est chimiosélective.

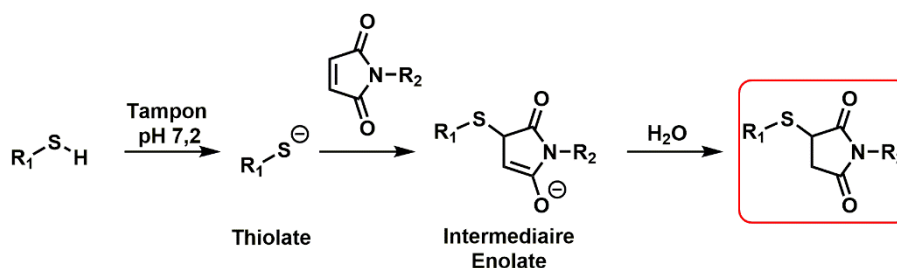


Figure 10. Mécanisme réactionnel de la réaction de thiol-maléimide par l'attaque du thiolate sur le maléimide

Les groupements maléimides sont susceptibles de présenter des problèmes de sélectivité envers les espèces nucléophiles de type amine ou encore alcool.^[65]

e. Ponts disulfures

Les liaisons disulfures sont formées à partir d'une réaction d'oxydation de deux groupements thiols. Cette réaction est favorisée en conditions basiques à un pH compris entre 8 et 10. Il est impossible de contrôler si le thiol va réagir avec un réactif identique ou avec le thiol d'un composé de nature différente (Figure 11). Cela peut être utile dans le cas de la chimie combinatoire dynamique ouvrant la possibilité de générer de nouvelles structures, mais peut représenter un inconvénient si l'on souhaite favoriser le produit R_1R_2 . Le caractère dynamique des ponts disulfures sous l'action d'un milieu oxydant est alors utile.^[66]

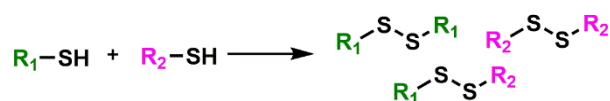


Figure 11. Formation de ponts disulfures

f. Ligations orthogonales

Deux ligations orthogonales sont des réactions indépendantes l'une de l'autre, n'interférant pas entre elles. Elles sont cependant, idéalement réalisées dans les mêmes conditions réactionnelles. Ces ligations click orthogonales peuvent être préparées de manière séquentielle ou bien simultanément selon un processus "one-pot". L'avantage offert par l'orthogonalité de certaines ligations click se traduit par une synthèse rapide et efficace de systèmes plurifonctionnels. Ainsi, une réaction d'oxime peut être envisagée en présence d'azotures permettant de fonctionnaliser un châssis peptidique par une cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre. Aucun problème de sélectivité n'est relevé puisque les conditions ainsi que les réactifs nécessaires à ces deux ligations sont totalement orthogonaux.^[67] D'autres types de liaisons orthogonales ont fait l'objet de travaux avec par exemple la synthèse de clusters multivalents via des oximes et des thiazolidines,^[68] ou encore la préparation d'oximes et de thioéthers.^[69] Finalement, des clusters multivalents fonctionnalisés via quatre ligations orthogonales ont été réalisés. Les fonctionnalisations ont été réalisées successivement par des ligations de type oxime, azoture-alcyne catalysée au cuivre, thiol-ène, thiol-éther ou encore thiol-maléimide (Figure 12).^[70] Par le biais de ces réactions, de nouvelles fonctions peuvent être attribuées aux systèmes ainsi préparés, comme l'apport d'un fluorophore, d'un ligand amenant de la spécificité pour une cible ou encore d'un groupement hydrophile permettant d'offrir une meilleure solubilité et des capacités métabolisables à la molécule (Figure 13).^[70a]

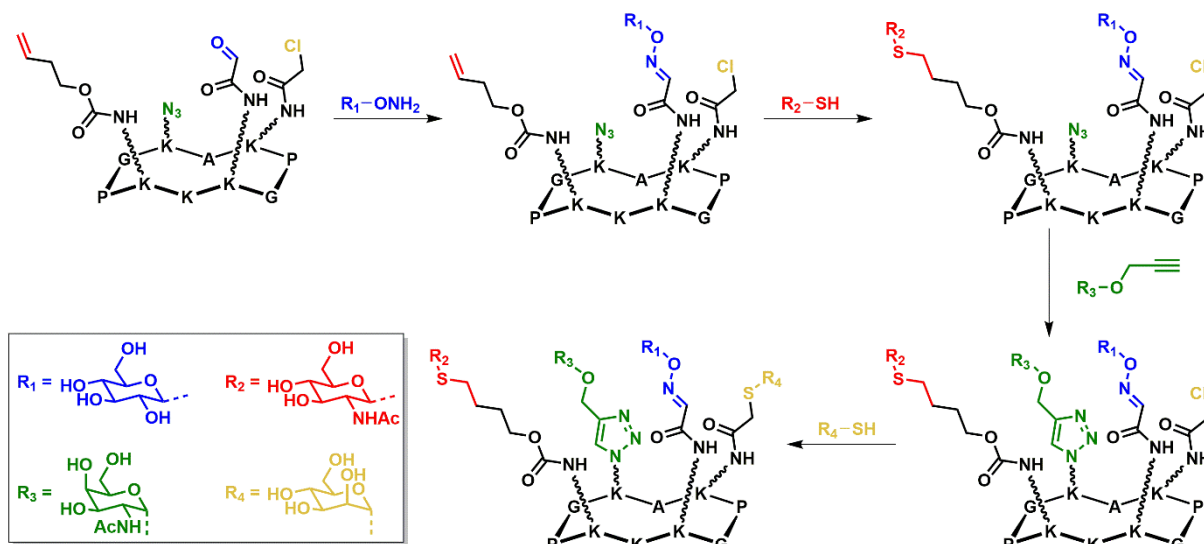


Figure 12. Plate-forme multivalente fonctionnalisée successivement via la formation de ligations click orthogonales et chimiosélectives

La reconnaissance d'une cible peut être homo- ou hétérotopique. Ainsi, un unique ligand va être engagé dans une reconnaissance homotopique, alors que des ligands de natures différentes peuvent être impliqués dans une complexation hétérotopique.^[67c; 71] Dans le cas de ce système tétra-fonctionnalisé, les différents groupements osidiques vont générer des interactions hétérotopiques.

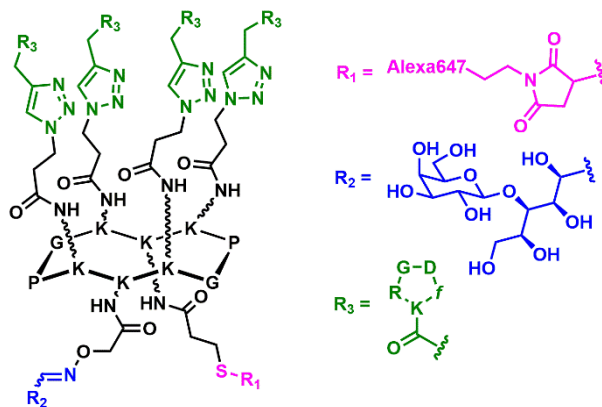


Figure 13. Système multivalent fonctionnalisé par des groupements apportant au composé des propriétés fluorescentes (Alexa 647), un accroissement de l'hydrophilie (sucre) et une capacité de reconnaissance de cellules cancéreuses (RGD) avec *f* pour la *D*-phénylalanine

Récemment, des travaux ont permis de développer, en une étape unique, des clusters penta-fonctionnalisés connus pour cibler les tumeurs cancéreuses (Figure 14).^[72] Pour cela, le choix des ligations s'est porté sur la similitude de leur conditions de synthèse, utilisant dans les deux cas du cuivre. D'une part, le châssis est fonctionnalisé via une cycloaddition de type azoture-alcyne, et d'autre part, une nouvelle liaison reposant sur la création d'amide avec l'utilisation d'un thioacide comme intermédiaire. Des dérivés peptidiques ont déjà été préparés avec ce même catalyseur.^[73] La ligature présente cependant l'inconvénient d'être

sensible à la présence d'autres amines nucléophiles mais ne réagit pas avec les hydroxyles et les thiols.^[74] Ainsi, les composés multivalents sont générés à partir de la combinaison de procédures catalysées par le Cu^{II} et le Cu^{I} respectivement pour la préparation de l'amide et la cycloaddition.

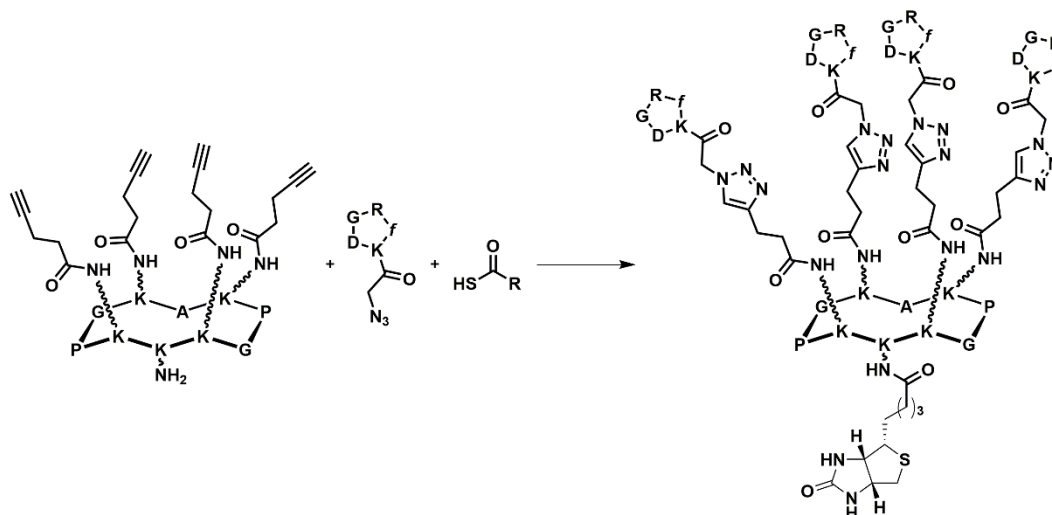


Figure 14. Préparation de systèmes penta-fonctionnalisés par auto-assemblage simultané avec différents dérivés thioacides avec f pour la D -phenylalanine

2. Auto-assemblage pour générer des structures multivalentes

Les procédés d'auto-assemblage, basés sur l'organisation de briques moléculaires entre elles, sont de plus en plus utilisés pour le développement de systèmes efficaces pour la reconnaissance de structures biologiques.^[75] Cet auto-assemblage est généré par la formation de liaisons covalentes dynamiques, ou d'interactions faibles supramoléculaires.^[76]

a. Auto-assemblage par des interactions supramoléculaires

La chimie supramoléculaire est une des méthodes exploitées ces dernières années pour la construction de systèmes multivalents auto-assemblés.^[77] La multivalence est d'un grand intérêt pour compenser la faible force des liaisons non covalentes des complexes générés par chimie supramoléculaire en milieux aqueux.^[1b; 4; 8; 11a; 12; 78] Différentes méthodes de préparation des systèmes multivalents auto-assemblés ont vu le jour ces dernières années :^[76] les liaisons non covalentes telles que les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogènes ou encore l'empilement π sont à l'origine de la stabilité des clusters.^[8; 78] Les châssis, générés par des groupements aromatiques, ont par exemple été utilisés pour former des colonnes dynamiques par auto-assemblage.^[79] L'auto-assemblage va induire de la multivalence et permettre d'éventuelles interactions. Des systèmes aromatiques fonctionnalisés par des ligands mannoses spécifiques de la lectine (Con A) ont d'ailleurs montré une reconnaissance accrue par rapport au sucre monovalent (Figure 15).^[79b]

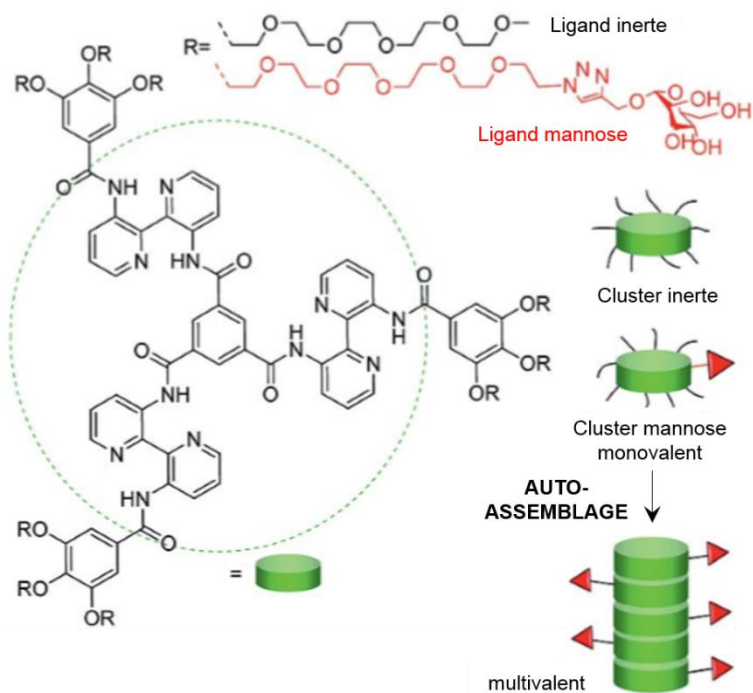


Figure 15. Auto-assemblage multivalent de systèmes aromatiques, fonctionnalisés par des ligands de type mannose^[79b]

La génération de composés multivalents auto-assemblés peut aussi être effectuée par la coordination de métaux.^[80] Une approche dynamique pour la reconnaissance de protéines via des complexes de fer a notamment été réalisée selon ce principe. Les ligands de bipyridines osidiques sont préformés puis mis en contact avec le Fe^{II} pour la préparation des complexes (Figure 16).^[81] Le groupement bipyridine est impliqué dans la coordination avec le métal alors que les sucres sont connectés au système par le biais de long espaceur flexible permettant aux saccharides d'être suffisamment distant pour se comporter comme des systèmes individuels pour l'interaction avec le domaine de reconnaissance de la lectine.^[82] La cible protéique, la concanavaline A, est ensuite additionnée au milieu contenant les trois complexes de fer qui vont subir des échanges et favoriser la formation du système le plus stable.

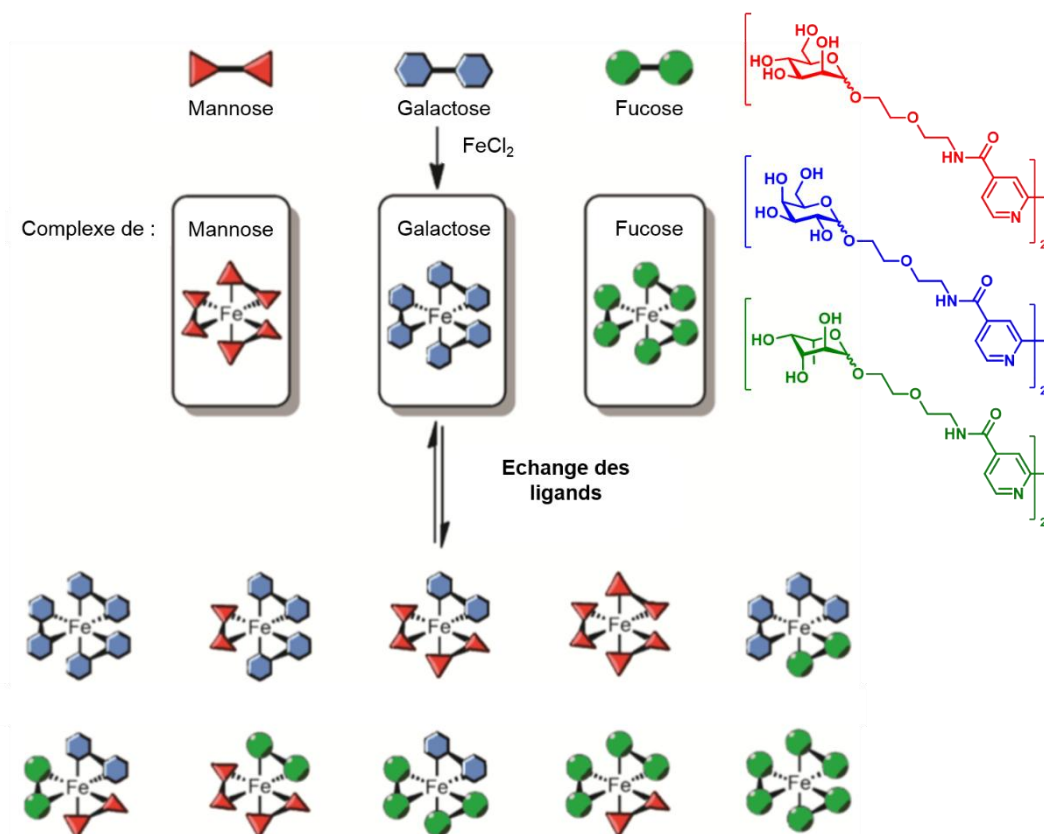


Figure 16. Auto-assemblage de complexes de Fe^{II} à partir de trois ligands osidiques bipyridines (de bas en haut : le *L*-fucose, le *D*-galactose et le *L*-mannose) et échange des ligands pour aboutir à une bibliothèque de 10 composés en l'absence de la protéine cible, la concanavaline A^[81]

En 2014, des systèmes multivalents générés par auto-assemblage supramoléculaire de ligands osidiques en présence d'atomes de Zn^{II} ont également vu le jour. Initialement, l'approche d'auto-assemblage a été réalisée en deux temps avec la préparation de liaisons hydrazones entre des résidus de sucres, glucose ou mannose. Les groupements osidiques sont fonctionnalisés par des liaisons hydrazides et un mono- ou un dialdéhyde aromatique. L'étape suivante reposait sur la complexation avec le métal. Deux types de systèmes vont ainsi pouvoir être générés. La coordination du Zn^{II} avec le mono saccharide hydrazone aboutira à une molécule coin et le ligand divalent permettra la formation d'un système grille [2x2] (Figure 17).^[83] La valence induite par l'auto-assemblage permet ainsi de générer des composés respectivement tétra et octavalent selon la nature de l'aldéhyde. Dans un second temps, l'auto-assemblage est effectué en une seule étape en plaçant les réactifs dans un milieu basique stabilisant la complexation des bipyridines avec le zinc par déprotonation des groupements CONH. Une fois les systèmes préparés, la dynamique de la ligation hydrazone permet d'équilibrer les systèmes vers la formation du complexe stabilisé par les interactions avec la cible biologique, la concanavaline A. Les réactions d'échanges, autorisées par les hydrazones et modulables selon le pH, vont offrir la possibilité de dissocier le complexe et relarguer la protéine. Les études d'association des systèmes auto-assemblés avec la

biomolécule ont permis d'observer un effet de multivalence favorisant la complexation de la grille au détriment de l'espèce tétravalente (Figure 17).

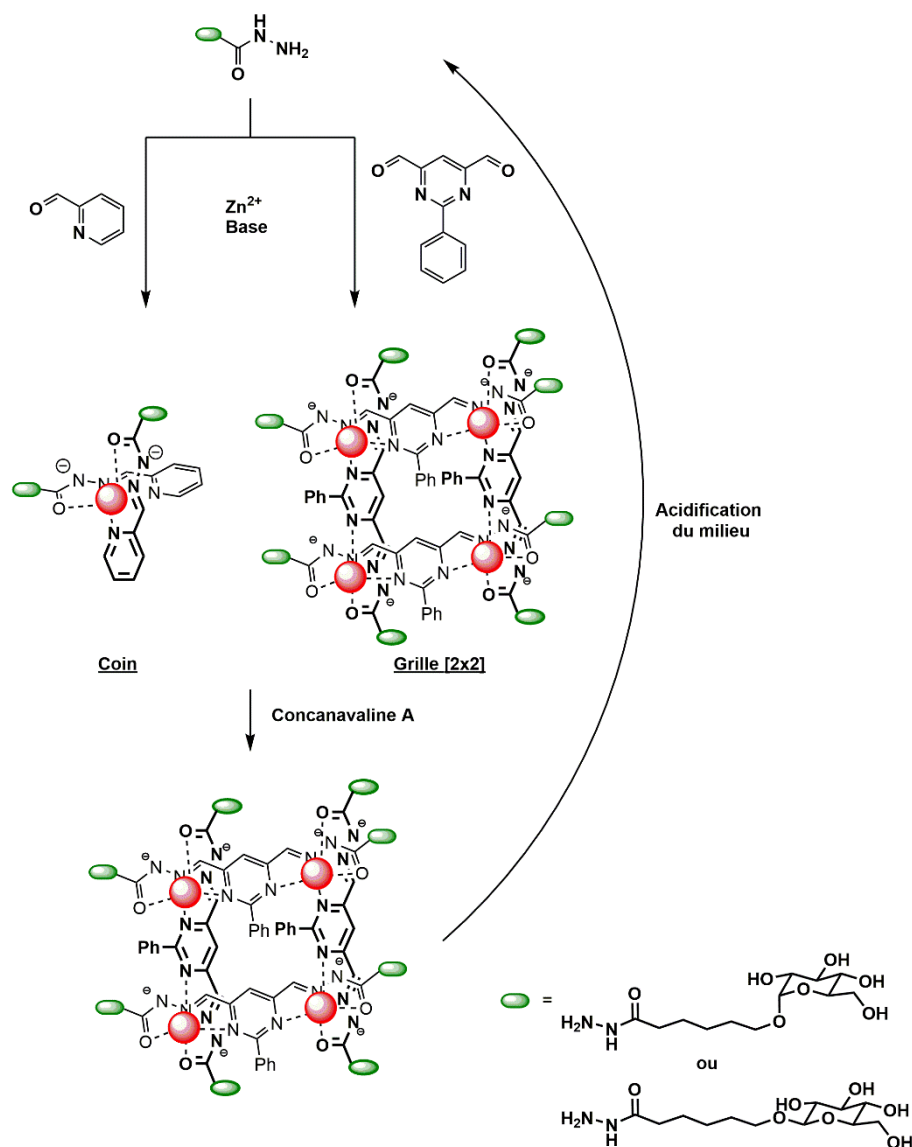


Figure 17. Auto-assemblage de complexes tétra-nucléaires de zinc de type grille, et de complexes mononucléaires, de type coin, fonctionnalisés par des dérivés osidiques. Avec les sphères rouges pour le Zn^{2+} et les ovales verts pour les sucres modifiés, en haut le dérivé mannose et en bas le glucose

b. Auto-assemblage basé sur la chimie covalente dynamique

L'approche covalente dynamique peut être utilisée pour la préparation de ligations par auto-assemblage. Cet auto-assemblage aboutit à une multivalence induite. Les clusters multivalents construits par auto-assemblage nécessitent de pouvoir être préparés dans des milieux complexes. Afin de favoriser la construction du système, il est courant d'utiliser la cible comme template. La dynamique des ligations est alors indispensable pour conduire de manière efficace à des clusters multivalents.

En 2013, des polymères cationiques sont construits par auto-assemblage via la formation de ponts disulfures en conditions oxydantes (Figure 18).^[84] Une multivalence est alors induite par la construction d'un système poly-guanidiniums permettant de réaliser de la pénétration cellulaire.

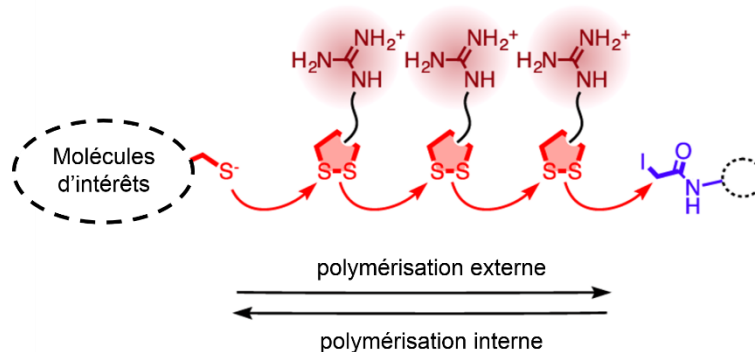


Figure 18. Préparation de polymères cationiques par auto-assemblage covalent dynamique pour la pénétration cellulaire

3. Chimie combinatoire dynamique

La chimie combinatoire dynamique repose sur la préparation de systèmes dynamiques à partir d'une bibliothèque de composés et par le biais de liaisons réversibles.^[85] Toutes les combinaisons sont alors possibles, en l'absence de sélectivité. Suite à l'ajout d'une cible, les systèmes peuvent s'adapter jusqu'à atteindre l'équilibre thermodynamique offrant une reconnaissance et une sélectivité optimale.^[86] Dans certains cas, l'effet thermodynamique n'est pas favorable à la complexation et un effet template cinétique peut être plus intéressant pour la stabilité du système. La complexité des milieux contraint en général à travailler sur des bibliothèques constituées d'un nombre réduit de composés.^[87] Ces bibliothèques offrent la possibilité de découvrir des molécules non décrites et inattendues.^[88] Ainsi quatre mécanismes différents sont possibles pour effectuer la sélection des composants de la bibliothèque combinatoire dynamique :

- La formation d'interactions non-covalentes intramoléculaires (Figure 19A)
- La formation d'interactions non-covalentes intermoléculaires (Figure 19B)
- L'addition du ligand dans le milieu (Figure 19C)
- L'addition du récepteur dans le milieu (Figure 19D)

La présence d'interactions secondaires avec des cibles biomoléculaires est, par exemple, largement favorable pour la préparation de ligands et de récepteurs.^[16] Un certain nombre de produits ont pu être amplifiés grâce à l'ajout d'une cible ionique^[89] ou encore biomoléculaire.^[86a; 90] Une même bibliothèque mise en présence de deux cibles différentes a ainsi pu générer deux clusters de nature diverse.^[91]

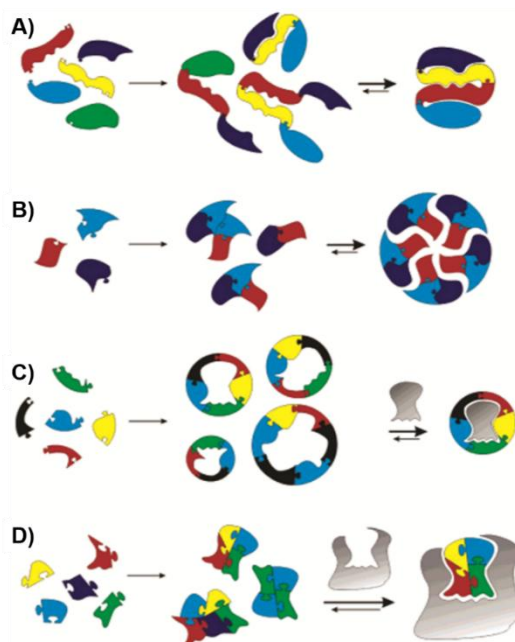


Figure 19. Quatre méthodes de sélection de composés d'une bibliothèque combinatoire dynamique. Avec A) la sélection par formation de liaisons non-covalentes intramoléculaires, B) la sélection des constituants par la génération d'interactions non-covalentes intermoléculaires, C) sélection assistée par le ligand ou D) par l'hôte^[57b]

Dans le cas de l'ADN, l'assemblage par effet template peut être favorisé par différents types d'interactions. On peut rencontrer des interactions au niveau des sillons de l'acide nucléique cible, l'intercalation de ligands, la génération de liaisons de types électrostatiques ou encore la formation de liaisons hydrogènes.^[92]

III. Applications

A. Clusters multivalents pour la reconnaissance de biomolécules

Interaction protéine-protéine. La reconnaissance protéique étant impliquée dans la plupart des phénomènes biologiques, la présence d'un dysfonctionnement se traduit immédiatement par des conséquences dramatiques. Quelques exemples non exhaustifs impliquant la reconnaissance multivalente de protéines par diverses plate-formes fonctionnalisées sont présentés ici.

La protéine p53 est un facteur de transcription, activée dès lors que la cellule subit un endommagement. Son action consiste à induire la croissance cellulaire ou bien à programmer le suicide de la cellule. Un calix[4]arène conique est substitué par quatre groupements méthyl guanidiniums sur sa face large et par des boucles hydrophobes sur sa face étroite. Il est utilisé comme cluster multivalent pour la stabilisation, sous forme de tétramères, d'hélices α riches en groupements carboxyliques comme l'aspartate et le glutamate^[93] (Figure 20).^[94] Ces hélices, stabilisées par des liaisons hydrogènes, sont présentes au niveau du domaine de tétramérisation de la protéine p53 et de son homologue

muté possédant un tétramère moins stable. En se complexant à l'hélice de la protéine mutée, le cluster va stabiliser le tétramère et permettre à la protéine de retrouver son activité de contrôle cellulaire.

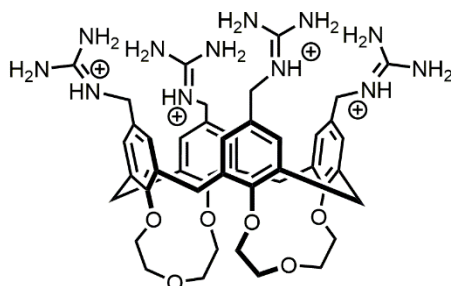


Figure 20. Structure du ligand calix[4]arène permettant la stabilisation du domaine tétramérique du facteur de transcription p53

La modulation de la reconnaissance des récepteurs transmembranaires de facteur de croissance PDGF sécrété par les plaquettes a également été étudiée.^[18] Il est impliqué dans la prolifération cellulaire et d'angiogenèse, indispensables dans le développement des cancers. Un récepteur sein subit un rétrocontrôle par internalisation au sein de la membrane après sécrétion de facteurs de croissance. La reconnaissance des protéines au niveau d'une zone cationique formée par trois boucles a été envisagée pour réguler le facteur de croissance surexprimé. Les premières générations de molécules actives reposaient sur la fonctionnalisation de la face la plus large d'un châssis calixarène par des cyclopeptides (Gly-Asp-Gly-Tyr).^[95] Le système le plus efficace correspond à un calixarène fonctionnalisé par des isophtalates (Figure 21).^[96]

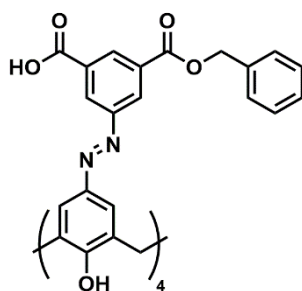


Figure 21. Structure du complexe issu d'un criblage de fonctionnalisation de calixarènes destinés à la reconnaissance des facteurs de croissance des plaquettes

Interaction sucre-lectine. Récemment, de nombreux groupements organiques tels que des peptides, des carbohydrates ou encore des chaînes alkyles ont été utilisés dans la fonctionnalisation de peptides cycliques pré-organisés de type RAFT.^[67b; 67d; 97] La lectine est une des cibles qui a fait l'objet d'étude sur l'efficacité des systèmes multivalents. Les interactions entre les sucres et cette protéine multimérique sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques comme la communication cellulaire, la reconnaissance

hôte-pathogène, la fertilisation ou encore les métastases cancéreuses. En 2013, la fonctionnalisation de la plate-forme peptidique par quatre résidus *N*-acétylglucosamines a résulté sur une importante diminution de l'adhésion des lectines sur les *N*-acétylglucosamines présentes dans le milieu (Figure 22).^[98] L'effet de multivalence s'est révélé être le plus important jamais observé avec une reconnaissance atteignant 19,5 millions de fois celle du carbohydrate monomérique, soit ramené à 4,8 millions par résidu.

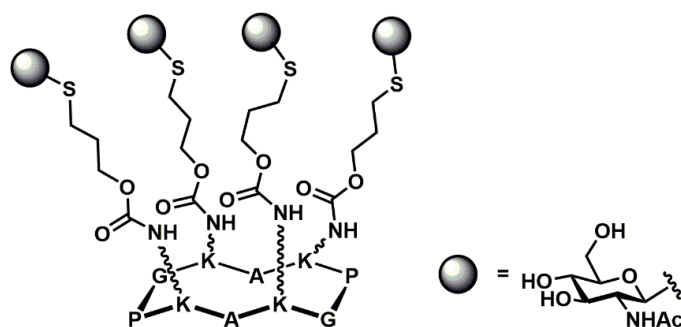


Figure 22. Structure d'un RAFT fonctionnalisé par des résidus *N*-acétylglucosamine pour la reconnaissance de lectine

Ces résultats montrant l'importance de la multivalence sur la reconnaissance, les cyclopeptides ont eux-mêmes été fonctionnalisés par des RAFT ou des polylysines via des liaisons oximes pour créer des composés dendritiques de génération deux incorporant seize copies de sucres (Figure 23).^[99] Des tests de reconnaissance ont ensuite été réalisés sur des lectines avec les composés tétravalents et hexadécavalent fonctionnalisés par des anomères d' α et de β -fucose. Une augmentation de la reconnaissance a été mesurée en parallèle de l'accroissement du nombre de résidus carbohydrates. Des différences ont également été constatées entre les deux types de systèmes dendritiques et entre les anomères, avec une efficacité de reconnaissance accrue pour la molécule portant les polylysines fonctionnalisées par l'anomère α . Ces travaux ont montré que, outre l'effet du nombre de copie de sucre, l'architecture du système et la nature de l'anomère ont un effet important sur la reconnaissance de la protéine.

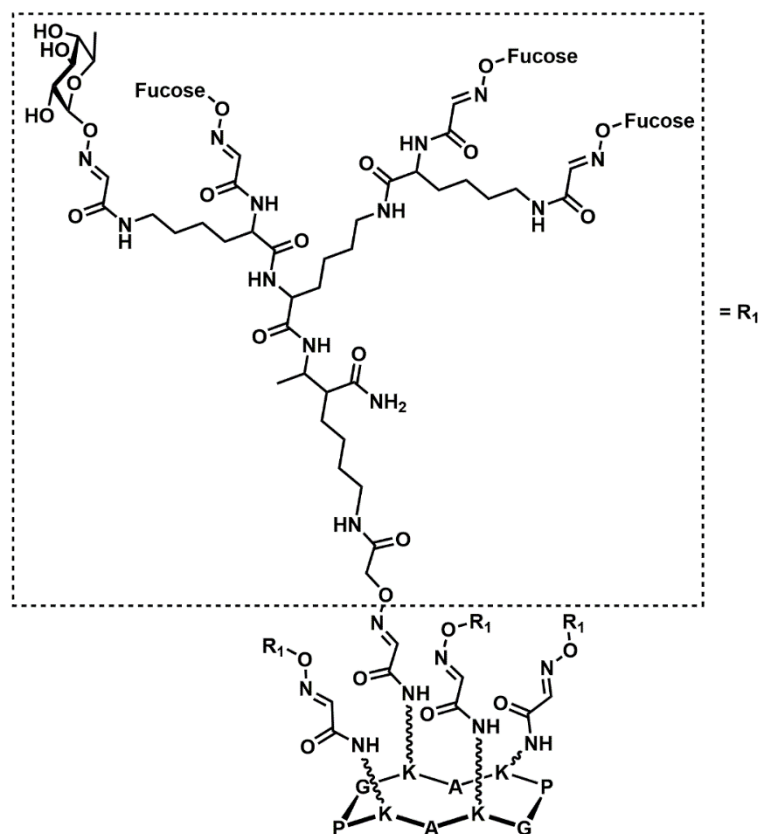


Figure 23. Structure du système dendritique composé de poly-lysines et fonctionnalisé par seize résidus α -fucose

Reconnaissance des intégrines par des motifs RGD. Parmi ces interactions protéine-protéine, la reconnaissance des intégrines par une séquence peptidique RGD a fait l'objet de plusieurs travaux du fait de l'implication de la protéine dans un certain nombre de cancers.^[100] Le motif RGD correspond à la séquence arginine-glycine-aspartate possédant un site de reconnaissance sur la protéine. Les intégrines sont des hétérodimères présents à la surface de la membrane cellulaire. Ces récepteurs de l'adhésion cellulaire ont un rôle dans la fixation à la membrane cellulaire et dans la transduction des signaux vers le milieu intracellulaire. Elles sont ainsi impliquées dans une large proportion de cancers.^[101] Les groupements RGD sont impliqués dans la reconnaissance de la protéine.^[102] Parmi les clusters multivalents construits pour réguler l'activité protéique, des plate-formes de cyclopeptides ont été fonctionnalisées en une seule étape via des ligations click orthogonales (Figure 24). Le motif RGD est lié à la plate-forme grâce à une ligation azoture-alcyne, alors qu'une séquence peptidique R β AD, non reconnu par l'intégrine, est liée par la formation d'une liaison oxime. L'intérêt de la valence du système a ainsi pu être évalué. La face inférieure du châssis a, par la suite, subit une fonctionnalisation, par des peptides, des acides nucléiques ou des sucres dans un intérêt thérapeutique ou encore des fluorophores permettant le diagnostic.^[70a; 103]

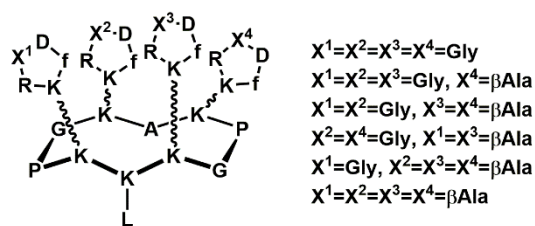


Figure 24. Cyclopeptides tétravalents fonctionnalisés par des motifs RGD ou R β AD et pouvant être fonctionnalisés par un groupement d'intérêt L

B. Clusters multivalents pour l'inhibition enzymatique

Depuis quelques années, des clusters multivalents sont préparés visant à améliorer l'inhibition enzymatique. Un certain nombre d'exemples existent dans la littérature, comme précédemment, un choix non exhaustif est présenté ici.

Une plate-forme fullerène a notamment été impliquée dans la préparation d'inhibiteurs enzymatiques. L'anhydrase carbonique^[104] ainsi que les glycosidases^[105] sont ciblées. Les coumarines ont alors été utilisées pour la fonctionnalisation de plate-forme en C₆₀ pour construire des clusters multivalents (Figure 25).^[104] Ces systèmes complexes génèrent grâce à la multiplicité des ligands liés par ligations click azoture-alcyne, une inhibition plus grande que celle des composés monovalents.

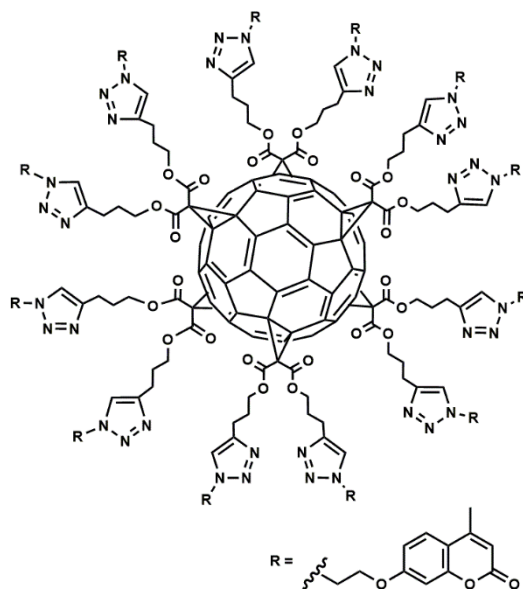


Figure 25. Clusters dodécavalents issus de la fonctionnalisation de plate-formes fullerènes par des ligands coumarines^[104]

En 2013, le squelette C₆₀ a été fonctionnalisé par deux iminosucres via des couplages azoture-alcyne en présence de cuivre.^[105] Ces isomères de positions ont ainsi générés deux macromolécules (Figure 26), actives sur deux cibles distinctes. La première présentant

l'hydroxyle en C2 de l'iminosucre, en position équatoriale, permet d'inhiber les α -glycosidases,^[106] alors que la seconde, cible l' α -mannosidase.^[106a]

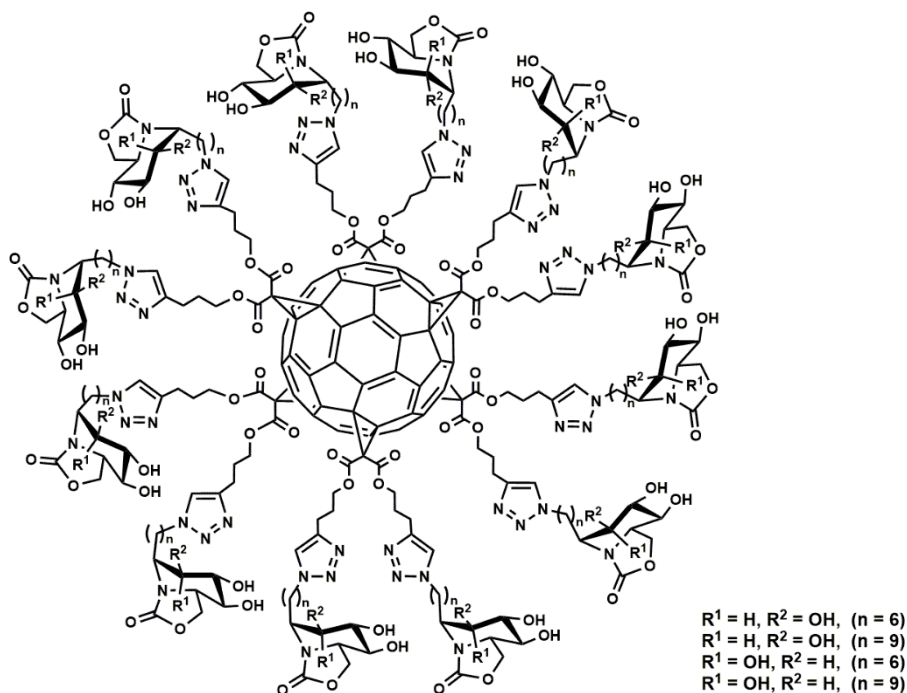


Figure 26. Structures de fullerènes dodécavalents fonctionnalisés par des iminosucres inhibant les α -glycosidase et α -mannosidase sélectivement^[105]

Un certain nombre de travaux tournés vers l'inhibition des glycosidases ont récemment choisi les calixarènes comme châssis pour les iminosucres capables d'entrer en compétition avec les substrats naturels.^[107] En 2013, une étude structurale est effectuée en fonctionnalisant la plate-forme calix[4]arène soit sur sa face étroite, soit alternativement par une substitution 1,3, sur les deux faces (Figure 27).^[108] Ces composés tétravalents ont ensuite été engagés dans des tests d'inhibition sur différentes enzymes. En comparant l'inhibition du système fonctionnalisé sur la face étroite pour la β -galactosidase et l' α -mannosidase de *Canavalia ensiformis* (JbMan), on remarque que le composé présente une activité plus importante pour l' α -mannosidase. La même observation est faite pour le système fonctionnalisé sur ses deux faces, testé sur l'amyloglucosidase, l' α -glucosidase de levure de boulanger et l' α -mannosidase de *Canavalia ensiformis*. La plate-forme fonctionnalisée sur la face supérieure présente quant à elle une moins bonne inhibition. Grâce à ces exemples, il a pu être observé que l'architecture du cluster a un effet important sur l'inhibition enzymatique.

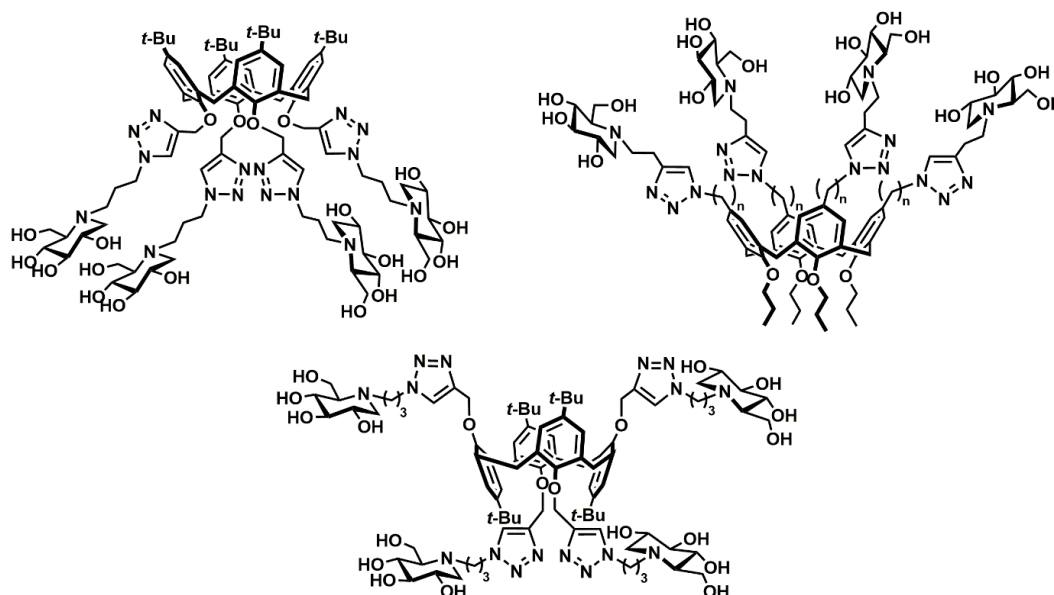


Figure 27. Systèmes tétravalents basés sur la fonctionnalisation de plate-formes calixarènes par des iminosucres destinés à l'inhibition enzymatique des glycosidases

Ces exemples issus de la littérature nous ont permis d'observer l'intérêt indéniable de la multivalence sur la spécificité et la stabilité qu'elle offre lors de la complexation avec des cibles biomoléculaires.

IV. Projet de Recherche

Les exemples précédents démontrent qu'une reconnaissance efficace de biomolécules d'intérêt peut être réalisée en combinant de multiples interactions faibles. Plusieurs systèmes synthétiques multivalents ont alors été développés pour améliorer l'affinité et moduler la sélectivité de reconnaissance. Les travaux présentés dans ce manuscrit visent à développer de nouvelles méthodologies d'accès à des systèmes multivalents ainsi que d'explorer de nouvelles applications.

Le premier volet de ce travail repose sur la conception d'une nouvelle méthodologie dans le but de reproduire un phénomène rencontré de manière ubiquitaire dans les systèmes biologiques : le relargage de la cible. Une approche par auto-assemblage utilisant des ligations click dynamiques est alors proposée pour une application destinée à la reconnaissance et la vectorisation d'oligonucléotides (Figure 28A).

Une seconde stratégie, appliquée au développement d'une nouvelle méthodologie, a été mise en œuvre pour une application qui a fait l'objet d'études depuis quelques années seulement : l'inhibition enzymatique par des clusters multivalents. Les travaux déjà réalisés dans le domaine reposent dans la majorité des cas sur une fonctionnalisation par le biais de ligations azoture-alcynes catalysées au cuivre. Le métal pouvant être à l'origine d'une

toxicité cellulaire, notre approche de synthèse rationnelle repose sur la construction de systèmes multivalents par le biais de ligations sans métaux (Figure 28B).

La reconnaissance des oligonucléotides est un domaine majeur nécessitant le développement de systèmes multivalents, pour permettre une interaction spécifique et efficace pour une séquence d'acide nucléique donnée. La conception de nouveaux châssis stables et fonctionnalisés de manière à générer des interactions secondaires complétant l'appariement de type Watson-Crick, est alors engagée (Figure 28D).

En plus de permettre la préparation de bioconjugués, la maîtrise de diverses ligations click permet d'accéder à des nanostructures complexes. Dans ce contexte, nous nous intéressons à l'utilisation combinée de ligations click sans métaux et de ligations covalentes dynamiques pour générer, par auto-assemblage, des nanostructures de type cages (Figure 28C).

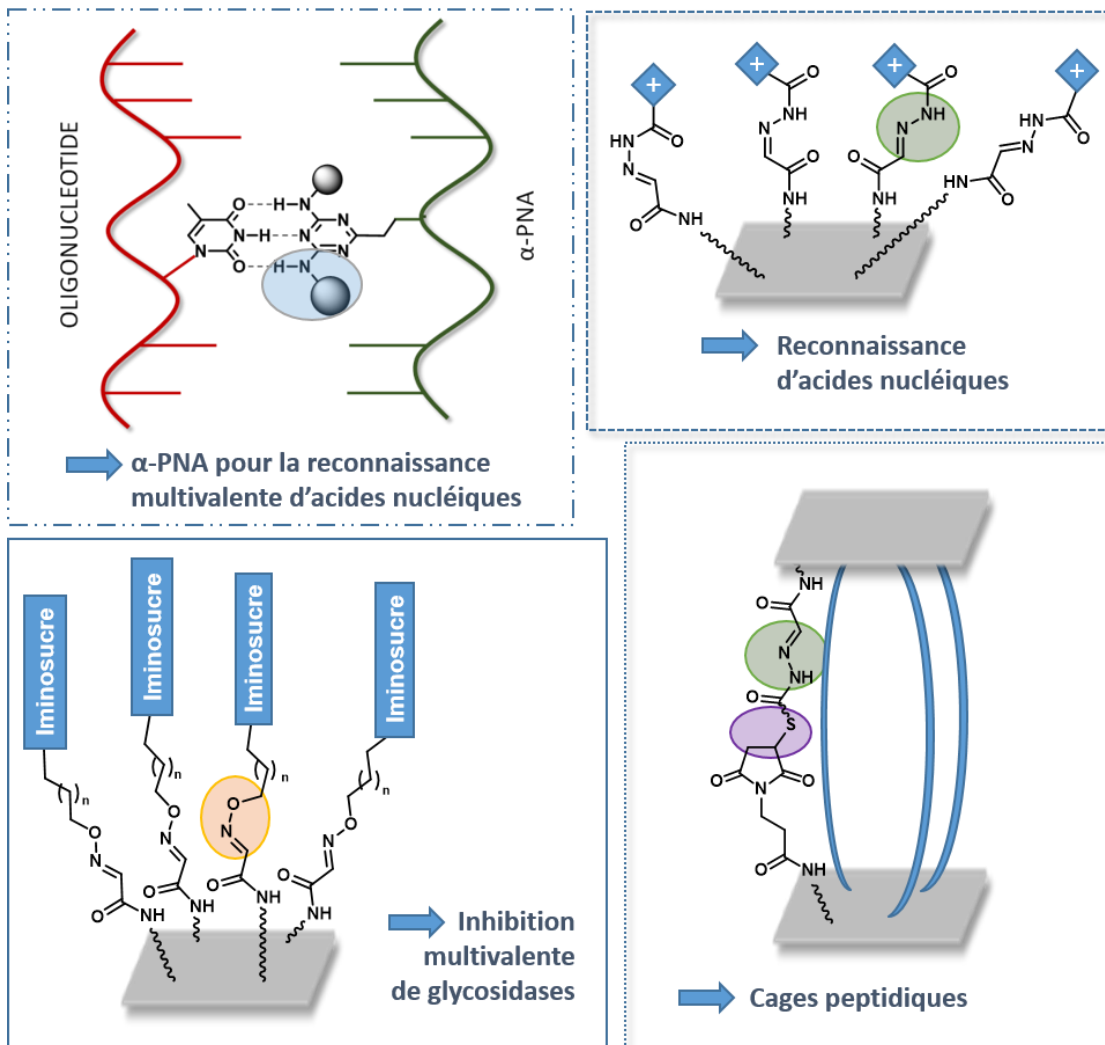


Figure 28. Objectifs des travaux

V. Références

- [1] a) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct, A. Varki, *Glycobiology*, **1993**, 3, 97-130; b) Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors, M. Mammen, S.-K. Choi and G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 2754-2794.
- [2] a) Synthetic polymeric sialoside inhibitors of influenza virus receptor-binding activity, M. N. Matrosovich, L. V. Mochalova, V. P. Marinina, N. E. Byramova and N. V. Bovin, *FEBS Lett.*, **1990**, 272, 209-212; b) Polyacrylamides bearing pendant α -sialoside groups strongly inhibit agglutination of erythrocytes by influenza virus, A. Spaltenstein and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 686-687; c) Polyacrylamides Bearing Pendant α -Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza A Virus: Multivalency and Steric Stabilization of Particulate Biological Systems, W. J. Lees, A. Spaltenstein, J. E. Kingery-Wood and G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37, 3419-3433; d) Polyacrylamides Bearing Pendant α -Sialoside Groups Strongly Inhibit Agglutination of Erythrocytes by Influenza Virus: The Strong Inhibition Reflects Enhanced Binding through Cooperative Polyvalent Interactions, G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 3789-3800; e) Generation and *in Situ* Evaluation of Libraries of Poly(acrylic acid) Presenting Sialosides as Side Chains as Polyvalent Inhibitors of Influenza-Mediated Hemagglutination, S.-K. Choi, M. Mammen and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 4103-4111; f) Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides, G. D. Glick, P. L. Toogood, D. C. Wiley, J. J. Skehel and J. R. Knowles, *J. Biol. Chem.*, **1991**, 266, 23660-23669; g) Molecular recognition of bivalent sialosides by influenza virus, G. D. Glick and J. R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 4701-4703; h) Cluster sialoside inhibitors for influenza virus: synthesis, NMR, and biological studies, S. Sabesan, J. O. Duus, S. Neira, P. Domaille, S. Kelm, J. C. Paulson and K. Bock, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 8363-8375.
- [3] a) New synthetic cluster ligands for galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin of mammalian liver, R. T. Lee, P. Lin and Y. C. Lee, *Biochemistry*, **1984**, 23, 4255-4261; b) Ligand Recognition by E-Selectin: Synthesis, Inhibitory Activity and Conformational Analysis of Bivalent Sialyl Lewis x Analogs, S. A. DeFrees, W. Kosch, W. Way, J. C. Paulson, S. Sabesan, R. L. Halcomb, D.-H. Huang, Y. Ichikawa and C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 66-79; c) Syntheses and some applications of chemically defined multivalent glycoconjugates, R. Roy, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1996**, 6, 692-702; d) Analysis by Surface Plasmon Resonance of the Influence of Valence on the Ligand Binding Affinity and Kinetics of an Anti-carbohydrate Antibody, C. R. MacKenzie, T. Hiram, S.-j. Deng, D. R. Bundle, S. A. Narang and N. M. Young, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 1527-1533; e) Tuning chemotactic responses with synthetic multivalent ligands, J. E. Gestwicki, L. E. Strong and L. L. Kiessling, *Chem. Biol.*, **2000**, 7, 583-591; f) Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions, L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki and L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4, 696-703; g) Chemical Glycobiology, C. R. Bertozzi, Kiessling and L. L., *Science*, **2001**, 291, 2357-2364; h) The Cluster Glycoside Effect, J. J. Lundquist and E. J. Toone, *Chem. Rev.*, **2002**, 102, 555-578; i) Rigidified multivalent lactose molecules and their interactions with mammalian galectins: a route to selective inhibitors, I. Vrasidas, S. Andre, P. Valentini, C. Bock, M. Lensch, H. Kaltner, R. M. J. Liskamp, H.-J. Gabius and R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, 1, 803-810; j) Chemically Defined Sialoside Scaffolds for Investigation of Multivalent Interactions with Sialic Acid Binding Proteins, S. A. Kalovidouris, O. Blixt, A. Nelson, S. Vidal, W. B. Turnbull, J. C. Paulson and J. F. Stoddart, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 8485-8493.
- [4] Supramolecular Chemistry in Water, G. V. Oshovsky, D. N. Reinhoudt and W. Verboom, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 2366-2393.
- [5] Noncovalent Synthesis Using Hydrogen Bonding, L. J. Prins, D. N. Reinhoudt and P. Timmerman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2382-2426.
- [6] Multicomponent metal–ligand self-assembly, W.-Y. Sun, M. Yoshizawa, T. Kusukawa and M. Fujita, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6, 757-764.
- [7] A Supramolecular System for Quantifying Aromatic Stacking Interactions, H. Adams, C. A. Hunter, K. R. Lawson, J. Perkins, S. E. Spey, C. J. Urch and J. M. Sanderson, *Chem. Eur. J.*, **2001**, 7, 4863-4877.
- [8] Multivalency in supramolecular chemistry and nanofabrication, A. Mulder, J. Huskens and D. N. Reinhoudt, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 3409-3424.
- [9] On the attribution and additivity of binding energies, W. P. Jencks, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, 78, 4046-4050.
- [10] Influencing Receptor–Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture, J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen and L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 14922-14933.
- [11] a) Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction, L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki and L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 2348-2368; b) Bacteria clustering by polymers induces the expression of quorum-sensing-controlled phenotypes, L. T. Lui, X. Xue, C. Sui, A. Brown, D. I. Pritchard, N. Halliday, K. Winzer, S. M. Howdle, F. Fernandez-Trillo, N. Krasnogor and C. Alexander, *Nat. Chem.*, **2013**, 5, 1058-1065.
- [12] Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle, C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Kocsch, J. Darnedde, C. Graf, E.-W. Knapp and R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 10472-10498.

- [13] Ligand binding to nucleic acids and proteins: Does selectivity increase with strength?, H.-J. Schneider, *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 2307-2315.
- [14] Binding to protein surfaces by supramolecular multivalent scaffolds, V. Martos, P. Castroño, J. Valero and J. de Mendoza, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, *12*, 698-706.
- [15] Anatomy of hot spots in protein interfaces, A. A. Bogan and K. S. Thorn, *J. Mol. Biol.*, **1998**, *280*, 1-9.
- [16] Probing secondary interactions in biomolecular recognition by dynamic combinatorial chemistry, S. Ulrich and P. Dumy, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 5810-5825.
- [17] Multivalent glycoconjugate syntheses and applications using aromatic scaffolds, Y. M. Chabre and R. Roy, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 4657-4708.
- [18] Targeting protein-protein interactions by rational design: mimicry of protein surfaces, S. Fletcher and A. D. Hamilton, *J. R. Soc. Interface*, **2006**, *3*, 215-233.
- [19] A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy, S. M. Moghimi, P. Symonds, J. C. Murray, A. C. Hunter, G. Debska and A. Szewczyk, *Mol. Ther.*, **2005**, *11*, 990-995.
- [20] a) Self-assembly using dendritic building blocks—towards controllable nanomaterials, D. K. Smith, A. R. Hirst, C. S. Love, J. G. Hardy, S. V. Brignell and B. Huang, *Prog. Polym. Sci.*, **2005**, *30*, 220-293; b) Dendrimers and supramolecular chemistry, J. M. J. Fréchet, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 4782-4787; c) Positively charged phosphorus dendrimers. An overview of their properties, A.-M. Caminade and J.-P. Majoral, *New J. Chem.*, **2013**, *37*, 3358-3373.
- [21] Dendrimers for drug delivery, A.-M. Caminade and C.-O. Turrin, *J. Mater. Chem. B*, **2014**, *2*, 4055-4066.
- [22] a) Carbonic Anhydrase Inhibitor Coated Gold Nanoparticles Selectively Inhibit the Tumor-Associated Isoform IX over the Cytosolic Isozymes I and II, M. Stiti, A. Cecchi, M. Rami, M. Abdaoui, V. Barragan-Montero, A. Scozzafava, Y. Guari, J.-Y. Winum and C. T. Supuran, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16130-16131; b) Inhibition of HIV Fusion with Multivalent Gold Nanoparticles, M.-C. Bowman, T. E. Ballard, C. J. Ackerson, D. L. Feldheim, D. M. Margolis and C. Melander, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 6896-6897.
- [23] Ultrasmall c(RGDyK)-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles and Their Specific Targeting to Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rich Tumor Cells, J. Xie, K. Chen, H.-Y. Lee, C. Xu, A. R. Hsu, S. Peng, X. Chen and S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 7542-7543.
- [24] a) Fluorescent Silica Nanoparticles with Multivalent Inhibitory Effects towards Carbonic Anhydrases, N. Touisni, N. Kanfar, S. Ulrich, P. Dumy, C. T. Supuran, A. Mehdi and J.-Y. Winum, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 10306-10309; b) Oxime Ligation on the Surface of Mesoporous Silica Nanoparticles, D. P. Ferris, P. R. McGonigal, L. S. Witus, T. Kawaji, M. M. Algaradah, A. R. Alnajadah, M. S. Nassar and J. F. Stoddart, *Org. Lett.*, **2015**, *17*, 2146-2149.
- [25] Modulating the Therapeutic Activity of Nanoparticle Delivered Paclitaxel by Manipulating the Hydrophobicity of Prodrug Conjugates, S. M. Ansell, S. A. Johnstone, P. G. Tardi, L. Lo, S. Xie, Y. Shu, T. O. Harasym, N. L. Harasym, L. Williams, D. Bermudes, B. D. Liboiron, W. Saad, R. K. Prud'homme and L. D. Mayer, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 3288-3296.
- [26] a) Rational design of cationic cyclooligosaccharides as efficient gene delivery systems, A. Diaz-Moscoso, P. Balbuena, M. Gomez-Garcia, C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, L. Le Gourrierc, C. Di Giorgio, P. Vierling, A. Mazzaglia, N. Micali, J. Defaye and J. M. Garcia Fernandez, *Chem. Commun.*, **2008**, 2001-2003; b) Insights in cellular uptake mechanisms of pDNA-polycationic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles (CDplexes), A. Díaz-Moscoso, D. Vercauteren, J. Rejman, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, S. C. De Smedt and J. M. G. Fernández, *J. Controlled Release*, **2010**, *143*, 318-325.
- [27] Hydroxycamptothecin-loaded nanoparticles enhance target drug delivery and anticancer effect, A. Wang and S. Li, *BMC Biotechnol.*, **2008**, *8*, 46-46.
- [28] a) Fullerene-porphyrin architectures; photosynthetic antenna and reaction center models, D. M. Guldi, *Chem. Soc. Rev.*, **2002**, *31*, 22-36; b) Giant Multiporphyrin Arrays as Artificial Light-Harvesting Antennas, H. Imahori, *The Journal of Physical Chemistry B*, **2004**, *108*, 6130-6143; c) Fullerene-(π -conjugated oligomer) dyads as active photovoltaic materials, J.-F. Nierengarten, *Solar Energy Materials and Solar Cells*, **2004**, *83*, 187-199; d) Chemical modification of C₆₀ for materials science applications, J.-F. Nierengarten, *New J. Chem.*, **2004**, *28*, 1177-1191; e) Materials for organic solar cells: the C₆₀/ π -conjugated oligomer approach, J. L. Segura, N. Martin and D. M. Guldi, *Chem. Soc. Rev.*, **2005**, *34*, 31-47; f) Molecular and supramolecular C₆₀-oligophenylenevinylene conjugates, T. M. Figueira-Duarte, A. Gegout and J.-F. Nierengarten, *Chem. Commun.*, **2007**, 109-119.
- [29] a) Medicinal chemistry with fullerenes and fullerene derivatives, T. Da Ros and M. Prato, *Chem. Commun.*, **1999**, 663-669; b) Functionalized Fullerenes in Water. The First 10 Years of Their Chemistry, Biology, and Nanoscience, E. Nakamura and H. Isobe, *Acc. Chem. Res.*, **2003**, *36*, 807-815; c) 1,2-Dihydro-4-quinazolinamines: Potent, Highly Selective Inhibitors of Inducible Nitric Oxide Synthase Which Show Antiinflammatory Activity in Vivo, A. C. Tinker, H. G. Beaton, N. Boughton-Smith, S. L. Cooper, L. Fraser-Rae, K. Hallam, P. Hamley, T. McNally, D. J. Nicholls, A. D. Pimm and A. V. Wallace, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 913-916.
- [30] Supramolecular Chemistry of p-Sulfonatocalix[n]arenes and Its Biological Applications, D.-S. Guo and Y. Liu, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 1925-1934.
- [31] a) Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host-Guest Interactions, X. Ma and Y. Zhao, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 7794-7839; b) Protein surface recognition by calixarenes, R. Zadmand and N. S. Alavijeh, *RSC Adv.*, **2014**, *4*, 41529-41542.
- [32] Cyclodextrins, S. V. Kurkov and T. Loftsson, *International Journal of Pharmaceutics*, **2013**, *453*, 167-180.

- [33] Sur la fermentation de la fécula par l'action du ferment butyrique, A. Villiers, *C. R. Acad. Sci.*, **1891**, 112, 536.
- [34] Synthesis and inclusion ability of a bis- β -cyclodextrin pseudo-cryptand towards Busulfan anticancer agent, S. Manuel, J.-P. Joly, B. Courcot, J. Elysée, N.-E. Ghermani and A. Marsura, *Tetrahedron*, **2007**, 63, 1706-1714.
- [35] Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation, T. Irie and K. Uekama, *J. Pharm. Sci.*, **1997**, 86, 147-162.
- [36] a) Host-Guest-Mediated DNA Templatation of Polycationic Supramolecules for Hierarchical Nanocondensation and the Delivery of Gene Material, L. Gallego-Yerga, L. Blanco-Fernández, K. Urbiola, T. Carmona, G. Marcelo, J. M. Benito, F. Mendicuti, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet and J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.*, **2015**, 21, 12093-12104; b) Precision Templating with DNA of a Virus-like Particle with Peptide Nanostructures, Y. Ruff, T. Moyer, C. J. Newcomb, B. Demeler and S. I. Stupp, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 6211-6219; c) Programmable multivalent display of receptor ligands using peptide nucleic acid nanoscaffolds, E. A. Englund, D. Wang, H. Fujigaki, H. Sakai, C. M. Micklitsch, R. Ghirlando, G. Martin-Manso, M. L. Pendrak, D. D. Roberts, S. R. Durell and D. H. Appella, *Nat. Commun.*, **2012**, 3, 614.
- [37] a) Protein design: novel metal-binding sites, L. Regan, *Trends in Biochemical Sciences*, **1995**, 20, 280-285; b) Protein design: On the threshold of functional properties, G. Tukscherer, L. Scheibler, P. Dumy and M. Mutter, *Peptide Science*, **1998**, 47, 63-73; c) Synthetic peptides as models for ion channel proteins, K. S. Akerfeldt, J. D. Lear, Z. R. Wasserman, L. A. Chung and W. F. DeGrado, *Acc. Chem. Res.*, **1993**, 26, 191-197; d) Toward the Synthesis of a Photosynthetic Reaction Center Maquette: A Cofacial Porphyrin Pair Assembled between Two Subunits of a Synthetic Four-Helix Bundle Multiheme Protein, F. Rabanal, W. F. DeGrado and P. L. Dutton, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 473-474.
- [38] Templates That Induce α -Helical, β -Sheet, and Loop Conformations, J. P. Schneider and J. W. Kelly, *Chem. Rev.*, **1995**, 95, 2169-2187.
- [39] a) A New Model for the Presentation of Tumor-Associated Antigens and the Quest for an Anticancer Vaccine: A Solution to the Synthesis Challenge via Ring-Closing Metathesis, I. Jeon, D. Lee, I. J. Krauss and S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 14337-14344; b) A convenient synthesis of cyclic peptides as regioselectively addressable functionalized templates (RAFT), P. Dumy, I. M. Eggleston, S. Cervigni, U. Sila, X. Sun and M. Mutter, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 1255-1258.
- [40] Solution structure of regioselectively addressable functionalized templates: An NMR and restrained molecular dynamics investigation, P. Dumy, I. M. Eggleston, G. Esposito, S. Nicula and M. Mutter, *Biopolymers*, **1996**, 39, 297-308.
- [41] Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, H. C. Kolb, M. G. Finn and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004-2021.
- [42] a) Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation, Craig S. McKay and M. G. Finn, *Chem. Biol.*, **2014**, 21, 1075-1101; b) Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry, D. M. Patterson, L. A. Nazarova and J. A. Prescher, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, 9, 592-605; c) Developments in the Field of Bioorthogonal Bond Forming Reactions—Past and Present Trends, M. King and A. Wagner, *Bioconjug. Chem.*, **2014**, 25, 825-839.
- [43] a) 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future, R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1963**, 2, 565-598; b) Bioorthogonal chemistry: recent progress and future directions, R. K. V. Lim and Q. Lin, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 1589-1600.
- [44] a) A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes, V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599; b) Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides, C. W. Tornøe, C. Christensen and M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057-3064.
- [45] Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition, Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless and M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 3192-3193.
- [46] Cu-Catalyzed Alkyne-Azide "Click" Cycloadditions from a Mechanistic and Synthetic Perspective, V. D. Bock, H. Hiemstra and J. H. van Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 2006, 51-68.
- [47] a) Viability study of HL60 cells in contact with commonly used microchip materials, F. Wolbers, P. ter Braak, S. Le Gac, R. Luttge, H. Andersson, I. Vermes and A. van den Berg, *ELECTROPHORESIS*, **2006**, 27, 5073-5080; b) Profiling Enzyme Activities In Vivo Using Click Chemistry Methods, A. E. Speers and B. F. Cravatt, *Chem. Biol.*, **2004**, 11, 535-546; c) Cellular Lipid Metabolism Is Influenced by the Coordination Environment of Copper, D. C. Kennedy, R. K. Lyn and J. P. Pezacki, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 2444-2445.
- [48] Recent applications of thiol-ene coupling as a click process for glycoconjugation, A. Dondoni and A. Marra, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, 573-586.
- [49] Organocatalytic Asymmetric Sulfa-Michael/Michael Addition Reactions: A Strategy for the Synthesis of Highly Substituted Chromans with a Quaternary Stereocenter, X.-F. Wang, Q.-L. Hua, Y. Cheng, X.-L. An, Q.-Q. Yang, J.-R. Chen and W.-J. Xiao, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 8379-8383.
- [50] a) Thiol-ene "click" reactions and recent applications in polymer and materials synthesis, A. B. Lowe, *Polym. Chem.*, **2010**, 1, 17-36; b) The Emergence of Thiol-Ene Coupling as a Click Process for Materials and Bioorganic Chemistry, A. Dondoni, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 8995-8997.

- [51] Glycoside and peptide clustering around the octasilsesquioxane scaffold via photoinduced free-radical thiol-ene coupling. The observation of a striking glycoside cluster effect, M. Lo Conte, S. Staderini, A. Chambery, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet, A. Marra and A. Dondoni, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 3269-3277.
- [52] Single and dual glycoside clustering around calix[4]arene scaffolds via click thiol-ene coupling and azide-alkyne cycloaddition, M. Fiore, A. Chambery, A. Marra and A. Dondoni, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3910-3913.
- [53] Multivalent Functionalization of Cyclodextrins by Photochemical Thiol-Ene Addition Reaction, M. M. Becker, Z. Zeng and B. J. Ravoo, *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, *2013*, 6831-6843.
- [54] Thiol-Ene Click Chemistry, C. E. Hoyle and C. N. Bowman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1540-1573.
- [55] Template-directed synthesis: use of a reversible reaction, J. T. Goodwin and D. G. Lynn, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 9197-9198.
- [56] Biocatalytic Imine Reduction and Reductive Amination of Ketones, J. H. Schrittwieser, S. Velikogne and W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.*, **2015**, *357*, 1655-1685.
- [57] a) A Dynamic Combinatorial Approach for Identifying Side Groups that Stabilize DNA-Templated Supramolecular Self-Assemblies, D. Paolantoni, S. Cantel, P. Dumy and S. Ulrich, *International Journal of Molecular Sciences*, **2015**, *16*, 3609; b) Dynamic Combinatorial Chemistry, P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J.-L. Wietor, J. K. M. Sanders and S. Otto, *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 3652-3711.
- [58] The alpha effect. A review, N. J. Fina and J. O. Edwards, *International Journal of Chemical Kinetics*, **1973**, *5*, 1-26.
- [59] Oxime Ligation: A Chemoselective Click-Type Reaction for Accessing Multifunctional Biomolecular Constructs, S. Ulrich, D. Boturnyn, A. Marra, O. Renaudet and P. Dumy, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 34-41.
- [60] Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes, J. Kalia and R. T. Raines, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 7523-7526.
- [61] Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 475-481.
- [62] α -Oxo Aldehyde or Glyoxylyl Group Chemistry in Peptide Bioconjugation, O. El-Mahdi and O. Melnyk, *Bioconjug. Chem.*, **2013**, *24*, 735-765.
- [63] a) Bioorthogonal oxime ligation mediated in vivo cancer targeting, L. Tang, Q. Yin, Y. Xu, Q. Zhou, K. Cai, J. Yen, L. W. Dobrucki and J. Cheng, *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 2182-2186; b) Biomolecular assembly by iterative oxime ligations, O. Renaudet, D. Boturnyn and P. Dumy, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 3880-3883.
- [64] Thiol-maleimide "click" chemistry: evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and selectivity, B. H. Northrop, S. H. Frayne and U. Choudhary, *Polym. Chem.*, **2015**, *6*, 3415-3430.
- [65] Selective Irreversible Chemical Tagging of Cysteine with 3-Arylpropionitriles, O. Koniev, G. Leriche, M. Nothisen, J.-S. Remy, J.-M. Strub, C. Schaeffer-Reiss, A. Van Dorselaer, R. Baati and A. Wagner, *Bioconjug. Chem.*, **2014**, *25*, 202-206.
- [66] Disulfide exchange: exposing supramolecular reactivity through dynamic covalent chemistry, S. P. Black, J. K. M. Sanders and A. R. Stefankiewicz, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 1861-1872.
- [67] a) Synthesis of Glycocyclopeptides by Click Chemistry and Inhibition Assays with Lectins, I. Bossu, N. Berthet, P. Dumy and O. Renaudet, *J. Carbohydr. Chem.*, **2011**, *30*, 458-468; b) One-Pot Approach to Well-Defined Biomolecular Assemblies by Orthogonal Chemoselective Ligations, M. Galibert, P. Dumy and D. Boturnyn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 2576-2579; c) Oligonucleotide Sequential Bis-Conjugation via Click-Oxime and Click-Huisgen Procedures, A. Meyer, N. Spinelli, P. Dumy, J.-J. Vasseur, F. Morvan and E. Defrancq, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 3927-3930; d) Synthesis of heteroglycoclusters by using orthogonal chemoselective ligations, B. Thomas, M. Fiore, I. Bossu, P. Dumy and O. Renaudet, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2012**, *8*, 421-427.
- [68] Highly Efficient Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates: Chemoselective Oxime and Thiazolidine Formation, D. Forget, D. Boturnyn, E. Defrancq, J. Lhomme and P. Dumy, *Chem. Eur. J.*, **2001**, *7*, 3976-3984.
- [69] Tandem Ligation of Unprotected Peptides through Thiaproyl and Cysteinyll Bonds in Water, J. P. Tam, Q. Yu and J.-L. Yang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 2487-2494.
- [70] a) Access to Biomolecular Assemblies through One-Pot Triple Orthogonal Chemoselective Ligations, M. Galibert, O. Renaudet, P. Dumy and D. Boturnyn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 1901-1904; b) A multi-ligation strategy for the synthesis of heterofunctionalized glycosylated scaffolds, B. Thomas, M. Fiore, G. C. Daskhan, N. Spinelli and O. Renaudet, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 5436-5439.
- [71] Multivalent glyco(cyclo)peptides, M. C. Galan, P. Dumy and O. Renaudet, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 4599-4612.
- [72] Biomolecular Assemblies Combining Two Orthogonal Copper-Mediated Ligations in a One-Pot Reaction, A. Grassin, M. Claron and D. Boturnyn, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 6022-6026.
- [73] a) Copper(II) mediated facile and ultra fast peptide synthesis in methanol, S. M. Mali, S. V. Jadhav and H. N. Gopi, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 7085-7087; b) Rapid Formation of N-Glycopeptides via Cu(II)-Promoted Glycosylative Ligation, R. Joseph, F. B. Dyer and P. Garner, *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 732-735.
- [74] Thioacids Mediated Selective and Mild N-Acylation of Amines, S. M. Mali, R. D. Bhaire and H. N. Gopi, *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 5550-5555.
- [75] a) Molecular Recognition: Use of Metal-Containing Molecular Clefts for Supramolecular Self-Assembly and Host-Guest Formation, J. D. Crowley and B. Bosnich, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2005**, *2005*, 2015-2025; b)

- Chemical complexity-supramolecular self-assembly of synthetic and biological building blocks in water, J. M. Zayed, N. Nouvel, U. Rauwald and O. A. Scherman, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 2806-2816.
- [76] Self-Assembled Multivalency: Dynamic Ligand Arrays for High-Affinity Binding, A. Barnard and D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 6572-6581.
- [77] a) Supramolecular chemical biology; bioactive synthetic self-assemblies, K. Petkau-Milroy and L. Brunsveld, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 219-232; b) Combining supramolecular chemistry with biology, D. A. Uhlenheuer, K. Petkau and L. Brunsveld, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 2817-2826.
- [78] Multivalency and Cooperativity in Supramolecular Chemistry, J. D. Badjić, A. Nelson, S. J. Cantrill, W. B. Turnbull and J. F. Stoddart, *Acc. Chem. Res.*, **2005**, *38*, 723-732.
- [79] a) Mechanosensitive Self-Replication Driven by Self-Organization, J. M. A. Carnall, C. A. Waudby, A. M. Belenguer, M. C. A. Stuart, J. J.-P. Peyralans and S. Otto, *Science*, **2010**, *327*, 1502-1506; b) Self-Assembling Multivalency – Supramolecular Polymers Assembled from Monovalent Mannose-Labelled Discotic Molecules, K. Petkau-Milroy and L. Brunsveld, *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, *2013*, 3470-3476.
- [80] a) Construction, Substitution, and Sorting of Metallo-organic Structures via Subcomponent Self-Assembly, J. R. Nitschke, *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 103-112; b) DNA Recognition by Synthetic Constructs, E. Pazos, J. Mosquera, M. E. Vázquez and J. L. Mascareñas, *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 1958-1973; c) Generation of [2x2] Grid Metallosupramolecular Architectures from Preformed Ditopic Bis(acylhydrazone) Ligands and through Component Self-Assembly, X.-Y. Cao, J. Harrowfield, J. Nitschke, J. Ramírez, A.-M. Stadler, N. Kyritsakas-Gruber, A. Madalan, K. Rissanen, L. Russo, G. Vaughan and J.-M. Lehn, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2007**, *2007*, 2944-2965; d) Self-organization by selection: Generation of a metallosupramolecular grid architecture by selection of components in a dynamic library of ligands, J. R. Nitschke and J.-M. Lehn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 11970-11974.
- [81] Dynamic Multivalency for Carbohydrate-Protein Recognition through Dynamic Combinatorial Libraries Based on Fell-Bipyridine Complexes, P. Reeh and J. de Mendoza, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 5259-5262.
- [82] Artificial Metalloglycoclusters: Compact Saccharide Shell to Induce High Lectin Affinity as Well as Strong Luminescence, T. Hasegawa, T. Yonemura, K. Matsuura and K. Kobayashi, *Bioconjug. Chem.*, **2003**, *14*, 728-737.
- [83] Multivalency by Self-Assembly: Binding of Concanavalin A to Metallosupramolecular Architectures Decorated with Multiple Carbohydrate Groups, M. J. Chmielewski, E. Buhler, J. Candau and J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 6960-6977.
- [84] Substrate-Initiated Synthesis of Cell-Penetrating Poly(disulfide)s, E.-K. Bang, G. Gasparini, G. Molinard, A. Roux, N. Sakai and S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 2088-2091.
- [85] Dynamic Covalent Chemistry, S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders and J. F. Stoddart, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 898-952.
- [86] a) Generation of novel DNA-binding compounds by selection and amplification from self-assembled combinatorial libraries, B. Klekota, M. H. Hammond and B. L. Miller, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 8639-8642; b) Templated Ligand Assembly by Using G-Quadruplex DNA and Dynamic Covalent Chemistry, A. M. Whitney, S. Ladame and S. Balasubramanian, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 1143-1146.
- [87] Dynamic combinatorial chemistry: on the road to fulfilling the promise, S. Ladame, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 219-226.
- [88] Dynamic Combinatorial Libraries: From Exploring Molecular Recognition to Systems Chemistry, J. Li, P. Nowak and S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 9222-9239.
- [89] a) Diastereoselective Amplification of an Induced-Fit Receptor from a Dynamic Combinatorial Library, P. T. Corbett, L. H. Tong, J. K. M. Sanders and S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 8902-8903; b) Salt-Induced Adaptation of a Dynamic Combinatorial Library of Pseudopeptidic Macrocycles: Unraveling the Electrostatic Effects in Mixed Aqueous Media, J. Atcher, A. Moure, J. Bujons and I. Alfonso, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 6869-6878.
- [90] a) DNA Analysis by Dynamic Chemistry, F. R. Bowler, J. J. Diaz-Mochon, M. D. Swift and M. Bradley, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 1809-1812; b) Discovery of potent inhibitors of human β -tryptase from pre-equilibrated dynamic combinatorial libraries, Q.-Q. Jiang, W. Sicking, M. Ehlers and C. Schmuck, *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 1792-1800; c) Use of Dynamic Combinatorial Chemistry for the Identification of Covalently Appended Residues that Stabilize Oligonucleotide Complexes, A. Bugaut, J.-J. Toulmé and B. Rayner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 3144-3147; d) Templating carbohydrate-functionalised polymer-scaffolded dynamic combinatorial libraries with lectins, C. S. Mahon, M. A. Fascione, C. Sakonsinsiri, T. E. McAllister, W. Bruce Turnbull and D. A. Fulton, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 2756-2761.
- [91] Selection and Amplification of Hosts From Dynamic Combinatorial Libraries of Macrocyclic Disulfides, S. Otto, R. L. E. Furlan and J. K. M. Sanders, *Science*, **2002**, *297*, 590-593.
- [92] DNA-templated assembly of dyes and extended pi-conjugated systems, A. Ruiz-Carretero, P. G. A. Janssen, A. Kaeser and A. Schenning, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 4340-4347.
- [93] a) De Novo Protein Surface Design: Use of Cation- π Interactions to Enhance Binding between an α -Helical Peptide and a Cationic Molecule in 50 % Aqueous Solution, B. P. Orner, X. Salvatella, J. Sánchez Quesada, J. de Mendoza, E. Giral and A. D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 117-119; b) A Tetraguanidinium Ligand Binds to the Surface of the Tetramerization Domain of Protein P53, X. Salvatella, M. Martinell, M. Gairí, M. G. Mateu, M. Feliz, A. D. Hamilton, J. de Mendoza and E. Giral, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 196-198.

- [94] Stability and structural recovery of the tetramerization domain of p53-R337H mutant induced by a designed templating ligand, S. Gordo, V. Martos, E. Santos, M. Menéndez, C. Bo, E. Giralt and J. de Mendoza, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, 16426-16431.
- [95] Design of growth factor antagonists with antiangiogenic and antitumor properties, S. M. Sebti and A. D. Hamilton, *Oncogene*, **2000**, *19*, 6566-6573.
- [96] Structure-activity studies on a library of potent calix[4]arene-based PDGF antagonists that inhibit PDGF-stimulated PDGFR tyrosine phosphorylation, H. Zhou, D.-a. Wang, L. Baldini, E. Ennis, R. Jain, A. Carie, S. M. Sebti and A. D. Hamilton, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 2376-2386.
- [97] a) Functionalisation of gold surfaces via topological templates, L. Scheibler, P. Dumy, D. Stamou, C. Duschl, H. Vogel and M. Mutter, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 3725-3734; b) Randomized Combinatorial Library of Heteroglycoclusters (hGC), V. Duléry, O. Renaudet, M. Wilczewski, A. Van der Heyden, P. Labbé and P. Dumy, *Journal of Combinatorial Chemistry*, **2008**, *10*, 368-371; c) Chemoselectively Template-Assembled Glycoconjugates as Mimics for Multivalent Presentation of Carbohydrates, O. Renaudet and P. Dumy, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 243-246.
- [98] Tetravalent glycocyclopeptide with nanomolar affinity to wheat germ agglutinin, M. Fiore, N. Berthet, A. Marra, E. Gillon, P. Dumy, A. Dondoni, A. Imberty and O. Renaudet, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 7113-7122.
- [99] a) High Affinity Glycodendrimers for the Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*, N. Berthet, B. Thomas, I. Bossu, E. Dufour, E. Gillon, J. Garcia, N. Spinelli, A. Imberty, P. Dumy and O. Renaudet, *Bioconjug. Chem.*, **2013**, *24*, 1598-1611; b) Dendri-RAFTs: a second generation of cyclopeptide-based glycoclusters, I. Bossu, M. Sulc, K. Krenek, E. Dufour, J. Garcia, N. Berthet, P. Dumy, V. Kren and O. Renaudet, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 1948-1959.
- [100] RAFT Nano-constructs: surfing to biological applications, D. Boturnyn, E. Defrancq, G. T. Dolphin, J. Garcia, P. Labbe, O. Renaudet and P. Dumy, *J. Pept. Sci.*, **2008**, *14*, 224-240.
- [101] Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities, J. S. Desgrosellier and D. A. Cheresh, *Nat. Rev. Cancer*, **2010**, *10*, 9-22.
- [102] a) Ligand Binding to Integrins, E. F. Plow, T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus and J. W. Smith, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 21785-21788; b) RGD and other recognition sequences for integrins, E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **1996**, *12*, 697-715.
- [103] Application of click-click chemistry to the synthesis of new multivalent RGD conjugates, M. Galibert, L. Sancey, O. Renaudet, J.-L. Coll, P. Dumy and D. Boturnyn, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 5133-5138.
- [104] Exploring carbonic anhydrase inhibition with multimeric coumarins displayed on a fullerene scaffold, M. Abellan-Flos, M. Tanc, C. T. Supuran and S. P. Vincent, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 7445-7451.
- [105] Glycosidase Inhibition with Fullerene Iminosugar Balls: A Dramatic Multivalent Effect, P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet and J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 5753-5756.
- [106] a) Generalized Anomeric Effect in gem-Diamines: Stereoselective Synthesis of α -N-Linked Disaccharide Mimics, E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, C. O. Mellet and J. M. García Fernández, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 3306-3309; b) sp²-Iminosugar O-, S-, and N-Glycosides as Conformational Mimics of α -Linked Disaccharides; Implications for Glycosidase Inhibition, E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, P. M. Nieto and J. Angulo, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 8527-8539.
- [107] a) Low-generation dendrimers with a calixarene core and based on a chiral C₂-symmetric pyrrolidine as iminosugar mimics, M. Marradi, S. Cicchi, F. Sansone, A. Casnati and A. Goti, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2012**, *8*, 951-957; b) Synthesis and biological properties of multivalent iminosugars, R. Zelli, J.-F. Longevial, P. Dumy and A. Marra, *New J. Chem.*, **2015**, *39*, 5050-5074.
- [108] Topological Effects and Binding Modes Operating with Multivalent Iminosugar-Based Glycoclusters and Mannosidases, Y. Brissonnet, C. Ortiz Mellet, S. Morandat, M. I. Garcia Moreno, D. Deniaud, S. E. Matthews, S. Vidal, S. Šesták, K. El Kirat and S. G. Gouin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 18427-18435.

Chapitre 2

***Reconnaissance multivalente d'ADN
par des systèmes biomoléculaires
auto-assemblés***

Chapitre 2 : Reconnaissance multivalente d'ADN par des systèmes biomoléculaires auto-assemblés

I. Contexte	38
A. <i>L'acide désoxyribonucléique</i>	38
B. <i>Reconnaissance de l'ADN</i>	39
1. Les agents intercalants	41
2. Les agents alkylants.....	42
3. Les agents d'interaction dans les petits et grands sillons.....	42
C. <i>Multivalence auto-assemblée</i>	44
1. Auto-assemblage assisté par un effet template de l'ADN	45
2. Auto-assemblage pour la reconnaissance de l'ADN	46
3. Système covalent dynamique pour la reconnaissance d'ADN	47
D. <i>Positionnement du projet</i>	47
II. Complexation dynamique de l'ADN par des clusters auto-assemblés	48
A. <i>Conception</i>	48
B. <i>Synthèse et préparation des composés</i>	48
1. Synthèse de la plate-forme peptidique cRAFT(ALD)₄	48
2. Synthèse de l'hydrazide L-ArgHyd en phase liquide.....	55
3. Préparation des clusters.....	57
C. <i>Etude de la complexation des clusters hydrazones (cRAFT(Hyd)₄)</i>	62
1. Etude par spectrométrie de masse MALDI-ToF.....	62
2. Etude par test de déplacement de bromure d'éthidium.....	64
a. <i>Sur cluster préformé</i>	65
b. <i>Par auto-assemblage du complexe</i>	67
3. Etude par électrophorèse sur gel.....	69
4. Etude par Titration Calorimétrique Isotherme	70
5. Etude par Microscopie Electronique à Transmission	71
D. <i>Etude d'une bibliothèque combinatoire dynamique</i>	72
1. HPLC	72
2. Etude par test de déplacement de Bromure d'éthidium	78
E. <i>Etude cinétique de formation des clusters</i>	81
F. <i>Modulation de la reconnaissance d'ADN par échange des ligands</i>	82
1. HPLC	82
2. Etude par test de déplacement de bromure d'éthidium.....	85
III. Conclusion	87
IV. Références	88

I. Contexte

A. L'acide désoxyribonucléique

L'ADN est un acide nucléique porteur du code génétique de tout être vivant. Ce double brin est organisé autour d'un enchaînement de bases nucléiques de type adénine (A), thymine (T), cytosine (C) et guanine (G) portées par les désoxyriboses, eux-mêmes liés les uns aux autres par des liaisons 5'-3' phosphodiester. On parle alors de structure primaire pour décrire cet enchaînement nucléotidique. L'adénine et la guanine appartiennent à la famille des purines alors que la thymine et la cytosine sont des pyrimidines. Chacune de ces bases présente des capacités de reconnaissance spécifique pour un nucléoside complémentaire appartenant à l'autre famille. Ainsi, l'adénine s'hybride spécifiquement via deux liaisons hydrogènes de type Watson-Crick avec la thymine alors que la cytosine présente un meilleur potentiel de complexation avec la guanine en créant trois liaisons (Figure 1).

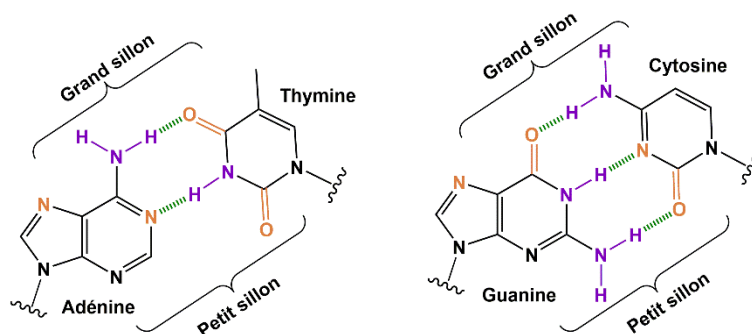


Figure 1. Appariement des bases adénine-thymine (gauche) et guanine-cytosine (droite) selon Watson-Crick. Les groupements donneurs de liaisons hydrogènes sont représentés en violet, les fonctions acceptrices sont oranges et les liaisons hydrogènes sont vertes

L'oligonucléotide ainsi créé s'organise autour de deux brins hybridés de manière antiparallèle selon une double hélice. La structure se caractérise par une charge négative due à la présence des phosphodiester sur sa surface extérieure. L'hydrophobie de l'intérieur de l'hélice s'explique quant à elle par l'arrangement des bases nucléiques. Les bases s'organisent dans un plan perpendiculaire à l'axe de l'hélice et stabilisent alors le duplex par des interactions d'empilement. Le double brin ainsi formé peut s'orienter sous diverses formes : A, B ou encore Z pour les plus connues (Figure 2), mais de nombreuses autres conformations synthétiques ont vu le jour.^[1]

La forme B est la plus commune dans le monde du vivant. Watson et Crick ont décrit sa structure sous la forme d'une hélice orientée vers la droite et l'analyse aux rayons X a permis de déterminer une distance de 3,4 Å entre chaque base d'un même brin.^[2] Un tour complet d'hélice nécessite 10 bases, on parle de pas d'hélice. Cette forme se caractérise également par la présence d'un grand et d'un petit sillon du fait de l'absence d'une orientation

diamétralement opposée des liaisons osidiques du squelette. La forme B est une hélice droite. La forme A est également une hélice droite mais elle est compactée. Elle est observée lorsque la quantité d'eau de solvation du milieu n'est pas suffisante. Le pas d'hélice la caractérisant atteint 11 paires de bases. L'existence *in vivo* de ce polymorphisme structurale n'est pas confirmée jusqu'à présent même s'il a été démontré que des séquences d'ADN partiellement déshydratées adoptent une configuration de type A dans des conditions physiologiques particulières. La troisième structure, la forme Z, est une hélice gauche qui repose sur la répétition successive d'une séquence pyrimidine - purine. Elle est plus étroite avec un diamètre de 18,4 Å par rapport aux 23,7 Å de la forme B et allongée avec 12 paires de bases nécessaires pour effectuer un tour d'hélice. Ces caractéristiques s'expliquent par une rotation à 180° des liaisons *N*-glycosidiques des bases guanines par rapport à leur conformation dans la forme B. Le cycle purique est ainsi dans la forme *syn* au lieu de la conformation *anti*. Le cycle de la cytosine reste quant à lui sous sa conformation *anti*. Afin de conserver l'appariement classique C-G, le furanose et la base subissent une rotation de 180°.^[3]

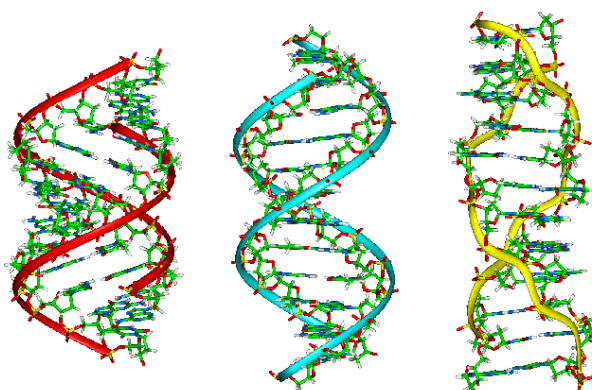


Figure 2. Les formes variées de l'ADN. De gauche à droite: ADN A, B et Z

L'étude de la thermodynamique de ce polymorphisme structural par le biais d'investigations sur l'appariement de type Watson-Crick, ainsi que l'importance de la concentration en NaCl ont permis de mieux comprendre les fonctions biologiques et les capacités de complexation de la biomolécule.^[4] Le rôle de l'eau ne doit pas être négligé tant ce solvant à un effet important sur la thermodynamique de reconnaissance des acides nucléiques. Les groupes fonctionnels gagnent ainsi jusqu'à 25% d'exposition au solvant lors de la déshybridation des deux brins d'ADN.^[5]

B. Reconnaissance de l'ADN

Une excellente reconnaissance de l'acide désoxyribonucléique est indispensable dans les processus biologiques pour transmettre l'information génétique le plus fidèlement. Au sein de la cellule, l'ADN peut être reconnu par des enzymes impliquées dans la réplication et la transcription^[6] ou encore par de nombreuses protéines.^[7] La reconnaissance protéique de

l'ADN étant complexe, un système simple de code a même été proposé, basé dans un premier temps sur des motifs de liaisons hydrogènes entre acides aminés et bases nucléiques.^[8] Ainsi, cette reconnaissance macromoléculaire est généralement obtenue par une complexation multivalente permettant d'assurer une meilleure sélectivité de séquence et d'améliorer la complexation.^[9] La majorité des motifs de reconnaissance d'ADN isolés sont incapables de se lier de manière stable et sélective à l'oligonucléotide. Par exemple, la construction d'un petit domaine de la protéine d'actine contenant le motif GCN4 responsable de la reconnaissance d'ADN ne permet pas d'obtenir un complexe stable. En apportant de la multivalence par l'ajout d'une glissière à leucine (leucine zipper), un complexe est créé avec l'acide nucléique.^[10] Les grands sillons d'ADN autour desquels s'organisent l'hélice sont le principal lieu de reconnaissance des protéines. Des liaisons non-covalentes de type liaisons hydrogènes ou interactions électrostatiques, sont créées entre le squelette osidique ou encore les bases et les protéines (Figure 3). Les petits sillons sont, quant à eux, moins propices à la complexation, du fait de l'étroitesse de la zone.^[9]

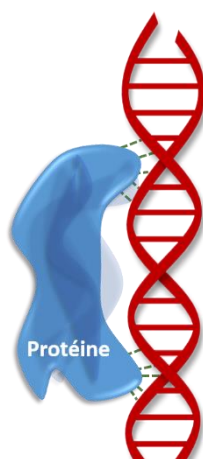


Figure 3. Reconnaissance multivalente de l'ADN par des protéines via les liaisons non covalentes indiquées par des traits pointillés verts

Ces dernières années de nombreux groupes ont travaillé sur le développement de ligands synthétiques de l'ADN.^[9,11] La variété de tailles et de modes de reconnaissance de ces composés s'est avérée être très étendue. Ces ligands peuvent être de nature peptidique, nucléotidique ou être des complexes métalliques. Cette diversité permet ainsi de contrôler de multiples fonctions biologiques telles que la régulation de l'expression des gènes impliquant la reconnaissance d'oligonucléotides et pouvant être dérégulées dans certaines maladies. L'un des challenges majeur de ces ligands synthétiques peut être la reconnaissance de l'ADN en milieu aqueux.^[12] L'eau va en effet induire une compétition avec le ligand pour la formation des liaisons non-covalentes.^[13] Les composés synthétiques vont dessolvater partiellement l'oligonucléotide, et ainsi, dissocier un certain nombre de liaisons hydrogènes générant de l'entropie. Les molécules pourront à leur tour complexer l'ADN. Le complexe ainsi généré doit

être plus stable que l'acide nucléique sous sa forme solvatée afin de déplacer l'équilibre vers sa création.

Ces ligands peuvent être classés selon les diverses stratégies de reconnaissance de l'ADN qu'ils ont développé^[14] :

1. Les agents intercalants

Ce mode de reconnaissance repose sur l'intercalation entre les bases d'ADN de composés aromatiques. Ce type de reconnaissance n'offre pas une importante sélectivité pour sa cible. Parmi ces composés, le bromure d'éthidium s'intercale entre les bases d'ADN, stabilisé par des interactions d'empilement π (Figure 4).^[15] La molécule se caractérise par la présence d'un ammonium quaternaire au sein de quatre cycles aromatiques conjugués. Cette structure permet ainsi de créer des liaisons non covalentes avec les nucléotides naturels. Ce composé présente une constante de dissociation $K_d = 50,2 \pm 0,5 \mu\text{M}$ pour un ADN double brin à 25°C.^[16] Cette intercalation peut alors induire des mutations du génome humain mais reste un redoutable anti-cancéreux. D'autres marqueurs d'ADN synthétiques, comme le SYBR® safe, ont alors été développés. Ces composés sont utilisés pour l'étude de la complexation de systèmes à l'ADN.

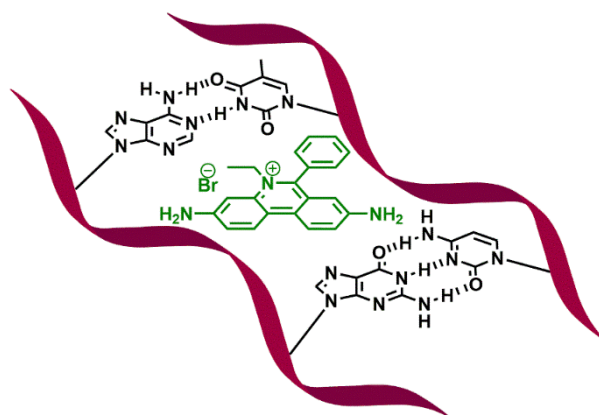


Figure 4. Intercalation du bromure d'éthidium entre les bases nucléiques

Les intercalants peuvent également être utilisés pour leurs qualités d'antibiotiques cytotoxiques bloquant la synthèse d'ADN et d'ARN comme dans le cas de la doxorubicine (Figure 5).^[17] Cet anti-cancéreux est utilisé dans le traitement d'un certain nombre de cancers comme celui du poumon, du sein, des ovaires ou de l'utérus ainsi que pour les leucémies.^[18] Outre ce composé anthracyclique, il existe également des molécules répertoriées pour leur pouvoir anti-malarial comme c'est le cas pour la quinacrine dont le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé.^[19] L'échinomycine appartenant à la classe des bis-intercalants présente une activité anti-tumorale grâce à sa complexation avec l'ADN (Figure 5).^[20] La thiocoraline et la triostine^[21] sont également des systèmes naturels construits autour de deux groupements

aromatiques permettant l'intercalation avec les bases nucléiques. Ces dernières années, des bis-intercalants ont été développés pour la reconnaissance sélective des erreurs d'appariement des oligonucléotides.^[22] Par la suite, des études ont été effectuées sur les poly-intercalants dont les groupements aromatiques sont séparés par des espaceurs de nature et de longueur variable.^[23]

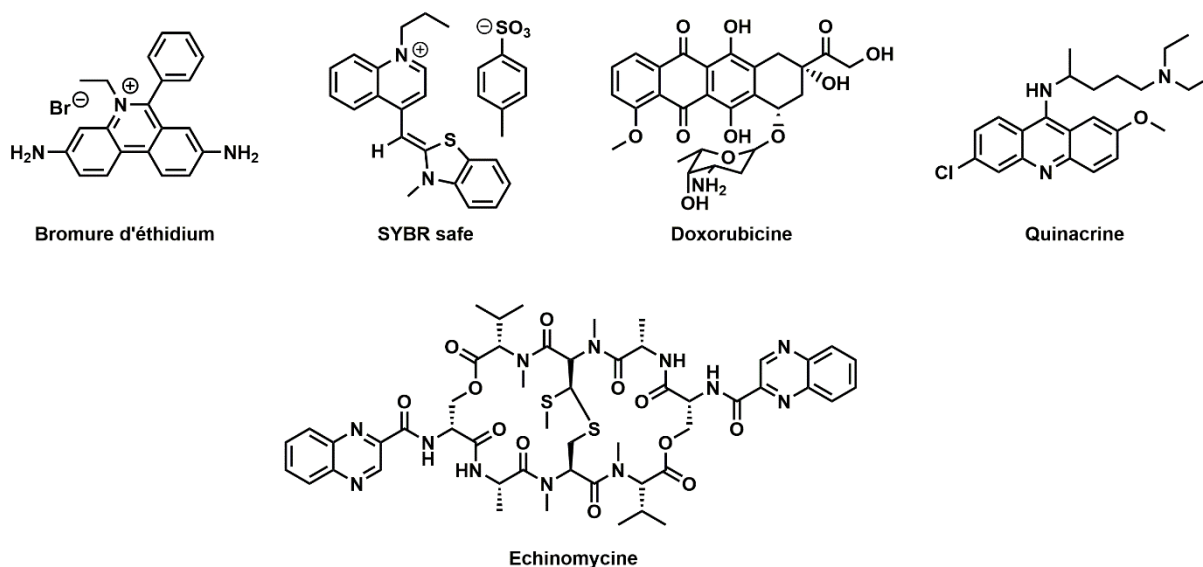


Figure 5. Structures chimiques de quelques intercalants courants

2. Les agents alkylants

Ces composés sont capables de créer des liaisons covalentes avec les brins d'ADN et d'induire des changements conformationnels de la biomolécule. On parle alors d'agents alkylants.^[24] Ce processus de désorganisation est à l'origine de mutation pouvant dans certains cas induire des cancers ou encore faire partie de la stratégie de régulation des phénomènes de transcription et de régulation. Les enzymes deviennent alors incapables de "lire" la séquence d'ADN ainsi modifiée. Les modifications peuvent être isolées, c'est alors une mono-alkylation, ou multiples, et se faire entre les deux brins (pont inter-brins) ou sur un même brin (pont intra-brin). Le cis-platine fait partie de cette famille de composés et joue un rôle de puissant anticancéreux.^[25] Son mode d'action repose sur une alkylation intra-brin qui va induire l'apoptose de la cellule en réponse à des signaux de transduction.^[26] Ces réponses sont cependant soumises à une atténuation de leur signal au cours du temps par l'action de mécanismes de réparation induisant l'inefficacité du composé durant le traitement.^[27]

3. Les agents d'interaction dans les petits et grands sillons

Un certain nombre de composés naturels se lie à l'ADN par la reconnaissance spécifique du petit sillon. Parmi eux, il existe, par exemple, la Distamycine A ou encore la Netropsine. Les aminoglycosides sont quant à eux des antibiotiques naturels construits autour d'un châssis

sucres et fonctionnalisés par des aminosucres. La charge positive apportée par ces carbohydrates aminés favorise la complexation. La néomycine, un aminoglycoside naturel, est connue pour sa reconnaissance de l'ARN (Figure 6). Elle est impliquée dans la préparation de conjugués mixtes avec un benzimidazole synthétique sélectif du petit sillon pour inhiber l'interaction entre la protéine Tat et l'ARN viral du VIH.^[28]

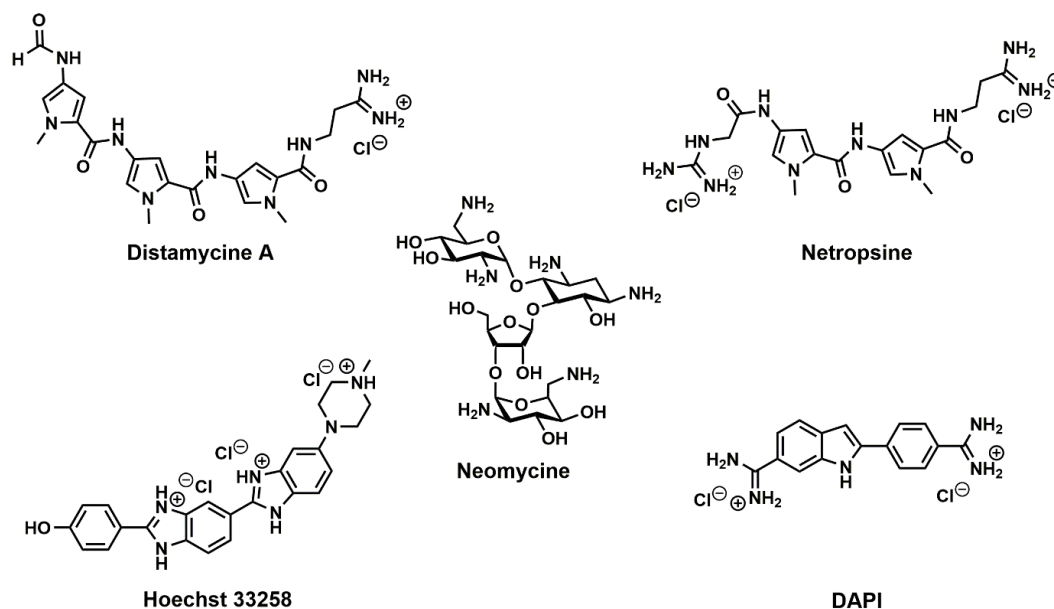


Figure 6. Structures chimiques de plusieurs composés de forme concave complexant avec le petit sillon de l'ADN. En haut et au centre, les agents naturels et en bas les complexants synthétiques

Un large panel de molécules ont également été synthétisées (Hoechst 33258, DAPI, Pentamicine, Bisbenzamidine^[29]).^[30] Tous ces agents naturels ou synthétiques se caractérisent par une forme incurvée leur permettant d'accéder au petit sillon malgré son étroitesse (Figure 6). Ces molécules chargées positivement reconnaissent de manière non covalente les séquences nucléotidiques. En se basant sur le mode d'action de la Distamycine A, des polyamides ont été développés sous forme d'épingles à cheveux interagissant de manière antiparallèle par formation de dimères avec chacun des brins d'ADN (Figure 7).^[31] La complexation entre le polyamide et les brins d'ADN se fait via des liaisons hydrogènes spécifiques selon la nature des bases.^[32] Ainsi, un imidazole opposé à un pyrrole (une paire imidazole/pyrrole) reconnaîtra spécifiquement une paire de base G/C alors qu'une paire pyrrole/imidazole ciblera une paire C/G. Un appariement pyrrole/pyrrole quant à lui pourra s'hybrider à la fois avec un couple A/T et T/A préférentiellement à C/G et G/C.

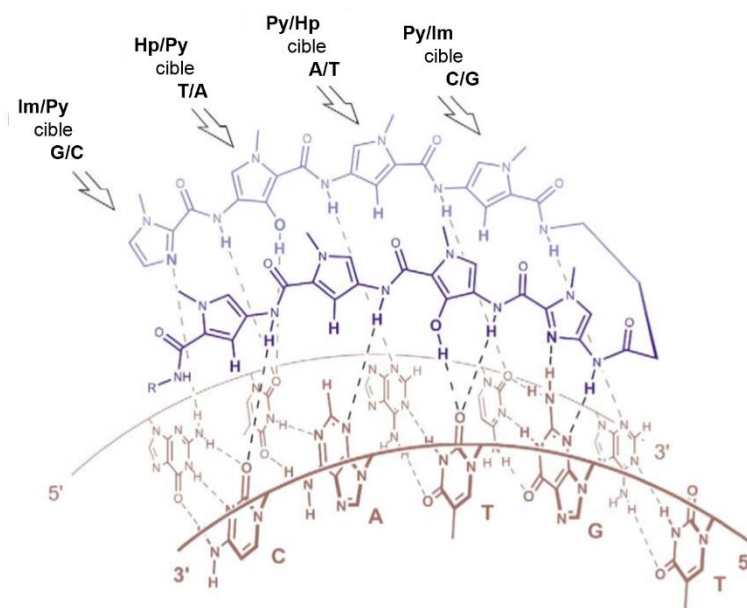


Figure 7. Structure chimique d'un polyamide pyrrole/imidazole (Py/Im) capable de complexer avec un duplex d'oligonucléotides vue de perspective^[32a]

Les protéines et plus particulièrement les facteurs de transcription, contrairement aux petites molécules utilisées comme agents intercalants, montrent une nette préférence pour l'interaction avec le grand sillon de l'ADN.^[33] La complexation se fait via des liaisons non covalentes de types hydrogènes, Van der Waals ou ioniques. Les résidus spermines et les PNAs complexent généralement les oligonucléotides selon le même processus ; la reconnaissance des grands sillons.^[34]

Des composés capables à la fois de complexer de manière réversible les petits et grands sillons de l'ADN en associant une bis(benzamidine) et une séquence peptidique structurée en hélice α ont récemment été développés.^[35] A travers ce dernier exemple, l'ADN est reconnu en différents points rendant la complexation plus sélective. La multivalence est nécessaire pour incrémenter encore la force de liaison entre le ligand et la cible. Afin d'améliorer la sélectivité du ligand pour l'ADN en question, l'auto-assemblage en présence de la cible peut être d'un grand intérêt. C'est le point qui sera traité dans la partie suivante.

C. Multivalence auto-assemblée

La multivalence a très vite été adoptée pour l'étude de la reconnaissance des oligonucléotides. Les possibilités qu'elle offre en multipliant les interactions avec les biomolécules permettent d'augmenter la constante d'association des complexes en milieu aqueux. Depuis longtemps, les polymères et des dendrimères cationiques sont utilisés pour la reconnaissance d'ADN.^[36] Cependant, ces systèmes présentent l'inconvénient d'être toxiques. Plus récemment, des clusters multivalents de plus petite taille ont été développés pour tenter de diminuer cette toxicité. Parmi les nombreux exemples de la littérature, la plupart des systèmes cationiques

généralisés ne présentent aucune dynamique. Des ligands chargés positivement sont notamment liés à des plate-formes via des liaisons covalentes irréversibles, généralement de type click. Ainsi, des systèmes multivalents basés sur l'utilisation de calixarènes,^[37] de fullerènes,^[38] de pilla[5]arène^[39] ou encore de cyclodextrines^[40] sont fonctionnalisés par des groupements guanidiniums ou ammoniums puis leur complexation aux oligonucléotides est évaluée.

1. Auto-assemblage assisté par un effet template de l'ADN

Les oligonucléotides peuvent avoir un rôle de template dans la préparation par auto-assemblage de clusters multivalents. Ils présentent ainsi, un rôle de plateforme utilisée comme support par les ligands. Le virus de la mosaïque du tabac est l'exemple naturel le plus connu. Sa construction repose sur l'auto-assemblage de protéines sur un template d'ARN.^[41] Inspiré par cette stratégie, de nombreux travaux ont été développés et décrits dans la littérature. L'auto-assemblage templaté par l'ADN a, par exemple, été développé via une approche de type chimie hôte-invité,^[42] par la formation de polymères supramoléculaires^[43] ou encore l'assemblage de peptides^[44] (Figure 8).

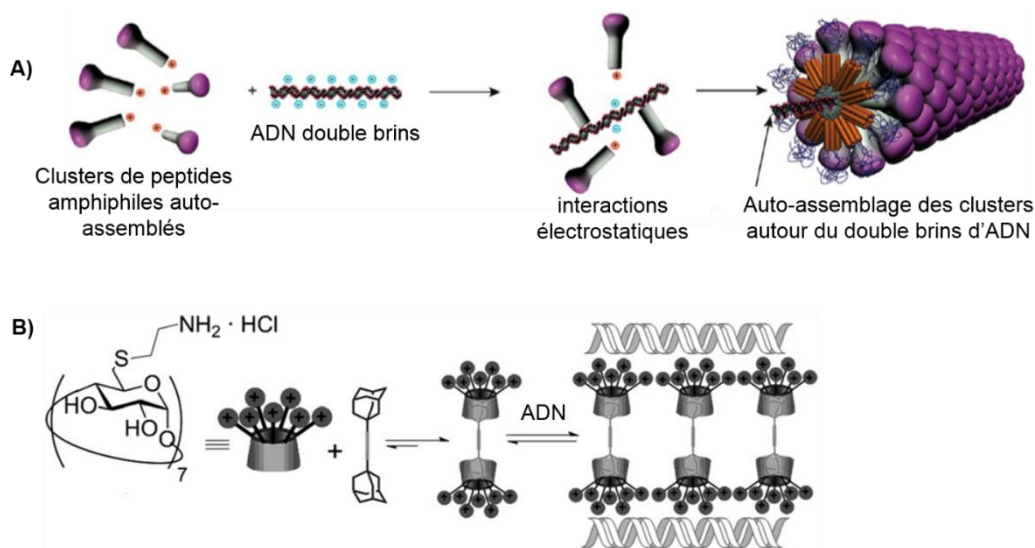


Figure 8. Systèmes appliqués à la reconnaissance d'ADN construits par auto-assemblage. A) Clusters peptidiques amphiphiles auto-assemblés autour d'un double brin d'ADN^[44b]; B) Cyclodextrines fonctionnalisées par des sucres cationiques et auto-assemblées pour la reconnaissance d'ADN^[42b]

Des études sur les PNAs ont aussi montré que l'assemblage des unités peut être guidé par la présence de l'ADN cible.^[45] Ainsi les composants sont dans un premier temps liés de manière non covalente à l'oligonucléotide puis des liaisons covalentes entre les résidus vont ensuite être créées pour stabiliser le système. Lors d'une étude en 2002, les peptides nucléiques acides sont d'une part substitués en position γ par des résidus *L*-lysines (^LK γ -PNA), eux-mêmes fonctionnalisés par des bases nucléiques, et portent d'autre part des ligands RGD capables d'inhiber les intégrines (Figure 9).^[46] Ainsi, la préparation du peptide multivalent est dirigée par la présence d'un oligonucléotide cible.

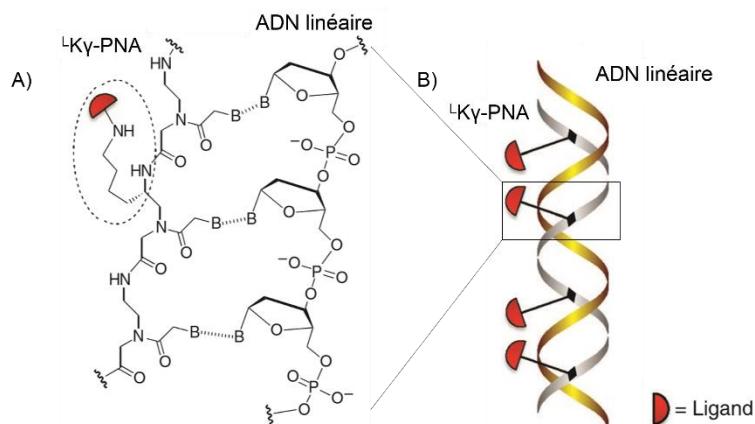


Figure 9. Représentation de L -Ky-PNA auto-assemblé en présence d'ADN. A) Structure chimique du peptide complexé à l'ADN correspondant à un zoom de B) Représentation de quatre L -Ky-PNAs portant chacun un ligand RGD^[46]

2. Auto-assemblage pour la reconnaissance de l'ADN

Un grand nombre de construction synthétique multivalente, dont les systèmes ciblant l'ADN, sont basés sur la construction de clusters multivalents par auto-assemblage. La complexation d'ADN a ainsi été étudiée par la préparation de doigts de zinc synthétiques. Ce motif protéique représente la plus grande famille de facteurs de transcription naturellement présents chez les eucaryotes.^[35] En se liant sur des séquences particulières de l'ADN, ces protéines vont induire la régulation de l'expression des gènes. L'ADN interagit avec une zone basique située en position N-terminale du facteur de transcription uniquement dans le cas où la protéine s'organise dans une configuration en hélice α par le biais d'un ion métallique (Zn^{2+}). Dans le but de créer un système capable de reconnaître spécifiquement l'ADN, plusieurs propriétés sont associées dans un même composé. L'ion métallique Ni^{2+} permet à la fois la dimérisation du système et initie le repliement configurationnel du facteur de transcription GCN4. La région peptidique basique isolée de GCN4 ne peut pas aboutir à une complexation de l'ADN. Il a alors été envisagé de conjuguer ce motif par coordination avec le nickel à un composé capable de reconnaître le petit sillon de l'ADN tel que la bis(benzamidine). Ainsi un système bivalent est construit par auto-assemblage pour la reconnaissance non-covalente d'ADN (Figure 10).

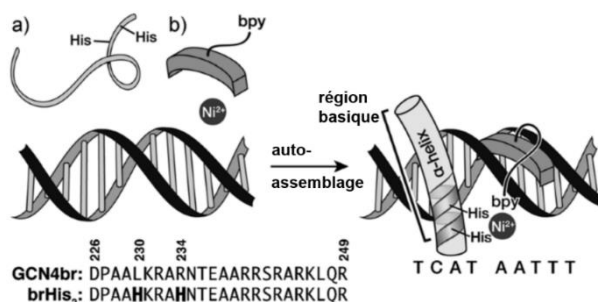


Figure 10. Stratégie d'auto-assemblage pour la reconnaissance d'ADN. a) l'analogue de GCN4, le brHis₂ dans une configuration d'hélice α dans le complexe, b) complexant du petit sillon de l'ADN, la bis(benzamidine)^[35]

3. Système covalent dynamique pour la reconnaissance d'ADN

La chimie covalente dynamique a également fait l'objet d'études pour la préparation de clusters impliqués dans la reconnaissance d'oligonucléotides. Pour générer ces composés, des liaisons covalentes dynamiques sont indispensables. Une nouvelle fois, la formation de ponts disulfures a permis de préparer des peptides complexant l'ADN par un processus oxydant.^[47] En parallèle en 2015, des travaux reposant sur la fonctionnalisation de nanoparticules d'or via des liaisons imines ont montré la capacité de l'ADN à favoriser et stabiliser l'auto-assemblage de certains constituants, au détriment d'autres, dans le but d'améliorer la complexation.^[48] Cette ligation a également été choisie pour la création de squelettes dynamiques d'un système de reconnaissance d'ADN (Schéma 1).^[49] La chimie covalente dynamique, utilisée dans cet exemple, est basée sur la présence de composés monovalents pouvant réagir ensemble et aboutir à la préparation de différents systèmes (Chapitre 1). Ainsi, les résidus cationiques, par exemple, sont organisés de manière à favoriser les interactions électrostatiques avec les phosphodiesteres de l'oligonucléotide, chargés négativement. L'ADN est alors complexé par un système construit par chimie covalente dynamique.

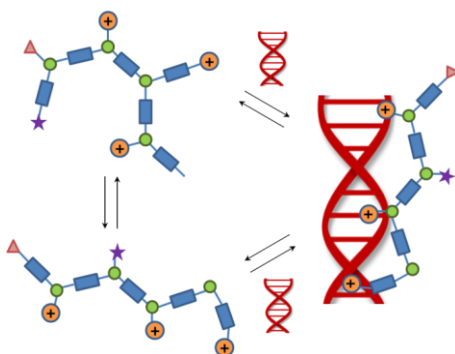


Schéma 1. Construction d'une charpente dynamique pour la reconnaissance d'ADN par chimie covalente dynamique

D. Positionnement du projet

L'objectif de ce chapitre repose sur la reconnaissance multivalente de l'ADN en milieu aqueux. Pour cela, des clusters cationiques hydrosolubles et de taille réduite vont être construits selon une approche d'auto-assemblage dynamique (Schéma 2). L'intérêt de l'auto-assemblage est grand pour la reconnaissance multivalente, comme cela a été montré précédemment. Il offre la possibilité de générer simplement et efficacement des systèmes complexes. Le caractère dynamique va, quant à lui, apporter de l'adaptabilité et de la réversibilité au système.

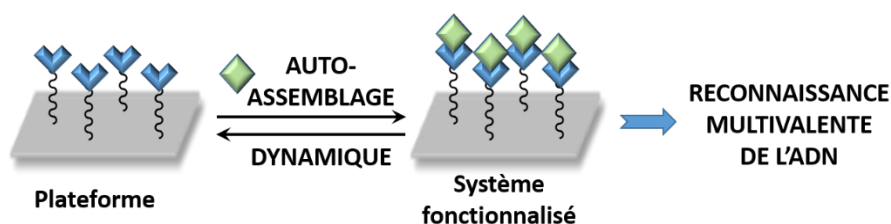


Schéma 2. Concept de la synthèse auto-assemblée de plate-forme fonctionnalisée pour la reconnaissance multivalente d'ADN

II. Complexation dynamique de l'ADN par des clusters auto-assemblés

A. Conception

La conception de clusters auto-assemblés nécessitait le choix d'une plate-forme pouvant être facilement fonctionnalisée et également accessible aisément. Les peptides cycliques déjà largement utilisés pour la reconnaissance des biomolécules, comme montré précédemment, sont alors choisis. Ils offrent l'avantage d'être soluble dans l'eau contrairement à un certain nombre d'autres plate-formes. Ces plate-formes peptidiques vont être décorées d'aldéhydes glyoxyliques pour créer des liaisons acylhydrazones. Les aldéhydes glyoxyliques sont préférés aux aldéhydes classiques car ils offrent une meilleure stabilité pour les liaisons créées.^[50] Ils sont également faciles à insérer dans une séquence peptidique ou protéique. En effet, le couplage d'un amino alcool β , tel que la sérine ou la thréonine, permet de générer des aldéhydes glyoxyliques de manière sélective. La ligation acylhydrazone, quant à elle, est choisie pour sa capacité à être générée en conditions aqueuses douces. Cette ligation est, de plus, chimiosélective et réversible.

B. Synthèse et préparation des composés

1. Synthèse de la plate-forme peptidique **cRAFT(ALD)₄**

Le peptide cyclique **cRAFT(ALD)₄** se caractérise par quatre bras fonctionnalisés par des aldéhydes glyoxyliques pointant sur une même face (Figure 11). Des travaux ont déjà rapporté l'intérêt de cette pré-organisation et de ce caractère hydrophile pour la reconnaissance de biomolécules (Chapitre 1).

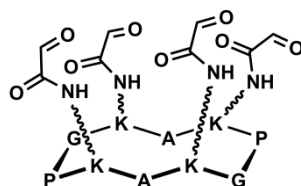


Figure 11. Structure de la plate-forme peptidique **cRAFT(ALD)₄**

Dans le cas de ce travail, quatre de ces acides aminés seront des résidus modifiés, les deux centraux seront des *L*-alanines. Les quatre restant seront communs à tous les RAFT ; deux glycines et deux prolines permettant de créer les coudes β . La première étape consiste en la préparation du dipeptide **2** (Figure 12).

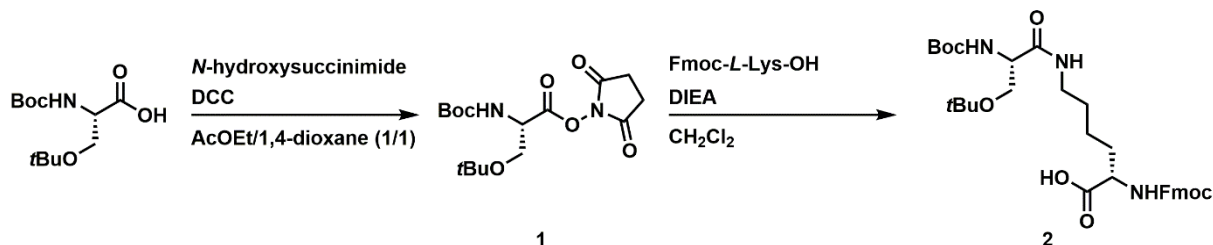


Figure 12. Voie de synthèse du dipeptide **2** engagé dans la préparation de **cRAFT(ALD)₄**

Le dipeptide **2** est ensuite engagé dans la synthèse peptidique du décapeptide par SPPS. Le peptide protégé, une fois clivé de la résine, est cyclisé, déprotégé puis oxydé comme présenté dans la Figure 13.^[51]

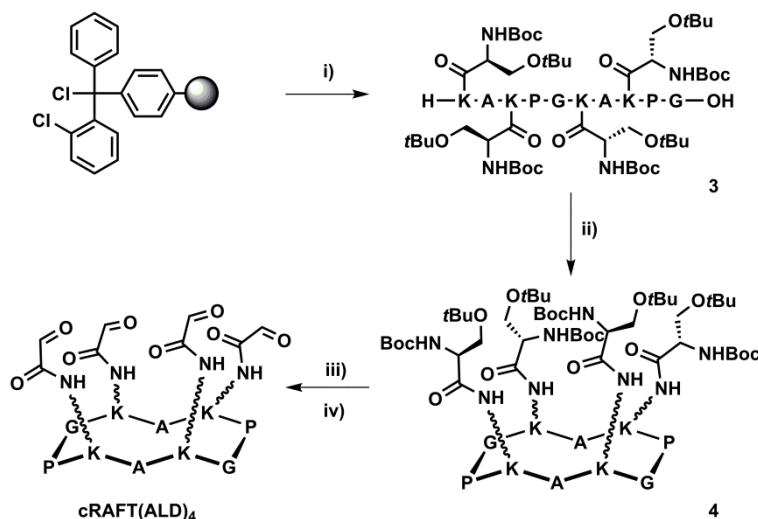


Figure 13. Voie de synthèse de la plate-forme peptidique **cRAFT(ALD)₄**. i) a : Fmoc-Gly-OH, Fmoc-AA-OH, Pipéridine/DMF (2/8), DIEA, DMF, micro-ondes, Δ , SPPS, b : TFA/CH₂Cl₂ (1/99) 43%; ii) PyBOP, DIEA, DMF 0,5mM, Rdt quantitatif; iii) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5); iv) NaIO₄, H₂O, 59%.

Le dipeptide **2** est construit autour d'un résidu Fmoc-*L*-lysine couplé au niveau de l'amine de la chaîne latérale avec une Boc-*L*-Ser(*O*tBu)-OH (Figure 12).^[52] Ce couplage est réalisé en phase liquide avec une première étape d'activation de l'acide carboxylique de la sérine par de la DCC en présence de *N*-hydroxysuccinimide pour former l'ester activé **1**. La préparation de l'ester est suivie de la complexation avec l'amine de la lysine pour former le dipeptide **2**. Le suivi LCMS réalisé au cours de la deuxième étape de synthèse a montré l'apparition de deux impuretés de nature peptidique. Ces produits absorbent à 214 nm, indiquant ainsi la présence de liaisons peptidiques dans leur constitution (Figure 14). Les données de spectrométrie de

masse ont permis de conclure à la formation de la Fmoc-lysine acétylée et celle du tripeptide issu d'un double couplage du résidu lysine pour former la sérine-lysine-lysine (Figure 14).

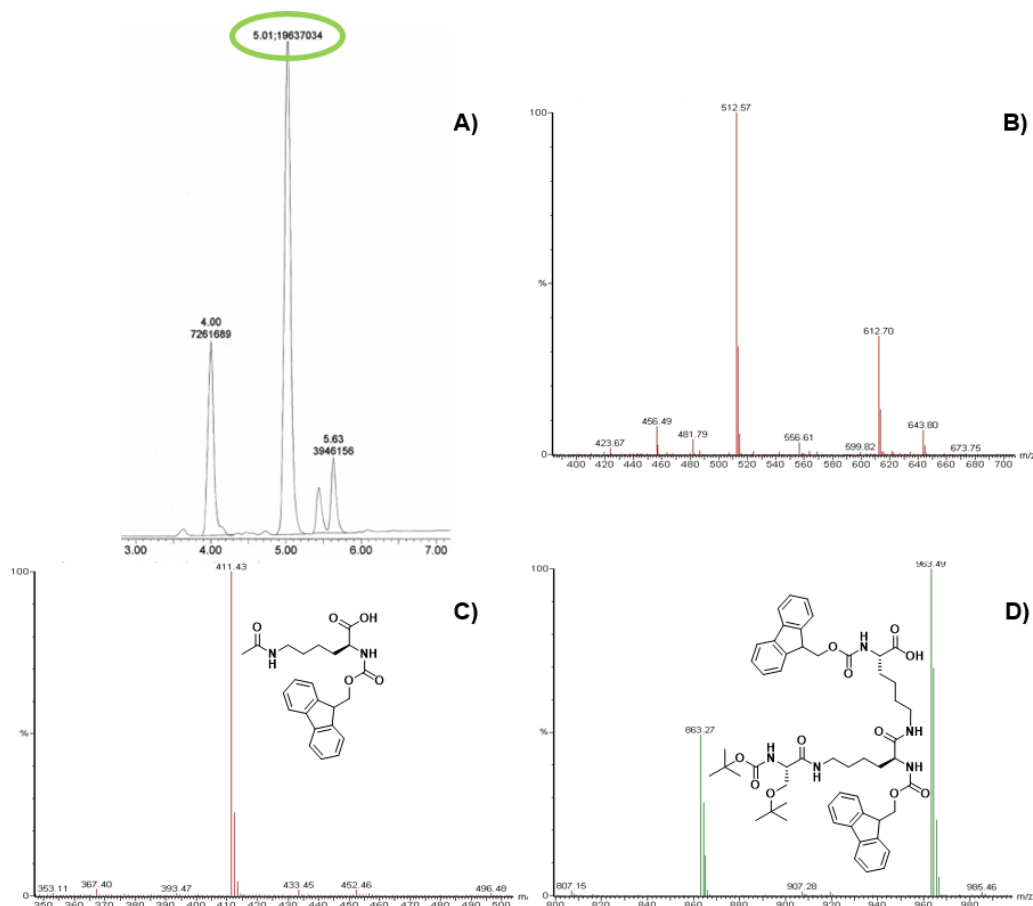


Figure 14. Chromatogramme HPLC (A) et spectre de masse du mélange réactionnel de la réaction de couplage peptidique pour la synthèse du dipeptide **2** avec le produit recherché entouré en vert (Méthode A) avec B) la masse de **2** calculée pour $[M+H]^+$ 612,32 , mesurée 612,70, et des impuretés générées C) Fmoc-lysine acétylée : calculée pour $[M+H]^+$ 411,18, mesurée 411,43 à $t = 4,00$ min; D) le tripeptide sérine-lysine-lysine : calculée pour $[M+H]^+$ 961,48, mesurée 963,49 à $t = 5,63$ min

Une hypothèse a été émise concernant la formation du tripeptide. Il est généré en présence d'un excès de DCC non éliminé après la première étape. Le carbodiimide résiduel a pu activer l'acide carboxylique de la Fmoc-lysine et permettre ainsi la formation d'un tripeptide (Figure 15).

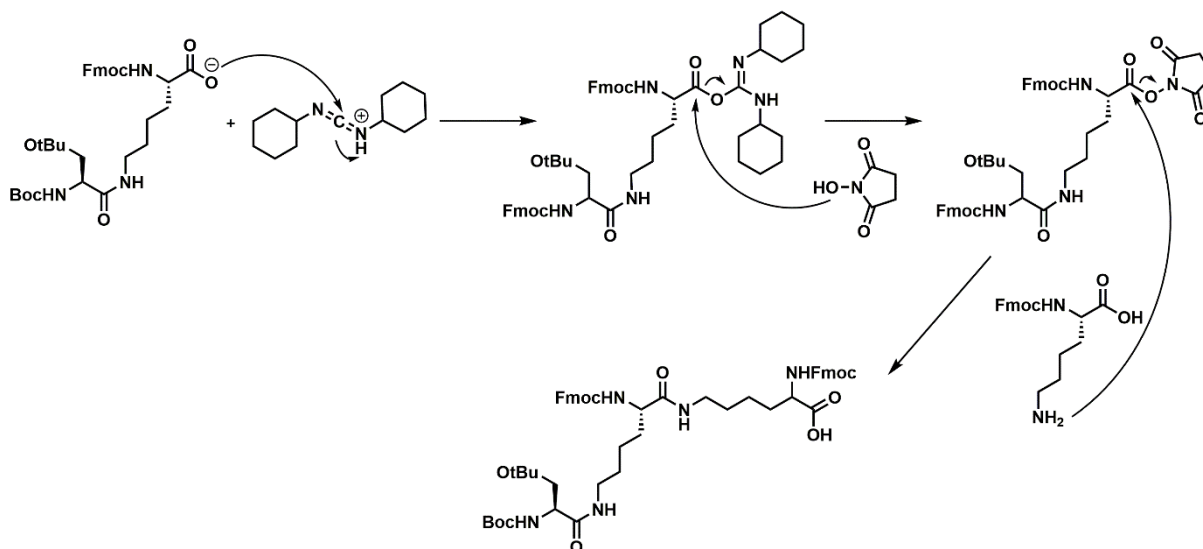


Figure 15. Voie de synthèse proposée pour la formation du tripeptide sérine-lysine-lysine

A présent que la nature des impuretés a été déterminée et leur origine potentielle proposée, des optimisations doivent être réalisées pour éviter la formation de ces produits secondaires. Il a alors été proposé de réaliser des lavages des bruts réactionnels. Le résidu lysine acétylé conserve une certaine hydrophilie et un lavage en condition basique peut induire sa déprotonation et faciliter son élimination. Le milieu réactionnel de l'étape de couplage est alors lavé avec une solution aqueuse saturée en NaHCO_3 . Un premier lavage permet d'éliminer la majeure partie de l'impureté et après un second, la Fmoc-lysine acétylée est complètement éliminée du milieu. Le suivi HPLC montre l'intérêt des lavages sur la pureté du mélange (Figure 16). Le pic de produit secondaire éluant à 4,00 min a complètement disparu.

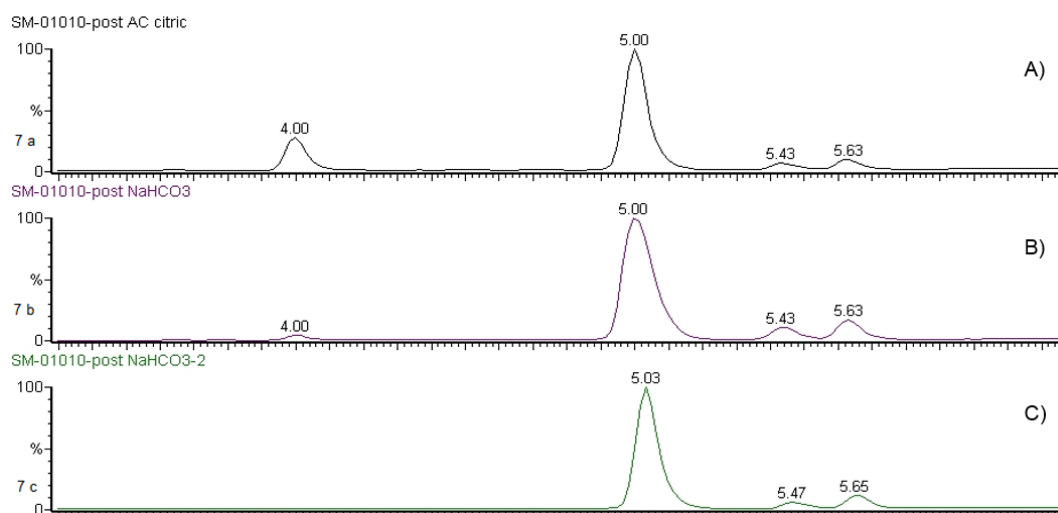


Figure 16. Efficacité du lavage basique avec la solution de NaHCO_3 saturée sur le pic à 4,00 min (Méthode A) : A) avant le lavage basique; B) après un lavage; C) après le deuxième lavage avec la solution saturée de NaHCO_3

Le lavage basique ne permet pas d'observer la moindre réduction des proportions en tripeptide à un temps de rétention de 5,65 min. Le produit secondaire présente peu d'affinité pour la phase aqueuse dû à la présence des deux groupements Fmoc. La stratégie proposée consiste

à éviter la formation du composé et non à l'éliminer comme pour la lysine acétylée. Le tripeptide est généré lors de la seconde étape et ce couplage n'est possible qu'en présence de dicyclohexyl carbodiimide (DCC) résiduel de la première étape. Afin de contourner ce problème, il a été envisagé, dans un premier temps, de travailler avec un défaut de DCC (0,9 éq). La formation du tripeptide est malgré tout observée. Un lavage du milieu réactionnel avec une solution acide de HCl va induire la protonation de la DCC. L'eau du milieu va jouer le rôle de nucléophile, neutralisant ainsi l'activité de la DCC, et induire la formation de la dicyclohexylurée (Figure 17). L'urée préparée n'induit plus la préparation du tripeptide. Ce composé sera éliminé par filtration.

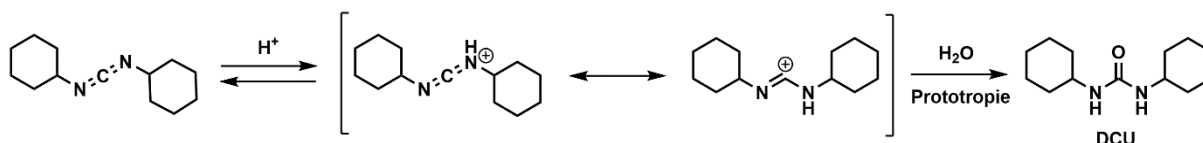


Figure 17. Inactivation de la DCC par l'eau en milieu acide pour éviter la formation de tripeptide

L'utilisation d'une solution acide pour le lavage n'est cependant pas sans risque. Elle est susceptible d'induire la déprotection des groupements Boc et *tert*-butyl du résidu sérine. La concentration en acide chlorhydrique de la solution est testée à 0,1 M et 1 M. L'analyse HPLC montre la présence résiduelle du produit secondaire avec le lavage à 0,1 mM mais un pic unique correspondant au produit **2** est observé à un temps de rétention de 4,99 min pour la solution à 1 M (Figure 18).

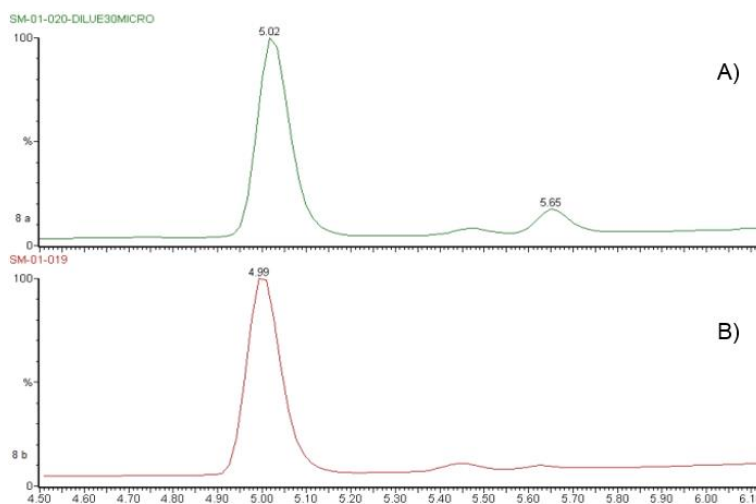


Figure 18. Suivi de l'efficacité du lavage acide sur l'élimination de la DCC et l'effet sur la déprotection des groupements acido-labiles du résidu sérine par HPLC. Avec un lavage avec une solution acide à A) 0,1 M en HCl, B) 1 M en HCl

L'analyse ¹H RMN du produit **2** après optimisation des lavages montre la présence de DCU résiduelle (Figure 19). Afin d'éliminer au mieux la DCU au terme de chacune des deux étapes, le solide blanc est repris dans du CH₂Cl₂ puis filtré sur fritté.

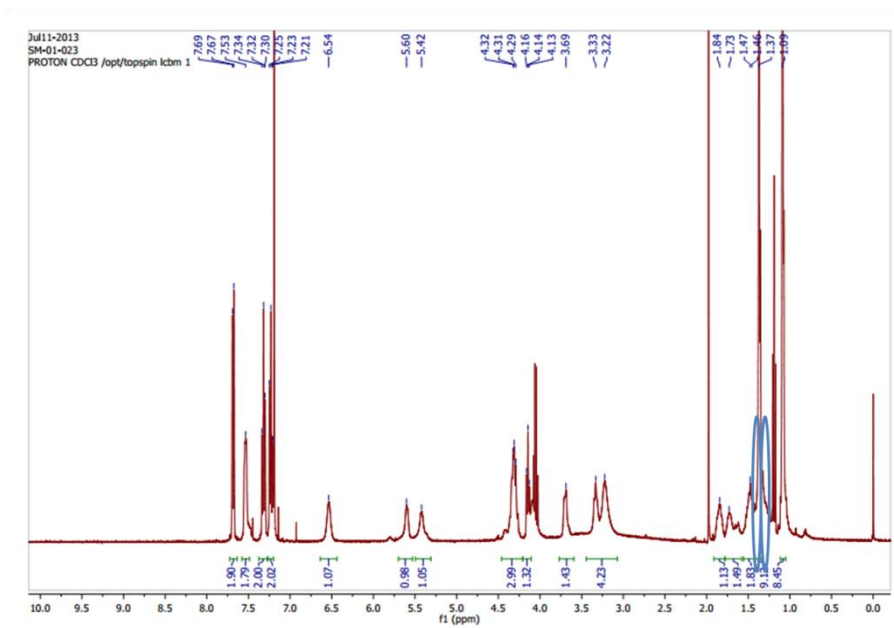


Figure 19. Spectre ¹H RMN de **2** avec les signaux de la DCU entourés en bleu

Le dipeptide **2** peut ainsi être engagé dans la synthèse SPPS du décapeptide sur l'automate Liberty, CEM®. La synthèse est réalisée en stratégie Fmoc, c'est à dire qu'une étape de déprotection en condition basique sera effectuée par le robot entre chacun des couplages. Une fois déprotégée, l'amine α du résidu préalablement couplé, pourra ainsi réagir avec l'acide aminé suivant.

La synthèse peptidique est réalisée sur une résine chlorure de 2-chlorotryl. Ce support, utilisé pour les synthèses en stratégie Fmoc, est une bille de polystyrène fonctionnalisée par des chlorures de 2-chlorotryl (2-CTC). Cette résine est caractérisée par la possibilité de cliver les peptides en conditions acides douces (1% de TFA). Des comparaisons ont été réalisées avec la résine de Merrifield ou encore la SASRIN pour aboutir à un temps de couplage 24 à 96 fois plus court dans le cas de notre support.^[53] Finalement, la résine chlorure de 2-chlorotryl réduit le risque de formation de dicétopipérazine souvent observée en présence de Fmoc-L-proline dans le couplage des deux premiers acides aminés en C-ter des peptides. Cette caractéristique est commune à toutes les résines fonctionnalisées par des groupements trityls. Afin d'éviter tout risque de formation de dicétopipérazine malgré l'utilisation préventive de la résine 2-CTC, le couplage des acides aminés successifs aux séquences Pro-Gly est réalisé en l'absence de chauffage et de micro-ondes (Figure 20).^[54]



Figure 20. Mécanisme de formation de la dicétopipérazine

Le décapeptide est synthétisé à partir de l'acide aminé qui sera, une fois le peptide clivé de la résine, en position C-terminale. La résine est dans un premier temps fonctionnalisée manuellement avec un résidu Fmoc-glycine. Afin de déterminer la charge du support solide suite à cette étape de couplage, quelques grains de résine sont prélevés. L'aliquot est ressuspendu dans une solution de Pipéridine/DMF (2/8) qui va en moins d'une demi-heure permettre la déprotection complète des groupements Fmoc de l'acide aminé couplé aux billes de polystyrène. La solution basique est diluée puis son absorbance UV-visible mesurée, permettant ainsi de déterminer la charge de la résine. Une fois la charge obtenue, la quantité de réactifs nécessaire pour chacun des couplages peut être calculée. Les rendements de chaque étape de couplage pourront également être déterminés par cette mesure. La résine fonctionnalisée par l'acide aminé Fmoc-glycine est ensuite placée dans le réacteur du robot et engagée dans le couplage des neuf acides aminés restants. Les résidus sont couplés selon un cycle : lavage de la résine, couplage, lavage, déprotection du groupement Fmoc puis un dernier rinçage. L'absorbance UV-visible de la solution de déprotection est mesurée par le robot après chaque couplage tout au long de la synthèse. La synthèse est terminée sur la déprotection du groupement Fmoc en présence de la solution basique. La résine est alors extraite du robot et les étapes suivantes sont réalisées en solution. Après lavage de la résine, le décapeptide linéaire protégé est clivé grâce à une solution acide douce évitant la déprotection des groupements acido-labiles protégeant les chaînes latérales. Le produit **3** est ainsi obtenu par filtration de la résine. Afin d'éviter toute déprotection lors de la concentration du milieu malgré de faible proportion en acide, le TFA est neutralisé par l'addition d'une solution basique (MeOH/Pyridine 8/2). **3** est obtenu après précipitation et purification par HPLC préparative avec 43% de rendement.

Le peptide linéaire est ensuite engagé dans une étape de cyclisation à faible concentration (0,5 mM). Ces conditions permettent d'éviter la polymérisation. L'agent de couplage PyBOP est préféré au BOP pour cette étape de cyclisation. En effet, cette nouvelle génération de composé ne forme pas de produits secondaires cancéreux comme l'hexaméthylphosphoramidite issue du BOP et reste pour autant très efficace (Figure 21).

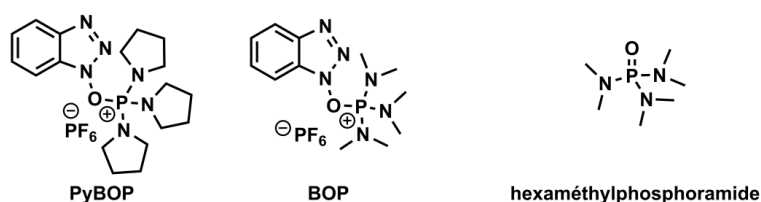


Figure 21. Structures des agents de couplage PyBOP, BOP et du produit secondaire généré par le BOP, l'hexaméthylphosphoramidite

Le produit cyclisé **4** est obtenu après précipitation avec un rendement quantitatif. Le solide blanc est ensuite solubilisé dans une solution acide permettant la déprotection des

groupements Boc et *tert*-butyl. Le produit déprotégé est finalement engagé dans une étape d'oxydation des quatre résidus sérines en présence de périodate de sodium pour créer quatre aldéhydes glyoxyliques (Figure 22) et donner **cRAFT(ALD)₄** avec 59% de rendement après purification par HPLC préparative.

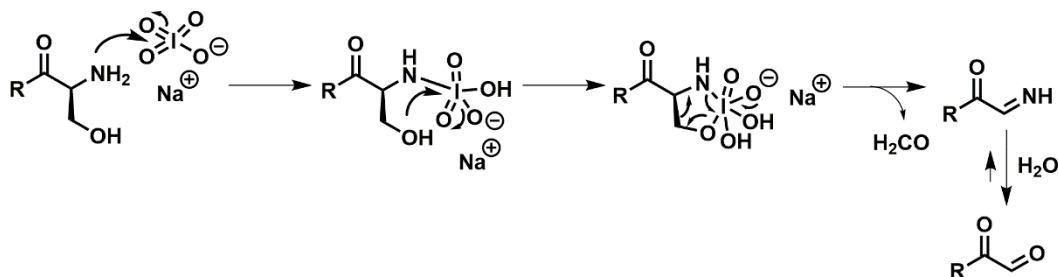


Figure 22. Mécanisme de coupure oxydante des résidus sérines par le périodate de sodium

2. Synthèse de l'hydrazide **L-ArgHyd** en phase liquide

Basé sur l'importante littérature rapportant que les groupements ammoniums^[37-38,39b,55] et guanidiniums complexent les oligonucléotides, le choix du résidu *L*-arginine s'est fait rapidement. Cet acide aminé est un composé naturel dont le dérivé protégé, Fmoc-*L*-Arg(Pbf)-OH, est commercialement disponible à des prix convenables. Les protections, dans ce cas orthogonales, sont indispensables pour toutes modifications du résidu. La fonction acide carboxylique va pouvoir facilement être modifiée pour générer une fonction hydrazide. Ce groupement mis en présence d'un aldéhyde glyoxylique va permettre la formation d'une liaison acylhydrazone.

La voie de synthèse du dérivé hydrazide est réalisée en phase liquide. La préparation de la fonction hydrazide est réalisée par couplage peptidique (Figure 23). Pour cela, le résidu Fmoc-*L*-Arg(Pbf)-OH est activé en présence d'HBTU comme agent de couplage dans une solution basifiée de NMP/DMF (4/1). Le *tert*-butyl carbazate est ensuite additionné au milieu pour former le composé **8**. Le produit protégé est obtenu sous la forme d'un solide blanc (97%) après purification sur gel de silice.

La déprotection du composé peut être envisagée de deux manières. Soit l'amine α est déprotégée de son groupement Fmoc en premier par un traitement basique, soit ce sont les groupements Pbf et Boc protégeant respectivement le guanidinium et l'hydrazide qui sont initialement éliminés en milieu acide. Afin de déterminer lequel des deux protocoles permet d'obtenir la meilleure pureté pour un rendement optimum, des tests de comparaison sont effectués. Dans le cas où la déprotection du groupement Fmoc est réalisée en premier, **8** est solubilisé dans une solution de DMF/pipéridine (8/2). Après 2h d'agitation, le suivi par chromatographie sur couche mince indique la présence d'un mélange de plusieurs composés dans le milieu. La purification par chromatographie sur gel de silice du produit est

indispensable pour isoler le composé. Au contraire, lors de la déprotection initiale des groupements Boc et Pbf par une solution de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5), le produit Fmoc-L-ArgHyd **9** est obtenu pur par simple précipitation avec un rendement supérieur à 75%.

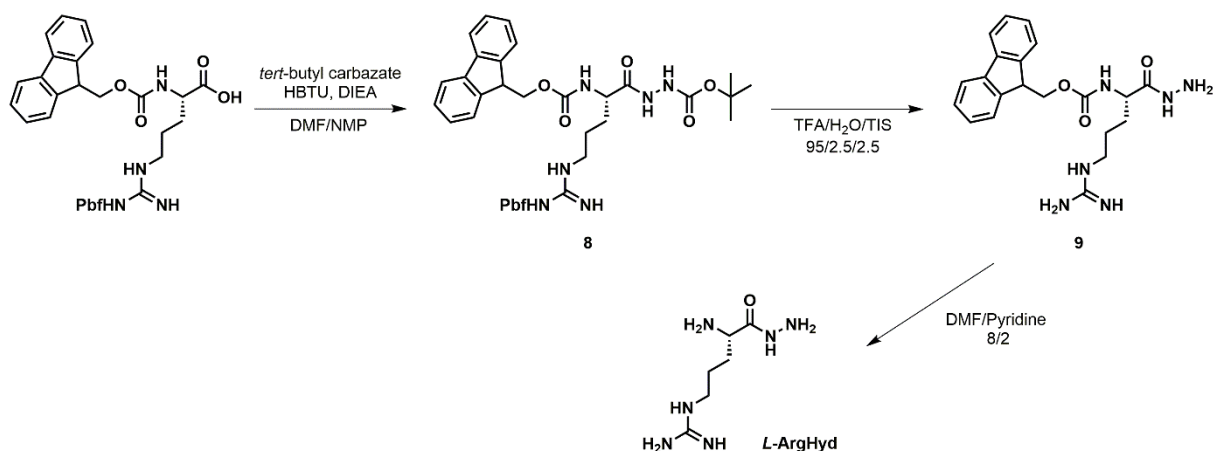


Figure 23. Voie de synthèse de la **L-ArgHyd** en phase liquide

L'étape permettant d'obtenir le résidu hydrazide final **L-ArgHyd** est la déprotection du groupement Fmoc en milieu basique (DMF/pipéridine 8/2) selon le même mode opératoire que celui testé précédemment. Le produit **L-ArgHyd** est ensuite précipité pour donner après lyophilisation un solide blanc (38%). L'analyse du composé par RMN du proton dans D₂O montre la présence de pipéridine résiduelle dans le milieu (Figure 24).

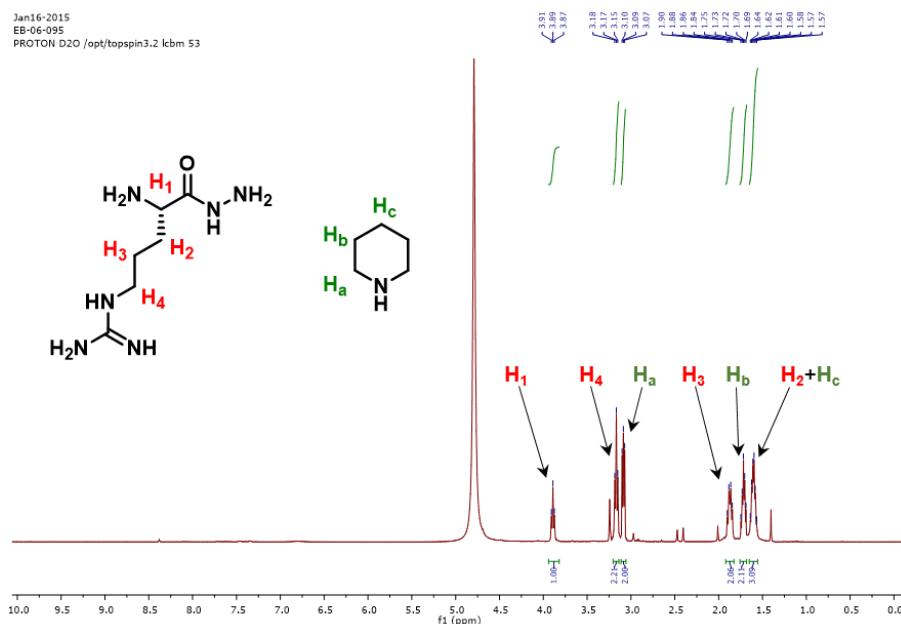


Figure 24. Spectre RMN ¹H de **L-ArgHyd** avec les signaux de la pipéridine présente comme impureté

Le composé est engagé dans les étapes de ligations acylhydrazones. La présence de l'impureté reste mineure (5% molaire). La pipéridine, en tant que composé monovalent ne devrait pas avoir une grande influence sur la complexation avec l'ADN par rapport aux clusters

multivalents générés avec **L-ArgHyd**. De plus, la pipéridine en réagissant avec les aldéhydes glyoxyliques de la plate-forme formerait des liaisons imines fortement destabilisées en milieu aqueux. Ces hypothèses seront testées par la suite.

3. Préparation des clusters

Les bioconjugués multivalents **cRAFT(Hyd)**₄ sont auto-assemblés à partir de la plate-forme peptidique cyclique **cRAFT(ALD)**₄ liée à des acides aminés modifiés via de multiples liaisons dynamiques acylhydrazones. Le résidu commercial **AcHyd** va permettre de créer une molécule multivalente neutre alors que l'arginine hydrazide **L-ArgHyd** offrira la possibilité de former une molécule cationique (Figure 25).

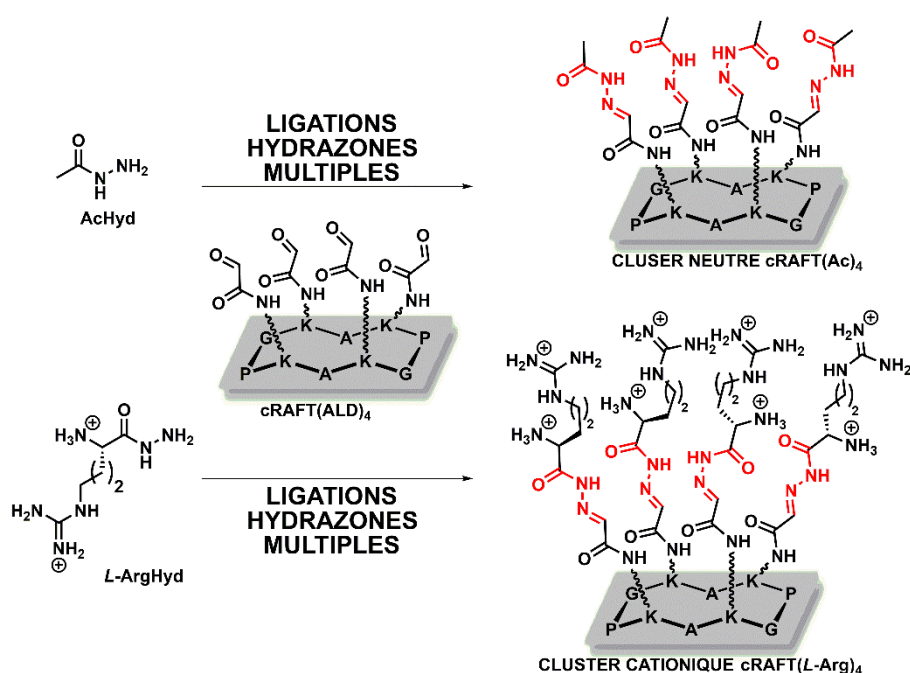


Figure 25. Multimérisation d'acides aminés modifiés via la formation de liaisons acylhydrazones

Un criblage des différentes conditions de préparation des liaisons acylhydrazones a été effectué pour déterminer le pH optimal de formation. La ligation étant click, un composé unique devrait être généré après optimisation (Figure 26). La préparation de la biomolécule neutre **cRAFT(Ac)**₄ est alors testée dans des solutions aqueuses de pH compris entre 1,0 et 8,0 à une concentration de 1mM en plate-forme. Après étude des chromatogrammes HPLC, il est facile de constater que la ligation n'est pas favorisée dans un milieu acide inférieur à pH 2,0.

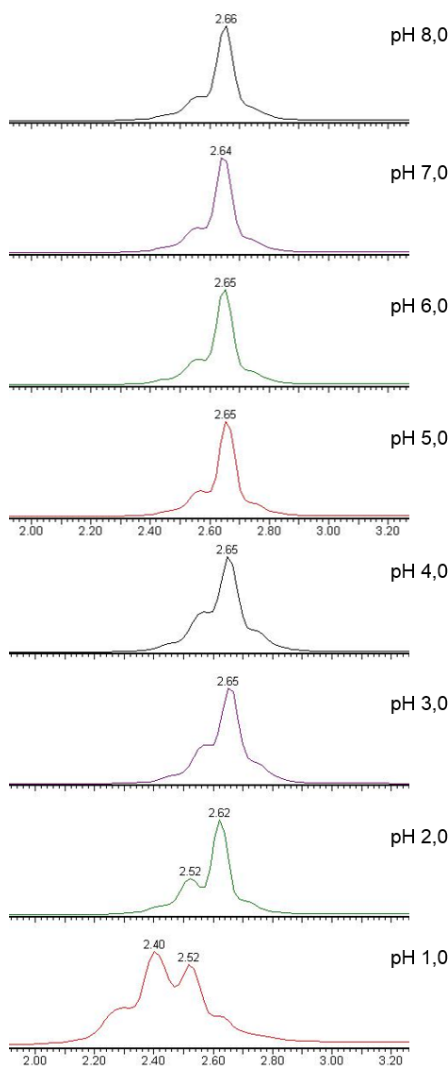


Figure 26. Criblage des pH des solutions tampons pour l'optimisation de formation de la liaison acylhydrazone (Méthode A, 20h)

Des travaux sur les ligations acylhydrazones ont rapporté des expériences réalisées à pH 5,2 dans le cas d'une fonctionnalisation de peptides artificiels.^[50] Suite à cette étude du pH et aux données de la littérature, la préparation de ces clusters artificiels est fixée pour être réalisée dans un tampon aqueux d'acétate de sodium (100 mM) à pH 5,0.

Les premiers essais ont été réalisés à une concentration de 1 mM en plate-forme peptidique et ont montré une fonctionnalisation complète du système en moins de 12h. Dans le but d'économiser de la matière, dans l'éventualité d'un travail en culture cellulaire et en présence d'un réactif peu soluble en milieu aqueux, il a été envisagé de travailler à des concentrations inférieures à 1 mM. Ainsi des concentrations en peptide de 0,75, 0,5, 0,25 et 0,1 mM ont été évaluées. Les tests aux différentes concentrations réalisés à pH 5,0 montrent qu'en présence de 0,25 mM de plate-forme, ou plus, le composé tétravalent **CRAFT(Ac)₄** est généré (Figure 27). A pH 7,2, la réaction n'est totale qu'en présence de 1 mM en plate-forme même après 3 semaines de couplage (Figure 28). Ces équilibres thermodynamiques ont été observés après

18 jours dans les deux conditions de pH. Un suivi cinétique réalisé par HPLC a montré que cette période de 18 jours était nécessaire pour atteindre un équilibre thermodynamique au pH physiologique (Figure 29). Afin de favoriser la formation du système tétravalent, les expériences seront effectuées à une concentration de 1 mM en plate-forme. 8 éq d'hydrazide sont ajoutés au milieu, puis la formation de **cRAFT(Ac)₄** est suivie après 4 heures par analyse HPLC et spectrométrie MALDI-ToF. Les analyses permettent d'identifier le produit unique ainsi formé comme étant **cRAFT(Ac)₄** (Figure 30A). Une expérience similaire a également été réalisée pour confirmer la préparation de **cRAFT(L-Arg)₄** dans les mêmes conditions (Figure 30B).

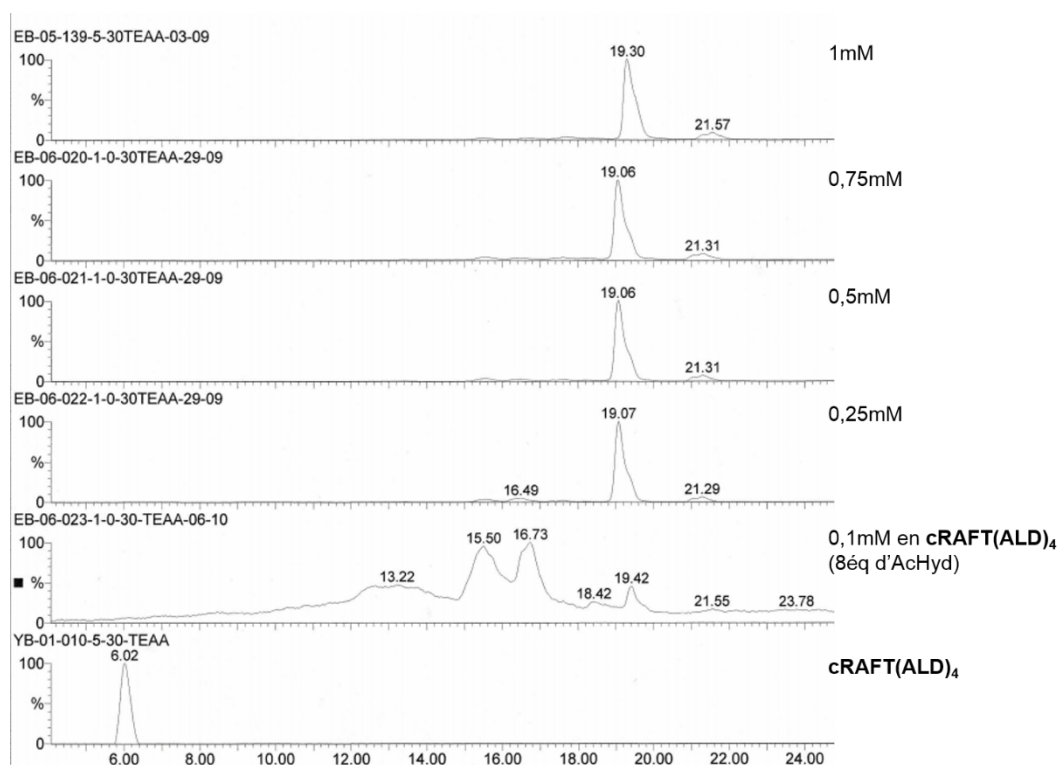


Figure 27. Détermination de la concentration optimale en **cRAFT(ALD)₄** pour la formation de liaisons acylhydrazones multiples pour former **cRAFT(Ac)₄** à pH 5,0 après 18 jours (Méthode B)

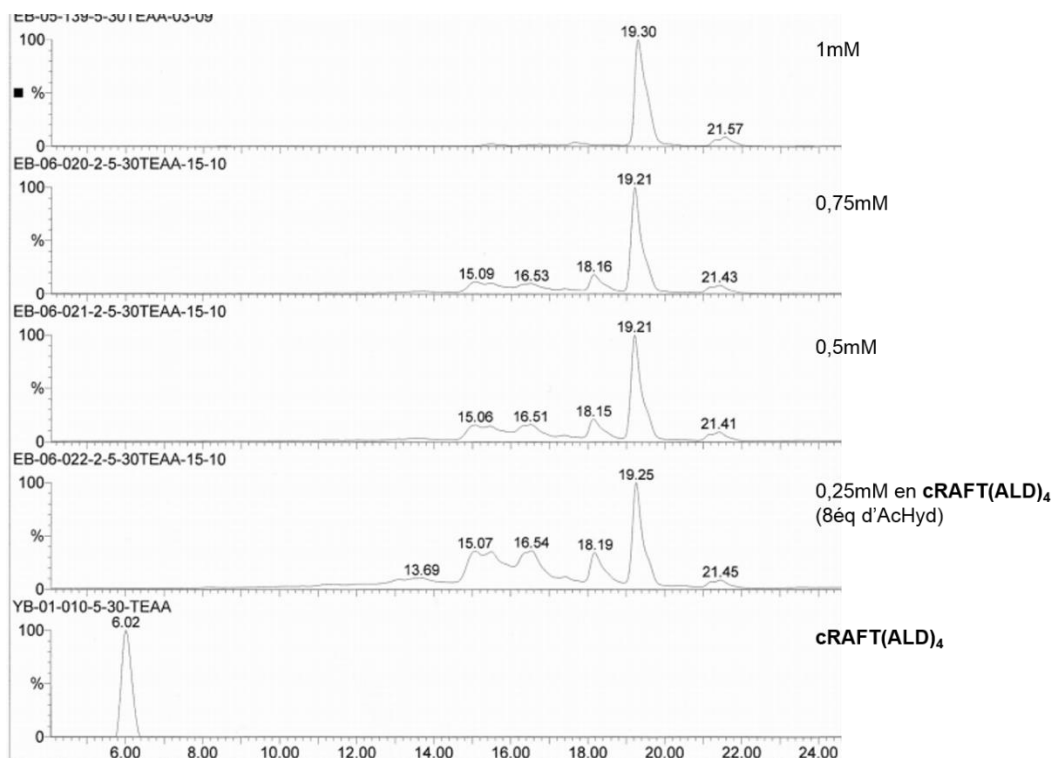


Figure 28. Etude de la préparation du composé tétravalent **cRAFT(Ac)₄** à différentes concentrations en plate-forme **cRAFT(ALD)₄** à pH 7,2 après 18 jours (Méthode B)

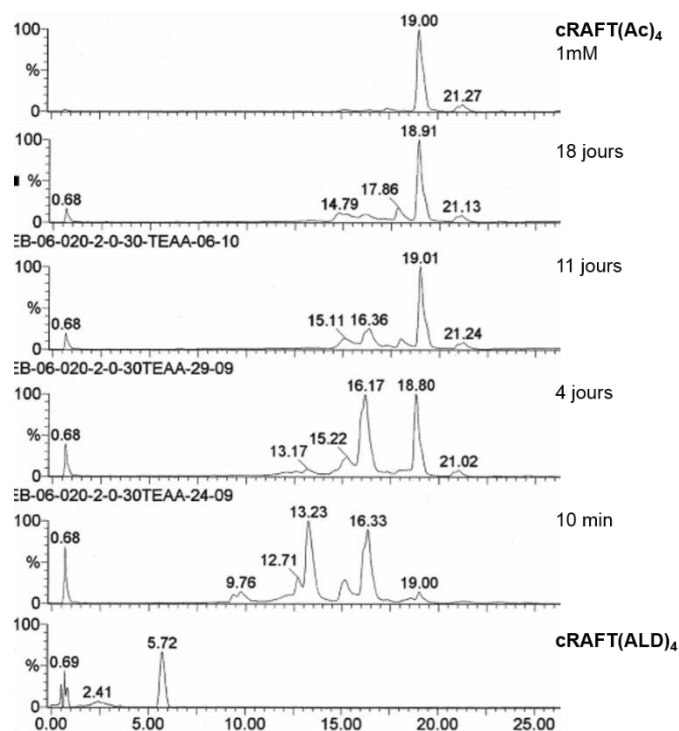


Figure 29. Suivi cinétique de la préparation du système multivalent **cRAFT(Ac)₄** à pH 7.2 à 0,75 mM (Méthode B)

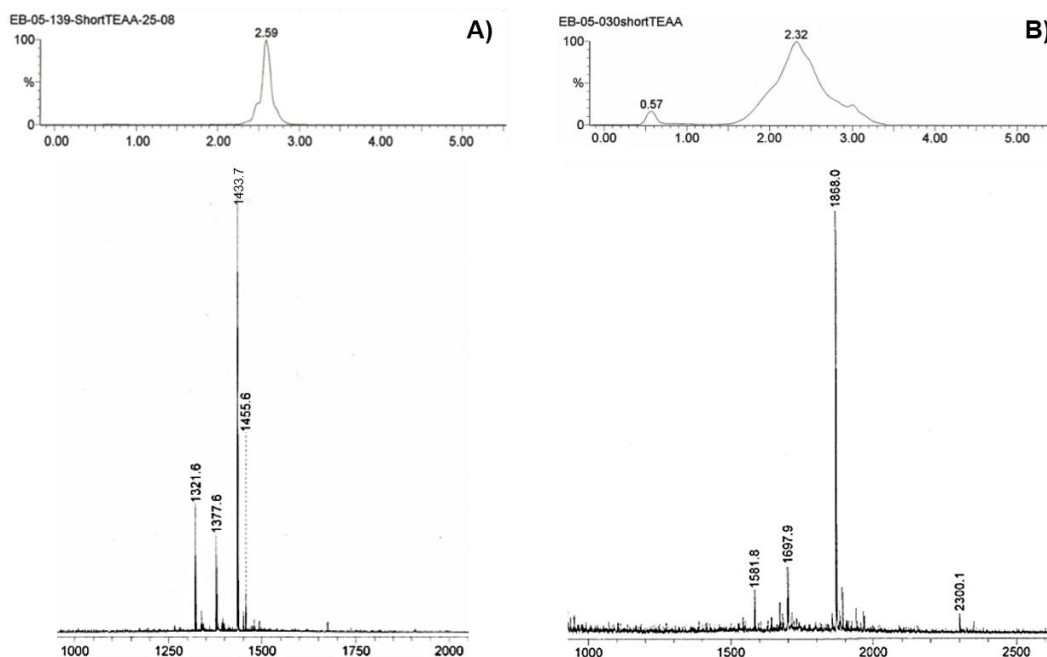


Figure 30. Chromatogrammes HPLC après 4 heures (Méthode A) et spectres MALDI-ToF de A) **cRAFT(Ac)₄** calculée pour $[M+Na]^+$ 1433,71, mesurée 1433,69 et B) **cRAFT(L-Arg)₄** calculée pour $[M+H]^+$ 1868,07, mesurée 1868,05

Les milieux physiologiques présentant des concentrations en NaCl de 150 mM, il a alors été envisagé de tester l'influence de la salinité sur la préparation du système **cRAFT(Ac)₄**. Des essais ont été réalisés pour évaluer la capacité du système à générer les liaisons selon la proportion en sel et en fonction de la valeur du pH. Ainsi, la formation du composé est étudiée dans des conditions tendant à se rapprocher des caractéristiques physiologiques (Figure 31). Le suivi par chromatographie HPLC après 14h de couplage des milieux réactionnels indique une réduction des cinétiques d'assemblage à 150 mM de NaCl et pH 7,2. Cette observation est appuyée par les résultats quantitatifs d'analyse par spectrométrie de masse des milieux. En effet, la masse du composé tri-fonctionnalisé ($[M+Na]^+$ mesurée 1321,64) est observée en proportion légèrement plus intense à pH 7,2.

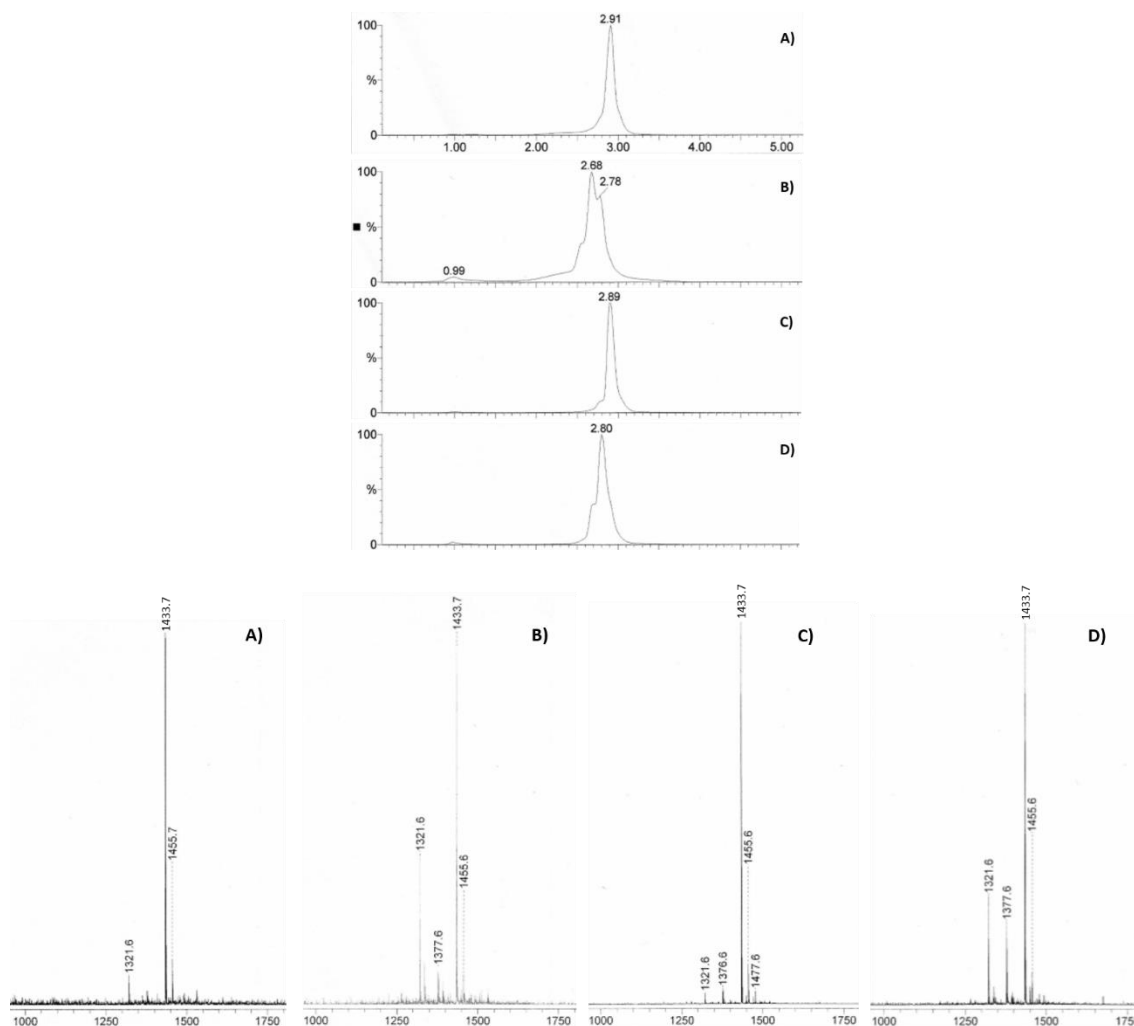


Figure 31. Etude de la préparation des systèmes tétravalents **cRAFT(Ac)₄** dans divers milieux tamponnés suivis par HPLC (Méthode A) (en haut) et spectrométrie MALDI-ToF (HCCA) : calculée pour $[M+Na]^+$ 1433,71, mesurée 1433,69 (en bas). A faible salinité (9,4 mM) : A) pH 5,0, B) à pH 7,2, et, à forte salinité (150 mM) : C) pH 5,0 et D) pH 7,2

Cependant, quel que soit la nature du milieu, les composés multivalents **cRAFT(Hyd)₄** sont formés majoritairement. A présent que les conditions d'auto-assemblage du système sont connues, l'étude de la complexation de ces clusters tétravalents pour l'ADN va pouvoir être réalisée.

C. Etude de la complexation des clusters hydrazones (**cRAFT(Hyd)₄**)

1. Etude par spectrométrie de masse MALDI-ToF

Des études de spectrométrie de masse ont alors été effectuées sur un simple brin d'ADN oligothymine de type dT₁₀ pour tester la complexation des systèmes multivalents sur un acide nucléique de taille réduite et non hybridé. De précédents travaux au sein de l'équipe avaient permis de montrer l'intérêt de cette analyse pour détecter de manière qualitative la formation de complexes de guanidiniums bi-fonctionnalisés avec des oligothymines.^[56] La méthode utilisée repose sur une complexation préalable des divers systèmes avec l'oligothymine avant

une concentration du milieu sur une matrice donnée puis l'analyse de cette dernière par spectrométrie MALDI-ToF. La masse des éventuels complexes créés, ou bien celle des systèmes seuls, sont alors observées.

Les premières analyses s'orientent autour d'expériences témoins pour s'assurer que la fonctionnalisation cationique joue un rôle primordial dans la complexation d'oligonucléotide. Ainsi, la plate-forme non-fonctionnalisée **cRAFT(ALD)₄** est testée sur une matrice de type DHAP à un ratio de 1 éq d'aldéhyde pour 1 éq de thymine. Seule la masse de l'oligonucléotide (Calculé pour [M+K]⁺ 3018,0, mesuré 3017,6) est observée même après enrichissement du milieu en plate-forme (5 éq, puis 10 éq d'aldéhydes). Le ligand monovalent **L-ArgHyd**, quant à lui, présente trois adduits pour l'oligonucléotide. Les systèmes multivalents **cRAFT(Ac)₄**, **cRAFT(L-Arg)₄** préformés sont ensuite étudiés. Le système neutre **cRAFT(Ac)₄** ne présente pas de complexation avec le dT₁₀, et seule la masse de l'oligonucléotide avec un adduit de ligand **AcHyd** est observée. Dans le cas du système cationique, un adduit de **cRAFT(L-Arg)₄** est visible lors de l'analyse MALDI-ToF (Figure 32). Ainsi en présence du composé multivalent, quatre résidus arginines interagissent avec le monobrin d'ADN.

Cette technique d'analyse a ainsi permis de conclure sur la nécessité de la présence de ligands cationiques et protonnés pour la ligation de l'ADN. Cette technique présente cependant des inconvénients majeurs dans sa mise en œuvre avec la nécessité de dessolvater le milieu puis de travailler en phase gazeuse pour réaliser la mesure. En effet, dans ces conditions, la conformation de l'ADN va être différente de celle adoptée en solution. Dans le but d'étudier le système en phase liquide pour conserver la conformation de l'oligonucléotide, des tests en solution aqueuse de déplacement de bromure d'éthidium sont envisagés.

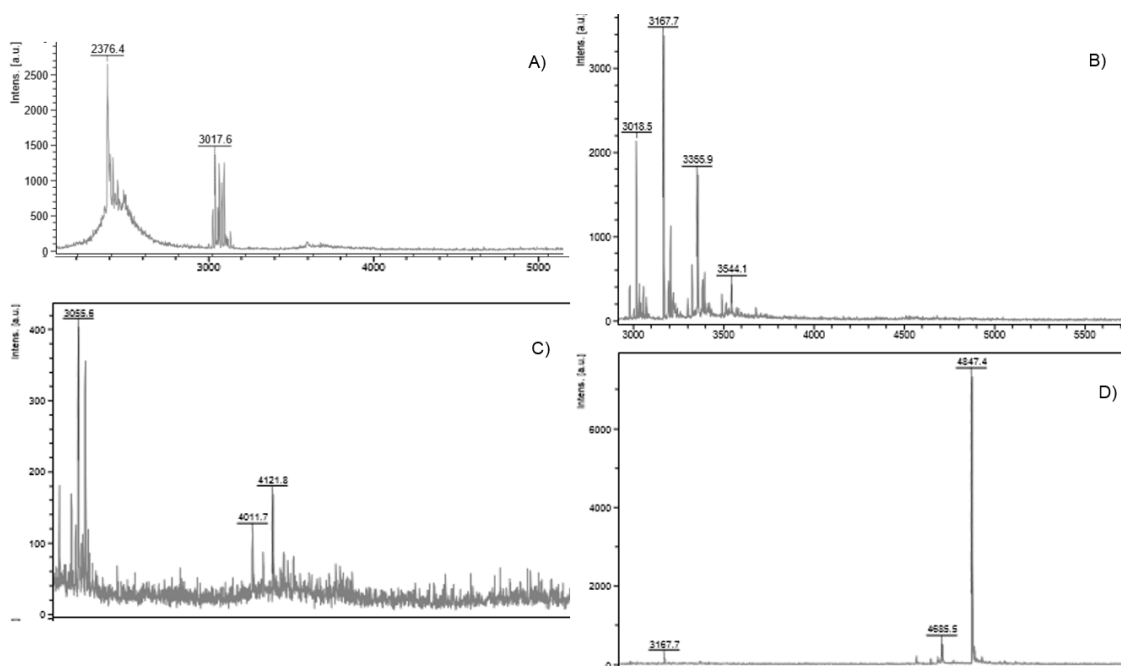


Figure 32. Spectres MALDI-ToF des essais de complexation avec l'oligonucléotide dT₁₀ de : A) **cRAFT(ALD)₄**, calculée pour [dT₁₀+K]⁺= 3018,0, mesurée 3017,6, B) **L-ArgHyd**, calculée pour [dT₁₀+M+H]⁺= 3169,1, mesurée 3167,7, C) **cRAFT(Ac)₄**, calculée pour [dT₁₀+M+H]⁺= 4391,7, mesurée [dT₁₀+AcHyd+H]⁺= 3055,6 et D) **cRAFT(L-Arg)₄**, calculée pour [dT₁₀+M+H]⁺= 4848,1, mesurée 4847,4

2. Etude par test de déplacement de bromure d'éthidium

La complexation des clusters **cRAFT(Ac)₄** et **cRAFT(L-Arg)₄** avec l'ADN double brins de thymus de veau est réalisée en milieu tamponné en présence d'un intercalant de bases nucléiques, le bromure d'éthidium (EtBr). Cette méthode se caractérise par la fluorescence générée à 590 nm par le composé aromatique en s'intercalant entre les bases d'ADN. Par ajout d'un composé capable de complexer l'ADN, le bromure d'éthidium va être déplacé. Ceci est possible dans le cas où la constante d'association de l'EtBr pour la cible est plus faible que celle de la nouvelle molécule.^[57] L'émission de fluorescence de l'EtBr est fortement réduite lorsqu'il est en solution (Schéma 3). La fluorescence émise par le complexe va alors diminuer. Une émission basse de fluorescence correspond alors à la complexation de l'acide nucléique alors qu'une valeur élevée indique l'absence de complexe.^[58]

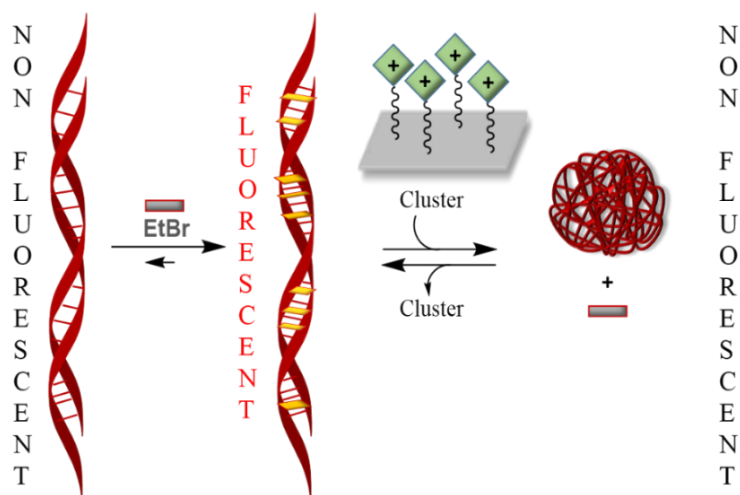


Schéma 3. Test de déplacement de bromure d'éthidium (EtBr)

Ce test présente cependant quelques limites. L'interprétation des mesures de fluorescence peut être faussée par la présence de faux positifs et de faux négatifs. Un faux positif peut être rencontré dans le cas de l'utilisation d'un autre intercalant. La fluorescence du milieu est diminuée sans la moindre formation d'un complexe. D'autre part, l'émission de fluorescence peut rester élevée malgré une reconnaissance de l'ADN dans le cas où l'agent complexant n'a pas déstructuré l'oligonucléotide. On parle alors de faux négatif. Malgré ces limitations nécessitant à l'expérimentateur de rester vigilant, ce test présente une grande efficacité pour déterminer la formation de complexe d'ADN. Il sera donc utilisé pour l'étude des composés.

a. Sur cluster préformé

Dans un premier temps, la complexation de l'ADN de thymus de veau par des systèmes multivalents est étudiée sur les clusters préformés. Pour cela, l'ADN est ajouté à une solution de bromure d'éthidium ($42 \mu\text{M}$) dans un milieu tamponné par 100 mM d'acétate de sodium à $\text{pH } 5,0$, $9,4 \text{ mM}$ en NaCl et en présence de $10 \mu\text{M}$ d'EDTA. L'EDTA permet de chélater les éventuelles métaux et ainsi inhiber l'activité des DNases qui ne sont actives qu'en présence d'ions métalliques. Le système multivalent **cRAFT(Hyd)₄** est ensuite additionné au milieu pour atteindre une concentration finale de 1 mM en plate-forme comme défini précédemment. La complexation avec l'acide nucléique est étudiée sur le système cationique **cRAFT(L-Arg)₄** et les briques formant le composé multivalent : l'hydrazide **L-ArgHyd** et la plate-forme peptidique **cRAFT(ALD)₄**. Alors que l'émission relative de fluorescence reste élevée lors des essais avec la plate-forme et les hydrazides (Tableau 1, Entrées 1, 2 et 3), une complexation de l'ADN est observée pour le peptide cationique après 1 à 2 heures. De même que pour les ligands monovalents et le peptide non fonctionnalisé, l'émission de fluorescence reste inchangée pour le cluster neutre **cRAFT(Ac)₄** (Tableau 1, Entrée 4)). Ces résultats indiquent donc l'importance de la multivalence du cluster pour une complexation efficace de l'ADN. Les tests sur **cRAFT(L-**

Arg)₄ sont effectués à un ratio N/P = 80 soit 80 charges positives (10 clusters cationiques **cRAFT(L-Arg)**)₄ par phosphodiester du squelette nucléique. Il est supposé dans le cas de ce système à pH 5,0 que quatre charges proviennent des ammoniums en position α des acides aminés modifiés. Les quatre autres charges positives sont présentes sur les groupements guanidiniums. Dans un deuxième temps, la quantité en ADN est augmentée par rapport au nombre de charges positives et les manipulations sont réalisées à N/P = 2. La salinité du milieu est également augmentée pour atteindre la concentration physiologique (150 mM en NaCl) dans le cas du composé actif. Quelles que soit les conditions testées, à N/P = 80 (Tableau 1, Entrée 5), ou N/P = 2 à faible ou forte salinité (Tableau 1, Entrées 6 et 7), la complexation de l'acide nucléique par le système cationique reste maximale.

Tableau 1. Evaluation de la complexation de l'ADN de thymus de veau avec les hydrazides, la plate-forme **cRAFT(ALD)**)₄ et les systèmes multivalents préformés dans différents milieux

Entrée	Composé	N/P ^[a]	[NaCl] (mM)	Emission de Fluorescence (%) ^[b]
1	cRAFT(ALD)) ₄	n.a. ^[c]	9,4	98,0
2	AcHyd	n.a. ^[d]	9,4	96,8
3	L-ArgHyd	24 ^[d]	9,4	87,9
4	cRAFT(Ac)) ₄	n.a. ^[c]	9,4	94,2
5	cRAFT(L-Arg)) ₄	80 ^[c]	9,4	0,0
6	cRAFT(L-Arg)) ₄	2 ^[c]	9,4	3,9
7	cRAFT(L-Arg)) ₄	2 ^[c]	150	0,0

[a] N/P représente le ratio de charges positives (N) par phosphodiester (P); en considérant que **L-ArgHyd** et **cRAFT(L-Arg)**)₄ portent, respectivement, 3 et 8 charges. [b] Mesuré après 2 h. [c] Expériences réalisées à 1 mM en composés. [d] Expériences réalisées à 8 mM en composés.

Cette étude a permis de montrer l'importance de la multivalence pour la complexation d'ADN double brins. Les différentes expériences ont clairement montré l'effet de multivalence. Les composés monovalents sont inefficaces pour déplacer le bromure d'éthidium même en présence d'un ratio en charges positives jusqu'à 120 fois supérieur à celui nécessaire au cluster **cRAFT(L-Arg)**)₄. La nature du ligand est également importante alors que le système neutre **cRAFT(Ac)**)₄ ne complexe pas l'oligonucléotide malgré sa multivalence. La suite du travail va reposer sur l'évaluation de la capacité de formation du complexe multivalent en préparant de nouvelles liaisons click acylhydrazones par auto-assemblage au sein même du milieu aqueux et en présence de la cible.

b. Par auto-assemblage du complexe

La complexation de l'acide nucléique est à présent testée en additionnant successivement au milieu tamponné, l'EtBr, l'ADN, les 8 équivalents d'hydrazide et enfin la plate-forme peptidique. La complexation est alors suivie au cours du temps pour observer l'évolution de l'émission de fluorescence. La Figure 33 permet de déduire la formation de **cRAFT(L-Arg)₄** et la complexation de l'ADN dès lors que le système multivalent est généré. Son homologue neutre, **cRAFT(Ac)₄**, pour sa part, indique un taux de fluorescence proche des 100%. Ces résultats permettent de conclure sur l'absence de complexation alors que l'on sait grâce au suivi HPLC réalisé précédemment que ce système est formé dans ces conditions.

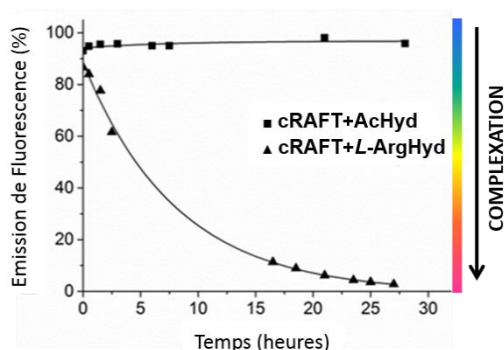


Figure 33. Préparation des systèmes multivalents **cRAFT(L-Arg)₄** et **cRAFT(Ac)₄** et l'évolution de l'émission de fluorescence

Ces résultats permettent de confirmer que les systèmes tétravalents cationiques, préparés en présence de la cible, complexent efficacement l'ADN de thymus de veau. En outre, il est possible de déduire de ces suivis par spectrométrie de fluorescence que les liaisons acylhydrazones multiples peuvent être générées *in situ*. Ainsi, la complexation de l'oligonucléotide est la conséquence de l'auto-assemblage du cluster multivalent.

L'importance de la multivalence et notamment de la tétrivalence du système généré pour la complexation de l'ADN est étudiée plus en détail. Pour cela, 0, 1, 2, 3, 4 éq d'hydrazides sont ajoutés à la plate-forme **cRAFT(ALD)₄** pour préparer des clusters de valence réduite ($n < 4$) et comparer ces systèmes avec le cluster formé avec 8 éq d'hydrazides. Grâce aux analyses HPLC et MALDI-ToF, la formation de systèmes **cRAFT(L-Arg)_n** et **cRAFT(Ac)_n** de valence réduite peut être suivie (Figure 34).

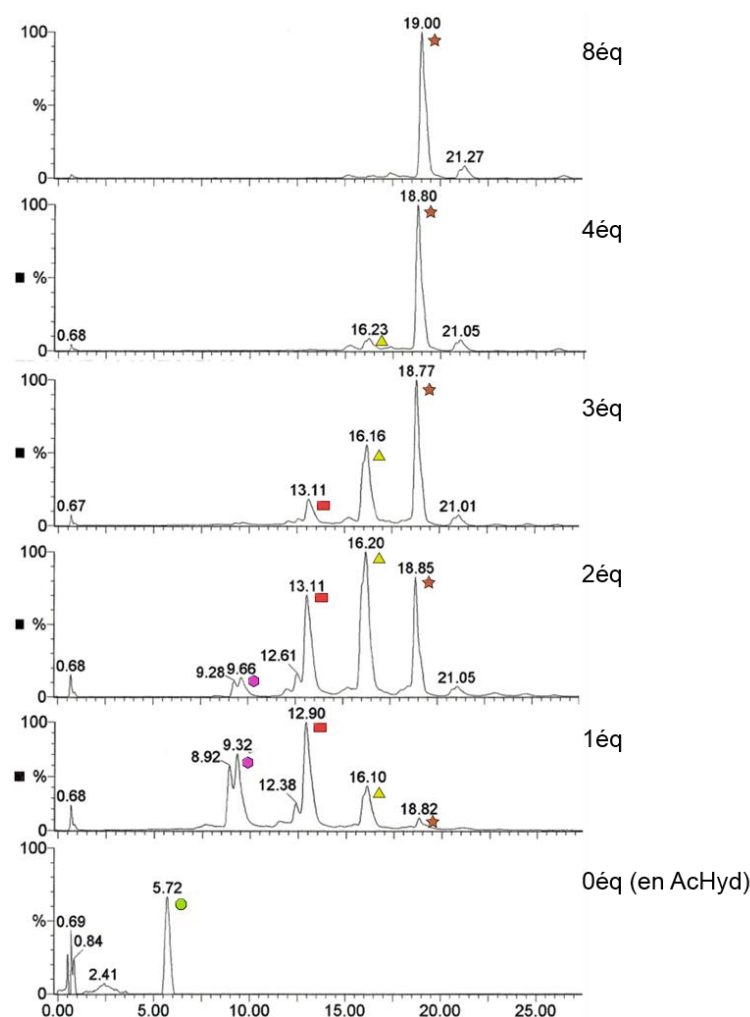


Figure 34. Chromatogrammes HPLC (Méthode B) des systèmes **cRAFT(Ac)_n** auto-assemblés à diverses stœchiométries mesurés après 13 jours. Produits : **cRAFT(ALD)₄** (●) calculée pour $[M+Na]^+$: 1209,28, mesurée $[M+Na]^+$: 1209,56, **cRAFT(Ac)₁** (◈) calculée pour $[M+Na]^+$: 1265,60, mesurée $[M+Na]^+$: 1265,58, **cRAFT(Ac)₂** (■) calculée pour $[M+Na]^+$: 1321,64, mesurée $[M+Na]^+$: 1321,62, **cRAFT(Ac)₃** (▲) calculée pour $[M+Na]^+$: 1377,67, mesurée $[M+Na]^+$: 1377,66, **cRAFT(Ac)₄** (★) calculée pour $[M+Na]^+$: 1433,71, mesurée $[M+Na]^+$: 1433,68, calculée pour $[M+K]^+$: 1449,71, mesurée $[M+K]^+$: 1449,66

L'auto-assemblage du cluster et la complexation *in situ* de l'ADN indique que seulement 3 éq d'hydrazides **L-ArgHyd** permettent d'atteindre une émission de fluorescence réduite dans des conditions de faible salinité (9,4 mM en NaCl) (Figure 35). Cependant, en augmentant la concentration en sel du milieu (150 mM en NaCl), la complexation n'est maximum qu'après l'ajout de plus de 4 éq de **L-ArgHyd** (Figure 35). Ces résultats permettent de déduire de l'importance de la multivalence. Les systèmes cationiques **cRAFT(L-Arg)_n** complexent de manière plus efficace les acides nucléiques avec l'augmentation de leur valence. Ainsi le cluster **cRAFT(L-Arg)₄** est le système capable de complexer le plus efficacement l'ADN en présence de 150 mM de NaCl.

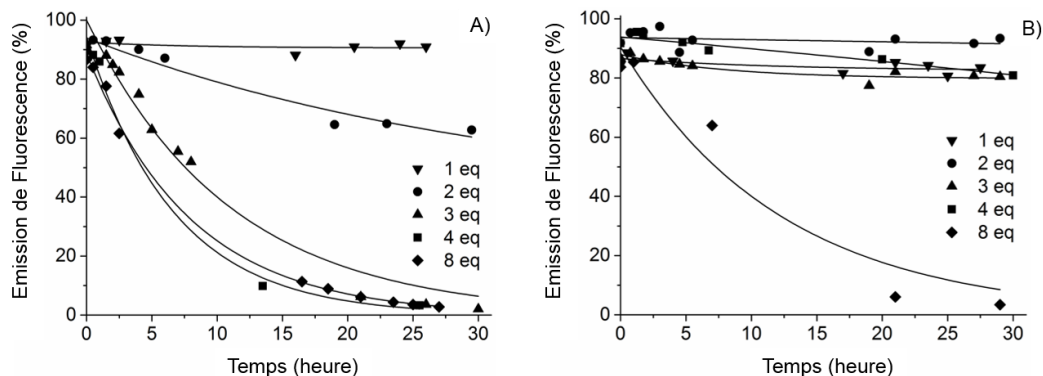


Figure 35. Complexation d'ADN *in situ* par auto-assemblage du peptide **cRAFT(ALD)₄** avec différentes quantités (1-8 éq) de **L-ArgHyd** : A) à faible salinité (9,4 mM NaCl) et B) à forte salinité (150 mM NaCl)

Dans le but de confirmer les résultats obtenus grâce à cette méthode d'analyse de la complexation d'ADN et pour approfondir la connaissance du système, des études complémentaires ont été réalisées, basées sur d'autres types de techniques. Parmi elles l'électrophorèse sur gel est envisagée pour déterminer la valeur du ratio N/P permettant la complexation.

3. Etude par électrophorèse sur gel

L'électrophorèse sur gel est une méthode de comparaison quantitative des clusters permettant la titration. Ainsi le ratio N/P pour lequel le complexe est généré peut être déduit. L'importance de la multivalence pour la complexation d'ADN est étudiée par la migration sur gel d'agarose du plasmide en présence de l'hydrazide **L-ArgHyd** et du cluster **cRAFT(L-Arg)₄**. Cet oligonucléotide cyclique est un vecteur d'expression de 5700 bases (Figure 36).

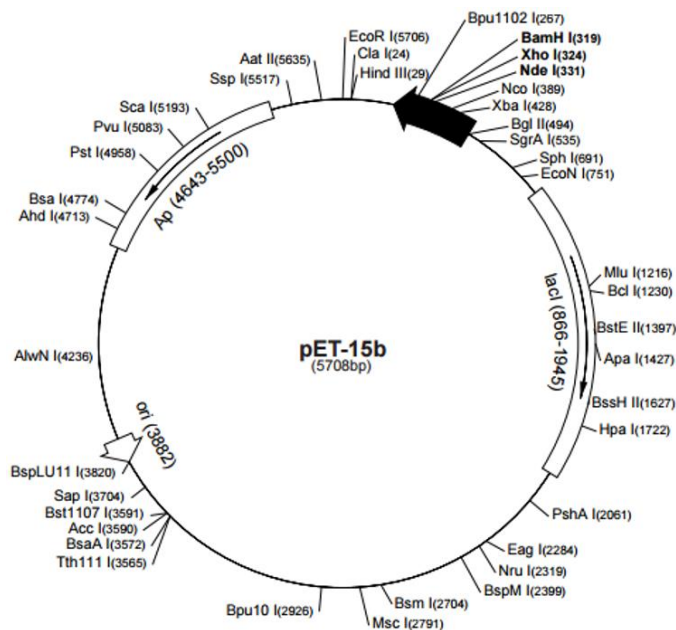


Figure 36. Carte du plasmide pET-15b^[60]

La migration est réalisée à pH 8,0 dans un milieu tamponné. Le complexe formé va être de taille plus importante que le plasmide et sa migration sera ainsi ralentie. L'hydrazide **L-ArgHyd** ne ralentit pas la migration du plasmide jusqu'à un ratio N/P = 500 alors que le système multivalent indique une complexation à partir d'un ratio N/P de 10 (Figure 37). Les données relevées dans la littérature montrent l'efficacité de complexation de notre composé multivalent, avec une valence somme toute limitée, de quatre ligands.^[37-38,55c,59]

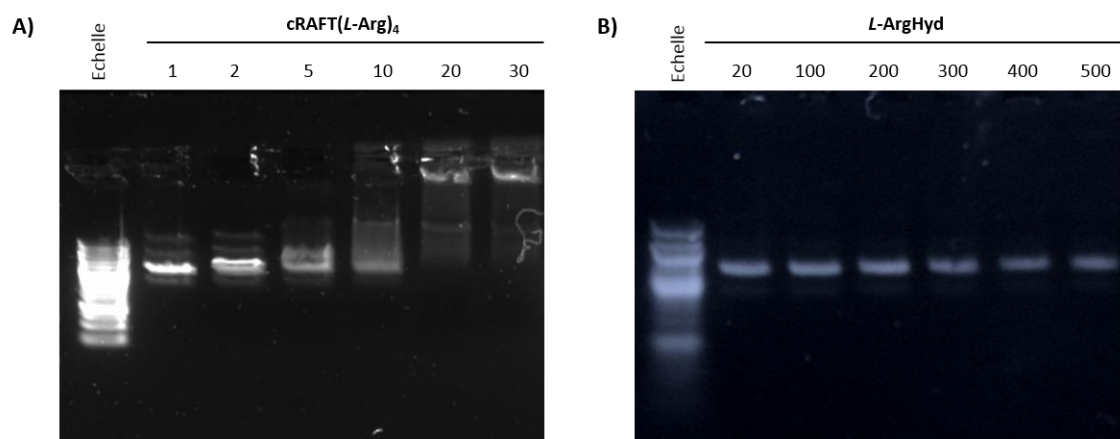


Figure 37. Etude de la complexation d'acide nucléique par électrophorèse sur gel à différents ratios de N/P par : A) **cRAFT(L-Arg)₄**, B) **L-ArgHyd**

Les gels ont permis de confirmer l'importance de la multivalence. Cette technique a offert la possibilité de démontrer cet effet multivalent d'un point de vue quantitatif après les résultats qualitatifs du test de déplacement du bromure d'éthidium. Afin de comprendre encore mieux ce système et de caractériser le mode de reconnaissance, une étude thermodynamique est réalisée. La titration calorimétrique isotherme est effectuée pour accéder aux paramètres thermodynamiques de reconnaissance.

4. Etude par Titration Calorimétrique Isotherme

La technique de titration calorimétrique isotherme (ITC) est utilisée pour étudier l'interaction entre deux molécules. Elle permet de conduire aux valeurs d'entropie ΔS , d'enthalpie ΔH mais également de déterminer la constante d'association K_a d'un complexe par mesure de la puissance à fournir par le calorimètre pour maintenir le réacteur isotherme.^[60] La chaleur associée à l'interaction peut ainsi être déterminée permettant d'en déduire si la réaction est endo- ou exothermique. L'ITC offre la possibilité d'étudier tous les types d'interactions créées par les biomolécules sans modification chimique des molécules. Ainsi, la complexation du système **cRAFT(L-Arg)₄** avec l'ADN de thymus de veau est confirmée à faible salinité et pH 7,2 (Figure 38A). La titration montre que la complexation est favorisée par des ligations exothermiques ($\Delta H = -4,3 \pm 0,13 \text{ kcal.mol}^{-1}$) et un gain entropique ($T\Delta S = 3,4 \pm 0,06 \text{ kcal.mol}^{-1}$) pouvant être dû à la dessolvatation de l'acide nucléique. L'intégration des valeurs mesurées

indique une constante de couplage de $4,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ pour l'interaction. Enfin, le nombre de sites N impliqués dans l'interaction est déterminé à 0,5, suggérant l'implication d'une plate-forme fonctionnalisée **cRAFT(L-Arg)₄** pour deux paires de bases d'ADN. La force d'interaction mesurée par ITC dans un milieu à 150 mM de NaCl est plus faible avec une constante de couplage de $1,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ pour l'ADN double brin (Figure 38B).

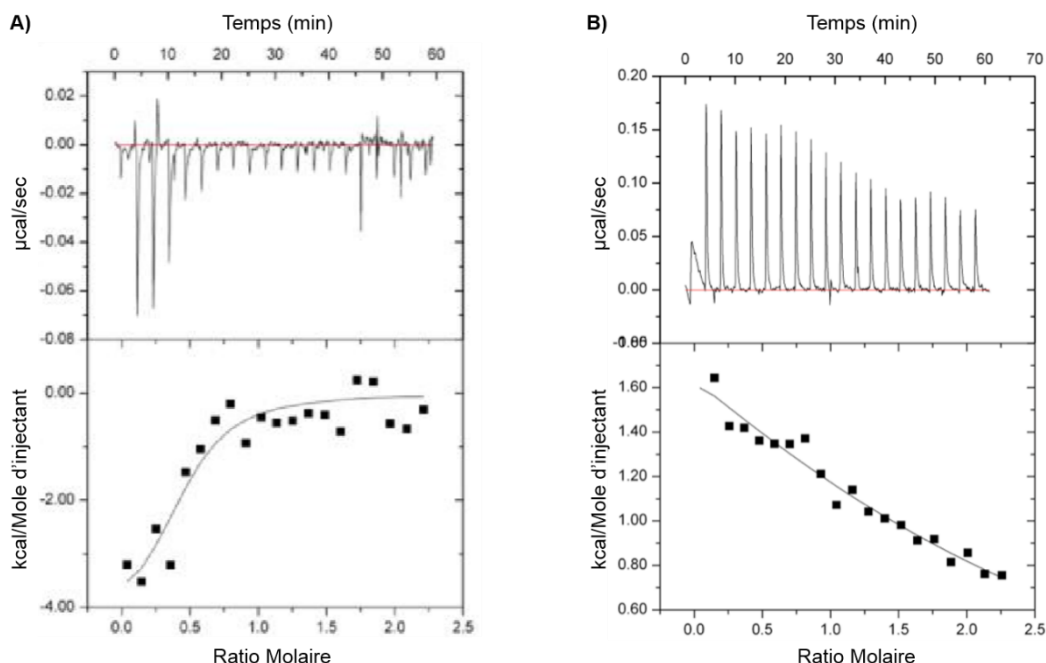


Figure 38. Etude de la complexation de l'ADN par Titration Calorimétrique Isotherme par le système **cRAFT(L-Arg)₄** à pH 7,2 : A) 9,4 mM de NaCl, B) 150 mM de NaCl. Les courbes isothermes du haut sont les valeurs brutes et celles du bas sont obtenues après intégration des signaux individuels de flux de chaleur appliqués pour maintenir la température de la cellule calorimétrique

Ces résultats montrent l'importance du taux de NaCl présent dans le milieu pour l'interaction électrostatique dans la complexation de l'ADN.

5. Etude par Microscopie Electronique à Transmission

Les différentes techniques présentées précédemment ont permis de conclure sur la capacité de complexation de l'ADN par des systèmes pré-organisés. Ces clusters étant fonctionnalisés de manière multivalente par des ligands cationiques protonnés. Cependant, ces méthodes ne permettent pas l'observation des complexes. Pour tenter d'illustrer et de comprendre comment s'organisent les biomolécules d'ADN en présence de clusters cationiques, des images de contraste du complexe, générées par de la microscopie électronique à transmission sont envisagées. Ainsi, le plasmide pET 15b seul, la plate-forme peptidique **cRAFT(L-Arg)₄** seule et le ligand **L-ArgHyd** en présence de plasmide sont successivement soumis au flux d'électrons (Figure 39). La complexation du composé cationique avec le plasmide est réalisée à des ratios N/P = 20 et 80. Les images obtenues montrent des systèmes de sections comprises entre 10 et 30 nm alors que la plate-forme peptidique seule mesure environ 1 nm

solution tamponnée. Après 14 jours, le mélange réactionnel est analysé par HPLC. Le chromatogramme obtenu montre la présence de plusieurs produits issus de la ligation réversible. La constitution de la bibliothèque est biaisée vers la formation du composé multivalent neutre **cRAFT(Ac)₄** (Figure 41).

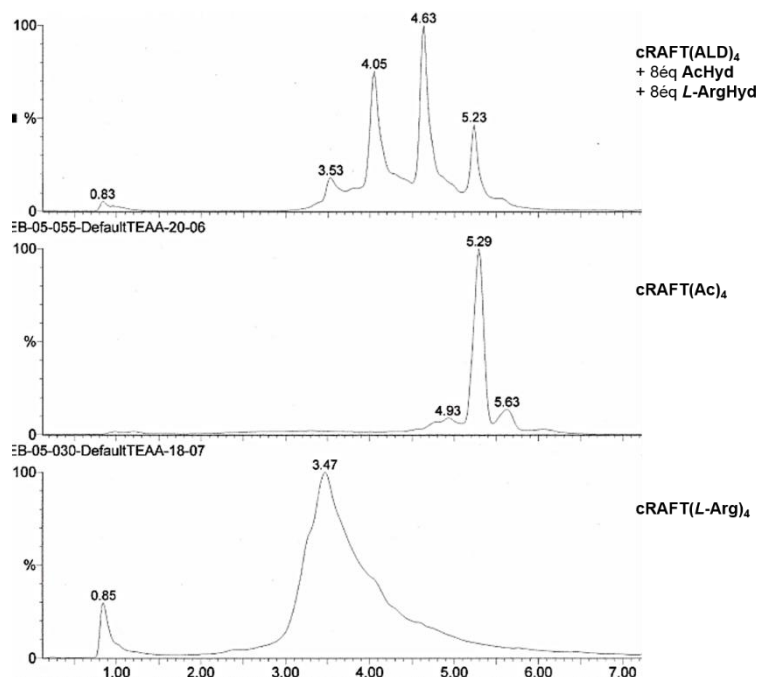


Figure 41. Suivi HPLC de la bibliothèque dynamique (Méthode D)

La liaison acylhydrazone ayant été sélectionnée entre autre dans ce projet pour sa dynamique, il a été envisagé d'étudier en parallèle, l'échange des systèmes multivalents **cRAFT(L-Arg)₄** et **cRAFT(Ac)₄** avec les monomères hydrazides **AcHyd** et **L-ArgHyd** respectivement. La réversibilité offerte par cette liaison permet d'obtenir des systèmes possédant un caractère adaptable intéressant. Les analyses HPLC du suivi des échanges montrent un équilibre atteint après 6 à 12 jours. Lors de l'addition des 8 éq d'**AcHyd** au système **cRAFT(L-Arg)₄** à pH 5,0, la formation du composé neutre **cRAFT(Ac)₄** est observée après 5 jours de réaction (Figure 42). La proportion en cluster **cRAFT(L-Arg)₄** est en parallèle diminuée. Lors de la réaction d'échange entre le composé neutre **cRAFT(Ac)₄** et le résidu guanidinium monovalent **L-ArgHyd**, l'analyse après 12 jours montre qu'on observe toujours le réactif multivalent initial à un temps de rétention de 5,3 min. L'équilibre atteint après ces deux semaines permet de conclure sur l'absence du système **cRAFT(L-Arg)₄** dans la composition du milieu (Figure 43). Les résultats des échanges indiquent comme dans le cas des expériences précédentes que la constitution des systèmes dynamiques est biaisée vers la formation du composé multivalent neutre **cRAFT(Ac)₄**. Ces réactions d'échanges confirment que la bibliothèque est sous contrôle thermodynamique.

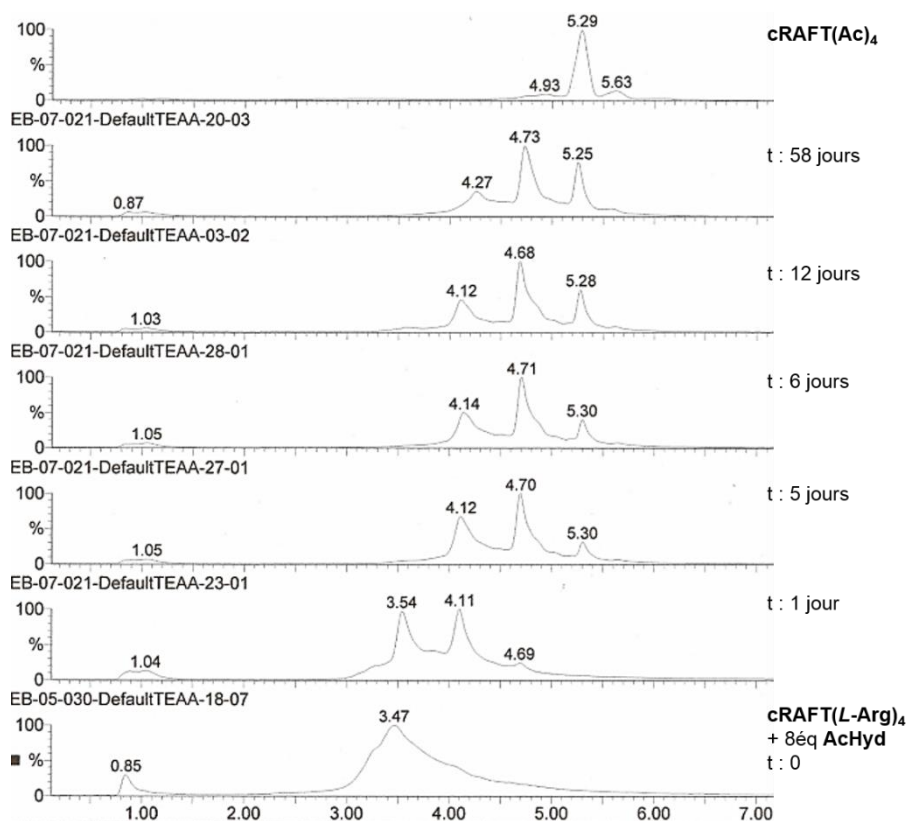


Figure 42. Suivi HPLC de l'échange **cRAFT(L-Arg)₄** avec **AcHyd** (Méthode D)

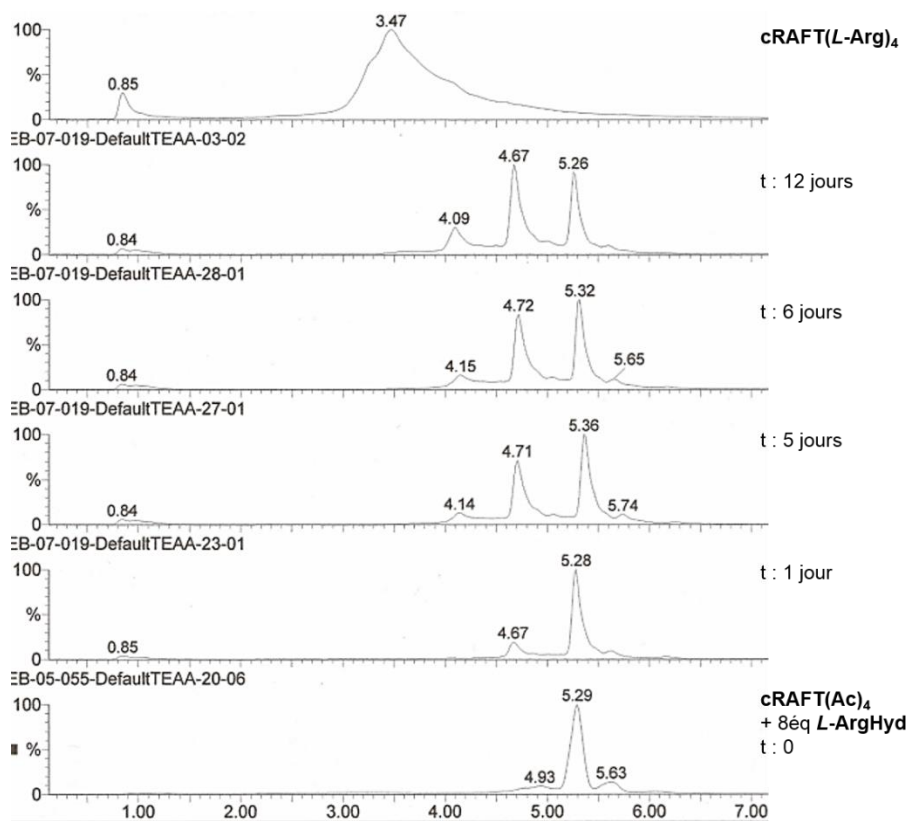


Figure 43. Suivi HPLC de l'échange **cRAFT(Ac)₄** avec **L-ArgHyd** (Méthode D)

La cinétique d'échange étant relativement lente, une méthode permettant d'accélérer la vitesse d'échange est recherchée.^[61] Pour cela, ces dernières années plusieurs groupes ont travaillé sur la catalyse nucléophile, dans le but d'améliorer la cinétique de formation des liaisons oximes et acylhydrazones et ainsi réduire les temps de réaction. Des catalyseurs ont été développés permettant de réaliser ces liaisons click dans des temps réduits. Parmi eux, le plus facile d'accès et le moins onéreux est l'aniline.^[61b,62] Cet hétérocycle améliore la cinétique des réactions à une concentration de 100 mM dans le milieu, en formant une liaison imine peu stabilisée en milieu aqueux (Figure 44). Afin d'étudier l'effet sur nos systèmes, des réactions de compétition incluant **AcHyd**, **L-ArgHyd** et la plate-forme **cRAFT(ALD)₄** sont alors testées dans des milieux catalysés à pH 5,0 et 7,2 et en présence de NaCl à faible concentration (9,4 mM). Le suivi HPLC montre après une journée que la proportion en composé tétravalent neutre est plus importante dans le cas du système catalysé à pH 5,0 (Figure 45). A pH 7,2, l'aniline déplace également l'équilibre vers la formation d'intermédiaires neutres après 24h mais n'a pas atteint d'équilibre thermodynamique après plusieurs semaines de réaction en l'absence de catalyseur (Figure 46). L'influence du catalyseur sur la vitesse d'équilibration du système reste mineure à pH 5,0 mais représente un grand intérêt pour les réactions à pH 7,2.

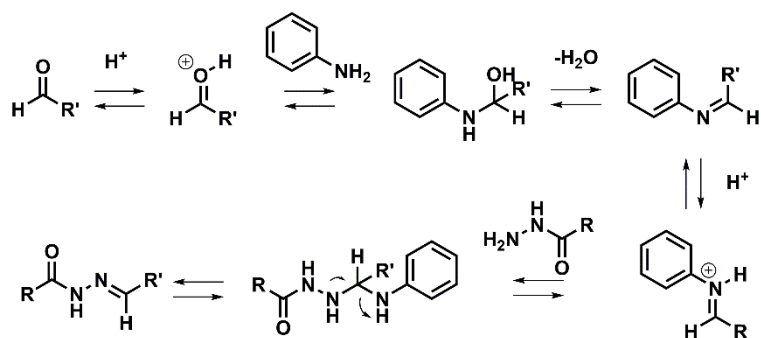


Figure 44. Mécanisme réactionnel d'une réaction de formation d'hydrazone catalysée par l'aniline

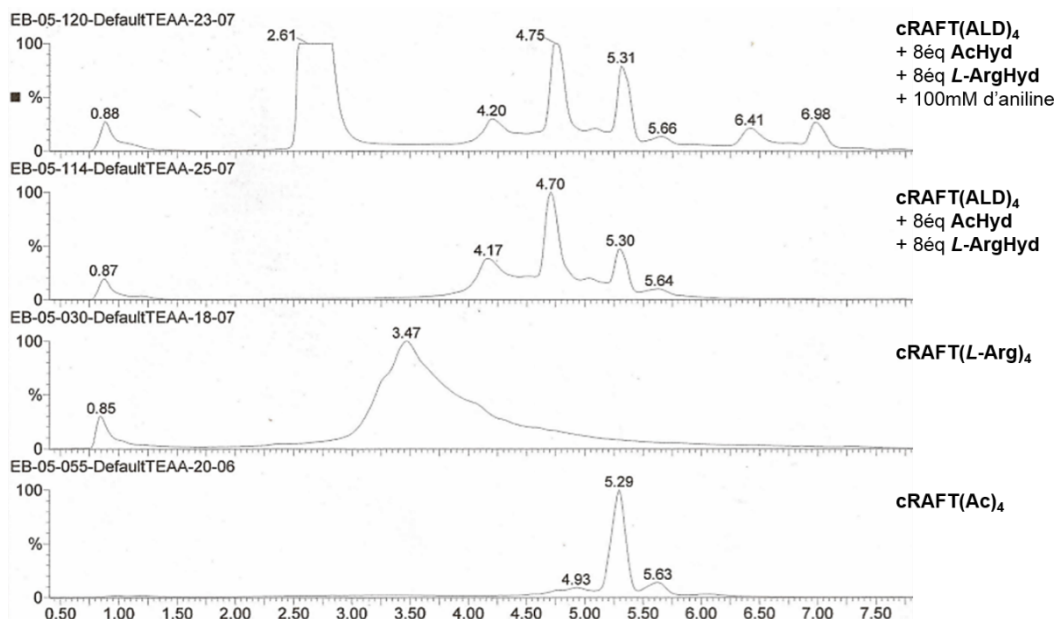


Figure 45. Comparaison après une journée de réaction des bibliothèques dynamiques à pH 5,0 en présence ou non d'aniline comme catalyseur nucléophile (Méthode D)

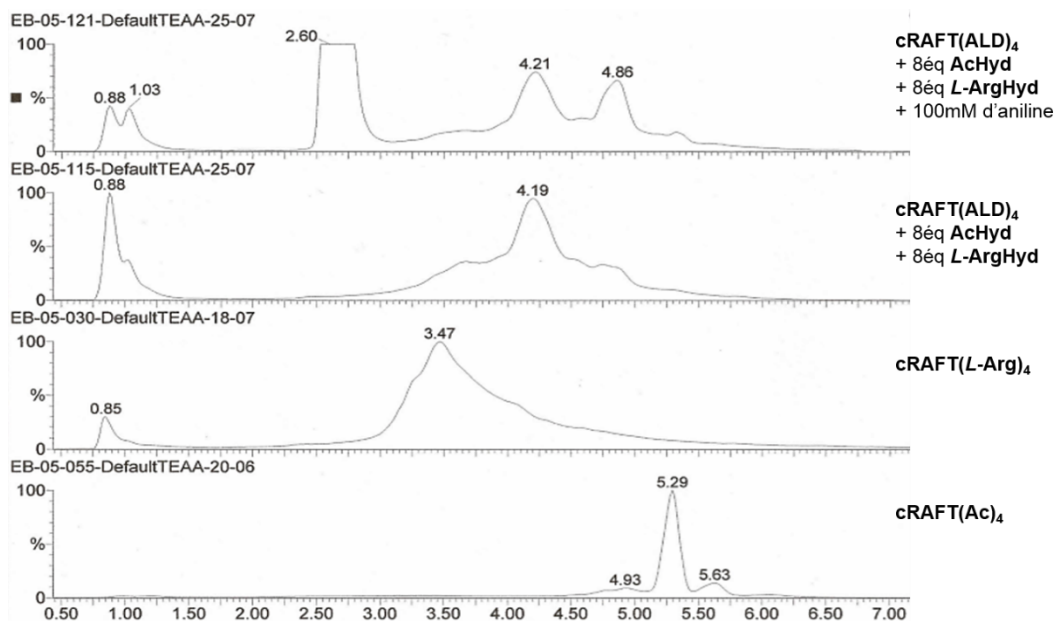


Figure 46. Comparaison après une journée de couplage à pH 7,2 des bibliothèques dynamiques en présence ou non d'aniline comme catalyseur nucléophile (Méthode D)

L'utilisation de l'aniline est à nouveau testée pour les échanges dans des milieux catalysés à pH 5,0 et 7,2 et en présence de NaCl à faible (9,4 mM) ou forte concentration (150 mM). Le suivi HPLC de l'addition de 8 éq de **AcHyd** au milieu **cRAFT(L-Arg)₄** montre une augmentation de la vitesse d'échange entre les résidus hydrazides lors du suivi cinétique à pH 5,0 (Figure 47). A pH 7,2, l'analyse HPLC réalisée après 21 jours montre une proportion légèrement plus grande d'intermédiaire neutre. L'équilibre n'est pas atteint en l'absence du catalyseur nucléophile (Figure 48). De la même manière que pour les réactions de compétition, la

présence du catalyseur influence peu la vitesse d'échange des ligations à pH 5,0. A pH 7,2, le rôle de l'aniline est moins visible que dans le cas des réactions de compétition.

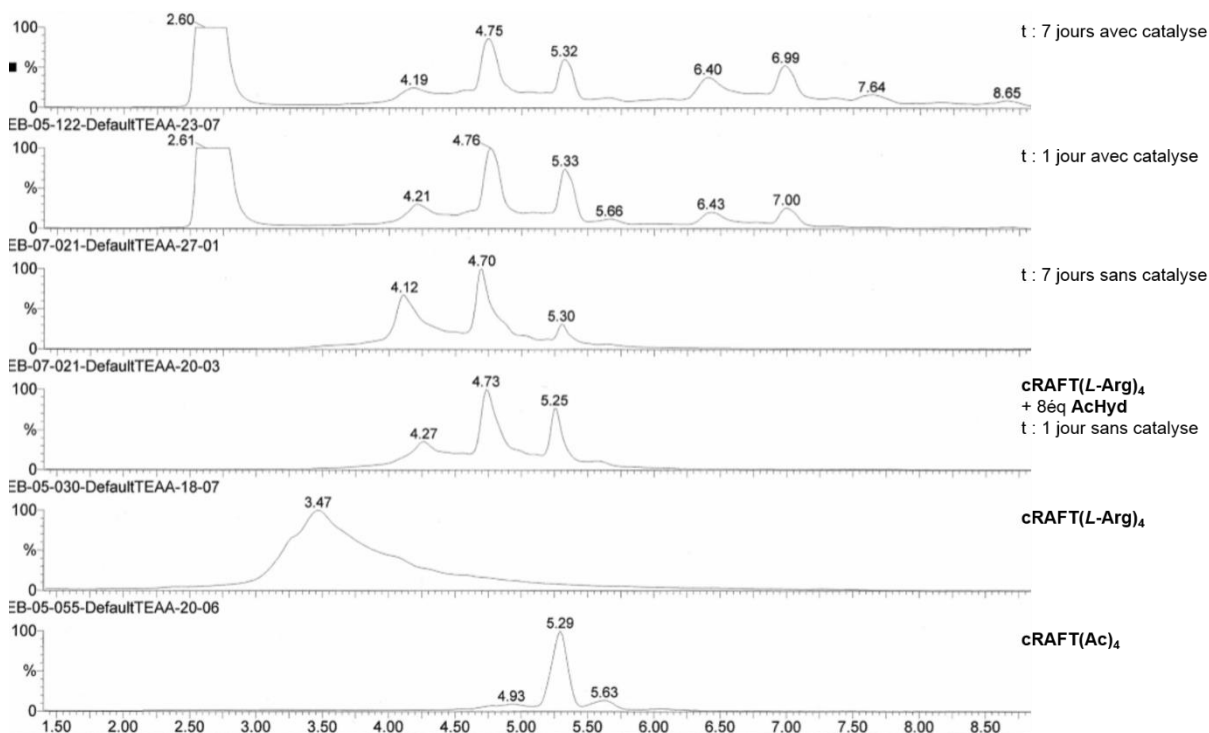


Figure 47. Suivi cinétique par HPLC de l'échange hydrazone (**cRAFT(L-Arg)₄**)-hydrazide (**AcHyd**) en présence ou non d'aniline comme catalyseur nucléophile à pH 5,0 (Méthode D)

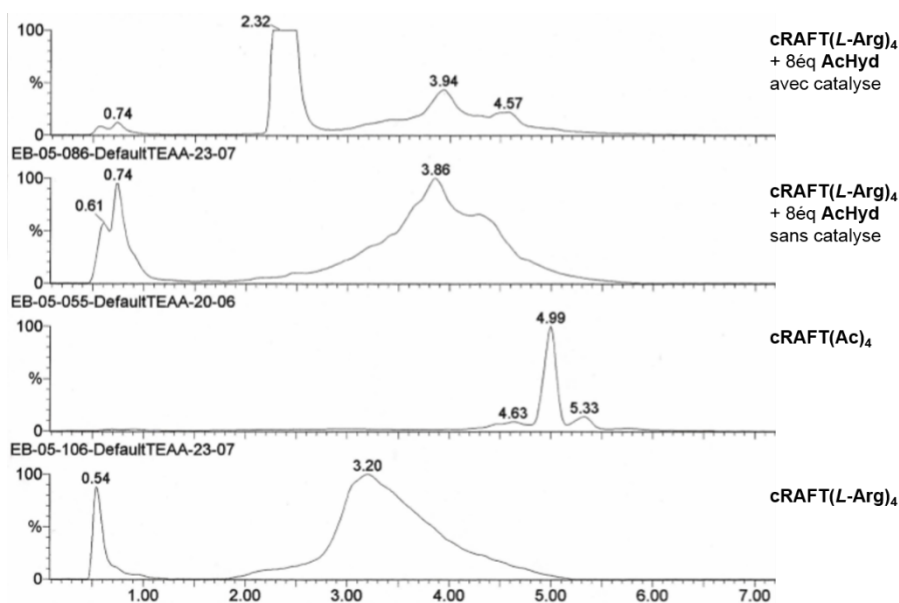


Figure 48. Evaluation de l'effet de la catalyse sur l'échange hydrazone (**cRAFT(L-Arg)₄**)-hydrazide (**AcHyd**) par HPLC à pH 7,2 en présence ou non d'aniline comme catalyseur nucléophile après 3 semaines (Méthode D)

Un profil de résultats similaires est observé dans le cas de l'échange par addition de 8 éq de **L-ArgHyd** au milieu **cRAFT(Ac)₄** à pH 5,0 lors du suivi cinétique et à pH 7,2 après 21 jours.

Ces tests ont permis de montrer l'intérêt d'une catalyse nucléophile, en particulier dans le cas des expériences réalisées à pH 7,2. L'équilibre thermodynamique atteint dans le cas des manipulations d'échanges montre cependant qu'à pH 5,0, le rôle d'une catalyse avec l'aniline est peu visible. Ainsi, ces expériences d'échanges de résidus hydrazides sont ensuite étudiées en présence d'ADN par déplacement de bromure d'éthidium à pH 5,0. L'objectif est de tester les possibilités de complexation et de relargage de l'ADN par ces systèmes dynamiques.

2. Etude par test de déplacement de Bromure d'éthidium

La formation de cluster à partir d'une bibliothèque de ligands est étudiée en présence de l'ADN. Le but est d'observer si la réaction peut être dirigée par l'acide nucléique et conduire à un autre système. Ainsi l'EtBr et l'ADN sont placés en solution puis les deux hydrazides en quantités équimolaires (8 éq) sont ajoutés au milieu tamponné à pH 5,0 et faible salinité (9,4 mM). La plate-forme peptidique est ensuite additionnée pour atteindre un ratio N/P de 80. L'émission de fluorescence est suivie dans le temps. Aucune évolution du signal n'est observée et le système analysé ne permet pas de distinguer de complexation pour l'ADN cible (Figure 49). Après avoir effectué l'expérience à un ratio N/P de 2, une diminution du signal de fluorescence est mesurée après quelques heures d'analyse (Figure 49). Cette émission de fluorescence basse indique la formation d'un système capable de complexer efficacement l'ADN de thymus de veau.

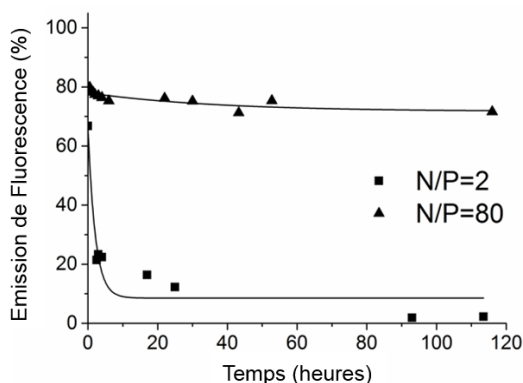


Figure 49. Compétition pour la complexation de l'ADN par l'addition de la plate-forme **cRAFT(ALD)₄** au mélange d'EtBr et d'ADN de thymus de veau avec 8éq d'**AcHyd** et de **L-ArgHyd** à N/P = 80 (▲) et N/P = 2 (■)

Alors que le suivi HPLC de l'expérience impliquant la plate-forme et les deux ligands avait permis de montrer un déplacement de l'équilibre vers la formation du système neutre **cRAFT(Ac)₄**, les résultats des tests de déplacement d'EtBr semblent tendre vers la présence de clusters cationiques. La diminution du taux d'émission de fluorescence est interprétée comme étant due au rôle de template que l'ADN joue pour favoriser la formation du meilleur complexant. Ainsi l'oligonucléotide déplace l'équilibre de la bibliothèque dynamique en assistant la génération du cluster **cRAFT(L-Arg)₄**. Le fait de diminuer le ratio N/P favorise cet

effet template de l'acide nucléique en impliquant la majeure partie des composants du système. L'ADN induit ainsi une sélection parmi les ligands constituant la bibliothèque (Figure 50 et Figure 52).

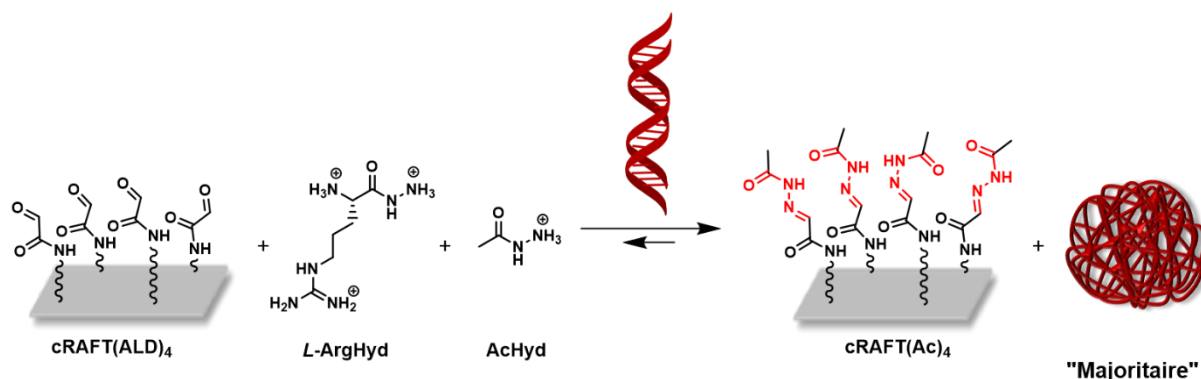


Figure 50. Formation d'un complexe d'ADN par sélection entre **AcHyd** et **L-ArgHyd** pour générer des clusters multivalents avec la plate-forme **cRAFT(ALD)₄**

Dans le cas des essais d'échange, le test de déplacement de bromure d'éthidium est répété dans les mêmes conditions que la préparation des échantillons pour le suivi HPLC. Les deux ligands sont additionnés à la plate-forme puis après une nuit, l'ADN et l'EtBr sont ajoutés au système pour atteindre un ratio N/P de 2. Une diminution du signal de fluorescence est mesurée après quelques heures d'analyse (Figure 51 et Figure 52). Cette réduction du taux de fluorescence indique la formation d'un système actif pour la complexation de l'ADN de thymus de veau. L'hypothèse d'interprétation des résultats par un rôle template de l'acide nucléique est confirmée dans cette expérience. La dynamique des liaisons formant le cluster a permis au système d'acquérir des propriétés d'adaptation.

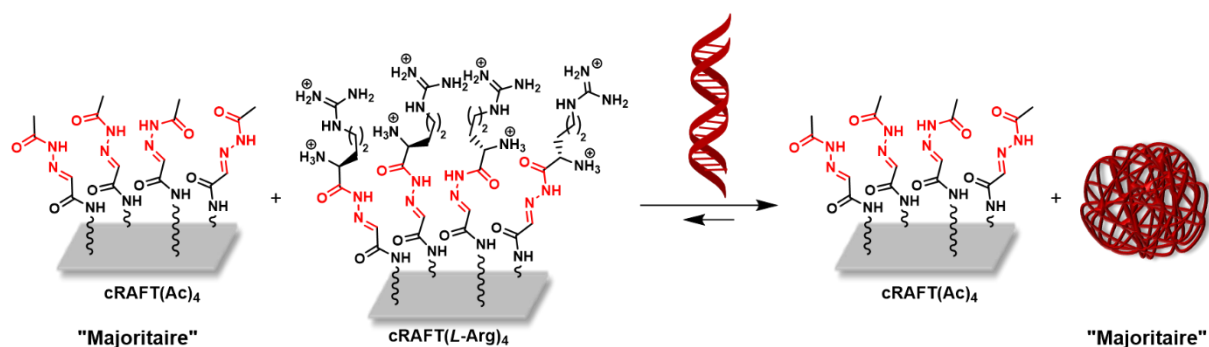


Figure 51. Formation d'un complexe d'ADN par adaptation entre **AcHyd** et **L-ArgHyd** pour générer des clusters multivalents avec la plate-forme **cRAFT(ALD)₄**

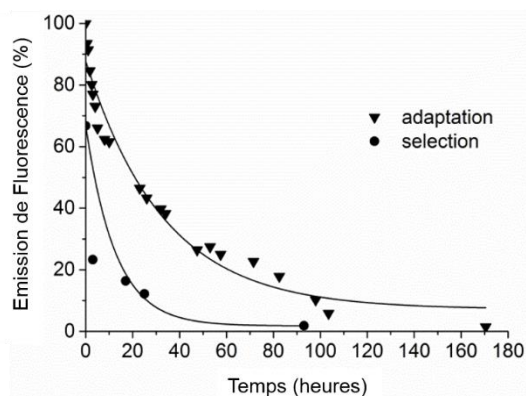


Figure 52. Suivi *in situ* de la complexation de l'ADN par adaptation (▼) ou sélection (●) de la bibliothèque

Ces expériences ont permis de montrer l'implication de l'ADN dans la nature des composés préparés à partir d'une bibliothèque de deux hydrazides **AcHyd** et **L-ArgHyd**. Le cluster neutre **cRAFT(Ac)₄**, majoritaire lors du suivi des milieux par HPLC, est déstabilisé par la présence de l'acide nucléique. L'oligonucléotide déplace l'équilibre vers la formation du système cationique **cRAFT(L-Arg)₄**.

La suite du travail a porté sur les tests d'échanges d'hydrazides sur un cluster préformé. A faible salinité, le système multivalent **cRAFT(Ac)₄** a été mis en présence de 8 éq de **L-ArgHyd**. Le test de déplacement d'EtBr permet d'observer une diminution de l'émission de fluorescence à un ratio N/P = 2, caractéristique de la complexation d'ADN. Ces résultats permettent de déduire qu'un composé actif pour la reconnaissance d'ADN a été généré. Les propriétés dynamiques du système sont indispensables pour réaliser ce type de réaction (Figure 53). Une expérience similaire est réalisée dans un milieu à forte salinité (150 mM de NaCl) mais l'émission de fluorescence reste élevée (Figure 53). Enfin, aucun changement n'est visible dans le cas de l'addition de 8 éq d'**AcHyd** sur le système **cRAFT(L-Arg)₄** dans les conditions favorables à l'échange (pH 5,0 et faible salinité) (Figure 53).

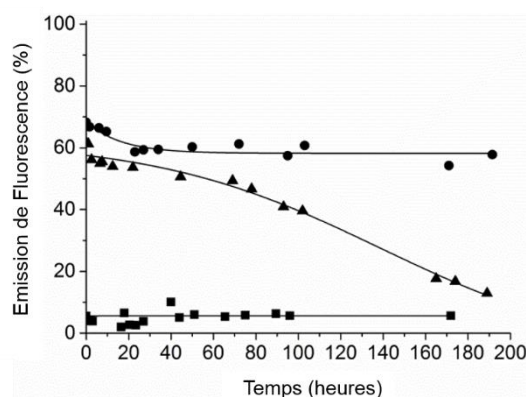


Figure 53. Complexation de l'ADN par génération *in situ* de systèmes multivalents soumis à des échanges de résidus hydrazides, avec l'addition de **L-ArgHyd** au système **cRAFT(Ac)₄** à 9,4 mM de NaCl (▲), à 150 mM de NaCl (●), et addition de **AcHyd** au composé **cRAFT(L-Arg)₄** (■)

Les expériences d'échanges d'hydrazide sur les clusters préformés ont confirmé l'influence de l'ADN sur la nature des systèmes. Ainsi, l'émission de fluorescence reste inchangée dans le cas de l'échange des ligands du cluster cationique **cRAFT(L-Arg)₄** avec **AcHyd** puisque le système initial est déjà stabilisé par l'oligonucléotide. Lors de l'étude de la substitution des ligands neutres du composé **cRAFT(Ac)₄** par **L-ArgHyd**, la salinité du milieu influence les réactions d'échanges. Ainsi l'ADN étant complexé avec une constante d'association plus grande à 9,4 mM en NaCl, l'échange est favorisé pour la formation du cluster **cRAFT(L-Arg)₄** alors qu'à 150 mM en sel, l'émission de fluorescence reste quasi maximale.

L'ensemble de ces résultats indiquent que l'ADN joue le rôle de template pour générer le système capable de complexer le plus efficacement l'oligonucléotide et incorporant le ligand **L-ArgHyd** (Schéma 4). Un mécanisme peut être envisagé pour tenter d'expliquer cet effet de guide joué par l'ADN. La formation spontanée de clusters de faible valence peut induire une complexation avec la biomolécule. L'ADN peut alors tendre à guider la poursuite de la génération du cluster tétravalent cationique. L'utilisation de la catalyse nucléophile (décrite plus tôt) pourrait être envisagée dans de prochains travaux afin d'accélérer les cinétiques d'échanges.

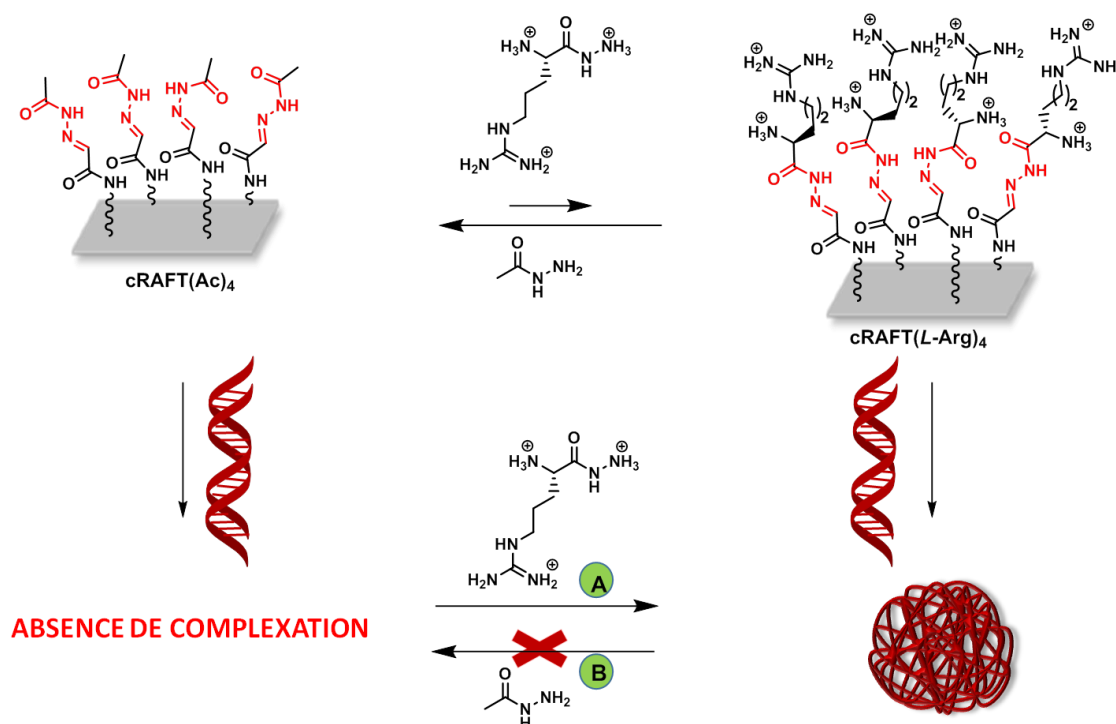
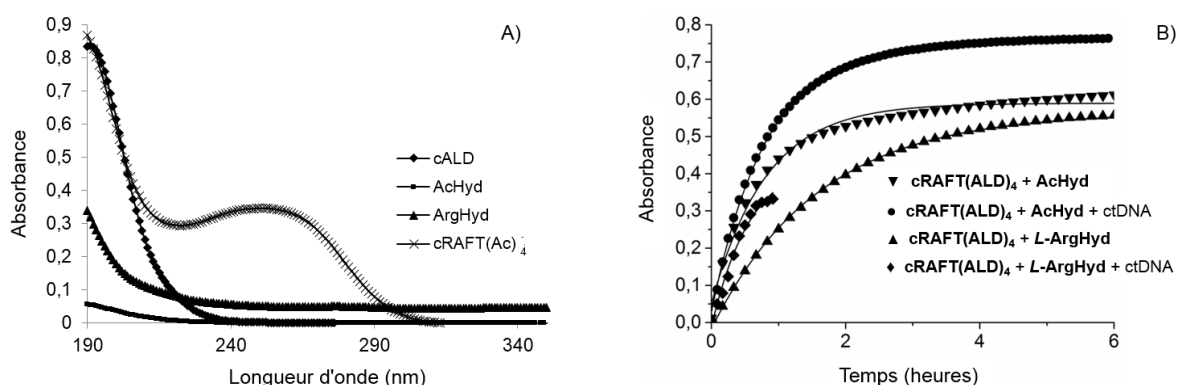


Schéma 4. Effet template de l'ADN favorisant la formation du système multivalent actif **cRAFT(L-Arg)₄**

E. Etude cinétique de formation des clusters

Un suivi cinétique de la formation des liaisons acylhydrazones pour la préparation des deux systèmes multivalents **cRAFT(Ac)₄** et **cRAFT(L-Arg)₄** est réalisé par spectroscopie

UV/Visible. Cette technique est envisagée du fait de l'existence d'une bande spécifique d'absorbance des liaisons hydrazones autour de 250 nm. Par le biais de ce suivi cinétique, la vitesse apparente de formation des liaisons acylhydrazone est observée. L'étude de l'auto-assemblage de ces composés à partir de la plate-forme peptidique **cRAFT(ALD)₄** montre que la présence de l'ADN de thymus de veau n'affecte pas la vitesse de ligation de **AcHyd**. Lors de l'étude de la ligation des résidus **L-ArgHyd**, au contraire, la vitesse initiale est doublée en présence de l'acide nucléique dans le milieu (Figure 54). Ces résultats mettent ainsi une nouvelle fois en évidence l'effet template de la biomolécule pour favoriser la formation du système cationique multivalent actif.



F. Modulation de la reconnaissance d'ADN par échange des ligands

1. HPLC

Outre des échanges possibles avec d'autres résidus hydrazides, les liaisons acylhydrazones peuvent être converties en oxime par substitution d'un résidu hydrazide par un composé oxyamine (Figure 55). L'oxime est beaucoup plus stable que l'acylhydrazone (Chapitre 1).

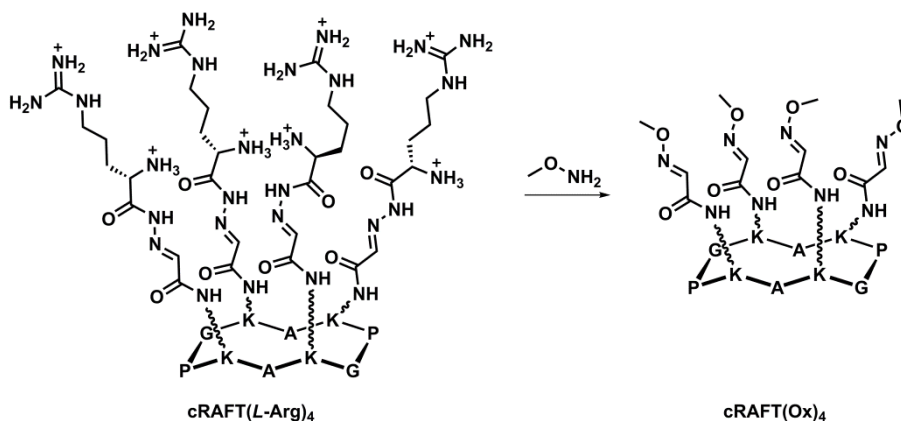


Figure 55. Réaction d'échange entre le composé **cRAFT(L-Arg)₄** par addition de méthoxyamine au milieu tamponné pour former le système tétra-oxime **cRAFT(Ox)₄**

Les analyses HPLC montrent qu'en additionnant 8 éq de méthoxyamine (MeONH₂) à une solution de **cRAFT(L-Arg)₄** à pH 5,0, une conversion complète pour former le composé tétravalent **cRAFT(Ox)₄** est observée (Figure 56). Après 8 jours, le composé neutre tétra-oxime est majoritaire dans le milieu tamponné. Le système oxime multivalent ainsi créé est identifié par spectrométrie de masse MALDI-ToF.

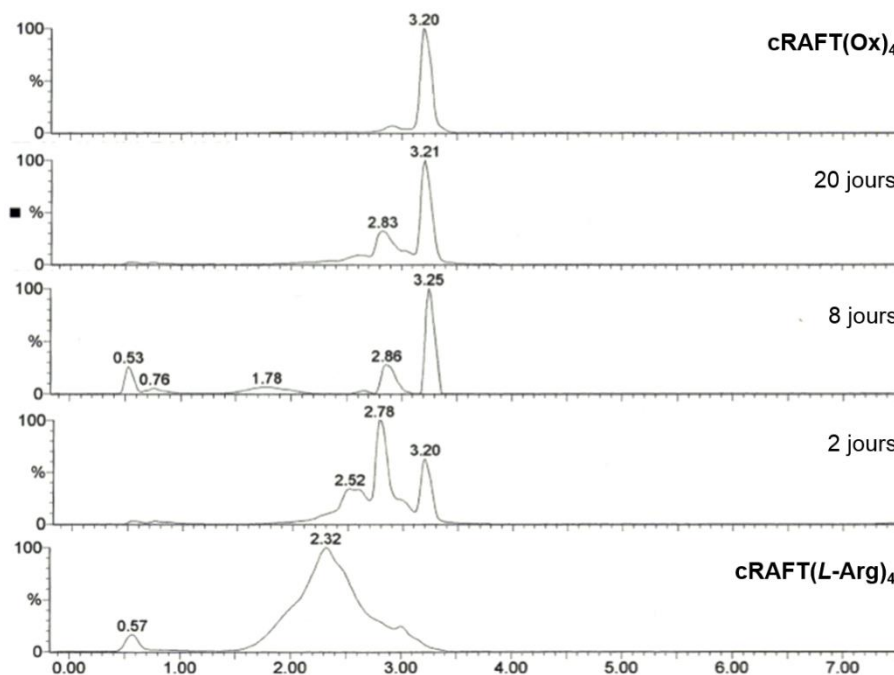


Figure 56. Suivi HPLC (Méthode A) de l'échange hydrazone-oxime par addition de 8 éq de méthoxyamine à pH 5,0. Le même suivi est effectué sur une expérience réalisée à pH 7,2. L'objectif est d'évaluer les réactions d'échange à pH physiologique. Les chromatogrammes HPLC indiquent un fort ralentissement de la cinétique d'échange pour former le composé neutre **cRAFT(Ox)₄**, 20 jours après l'ajout de la méthoxyamine (Figure 57). Ainsi, après 8 jours de réaction d'échange à pH 7,2, la bibliothèque a atteint un équilibre thermodynamique où le composé tétra-oxime est très minoritaire à un temps de rétention de 3,2 minutes. Les autres constituants du mélange sont des intermédiaires formés d'un plus ou moins grand nombre de liaisons oximes nouvellement créées et de liaisons acylhydrazones résiduelles. L'échange n'étant pas total à pH 7,2, il semble intéressant d'étudier la capacité de relargage de l'ADN par ce système via des expériences de déplacement d'EtBr. Si tel est le cas, il sera possible de conclure que l'omniprésence du cluster tétra-oxime neutre n'est pas indispensable dans ces conditions.

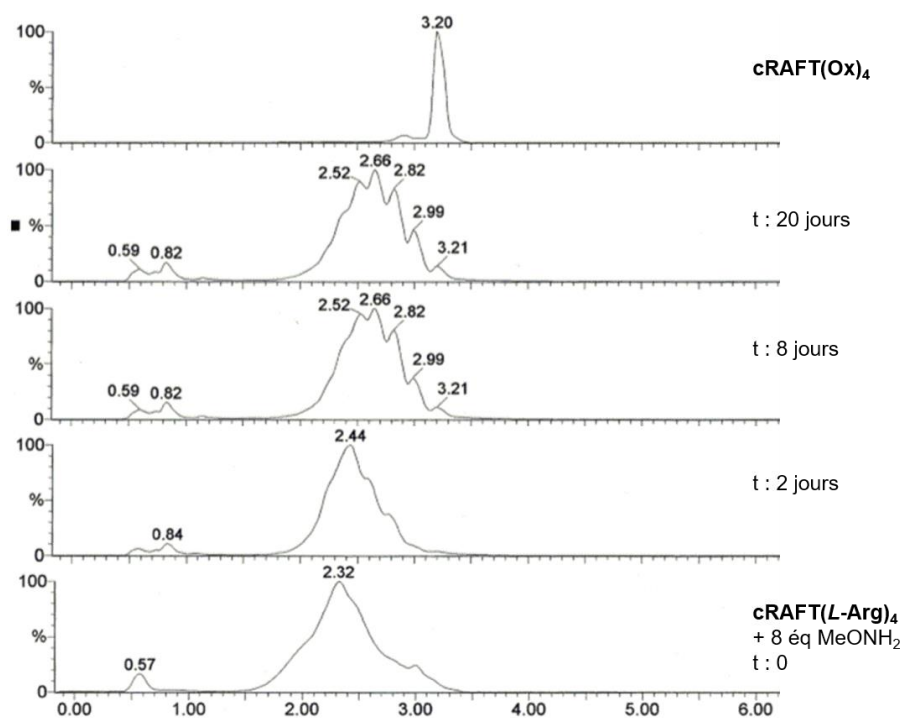


Figure 57. Suivi HPLC (Méthode A) de l'échange hydrazone-oxime par addition de 8 éq de méthoxyamine à pH 7,2. En parallèle, l'échange de résidus est étudié à pH 5,0 en travaillant à différentes stœchiométries en méthoxyamine. Cette analyse permet d'estimer combien d'équivalents de méthoxyamine sont nécessaires à l'échange complet des liaisons acylhydrazones pour générer le composé tétra-oxime **cRAFT(Ox)₄**. Ainsi, les chromatogrammes permettent de déduire que plus de 4 équivalents sont indispensables à un échange complet des liaisons (Figure 58).

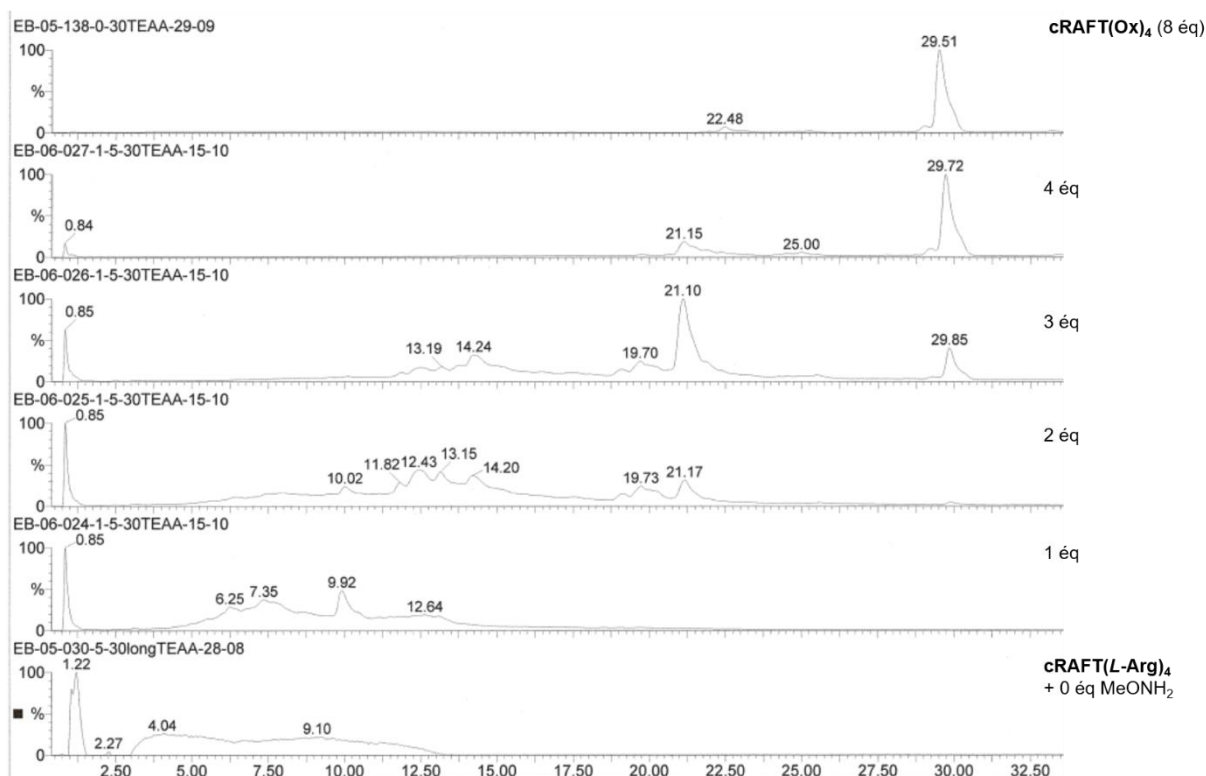


Figure 58. Etude de la stoechiométrie en résidu oxyamine nécessaire à l'échange des liaisons acylhydrazones du composé **cRAFT(L-Arg)₄** pour former **cRAFT(Ox)₄** (Méthode B)

La modulation de complexation de l'ADN de thymus de veau par échange des ligands est alors, dans un premier temps, réalisée par l'ajout de 8 éq de MeONH₂ pour générer le complexe tétravalent neutre **cRAFT(Ox)₄**. Cette étude est suivie par déplacement du bromure d'éthidium.

2. Etude par test de déplacement de bromure d'éthidium

Le relargage de l'ADN par l'ajout d'un ligand oxyamine neutre au système cationique **cRAFT(L-Arg)₄** est étudié en suivant l'évolution du signal de fluorescence. La Figure 59 montre dans une première phase la diminution de l'émission de fluorescence correspondant à la complexation *in situ* de l'ADN par le système cationique **cRAFT(L-Arg)₄** à pH 5,0 et pH 7,2. Après 42 heures, 8 éq de méthoxyamine sont additionnés au milieu et un signal élevé de fluorescence est à nouveau observé. Cette évolution du taux de fluorescence s'avère être pH-dépendante et la recouvrance du signal est plus rapide à pH 5,0 qu'à pH 7,2. La différence relevée ici est en accord avec les variations pH-dépendantes constatées dans le suivi HPLC de la conversion hydrazone-oxime. En diminuant la valence en ligands positifs, l'affinité pour l'ADN est elle aussi réduite.

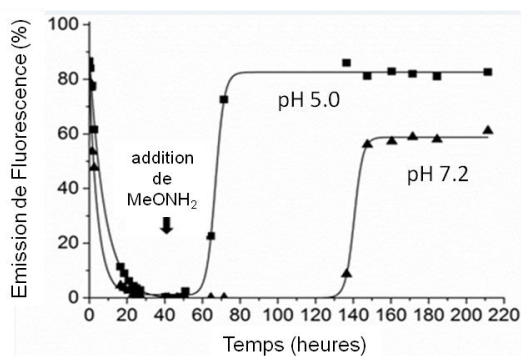


Figure 59. Relargage de l'ADN par échange de ligands hydrazone-oxime à pH 5,0 (■) et pH 7,2 (▲)

En générant le système tétra-oxime neutre **cRAFT(Ox)₄**, l'ADN est décomplexé et le bromure d'éthidium reprend sa place entre les bases nucléiques. L'intercalant émet ainsi à nouveau de la fluorescence à 590 nm. La dissociation de la plate-forme multivalente **cRAFT(L-Arg)₄** pour donner des ligands monovalents **L-ArgHyd** explique la décomplexation de la biomolécule (Schéma 5).

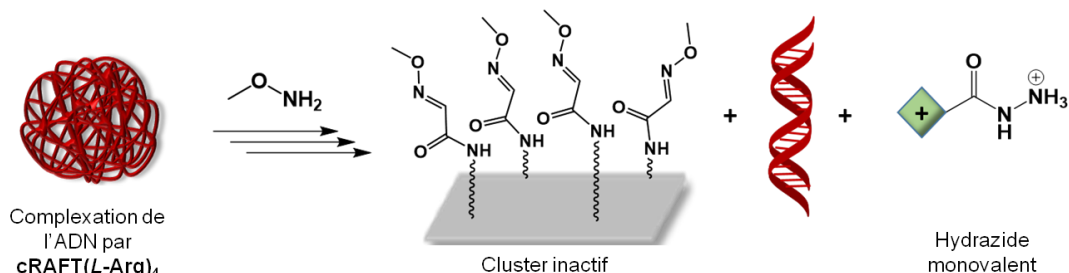


Schéma 5. Principe du relargage de l'ADN de thymus de veau par modulation de la nature du complexant

L'étude stœchiométrique du relargage de l'ADN est alors réalisée dans le but d'évaluer l'effet de la multivalence. Ainsi, 1, 2, 3, 4 et 8 équivalents de méthoxyamine ont été additionnés au système cationique **cRAFT(L-Arg)₄** puis l'émission de fluorescence a été suivie dans le temps à pH 5,0. Les taux d'émission relevés indiquent la nécessité d'ajouter plus de 4 éq de ligand neutre pour permettre de retrouver 100% de fluorescence. Ces résultats concordent avec les observations faites lors du suivi HPLC. Ils semblent appuyer l'hypothèse de la nécessité d'une conversion complète du cluster cationique vers la formation du composé **cRAFT(Ox)₄** pour un relargage total de l'acide nucléique. Cette conclusion n'explique cependant pas le relargage de l'ADN dans le milieu à pH physiologique (pH 7,2) sans l'obtention de 100% du cluster neutre.

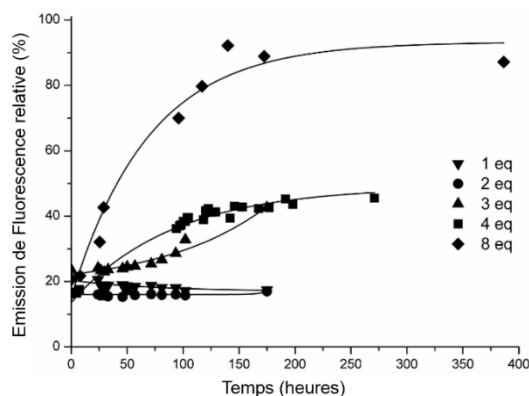


Figure 60. Etude du relargage de l'ADN par échange de ligands hydrazones-oxyamines à différentes stœchiométries, avec 1, 2, 3, 4 et 8 éq en méthoxyamine

A ce jour, les seules études de relargage contrôlé d'ADN rapportées dans la littérature utilisent des vecteurs dégradables en réponse à un stimulus comme la variation du pH,^[59,63] une réduction du potentiel^[55d,64] ou encore la lumière.^[65]

III. Conclusion

Dans ce chapitre, une nouvelle approche basée sur la chimie combinatoire dynamique a été rapportée. L'objectif a été de développer des systèmes multivalents dynamiques construits autour de liaisons acylhydrazones et capables de complexer l'ADN. Il a été démontré que cette complexation est permise par la multivalence via la formation de multiples interactions non-covalentes. L'effet template de la cible nucléique a été mis en évidence. La présence d'ADN induit une sélection du ligand et provoque l'adaptation du système dynamique pour créer le meilleur complexant.^[66] Cette approche d'auto-assemblage en présence de la cible pourrait être utilisée pour le développement de ligands spécifiques à un acide nucléique. Outre l'intérêt d'auto-assemblage de clusters, la liaison acylhydrazone a également permis d'apporter au système la possibilité de relarguer l'ADN par addition d'un oxyamine neutre. Cette dernière propriété pourrait ouvrir des possibilités pour le développement de systèmes répondant à des stimuli chimiques utiles dans la thérapie génique notamment. Ce domaine nécessite en effet des composés capables de complexer l'ADN pour permettre sa transfection, puis de décomplexer l'acide nucléique une fois la paroi cellulaire traversée.

IV. Références

- [1] A glossary of DNA structures from A to Z, A. Ghosh, M. Bansal, *Acta Cryst. D*, **2003**, 59, 620-626.
- [2] Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, 171, 737-738.
- [3] R. H. Garrett, C. M. Grisham, B. Lubochinsky, *Biochimie*, De Boeck, **2000**.
- [4] The Thermodynamics of DNA Structural Motifs, J. SantaLucia, D. Hicks, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **2004**, 33, 415-440.
- [5] Hydration Changes Accompanying Helix-to-Coil DNA Transitions, I. Son, Y. L. Shek, D. N. Dubins, T. V. Chalikian, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 4040-4047.
- [6] DNA Transcription and Repair: A Confluence, R. E. Moses, B. W. O'Malley, *J. Biol. Chem.*, **2012**, 287, 23266-23270.
- [7] Making the Bend: DNA Tertiary Structure and Protein-DNA Interactions, S. Harteis, S. Schneider, *Int. J. Mol. Sci.*, **2014**, 15, 12335.
- [8] Protein-DNA binding: complexities and multi-protein codes, T. Siggers, R. Gordân, *Nucleic Acids Res.*, **2014**, 42, 2099-2111.
- [9] DNA Recognition by Synthetic Constructs, E. Pazos, J. Mosquera, M. E. Vázquez, J. L. Mascareñas, *ChemBioChem*, **2011**, 12, 1958-1973.
- [10] Structure-Based Design of a Leucine Zipper Protein with New DNA Contacting Region, T. Morii, S.-i. Sato, M. Hagihara, Y. Mori, K. Imoto, K. Makino, *Biochemistry*, **2002**, 41, 2177-2183.
- [11] Generation of novel DNA-binding compounds by selection and amplification from self-assembled combinatorial libraries, B. Klekota, M. H. Hammond, B. L. Miller, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 8639-8642.
- [12] Anion recognition in water, S. Kubik, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 3648-3663.
- [13] Supramolecular Chemistry in Water, G. V. Oshovsky, D. N. Reinhoudt, W. Verboom, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 46, 2366-2393.
- [14] a) From transcription factors to designed sequence-specific DNA-binding peptides, M. E. Vazquez, A. M. Caamano, J. L. Mascarenas, *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, 32, 338-349; b) Cyclic hydroxamates, especially multiply substituted [1,2]oxazinan-3-ones, S. Wolfe, M.-C. Wilson, M.-H. Cheng, G. V. Shustov, C. I. Akuche, *Can. J. Chem.*, **2003**, 81, 937-960; c) DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes, D. R. Boer, A. Canals, M. Coll, *Dalton Trans.*, **2009**, 399-414.
- [15] The binding of ethidium bromide with DNA: interaction with single- and double-stranded structures, P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, H. G. Davtyan, A. T. Karapetyan, *Exp. Mol. Med.*, **2003**, 35, 527-533.
- [16] The DNA intercalators ethidium bromide and propidium iodide also bind to core histones, A. Banerjee, P. Majumder, S. Sanyal, J. Singh, K. Jana, C. Das, D. Dasgupta, *FEBS Open Bio*, **2014**, 4, 251-259.
- [17] Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin, B. Pang, X. Qiao, L. Janssen, A. Velds, T. Groothuis, R. Kerkhoven, M. Nieuwland, H. Ovaa, S. Rottenberg, O. van Tellingen, J. Janssen, P. Huijgens, W. Zwart, J. Neefjes, *Nat. Commun.*, **2013**, 4, 1908.
- [18] Antibiotic doxorubicin and its derivative bind milk β -lactoglobulin, D. Agudelo, M. Beauregard, G. Bérubé, H.-A. Tajmir-Riahi, *J. Photochem. Photobiol., B*, **2012**, 117, 185-192.
- [19] DNA intercalation of methylene blue and quinacrine: new insights into base and sequence specificity from structural and thermodynamic studies with polynucleotides, M. Hossain, G. Suresh Kumar, *Mol. Biosyst.*, **2009**, 5, 1311-1322.
- [20] a) Echinomycin: a bifunctional intercalating antibiotic, M. J. Waring, L. P. G. Wakelin, *Nature*, **1974**, 252, 653-657; b) Bisintercalator natural products with potential therapeutic applications: isolation, structure determination, synthetic and biological studies, S. Dawson, J. P. Malkinson, D. Paumier, M. Searcey, *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, 24, 109-126.
- [21] a) Non-Watson-Crick G/C and A/T Base Pairs in a DNA-Antibiotic Complex, G. J. Quigley, G. Ughetto, G. A. V. D. Marel, J. H. V. Boom, A. H. J. Wang, A. Rich, *Science*, **1986**, 232, 1255-1258; b) The Molecular Structure of a DNA-Triostin A Complex, A. H. J. Wang, G. Ughetto, G. J. Quigley, T. Hakoshima, G. A. V. D. Marel, J. H. V. Boom, A. Rich, *Science*, **1984**, 225, 1115-1121.
- [22] a) Selective recognition of pyrimidine-pyrimidine DNA mismatches by distance-constrained macrocyclic bis-intercalators, M. Bahr, V. Gabelica, A. Granzhan, M.-P. Teulade-Fichou, E. Weinhold, *Nucleic Acids Res.*, **2008**, 36, 5000-5012; b) Macrocyclic DNA-Mismatch-Binding Ligands: Structural Determinants of Selectivity, A. Granzhan, E. Largy, N. Saettel, M.-P. Teulade-Fichou, *Chem. Eur. J.*, **2010**, 16, 878-889.
- [23] a) A sequence-specific threading tetra-intercalator with an extremely slow dissociation rate constant, G. G. Holman, M. Zewail-Foote, A. R. Smith, K. A. Johnson, B. L. Iverson, *Nat Chem*, **2011**, 3, 875-881; b) Threading Polyintercalators with Extremely Slow Dissociation Rates and Extended DNA Binding Sites, A. Rhoden Smith, B. L. Iverson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 12783-12789.
- [24] a) Identification and Characterization of a New Family of Cell-penetrating Peptides: Cyclic Cell-Penetrating Peptides, L. Cascales, S. T. Henriques, M. C. Kerr, Y.-H. Huang, M. J. Sweet, N. L. Daly, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.*, **2011**, 286, 36932-36943; b) DNA alkylation damage and autophagy induction, D. L. Bordin, M. Lima, G. Lenz, J. Saffi, L. B. Meira, P. Mésange, D. G. Soares, A. K. Larsen, A. E. Escargueil, J. A. P. Henriques, *Mutat. Res.*, **2013**, 753, 91-99.
- [25] Z. H. Siddik, in *The Cancer Handbook*, John Wiley & Sons, Ltd, **2005**.

- [26] Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, Z. H. Siddik, *Oncogene*, **2003**, *22*, 7265-7279.
- [27] Understanding cisplatin resistance using cellular models, B. Stordal, M. Davey, *IUBMB Life*, **2007**, *59*, 696-699.
- [28] Recognition of HIV-TAR RNA using neomycin–benzimidazole conjugates, N. Ranjan, S. Kumar, D. Watkins, D. Wang, D. H. Appella, D. P. Arya, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 5689-5693.
- [29] Light-controlled DNA binding of bisbenzamidines, M. I. Sanchez, O. Vazquez, M. E. Vazquez, J. L. Mascareñas, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 11107-11109.
- [30] Synthetic DNA minor groove-binding drugs, B. S. P. Reddy, S. M. Sondhi, J. W. Lown, *Pharmacol. Ther.*, **1999**, *84*, 1-111.
- [31] Design of Sequence-Specific DNA Binding Molecules for DNA Methyltransferase Inhibition, J. S. Kang, J. L. Meier, P. B. Dervan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 3687-3694.
- [32] a) Recognition of the DNA minor groove by pyrrole-imidazole polyamides, P. B. Dervan, B. S. Edelson, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2003**, *13*, 284-299; b) Sequence-specific DNA recognition by polyamides, P. B. Dervan, R. W. Bürl, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, *3*, 688-693.
- [33] Sequence-Selective DNA Recognition with Peptide–Bisbenzamidine Conjugates, M. I. Sánchez, O. Vázquez, M. E. Vázquez, J. L. Mascareñas, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 9923-9929.
- [34] Chemistry and biology of DNA-binding small molecules, S. B. A Paul, *Curr. Sci.*, **2012**, *102*, 212-231.
- [35] Reversible Supramolecular Assembly at Specific DNA Sites: Nickel-Promoted Bivalent DNA Binding with Designed Peptide and Bipyridyl–Bis(benzamidine) Components, M. I. Sánchez, J. Mosquera, M. E. Vázquez, J. L. Mascareñas, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 9917-9921.
- [36] Polymers for DNA Delivery, H. Eliyahu, Y. Barenholz, A. Domb, *Molecules*, **2005**, *10*, 34.
- [37] Arginine clustering on calix[4]arene macrocycles for improved cell penetration and DNA delivery, V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Nat. Commun.*, **2013**, *4*, 1721.
- [38] Gene delivery with polycationic fullerene hexakis-adducts, D. Sigwalt, M. Holler, J. Iehl, J.-F. Nierengarten, M. Nothisen, E. Morin, J.-S. Remy, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 4640-4642.
- [39] a) Cationic Vesicles Based on Amphiphilic Pillar[5]arene Capped with Ferrocenium: A Redox-Responsive System for Drug/siRNA Co-Delivery, Y. Chang, K. Yang, P. Wei, S. Huang, Y. Pei, W. Zhao, Z. Pei, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 13126-13130; b) Polycationic Pillar[5]arene Derivatives: Interaction with DNA and Biological Applications, I. Nierengarten, M. Nothisen, D. Sigwalt, T. Biellmann, M. Holler, J.-S. Remy, J.-F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 17552-17558.
- [40] a) Nanostructures of Cationic Amphiphilic Cyclodextrin Complexes with DNA, V. Villari, A. Mazzaglia, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, N. Micali, *Biomacromolecules*, **2013**, *14*, 811-817; b) Rational design of cationic cyclooligosaccharides as efficient gene delivery systems, A. Diaz-Moscoso, P. Balbuena, M. Gomez-Garcia, C. Ortiz Mellet, J. M. Benito, L. Le Gourrierc, C. Di Giorgio, P. Vierling, A. Mazzaglia, N. Micali, J. Defaye, J. M. Garcia Fernandez, *Chem. Commun.*, **2008**, 2001-2003.
- [41] The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly, A. Klug, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **1999**, *354*, 531-535.
- [42] a) Supramolecular Amphiphiles Based on Host–Guest Molecular Recognition Motifs, G. Yu, K. Jie, F. Huang, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 7240-7303; b) Host–Guest-Mediated DNA Templatation of Polycationic Supramolecules for Hierarchical Nanocondensation and the Delivery of Gene Material, L. Gallego-Yerga, L. Blanco-Fernández, K. Urbiola, T. Carmona, G. Marcelo, J. M. Benito, F. Mendicuti, C. Tros de Ilarduya, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 12093-12104; c) Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host–Guest Interactions, X. Ma, Y. Zhao, *Chem. Rev.*, **2015**, *115*, 7794-7839.
- [43] Spatiotemporal control and superselectivity in supramolecular polymers using multivalency, L. Albertazzi, F. J. Martinez-Veracochea, C. M. A. Leenders, I. K. Voets, D. Frenkel, E. W. Meijer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2013**, *110*, 12203-12208.
- [44] a) Structural Mimics of Viruses Through Peptide/DNA Co-Assembly, R. Ni, Y. Chau, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 17902-17905; b) Precision Templating with DNA of a Virus-like Particle with Peptide Nanostructures, Y. Ruff, T. Moyer, C. J. Newcomb, B. Demeler, S. I. Stupp, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 6211-6219.
- [45] PNA as a Biosupramolecular Tag for Programmable Assemblies and Reactions, S. Barluenga, N. Winssinger, *Acc. Chem. Res.*, **2015**, *48*, 1319-1331.
- [46] Programmable multivalent display of receptor ligands using peptide nucleic acid nanoscaffolds, E. A. Englund, D. Wang, H. Fujigaki, H. Sakai, C. M. Micklitsch, R. Ghirlando, G. Martin-Manso, M. L. Pendrak, D. D. Roberts, S. R. Durell, D. H. Appella, *Nat. Commun.*, **2012**, *3*, 614.
- [47] a) A Potent New Class of Reductively Activated Peptide Gene Delivery Agents, D. L. McKenzie, K. Y. Kwok, K. G. Rice, *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275*, 9970-9977; b) Low Molecular Weight Disulfide Cross-Linking Peptides as Nonviral Gene Delivery Carriers, D. L. McKenzie, E. Smiley, K. Y. Kwok, K. G. Rice, *Bioconjug. Chem.*, **2000**, *11*, 901-909; c) Monomolecular collapse of plasmid DNA into stable virus-like particles, T. Blessing, J.-S. Remy, J.-P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 1427-1431.
- [48] Localized Template-Driven Functionalization of Nanoparticles by Dynamic Combinatorial Chemistry, P. Nowak, V. Saggiomo, F. Salehian, M. Colomb-Delsuc, Y. Han, S. Otto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 4192-4197.
- [49] Dynamic constitutional frameworks for DNA biomimetic recognition, R. Catana, M. Barboiu, I. Moleavin, L. Clima, A. Rotaru, E.-L. Ursu, M. Pinteala, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 2021-2024.

- [50] α -Oxo Aldehyde or Glyoxylyl Group Chemistry in Peptide Bioconjugation, O. El-Mahdi, O. Melnyk, *Bioconjug. Chem.*, **2013**, *24*, 735-765.
- [51] Chemoselectively Template-Assembled Glycoconjugates as Mimics for Multivalent Presentation of Carbohydrates, O. Renaudet, P. Dumy, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 243-246.
- [52] a) 1-Ethoxyethylidene, a New Group for the Stepwise SPPS of Aminoxyacetic Acid Containing Peptides, S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 983-991; b) Preparation and application of O-amino-serine, Ams, a new building block in chemoselective ligation chemistry, J. C. Spetzler, T. Hoeg-Jensen, *J. Pept. Sci.*, **1999**, *5*, 582-592.
- [53] Solid phase synthesis of partially protected tocinoic acid: Optimization with respect to resin and protecting groups, J. Hlaváček, U. Ragnarsson, *J. Pept. Sci.*, **2001**, *7*, 349-357.
- [54] a) Related impurities in peptide medicines, M. D'Hondt, N. Bracke, L. Taevernier, B. Gevaert, F. Verbeke, E. Wynendaele, B. De Spiegeleer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, *101*, 2-30; b) Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis, M. Amblard, J.-A. Fehrentz, J. Martinez, G. Subra, *Mol. Biotechnol.*, **2006**, *33*, 239-254.
- [55] a) Self-Assembled Multivalency: Dynamic Ligand Arrays for High-Affinity Binding, A. Barnard, D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 6572-6581; b) Dynamic Self-Assembly of Polycationic Clusters Based on Cyclodextrins for pH-Sensitive DNA Nanocondensation and Delivery by Component Design, L. Gallego-Yerga, M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, F. Santoyo-González, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 6622-6627; c) High-Affinity Multivalent DNA Binding by Using Low-Molecular-Weight Dendrons, M. A. Kostianen, J. G. Hardy, D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 2556-2559; d) Double-degradable responsive self-assembled multivalent arrays - temporary nanoscale recognition between dendrons and DNA, A. Barnard, P. Posocco, M. Fermeglia, A. Tschiche, M. Calderon, S. Priel, D. K. Smith, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 446-455.
- [56] Probing the importance of π -stacking interactions in DNA-templated self-assembly of bisfunctionalized guanidinium compounds, D. Paolantoni, J. Rubio-Magnieto, S. Cantel, J. Martinez, P. Dumy, M. Surin, S. Ulrich, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 14257-14260.
- [57] Fluorescence lifetime analysis of DNA intercalated ethidium bromide and quenching by free dye, D. P. Heller, C. L. Greenstock, *Biophys. Chem.*, **1994**, *50*, 305-312.
- [58] a) A Fluorescent Intercalator Displacement Assay for Establishing DNA Binding Selectivity and Affinity, W. C. Tse, D. L. Boger, *Acc. Chem. Res.*, **2004**, *37*, 61-69; b) Fluorescent intercalator displacement analyses of DNA binding by the peptide-derived natural products netropsin, actinomycin, and bleomycin, M. A. Lewis, E. C. Long, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, *14*, 3481-3490.
- [59] "On-Off" Multivalent Recognition: Degradable Dendrons for Temporary High-Affinity DNA Binding, D. J. Welsh, S. P. Jones, D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 4047-4051.
- [60] a) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, T. Wiseman, S. Williston, J. F. Brandts, L.-N. Lin, *Anal. Biochem.*, **1989**, *179*, 131-137; b) M. W. Freyer, E. A. Lewis, in *Methods in Cell Biology*, Vol. 84 (Eds.: J. C. Dr. John, Dr. H. William Detrich), Academic Press, **2008**, pp. 79-113.
- [61] a) Nucleophilic Catalysis of Hydrazone Formation and Transimination: Implications for Dynamic Covalent Chemistry, A. Dirksen, S. Dirksen, T. M. Hackeng, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 15602-15603; b) Rapid Oxime and Hydrazone Ligations with Aromatic Aldehydes for Biomolecular Labeling, A. Dirksen, P. E. Dawson, *Bioconjug. Chem.*, **2008**, *19*, 2543-2548.
- [62] a) New Organocatalyst Scaffolds with High Activity in Promoting Hydrazone and Oxime Formation at Neutral pH, D. Larsen, M. Pittelkow, S. Karmakar, E. T. Kool, *Org. Lett.*, **2015**, *17*, 274-277; b) Water-Soluble Organocatalysts for Hydrazone and Oxime Formation, P. Crisalli, E. T. Kool, *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 1184-1189; c) Fast Hydrazone Reactants: Electronic and Acid/Base Effects Strongly Influence Rate at Biological pH, E. T. Kool, D.-H. Park, P. Crisalli, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 17663-17666.
- [63] Polymersome-Loaded Capsules for Controlled Release of DNA, H. Lomas, A. P. R. Johnston, G. K. Such, Z. Zhu, K. Liang, M. P. Van Koeverden, S. Alongkornchotikul, F. Caruso, *Small*, **2011**, *7*, 2109-2119.
- [64] Effective Gene Delivery Using Stimulus-Responsive Cationic Polymer Designed with Redox-Sensitive Disulfide and Acid-Labile Imine Linkers, X. Cai, C. Dong, H. Dong, G. Wang, G. M. Pauletti, X. Pan, H. Wen, I. Mehl, Y. Li, D. Shi, *Biomacromolecules*, **2012**, *13*, 1024-1034.
- [65] a) Light-Responsive Helical Polypeptides Capable of Reducing Toxicity and Unpacking DNA: Toward Nonviral Gene Delivery, L. Yin, H. Tang, K. H. Kim, N. Zheng, Z. Song, N. P. Gabrielson, H. Lu, J. Cheng, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 9182-9186; b) Optically Triggered Release of DNA from Multivalent Dendrons by Degrading and Charge-Switching Multivalency, M. A. Kostianen, D. K. Smith, O. Ikkala, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 7600-7604; c) Light-Triggered Capture and Release of DNA and Proteins by Host-Guest Binding and Electrostatic Interaction, J. Moratz, A. Samanta, J. Voskuhl, S. K. Mohan Nalluri, B. J. Ravoo, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 3271-3277; d) Self-assembly and optically triggered disassembly of hierarchical dendron-virus complexes, M. A. Kostianen, O. Kasyutich, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, *Nat Chem*, **2010**, *2*, 394-399.
- [66] Dynamic Expression of DNA Complexation with Self-assembled Biomolecular Clusters, E. Bartolami, Y. Bessin, V. Gervais, P. Dumy, S. Ulrich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 10183-10187.

Chapitre 3

***Clusters biomoléculaires multivalents
pour la vectorisation
d'oligonucléotides***

Chapitre 3 : Clusters biomoléculaires multivalents pour la vectorisation d'oligonucléotides

I. Systèmes multivalents cationiques comme vecteur d'acides nucléiques	92
A. <i>Challenge de la vectorisation</i>	92
B. <i>Les polymères et les dendrimères comme outils de vectorisation</i>	92
C. <i>Les clusters comme outils de vectorisation</i>	95
D. <i>Positionnement du projet</i>	96
II. Détermination efficace de nouveaux systèmes complexant l'ADN	97
A. <i>Synthèse et préparation des composés</i>	97
1. <i>Synthèse des hydrazides Hyd</i>	97
2. <i>Synthèse des plateformes peptidiques</i>	99
3. <i>Préparation des clusters</i>	100
B. <i>Etude de la complexation des clusters hydrazones avec l'ADN de thymus de veau</i>	101
C. <i>Etude par électrophorèse sur gel d'agarose</i>	103
III. Vectorisation de siARN	109
IV. Conclusion	113
V. Références	115

I. Systèmes multivalents cationiques comme vecteur d'acides nucléiques

A. Challenge de la vectorisation

La vectorisation repose sur trois étapes bien distinctes :

- La reconnaissance de l'oligonucléotide
- Le passage de la membrane cellulaire
- Le relargage de l'acide nucléique

La reconnaissance des oligonucléotides est régie, du moins en partie, par la nature des ligands fonctionnalisant les plateformes (Chapitre 2). Des études pour la transfection de l'ADN et de petits ARN sont indispensables pour permettre la vectorisation des systèmes. Ces oligonucléotides sont impliqués dans des rôles d'ADN antisens et de siARN.^[1] Ces acides nucléiques, en se complexant avec un ARNm, bloque la traduction dans la protéine correspondante. On parle de silençage de gènes.^[2] La construction de systèmes multivalents a été mise en œuvre pour permettre cette vectorisation. Cet oligonucléotide est une cible thérapeutique d'intérêt puisqu'en se liant aux ARN messagers, ils inhibent l'expression génique. Les siARN sont des oligonucléotides doubles brins constitués de 17 à 23 nucléotides. Cette longueur de séquence est nécessaire pour offrir une bonne sélectivité. Si le nombre de bases nucléotidiques est inférieur, la sélectivité de reconnaissance sera insuffisante et dans le cas contraire, s'il y a plus de bases, la sélectivité sera trop importante et l'hybridation trop forte pour relarguer l'acide nucléique dans le milieu intracellulaire. Ainsi, en empêchant la production de la protéine à l'origine d'une maladie, ces petits oligonucléotides vont être d'un enjeu considérable dans la propagation des maladies.

B. Les polymères et les dendrimères comme outils de vectorisation

Les dendrimères ont été largement impliqués dans la reconnaissance des acides nucléiques. Les dendrimères de polyaminoamines (PAMAM)^[3] furent les premiers décrits, suivis des poly(L-lysines)^[4] puis les polypropylènes imines.^[5] La reconnaissance des acides nucléiques est principalement réalisée grâce à des dendrimères de grande taille. Cependant, des travaux ont montré que de la thérapie génique était possible avec des composés de faible poids moléculaire.^[6] La reconnaissance d'ADN a notamment été étudiée grâce à des dendrimères de spermines spécifiques du petit sillon de l'oligonucléotide (Figure 1). Les essais de complexation d'oligonucléotides testés sur le monomère de spermine révélèrent la nécessité d'une concentration de l'ordre du mM. Le cluster multivalent, quant à lui, présentait une complexation nettement supérieure. De plus, la complexation n'était pas affectée par la présence des cations sodiques qui entrent en compétition dans le cas du monomère.^[6b] Tout comme dans les exemples précédents, l'interaction pour la cible devait être modulable pour

permettre son relargage après la transfection. Il a, en effet, été rapporté qu'une interaction trop importante des dendrimères avec leur cible pouvait s'avérer contre bénéfique si la biomolécule ne pouvait pas être dissociée suite à la transfection.^[7] Des dendrimères dégradables ont alors été synthétisés dans le but de relarguer de manière contrôlée le composé complexé^[8] ou bien une inhibition totale du signal multivalent en remplaçant le lien amide par une liaison ester (Figure 1).^[9]

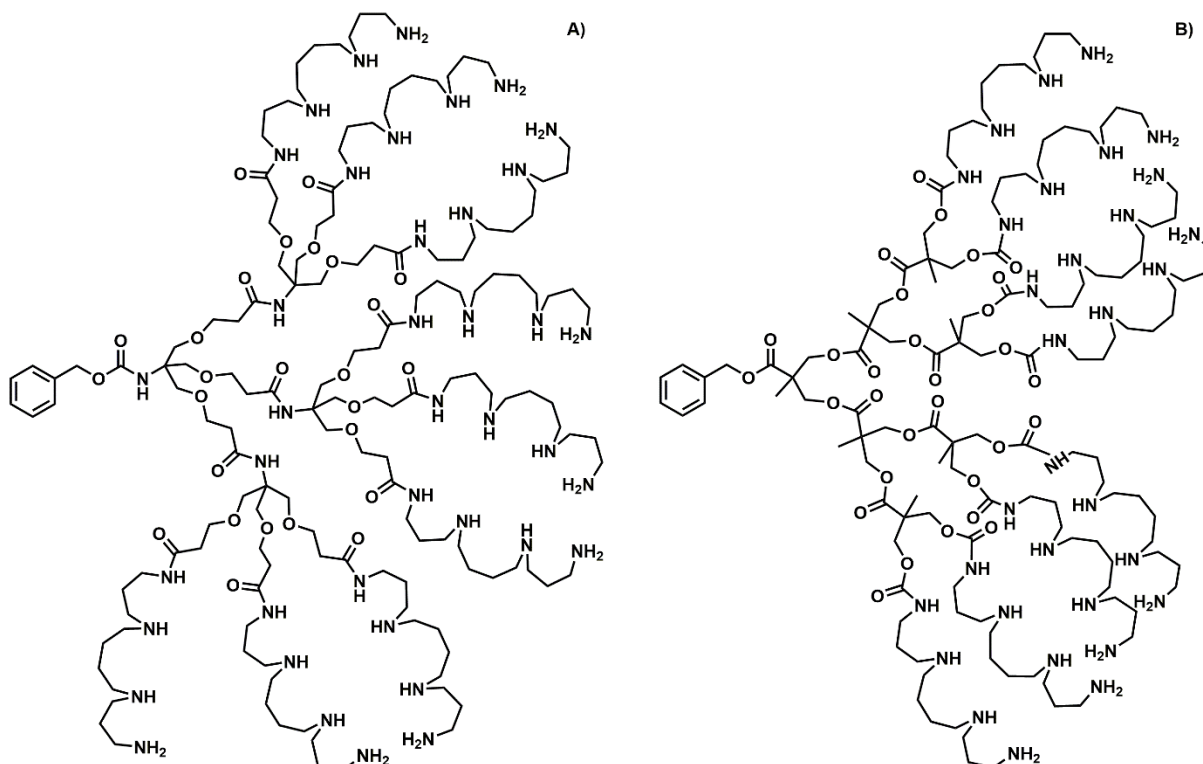


Figure 1. Structure du dendrimère de spermines A) amides stables et B) esters dégradables

Les systèmes polycationiques auto-assemblés sont largement engagés dans la complexation d'oligonucléotides. Ainsi, outre les PNAs, les peptides de polylysines sont également capables de reconnaître l'ADN pour générer des agrégats.^[10] Ces complexes effectuent de la transfection en pénétrant la paroi cellulaire et libérant l'acide nucléique dans l'endosome. De la même manière, des lipides fonctionnalisés par les amines terminales^[11] et des dendrimères de polyamidoamines décorés par des peptides d'intérêt (Figure 2) permettent la transfection de l'ADN.^[3a] Finalement, des polycations de nature diverse sont également étudiés pour la préparation de systèmes de transfection tels que les poly(éthylénimines) (Figure 2),^[12] ou encore les polyuréthanes.^[13]

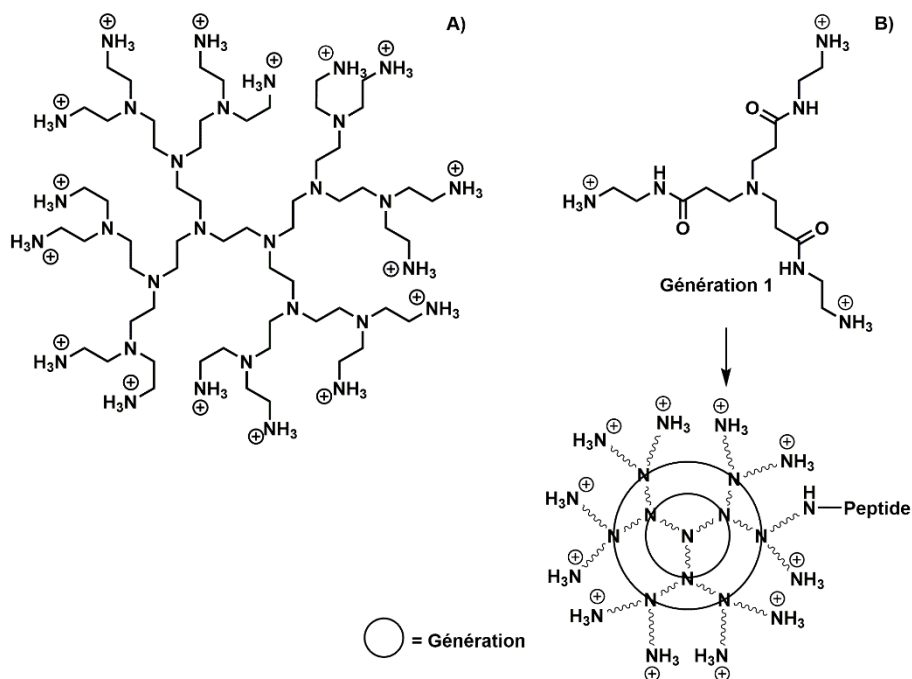


Figure 2. Systèmes polycationiques auto-assemblés impliqués dans la transfection de l'ADN. A) Poly(éthylèneimine) ; B) Dendrimères de polyamidoamines fonctionnalisés par des peptides

Récemment, des dendrimères de peptides ont été décrits pour leur activité anti-tumorale par la reconnaissance d'acides nucléiques. Ces systèmes riches en tryptophanes présentent sur leur surface, d'une part des groupements indoles interagissant avec l'ADN pour augmenter l'activité anti-tumorale,^{[14] [15]} et d'autre part des amines augmentant la solubilité du composé.^[16]

En 2014, des polymères hybrides chargés positivement et générés par formation de liaisons dynamiques ont été développés. La ligation acylhydrazone a permis la préparation de ces matériaux par l'association de résidus cationiques portant des aldéhydes, et de composés neutres, fonctionnalisés par des hydrazides. Des études de déplacement de fluorescence ont prouvé l'efficacité de ce polymère pour la reconnaissance d'ADN, alors que les systèmes monovalents ne présentaient aucune activité de ce type (Figure 3). Ces polymères cationiques dynamiques sont ainsi stables à pH 7,0 et dégradables à un pH plus acide (pH 5,0), correspondant au pH du milieu intracellulaire.^[17]

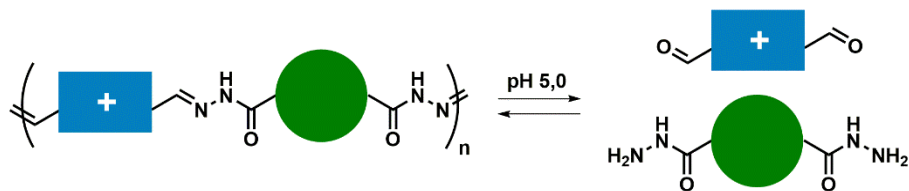


Figure 3. Equilibre de formation du complexe polymère cationique-ADN selon l'acidité du milieu

C. Les clusters comme outils de vectorisation

Les clusters de valences réduites sont également utilisés pour la vectorisation. Des plateformes sans pré-organisation particulière ont été engagées dans la complexation d'ADN. Parmi elles, la synthèse de fullerènes cationiques a montré la possibilité de créer des systèmes capables de transférer des acides nucléiques.^[18] La balance hydrophile-hydrophobe doit être correctement dosée pour permettre, à la fois à l'ADN de passer la paroi cellulaire, et la dissociation du complexe une fois la cible atteinte. Ainsi la molécule hexa-cationique^[19] ne permet pas la transfection. Les systèmes présentant entre 12 et 96 ammoniums sur leur surface (Figure 4), avec des espaceurs offrant une chaîne carbonée plus longue, transfectent les acides nucléiques.^[20] Cet exemple montre clairement l'effet de la valence du cluster sur la vectorisation.

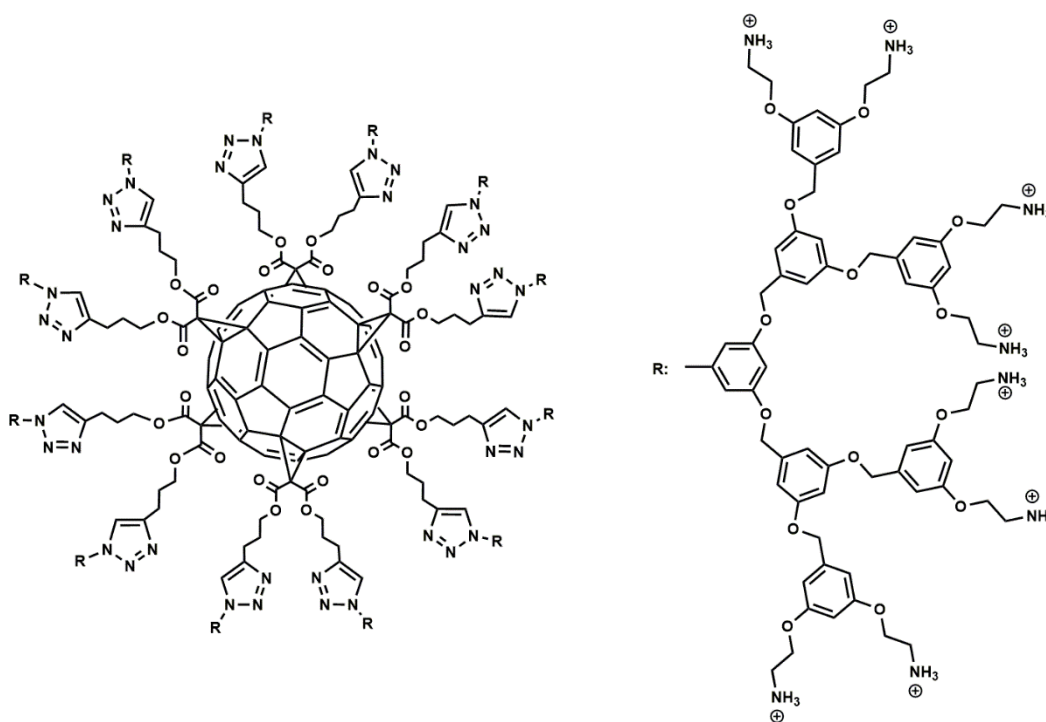


Figure 4. Structure du cluster fullerène, fonctionnalisé par 96 groupements ammoniums, capable de transférer l'ADN

En parallèle, de nombreuses études sur les plateformes pré-organisées de type cyclodextrine ont été appliquées à la reconnaissance de l'ADN et plus particulièrement au transport d'acides nucléiques à travers la barrière cellulaire. Une fois l'objectif de transfection de molécules d'ADN atteint, le second point repose sur le relargage de l'acide nucléique dans le milieu intracellulaire et dans des conditions proches du pH physiologique. Afin de répondre à ces deux critères, des systèmes amphiphiles sont envisagés. Ainsi, alors qu'une des faces de la cyclodextrine est fonctionnalisée par des groupements cationiques, l'autre est initialement modifiée avec des oligoéthylèneimines,^[21] puis avec des chaînes carbonées,^[22] et enfin avec

des groupements de type xylène (Figure 5).^[23] A pH 7,0, les cycles aromatiques des xylènes vont interagir et créer des interactions hydrophobes générant alors un dimère. Le système est ensuite mis en présence de l'ADN. La condensation de l'acide nucléique faite, le complexe va traverser la cellule puis se dissocier sous l'action du pH endosomal acide. L'acidité du milieu va augmenter la répulsion électrostatique des composés cationiques et ainsi déstabiliser le système, facilitant la libération de l'ADN dans la cellule. Dans ces exemples, l'internalisation n'est pas spécifique. Pour remédier à cela, les groupements cationiques ont alors été fonctionnalisés par des sucres capables de reconnaître les récepteurs de surfaces biologiques. Des plateformes de cyclodextrines mannosylées ont montré leur efficacité pour la reconnaissance spécifique par les récepteurs de mannose présents chez les lectines et les macrophages humains.^[24] Ces exemples prouvent l'effet important que peuvent présenter la structure du cluster et la nature des ligands le fonctionnalisant.

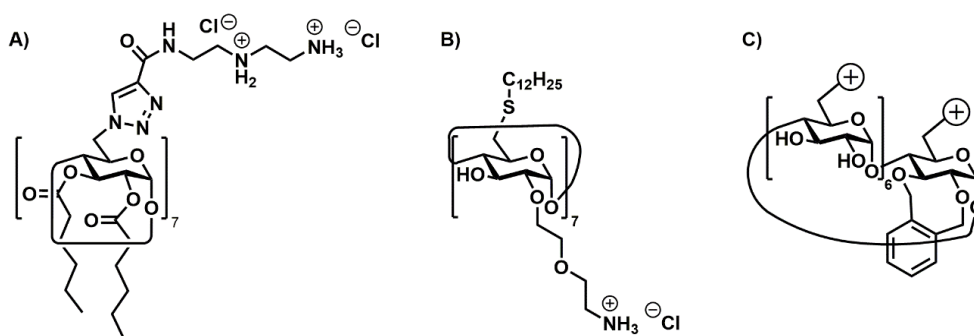


Figure 5. Structures des systèmes basés sur des cyclodextrines amphiphiles impliqués dans la transfection d'ADN et fonctionnalisés A) par les chaînes alkyles, B) par les oligoéthylèneamines et C) par les xylènes

D. Positionnement du projet

L'objectif de ce chapitre va reposer sur la préparation de clusters multivalents et dynamiques capables de complexer l'ADN. Pour cela, des plateformes, de valences comprises entre 1 et 4 aldéhydes et d'architectures variées, vont être mises en présence d'hydrazides de nature différente. En effet, suite au Chapitre 2, la complexation de l'oligonucléotide est en partie expliquée par la multivalence du système, mais il semble également intéressant d'étudier l'impact de la pré-organisation du composé. Ainsi, l'importance de la structure du châssis et des ligands va être étudiée grâce à un criblage. Ces clusters vont être construits par l'auto-assemblage des fragments. L'étude de la complexation est réalisée grâce au test de déplacement du bromure d'éthidium ainsi qu'avec la migration des clusters sur gel d'électrophorèse. Ces travaux nous permettront d'évaluer l'efficacité de complexation de l'oligonucléotide à la fois qualitativement et quantitativement. Le but est de découvrir d'autres systèmes complexant que **cRAFT(L-Arg)₄**. La vectorisation de siARN sera alors testée sur certains de ces clusters.

II. Détermination efficace de nouveaux systèmes complexant l'ADN

A. Synthèse et préparation des composés

1. Synthèse des hydrazides **Hyd**

Les résidus hydrazides non commerciaux utilisés dans ce criblage sont des acides aminés modifiés au niveau de leur groupement carboxylique. Le choix de ces composés a été réalisé dans l'optique de couvrir le plus vaste champ possible de caractéristiques offertes par les chaînes latérales des acides aminés.

La préparation des résidus est cette fois-ci réalisée sur support solide. Cette approche à haut débit permet la synthèse de peptides plus longs et offre la possibilité de générer des clusters et de réaliser les tests de complexation. Pour cela, une résine chlorure de 2-chlorotriyl (2CTC) est fonctionnalisée par le Fmoc-carbazate en conditions basiques. Ceci permettra par la suite les couplages avec les acides aminés sélectionnés.^[25] Quelques billes de résine ont subi une étape de déprotection du groupement Fmoc, protégeant l'hydrazine, pour déterminer la charge du support solide. Tout comme dans le cas de la préparation de la résine pour la synthèse du décapeptide cyclique, la charge est déterminée par mesure de l'absorbance UV-Vis de la solution de déprotection diluée à 301 nm. Cette valeur va permettre d'évaluer le nombre de sites disponibles pour réaliser une réaction de couplage avec l'acide aminé. La résine est ensuite soumise à une étape de déprotection pour aboutir à l'amine α libre. Après lavage de la résine avec différents solvants, suivi de sa filtration et du séchage. En parallèle, l'acide aminé est préactivé en présence de l'agent de couplage HATU et d'une base, puis additionné à la résine et agité. L'étape de couplage est répétée deux autres fois. Au terme du couplage peptidique et après lavage du support solide, les éventuels groupements hydrazines qui n'auraient pas réagi avec l'acide aminé sont inactivés par une solution d'anhydride acétique dans le dichlorométhane (1/1) par transformation de l'amine α en amide. Les groupements Fmoc du résidu aminé fraîchement couplé sont éliminés par traitement basique pour obtenir l'amine en position α libre. Le composé est obtenu pur après clivage et déprotection par une solution acide TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5) (Figure 6).

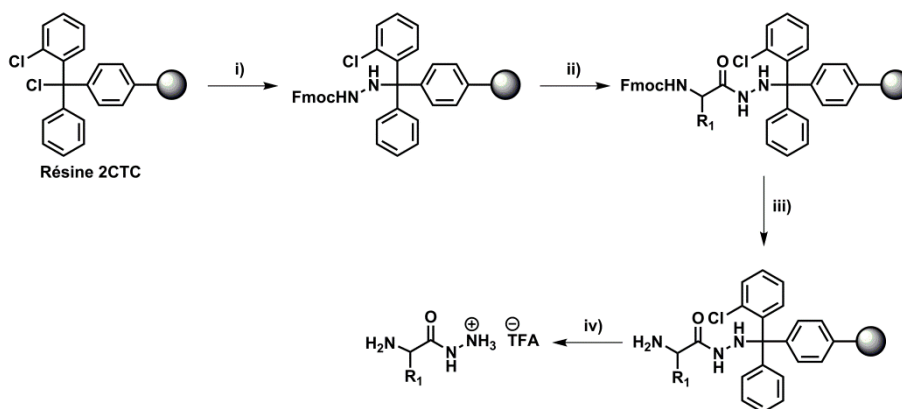


Figure 6. Voie de synthèse sur support solide des acides aminés hydrazides. i) Fmoc-hydrazide, DIEA; ii) a : déprotection: pipéridine, b : couplage peptidique: Fmoc-AA-OH, HATU, DIEA; iii) pipéridine; iv) TFA/H₂O/TIS

Afin d'accroître encore la multivalence des systèmes générés, des tripeptides cationiques fonctionnalisés par un hydrazide au niveau de leur extrémité C-terminale sont synthétisés. Deux peptides linéaires sont préparés par synthèse SPPS classique en utilisant la même résine que dans le cas des monomères pour former après déprotection et clivage, les résidus **Arg₃Hyd** et **Lys₃Hyd** (Figure 7). En parallèle, un dendrimère de première génération, **G₁-LysHyd**, est synthétisé sur support solide pour étudier l'impact de l'organisation des résidus sur la préparation des systèmes puis la complexation de l'ADN. Pour cela, un résidu Fmoc-L-Lys(Fmoc)-OH est couplé à la résine hydrazide. Après déprotection des deux groupements Fmoc, un deuxième couplage est réalisé mais en doublant les quantités de réactifs pour permettre de réaliser un couplage peptidique à la fois sur l'amine α ainsi que sur l'amine en position ε.^[26] L'absorbance attendue, générée par la déprotection des amines, est alors deux fois plus intense que celle obtenue lors de la déprotection du résidu lysine initialement couplé. Cette fois-ci, non pas deux mais quatre molécules issues de la déprotection du Fmoc par la pipéridine sont générées.

Ainsi, douze hydrazides présentant des chaînes latérales variées, différentes stéréochimies et des valences diverses vont être engagées dans le criblage (Figure 7).

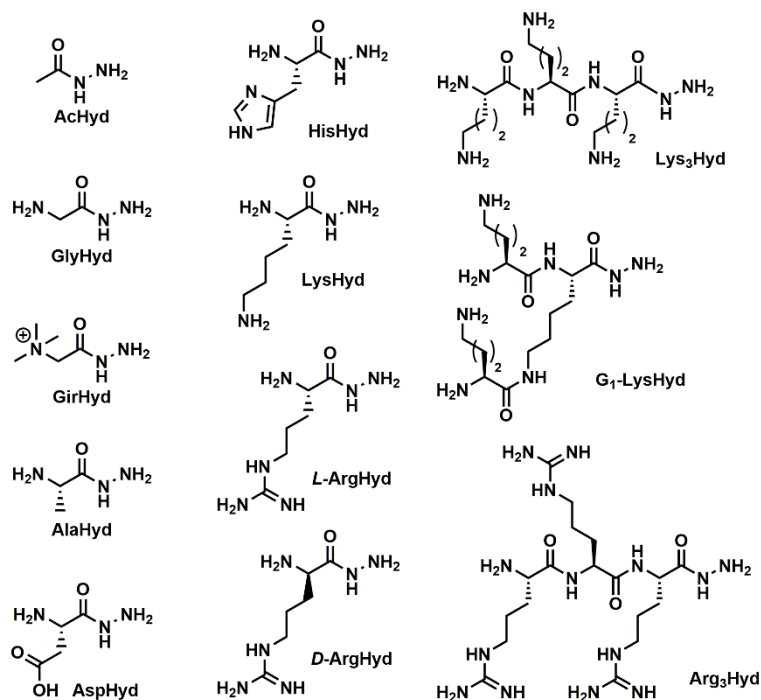


Figure 7. Structures des résidus hydrazides (**Hyd**) préparés pour le criblage

2. Synthèse des plateformes peptidiques

La préparation du peptide linéaire **IRAF(TALD)₄** est adaptée à partir du protocole de synthèse de la plateforme **cRAFT(ALD)₄**.^[27] Le décapeptide linéaire est synthétisé par SPPS puis l'amine terminale est protégée par acétylation grâce à une solution d'anhydride acétique/CH₂Cl₂ (1/1). La protection de l'amine est réalisée, en prévention, pour éviter la formation d'imine intramoléculaire. Le composé est ensuite clivé de la résine en condition d'acidité élevée afin de déprotéger également les groupements Boc et *tert*-butyls des résidus sérines. Enfin, le peptide linéaire est mis en présence d'une solution aqueuse de NaIO₄ pour subir un clivage oxydant des quatre dérivés sérines et obtenir les aldéhydes glyoxyliques (Figure 8).

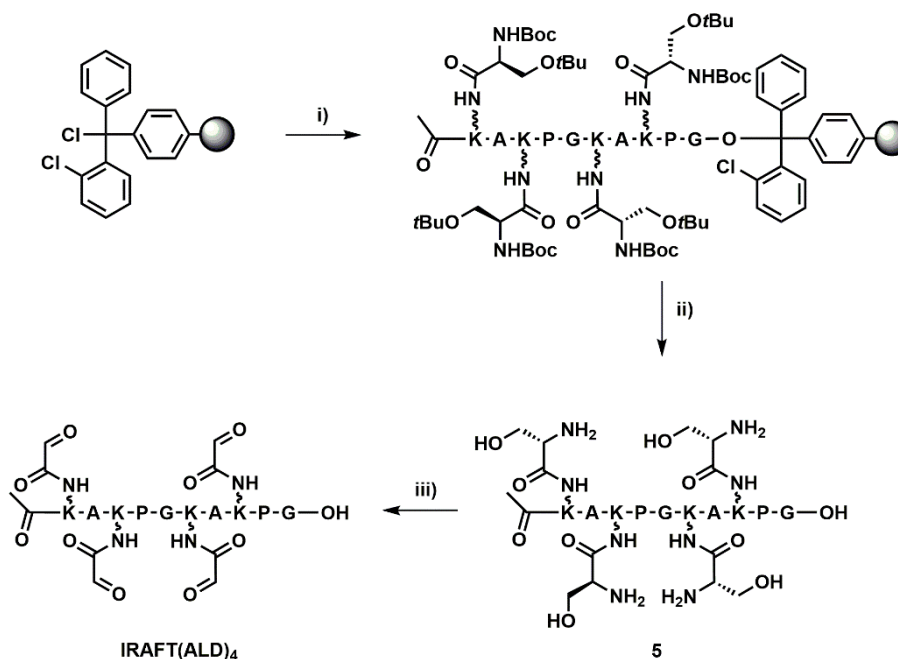


Figure 8. Voie de synthèse du décapeptide linéaire par SPPS. i) Fmoc-Gly-OH, Fmoc-AA-OH, Pipéridine/DMF (2/8), DIEA, DMF, micro-ondes, Δ , SPPS 71%; ii) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5); iii) NaIO₄, H₂O, 47%.

Six composés commerciaux portant un nombre variable de groupements aldéhydes ont été sélectionnés pour le criblage, en supplément des deux peptides synthétisés. Les plateformes choisies vont permettre l'étude de systèmes de valence variable avec un nombre d'aldéhydes compris entre 1 et 4 (Figure 9).

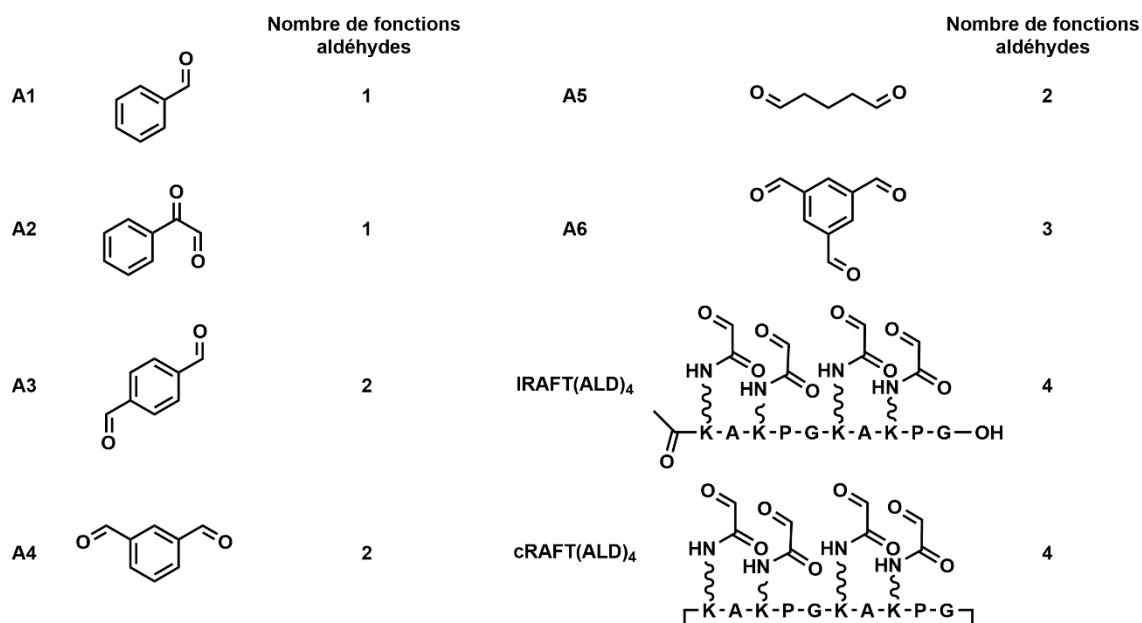


Figure 9. Structures des aldéhydes (A) engagés dans le criblage

3. Préparation des clusters

La préparation des bioconjugués est réalisée à travers la formation de liaisons acylhydrazones dans des conditions identiques à celles décrites précédemment. L'aldéhyde A est placé en

solution tamponnée par 100 mM d'acétate de sodium à pH 5,0 puis 8 éq d'hydrazides **Hyd** sont additionnés au milieu pour favoriser la formation de bioconjugués avec la valence la plus élevée. Afin de vérifier ces affirmations et dans le but de démontrer que la ligation peut être réalisée de manière efficace quelle que soit la nature des réactifs, la préparation de certains de ces systèmes est envisagée. Ainsi, en mélangeant la plateforme **cRAFT(ALD)₄** avec tous les hydrazides **Hyd**, et toutes les plateformes **A** avec le ligand **AcHyd**, le suivi HPLC et les analyses de spectrométrie de masse confirment la formation du système recherché. Il est donc possible de conclure sur la généralité des conditions choisies pour la préparation de ces diverses plateformes fonctionnalisées. Les expériences de criblage par auto-assemblage des clusters sont alors effectuées dans ces conditions pour identifier rapidement les caractéristiques structurales favorisant la reconnaissance de l'ADN.

B. Etude de la complexation des clusters hydrazones avec l'ADN de thymus de veau

L'étude de la complexation de l'ADN par des plateformes fonctionnalisées avec des liaisons acylhydrazones est à nouveau réalisée par le test de déplacement de l'EtBr (Chapitre 2). Cette méthode va dans ce cas être utilisée pour une étude de la complexation avec l'acide nucléique dans une plaque 96 puits.^[28] L'utilisation de microplaques dans la réalisation de criblage pour la reconnaissance de l'ADN de manière séquence-sélective par des ligands a déjà été utilisée sur des composés préalablement isolés.^[29] Dans ce travail, la technologie de criblage est utilisée pour la complexation de l'ADN par 96 bioconjugués auto-assemblés et de nature variée. L'auto-assemblage des clusters est directement réalisé dans les puits et ceci pour les 96 systèmes préparés. L'affinité de l'ADN est ensuite mesurée dans ces mêmes puits sans purification ni isolement des clusters. La comparaison des différents systèmes pourra ainsi être effectuée rapidement avec des temps d'auto-assemblage des clusters et de complexation quasi identiques pour chaque puit.

Pour cela, une plateforme **A** et 8 éq d'hydrazides sont déposés dans chaque puit de la plaque. Après une nuit de ligation, le système est repris dans une solution tamponnée à pH 5,0 par 100 mM d'acétate de sodium à faible salinité (9,4 mM de NaCl) puis l'ADN de thymus de veau et le bromure d'éthidium sont additionnés au milieu. La complexation de l'ADN est effective en quelques heures et s'observe par une diminution de l'émission de fluorescence. Six heures après l'addition de l'acide nucléique dans le milieu, d'importantes différences d'émission de fluorescence sont mesurées entre les puits. Ces variations de signaux indiquent des complexations d'ADN très diverses entre les systèmes (Figure 10).

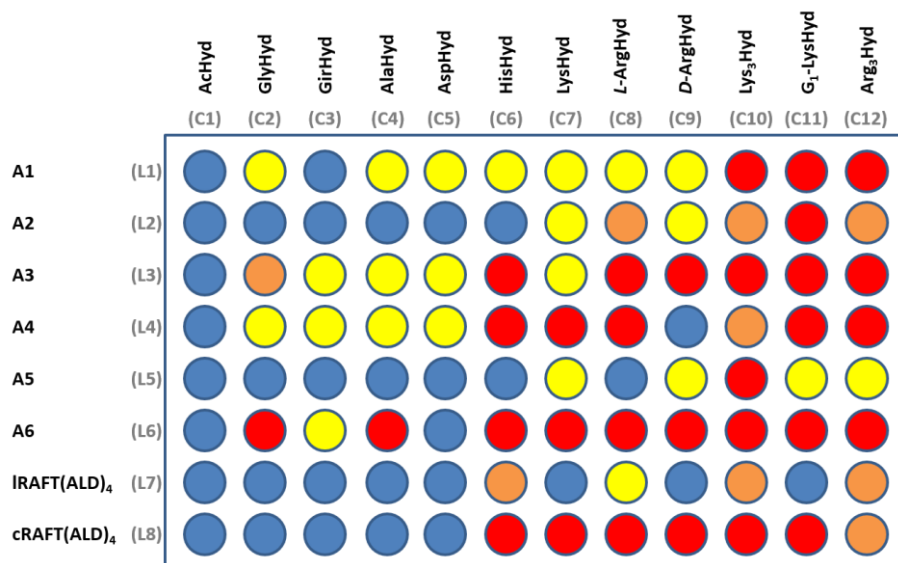


Figure 10. Etude combinatoire de l'ADN par des plateformes aldéhydes (gauche) et des ligands hydrazides (en haut) assemblés par liaisons acylhydrazones via la méthode de déplacement de l'EtBr. Diminution de l'émission relative de fluorescence 0-25% (●), 26-50% (●), 51-75% (●), 76-100% (●) mesurée à 590 nm, 6h après l'addition de l'ADN de thymus de veau

En se focalisant dans un premier temps sur la nature des hydrazides, les différences d'émission de fluorescence mesurées indiquent un rôle important du choix du ligand. La colonne (C1) montre l'absence de complexation de ces clusters neutres avec l'ADN, quelle que soit la multivalence. Au contraire, la complexation des composés cationiques pour les acides nucléiques est notamment observée dans les puits des colonnes (C10), (C11) et (C12) (Figure 10). Ces résultats confirment l'absence de complexation du système neutre **cRAFT(Ac)₄** alors que le composé cationique **cRAFT(L-Arg)₄** complexe. Cette conclusion confirme les essais obtenus précédemment par l'étude en cuve (Chapitre 2). Ces observations valident ainsi les résultats de cette nouvelle méthodologie sur support microplaque. L'effet de la multivalence est facilement observable grâce à ce type de support. Ainsi, un nombre plus important de systèmes semble complexer avec l'augmentation de leur multivalence. Les plateformes tétravalentes sont plus efficaces pour la complexation de l'ADN que leurs homologues monovalents. Par exemple, **cRAFT(ALD)₄** permet selon les résultats obtenus par ce criblage de créer sept bioconjugués efficaces pour la complexation de l'ADN, alors que **A1** en forme trois. Les résultats des tests de complexation réalisés sur les composants confirment l'effet de la multivalence sur la cible. Une seconde analyse de déplacement de l'EtBr par les réactifs est donc réalisée. La complexation d'ADN par les plateformes aldéhydes non fonctionnalisées **A** d'une part, et les hydrazides **Hyd** d'autres parts, est alors testée (Figure 11). Les signaux d'émission de fluorescence élevés indiquent que les plateformes **A** sont incapables de complexer l'ADN. De même, les hydrazides ne montrent pas de complexation avec l'ADN dans ces conditions sauf dans le cas des tripeptides **Lys₃Hyd**, **G₁-Lys Hyd** et **Arg₃Hyd**. Ce test est réalisé dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'étude des

systèmes acylhydrazones impliquant des concentrations de 1 mM en plateforme **A** et de 8 mM en hydrazide. La concentration en hydrazides étant constante, les ratios N/P pour chaque colonne varient avec le nombre de charges qui caractérisent les ligands hydrazides. Ainsi, **AcHyd** présente une unique charge positive lorsque le composé est sous forme monovalente et les tripeptides portent jusqu'à 5 charges cationiques sous forme hydrazide. La charge cationique des tripeptides est ainsi 5 fois supérieure à celle d'autres ligands et le ratio N/P est donc 5 fois plus élevé lors des études de complexation à l'ADN. La complexation globale du cluster est alors évaluée pour une concentration donnée en plateforme ou en ligand impliquant des ratios N/P variés.

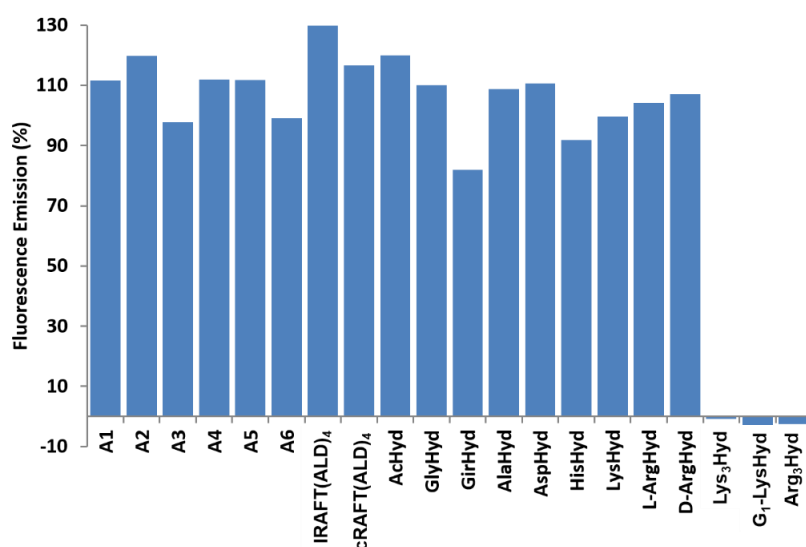


Figure 11. Complexation de l'ADN par les plateformes non fonctionnalisées **A** et les ligands **Hyd** via le test de déplacement du bromure d'éthidium

Le ratio N/P est choisi comme critère de comparaison en plus des expériences de titration dans le cas des études de migration sur gel d'agarose.

C. Etude par électrophorèse sur gel d'agarose

Les tests d'électrophorèse sur gel réalisés à pH 8,0 confirment le rôle de la multivalence pour la complexation du plasmide pET-15b. Tout comme cela a été observé précédemment entre **cRAFT(L-Arg)₄** et **L-ArgHyd**, le tripeptide **Arg₃Hyd** est efficace pour complexer l'ADN pour un ratio N/P ≥ 600 alors qu'un N/P ≥ 1 suffit pour créer le complexe tétravalent **cRAFT(Arg₃)₄** correspondant (Figure 12).

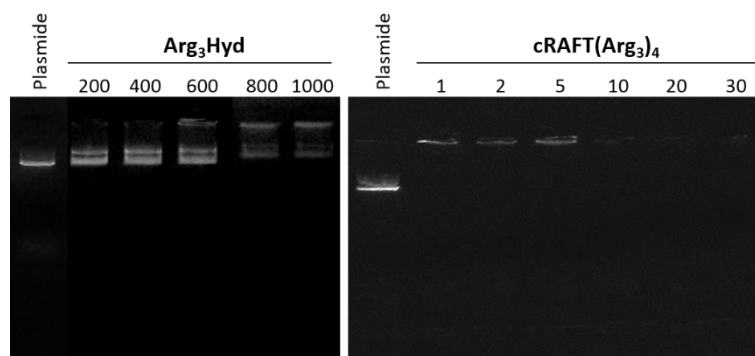


Figure 12. Complexation de l'ADN plasmidique par le tripeptide **Arg₃Hyd** (gauche) et le système tétravalent correspondant **cRAFT(Arg₃)₄** (droite) à différents ratios N/P

Dans le Chapitre 2, il a été démontré que le système tétravalent cyclique **cRAFT(L-Arg)₄** était capable de réaliser une complexation efficace avec l'ADN de thymus de veau.^[27] Cependant en modifiant la structure de la plateforme, il est facile de constater que l'architecture joue un rôle sur la complexation comme cela a été montré dans le criblage réalisé par déplacement de l'EtBr. Ainsi, parmi les huit plateformes étudiées, seules 4 d'entre elles une fois fonctionnalisées avec l'hydrazide **L-ArgHyd** sont des agents de complexation efficaces. Les plateformes tri et tétravalentes **A6** et **cRAFT(ALD)₄** sont capables de complexer l'ADN. **IRRAFT(ALD)₄** montre également une complexation partielle à l'acide nucléique, mais non totale. Cette différence avec le bioconjugué cyclique peut s'expliquer par l'absence d'une pré-organisation. Les composés divalents **A3** et **A4** montrent l'apparition d'une deuxième bande de plasmide. Ces deux plateformes, l'une linéaire et l'autre cyclique ont également été envisagées pour tester l'effet de la pré-organisation du système sur la complexation de l'ADN. La différence de complexation est difficilement observable, certainement due au fait que le changement structural est minime en comparaison de celui des **RAFT(ALD)₄**. Les expériences réalisées sur gel d'électrophorèse confirment ces résultats et permettent de montrer que les systèmes divalents révèlent une efficacité de complexation moindre pour l'ADN que leurs homologues tri et tétravalents (Figure 13).

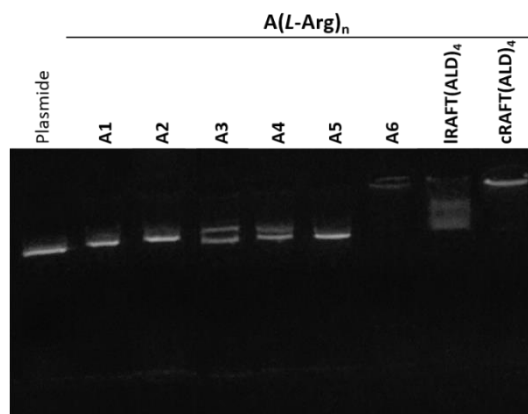


Figure 13. Electrophorèse sur gel montrant la complexation de l'ADN plasmidique par des systèmes construits autour des différentes plateformes **A** avec l'hydrazide **L-ArgHyd**. Les complexations sont réalisées pour un ratio N/P = 80 avec n indiquant l'indice de multivalence

L'importance de ces quatre plateformes est confirmée par l'étude de l'influence de la nature des plateformes fonctionnalisées cette fois-ci avec le tripeptide **Arg₃Hyd**. La complexation des différents systèmes créés est évaluée à un ratio N/P de 1 et, ici encore, les plateformes **A3**, **A4**, **A6** et **cRAFT(ALD)₄** présentent une supériorité dans leur capacité à complexer l'ADN (Figure 14).

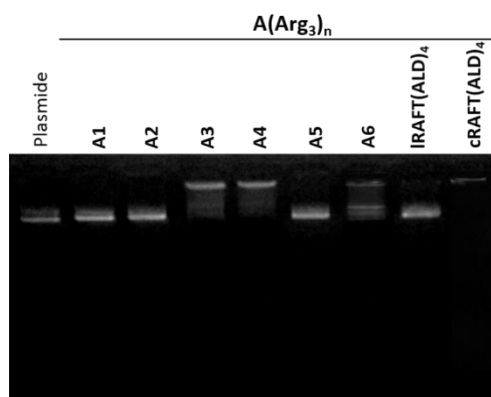


Figure 14. Etude par électrophorèse sur gel de la complexation de l'ADN plasmidique par des systèmes créés en fonctionnalisant différentes plateformes par le ligand **Arg₃Hyd**. L'expérience est réalisée avec des ratios N/P = 1 avec n indiquant l'indice de multivalence

La pré-organisation de la plateforme semble importante pour la complexation de l'ADN comme cela est observé par mesure de l'émission de fluorescence dans la Figure 10. En effet, selon les précédents résultats, le système cyclique **cRAFT(ALD)₄** montre une plus grande capacité à complexer l'ADN que son homologue linéaire **IRAFT(ALD)₄**. L'étude par gel d'électrophorèse confirme cette observation en démontrant qu'en présence d'un ratio N/P supérieur à 10, le plasmide pET-b15 est complexé alors que la complexation n'est effective qu'à partir d'un ratio de 50 dans le cas du système linéaire (Figure 15).

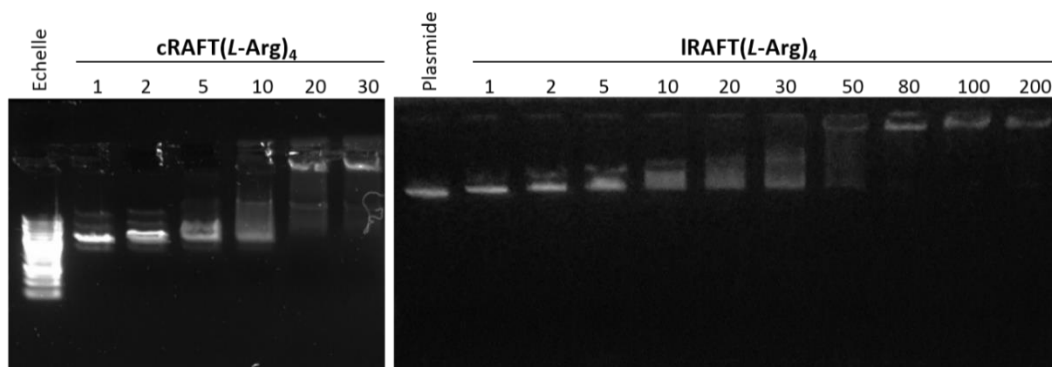


Figure 15. Analyse d'électrophorèse sur gel montrant la complexation de l'ADN plasmidique par le cluster cyclique **cRAFT(L-Arg)₄** (gauche) et par le linéaire **IRAFT(L-Arg)₄** (droite) à différents ratios N/P

L'impact de l'organisation structurale d'un système cationique pour la reconnaissance d'ADN a été précédemment observé sans pour autant en connaître les raisons précises.^[30] Dans le cas présent, il est supposé que la pré-organisation du système tétravalent cyclique **cRAFT(ALD)₄** soit à l'origine d'une concentration locale plus grande en charge positive par rapport au composé linéaire. Une autre explication possible serait, que la constante d'association des deux clusters soit égale, mais, que le linéaire induise une moins grande déformation de l'oligonucléotide. Le cluster cyclique pourrait s'intercaler dans le grand sillon.^[31]

Outre le fait que les plateformes jouent un rôle important dans la complexation de l'ADN, l'étude des ligands est également indispensable pour connaître au mieux les caractéristiques nécessaires à la complexation de l'ADN. Le criblage, grâce à la mesure du déplacement de bromure d'éthidium par émission de fluorescence, indique que les hydrazides neutre (**AcHyd**) et anionique (**AspHyd**) sont totalement inactifs face à la complexation de l'ADN. De la même manière, les systèmes fonctionnalisés avec le réactif de Girard (**GirHyd**) ne présentent qu'une faible complexation contrairement aux systèmes cationiques protonnés. Cette observation indique que la charge cationique n'explique pas entièrement la complexation de l'ADN. Malgré une part importante des interactions électrostatiques pour la complexation de l'ADN, d'autres forces comme les liaisons hydrogènes doivent être considérées. Les analyses par gel d'électrophorèse confirment ces résultats. La complexation est ici étudiée avec un ratio N/P de 40 autour de la fonctionnalisation de la plateforme cyclique **cRAFT(ALD)₄** par les dix hydrazides pouvant permettre d'atteindre un tel ratio. En effet, l'**AcHyd** et l'**AspHyd** ne présentant pas de charges positives, l'expérience sur ces résidus n'a pas été réalisée. La Figure 16 révèle, parmi tous les ligands testés, que les hydrazides contenant des résidus lysine ou arginine sont les plus efficaces pour complexer l'ADN. Les mêmes observations sont obtenues lors d'une étude similaire avec la plateforme trivalente **A6**. La complexation du cluster **cRAFT(Lys)₄** semble moins efficace que celle de l'arginine. Cette différence peut s'expliquer par la formation d'une simple liaison hydrogène ou d'une interaction électrostatique entre l'ammonium de la lysine et l'ADN. Le guanidinium de l'arginine joue quant à lui le rôle de

ligand bidentate pour réaliser des liaisons hydrogènes avec le phosphodiester de l'acide nucléique.^[32]

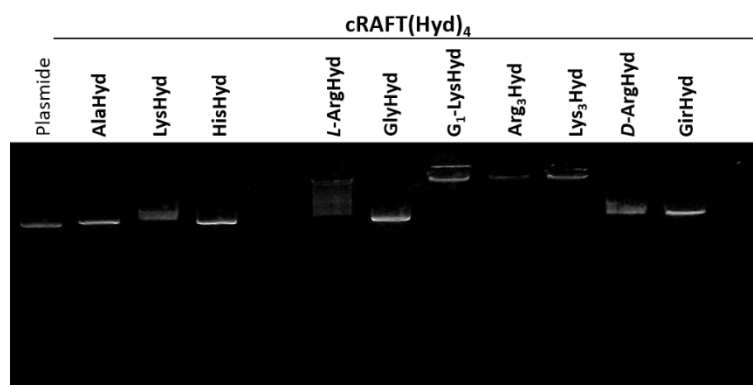


Figure 16. Etude par électrophorèse sur gel de la complexation de l'ADN plasmidique par des systèmes **cRAFT(ALD)₄** fonctionnalisés avec les différents hydrazides. L'expérience est réalisée avec un ratio N/P de 40

Des différences sont observées entre le test de déplacement du bromure d'éthidium mesuré par fluorescence et le gel d'électrophorèse. Un décalage est notamment visible au niveau de la complexation d'ADN par les systèmes fonctionnalisés avec des acides aminés dont le pKa de la chaîne latérale est plus bas que celui de l'arginine (pKa = 12,5). L'histidine (pKa = 6,0) et la lysine (pKa = 10,5) font parties de ces résidus. Cette variation peut s'expliquer par l'effet du pH. En effet, les gels sont réalisés à pH 8,0 alors que l'émission de fluorescence est quant à elle mesurée à pH 5,0.

D'autres dissemblances sont constatées entre les deux techniques dans le cas des acides aminés qui ne présentent pas de charges positives au niveau de leur chaîne latérale comme **GlyHyd** et **AlaHyd**. L'amine α des ligands ne semble pas suffisante pour permettre la complexation du système même dans le cas du composé tétravalent. La ligation de l'ADN de thymus de veau par le système **cRAFT(Gly)₄** est malgré tout observée par déplacement du bromure d'éthidium lorsque les essais sont réalisés à N/P = 80 et pH 5,0. Cependant, en durcissant les conditions, contrairement à **cRAFT(L-Arg)₄** qui reste actif à faible ratio N/P = 2 ou encore à forte salinité, le système **cRAFT(Gly)₄** est pour sa part incapable de complexer l'ADN (Tableau 2).

Tableau 1. Complexation de l'ADN de thymus de veau suivie par un test de déplacement d'EtBr, par les systèmes **cRAFT(L-Arg)₄** et **cRAFT(Gly)₄** à différentes conditions

Entrée	Composé	N/P ^[a]	[NaCl] (mM)	Emission de Fluorescence (%) ^[b]
1	cRAFT(L-Arg)₄	80	9,4	2,6
2	cRAFT(L-Arg)₄	2	9,4	0
3	cRAFT(L-Arg)₄	80	150	25,3
4	cRAFT(Gly)₄	80	9,4	3,6
5	cRAFT(Gly)₄	2	9,4	100
6	cRAFT(Gly)₄	80	150	92,4

[a] N/P représente le ratio en charge positive (N) par phosphodiester (P); [b] mesuré après 20 heures

Les gels d'électrophorèse réalisés à pH 8,0 confirment ces résultats. Aucune complexation de l'ADN n'est observée dans une gamme de ratio N/P comprise entre 10 et 80 pour le système **cRAFT(Gly)₄**.

Le gel d'électrophorèse présenté dans la Figure 17 montre un autre résultat surprenant. En effet, une différence de complexation de l'ADN par les systèmes **cRAFT(L-Arg)₄** et **cRAFT(D-Arg)₄** est observée. Ce résultat a été confirmé à plusieurs reprises. Cette constatation implique un rôle de la chiralité du ligand dans sa puissance de complexation pour l'ADN. Ainsi, le composé **cRAFT(L-Arg)₄** est capable de créer un complexe avec un ratio N/P plus petit que dans le cas de son isomère. Le gel d'électrophorèse du système **cRAFT(D-Arg)₄** complexant l'ADN, réalisé à des ratios N/P compris entre 10 et 100, montre des bandes légèrement plus retenues que la bande du plasmide. Les complexes ainsi formés entraînent probablement un changement de conformation plus fin de l'ADN par rapport au cluster fonctionnalisé par le ligand **L-ArgHyd**. A nouveau, une hypothèse est émise quant à la présence d'un autre type d'interaction que les forces électrostatiques. Ici encore l'existence de liaisons hydrogènes est envisagée pour former le complexe entre l'ADN et les systèmes multivalents cationiques. Les liaisons hydrogènes étant directionnelles, la présence d'une chiralité peut favoriser un ligand sous une configuration plutôt que l'autre, expliquant ainsi le phénomène observé. Les interactions électrostatiques n'étant pas directionnelles, l'effet de la chiralité sur la complexation ne pourrait pas être expliqué.

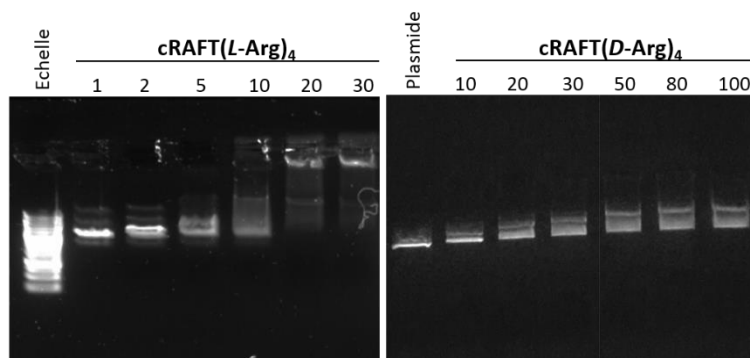


Figure 17. Comparaison des analyses d'électrophorèse sur gel montrant la complexation du plasmide pET-15b par le système multivalent **cRAFT(L-Arg)₄** (gauche) et **cRAFT(D-Arg)₄** (droite) à différents ratios N/P

Cette méthode de criblage a permis d'aboutir rapidement à une meilleure compréhension de la complexation de l'ADN et ainsi de pouvoir rapidement identifier la nature du système le plus efficace pour lier la cible étudiée. Ainsi les composés les plus puissants se révèlent être les systèmes construits autour de la plateforme cyclique **cRAFT(ALD)₄** fonctionnalisée avec des résidus *L*-arginines mono ou multivalents.

III. Vectorisation de siARN

La complexation dynamique à l'ADN des systèmes développés dans ce chapitre peut être envisagée dans la vectorisation d'acides nucléiques. Cette perspective de pénétration cellulaire pour le silençage de gènes a déjà fait l'objet de travaux basés sur la synthèse de poly-arginines^[33] ou même de peptides cycliques capables de traverser la membrane cellulaire.^[34]

Le potentiel des systèmes multivalents pour la vectorisation de siARN est évalué sur la lignée cellulaire MCF7-luc. Cette lignée cellulaire est dérivée de cellules humaines du cancer du sein MCF7, transfectées par le gène de la luciférase de la luciole. Les siARN sont des ARN double brins qui peuvent notamment jouer un rôle dans l'inhibition post-transcriptionnelle des gènes.^[1b,35] Pour ces tests, les deux systèmes qui se sont dévoilés être les plus efficaces pour la complexation d'ADN sont sélectionnés, **cRAFT(L-Arg)₄** et **cRAFT(Arg₃)₄**.

Des études de diffusion dynamique de la lumière sur le composé **cRAFT(ALD)₄** confirme la formation de complexes avec le siARN. Les particules obtenues présentent un diamètre hydrodynamique de 148-190 nm pour un ratio N/P = 20 (Figure 18).

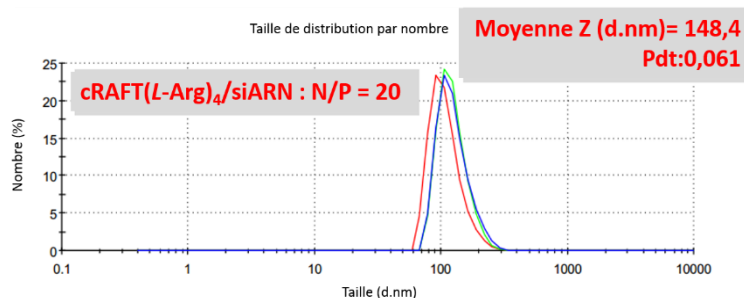


Figure 18. Diffusion dynamique de la lumière du complexe formé entre **cRAFT(L-Arg)₄** et le siARN à un ratio N/P = 20.

Lorsque le système est soumis à un test de pénétration cellulaire par imagerie par fluorescence ou encore lors d'essais de transfection avec des travaux sur des cellules de luciférase, aucune activité n'est observée (Figure 19). En effet, aucun signal de fluorescence caractéristique de la cyanine 3 (Figure 20), le fluorophore hydrosoluble étiqueté au siARN, n'est observé. En superposant les différents clichés, seule la cellule et le noyau marqué par le DAPI sont donc visibles (Figure 19), le siARN ayant été lavé faute d'avoir pénétré la membrane cellulaire. Le DAPI est utilisé pour marquer le noyau grâce à sa forte interaction avec les adénines et les thymines de l'ADN (Figure 20).

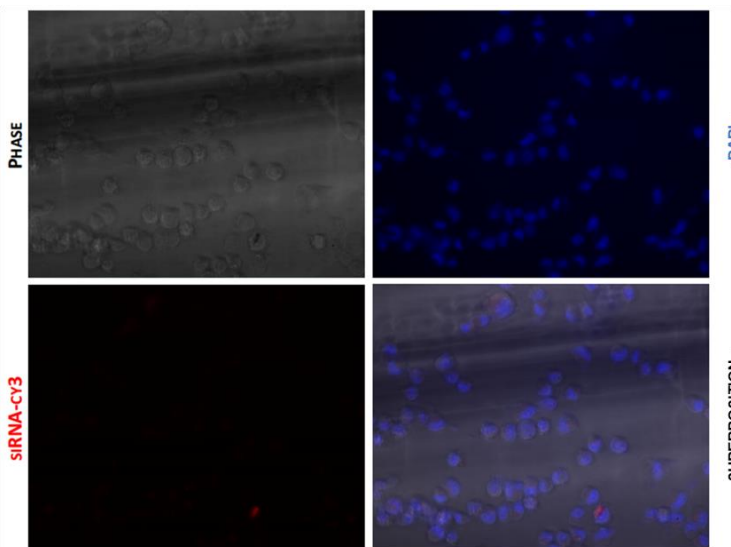


Figure 19. Imagerie de fluorescence des cellules MCF7 transfectées par le complexe formé entre le système **cRAFT(L-Arg)₄** et le siARN non-codant étiqueté par la Cy3 à N/P = 20

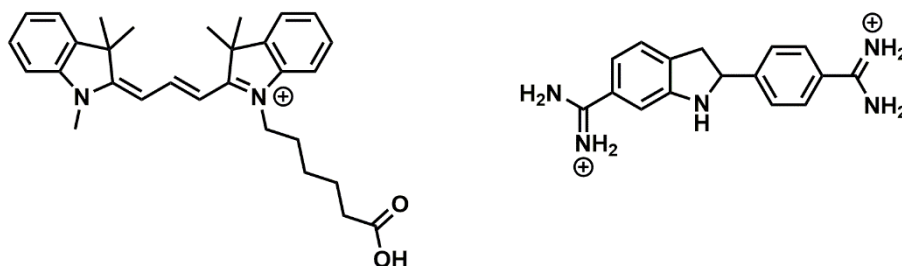


Figure 20. Structure chimique de la cyanine 3, un fluorophore hydrosoluble émettant dans le rouge à 570nm (gauche) et du DAPI, capable d'interagir avec les bases adénine et thymine de l'ADN (droite)

Face à ces résultats, la suite des analyses et des tests se tournent vers l'étude de l'autre système portant des groupements guanidiniums et complexant l'ADN : le **cRAFT(Arg₃)₄**.

Une électrophorèse sur gel est réalisée pour confirmer la complexation du siARN par **cRAFT(Arg₃)₄**. L'analyse confirme également la complexation du composé pour cet acide nucléique. Une complexation totale est obtenue à partir de N/P = 9 (Figure 21).

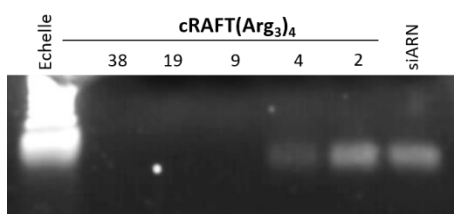


Figure 21. Analyse par électrophorèse sur gel de la complexation du siARN par le système multivalent cationique **cRAFT(Arg₃)₄** à différents N/P

Tout comme dans l'étude avec **cRAFT(L-Arg)₄**, la diffusion dynamique de la lumière montre la formation de complexes avec le siARN à un ratio N/P = 9. Les particules ainsi formées présentent un diamètre de l'ordre de 200 nm avec un indice de polydispersité (PDI) compris entre 0,1 et 0,2. Après une heure, la mesure est constante et indique la stabilité de ces complexes dans le temps. En augmentant les proportions en sel, pour atteindre une concentration physiologique (154 mM), le diamètre des complexes formés évolue pour atteindre une valeur de 320 nm (PDI = 0,12) (Tableau 2). L'hypothèse proposée pour expliquer ce phénomène est basée sur l'agrégation des complexes, due à la présence de sel.

Tableau 2. Caractérisation par diffusion dynamique de la lumière pour déterminer la taille des particules formées par complexation de **cRAFT(Arg₃)₄** et du siARN à N/P = 9

	to	Après 1h	Après 1h (154 mM NaCl)
Moyenne Z ^[a]	179,3 ± 1,2	201,8 ± 1,9	320,4 ± 30,0
PDI ^[b]	0,143 ± 0,005	0,154 ± 0,009	0,122 ± 0,008

[a] diamètre hydrodynamique en nm; [b] indice de polydispersité

L'internalisation des particules par les cellules cancéreuses MCF7 est ensuite réalisée et analysée par microscopie par fluorescence. Le système multivalent cationique **cRAFT(Arg₃)₄** est, contrairement à son homologue **cRAFT(L-Arg)₄**, capable de traverser la membrane cellulaire et de faire pénétrer le siARN. Ainsi la fluorescence rouge caractéristique du groupement cyanine 3 lié au siARN non-codant est visualisée par microscopie après les étapes de lavage successives à la période de pénétration (Figure 22). Des analyses sur une autre lignée cellulaire du cancer du sein, MDA-MB-231, confirment la capacité de transfection de l'ARN par le composé **cRAFT(Arg₃)₄** (Figure 23).

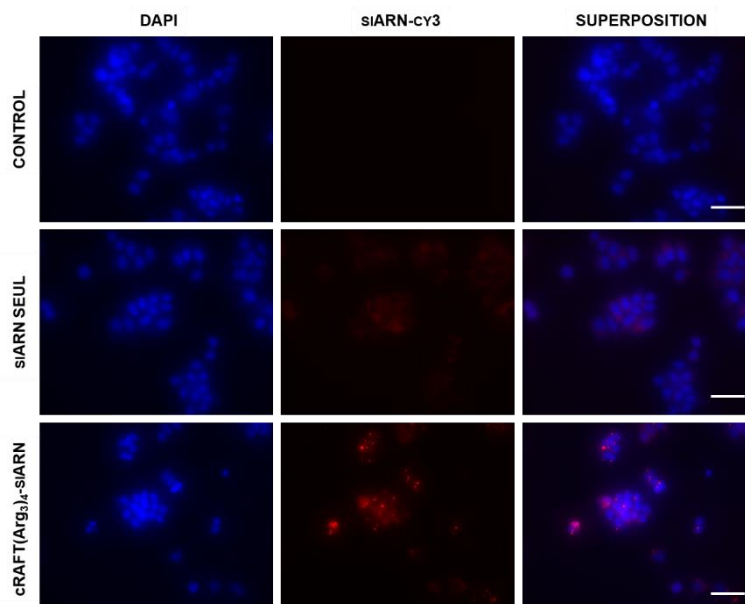


Figure 22. Image de fluorescence (grossissement 40x) de cellules MCF7, seules (haut), en présence de siARN non codant étiqueté par la cyanine 3 (centre), et avec le complexe formé du système **cRAFT(Arg₃)₄** et du siARN non codant étiqueté par la cyanine 3 à N/P = 9 (bas). La fluorescence bleue (droite) indique le noyau (marquage au DAPI), et la fluorescence rouge (milieu) révèle le siARN étiqueté par la cyanine 3. Les barres d'échelle représentent 50 μ m

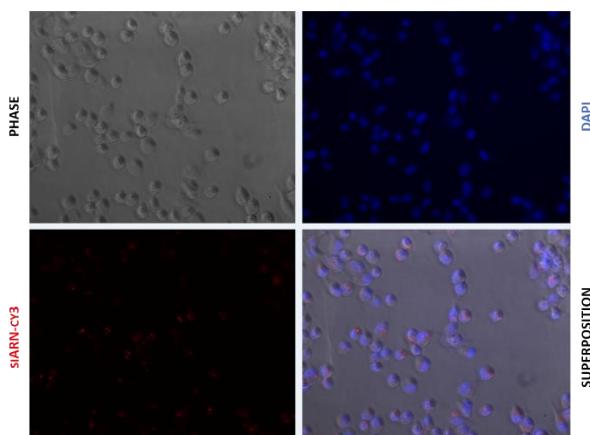


Figure 23. Image de fluorescence (grossissement 40x) de cellules MDA-MD-231 transfectées par le complexe formé entre le système polycationique multivalent **cRAFT(Arg₃)₄** et le siARN non-codant étiqueté avec la cyanine 3 à N/P = 9. La fluorescence bleue (en haut à droite) indique le noyau (marquage au DAPI), et la fluorescence rouge (en bas à gauche) révèle le siARN étiqueté par la cyanine 3

Les tests de pénétration cellulaire sur la luciférase révèlent cette fois-ci le pouvoir du système **cRAFT(Arg₃)₄** pour la vectorisation du 21-mer dans la cellule à un ratio N/P de 9. En augmentant la quantité de siARN transfectée, la spectroscopie par fluorescence permet d'observer une atténuation de l'expression de la luciférase (Figure 24).

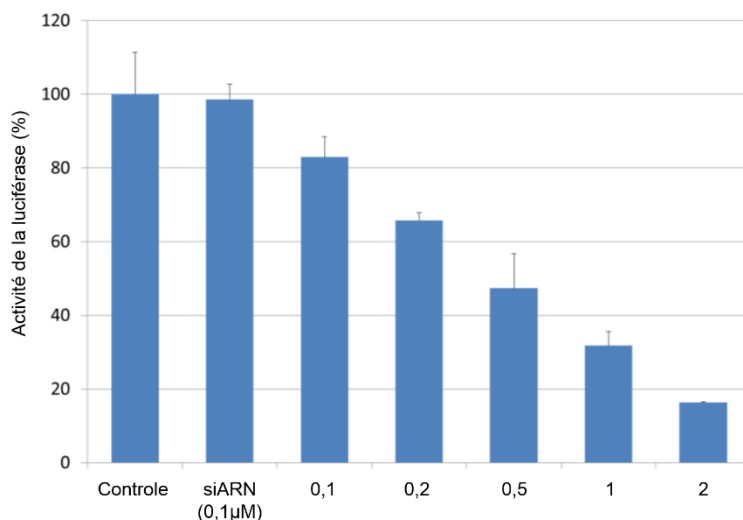


Figure 24. Activité de la luciférase montrant la transfection du siARN ciblant l'expression de la luciférase. Les mesures sont effectuées à une concentration croissante en siARN (0,1 à 2 μM) complexé avec **cRAFT(Arg₃)₄** à un ratio N/P = 9

L'activité du système pour la vectorisation étant démontrée ; il faut ensuite étudier la toxicité des particules sur la viabilité des cellules. Le test MTT évalue la cytotoxicité des composés synthétiques en mesurant l'absorbance à 540 nm des milieux traités avec différents ratios de complexe **cRAFT(Arg₃)₄/siARN**. Aucune toxicité significative n'est relevée jusqu'à une concentration de 1 μM en plateforme fonctionnalisée **cRAFT(Arg₃)₄** (Figure 25).

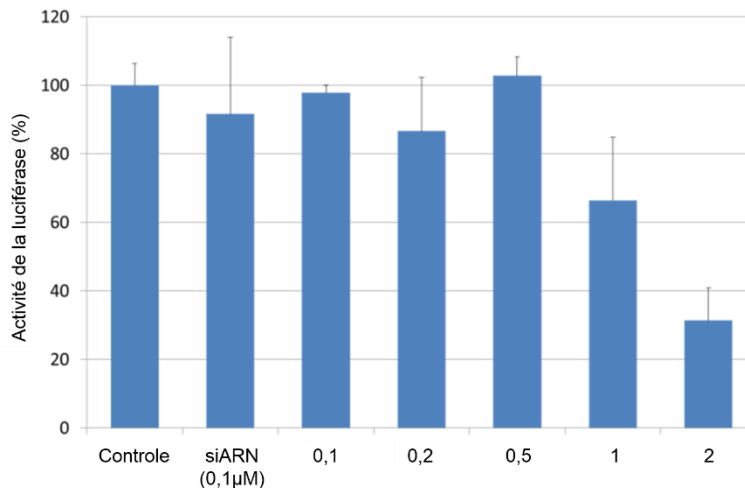


Figure 25. Test MTT d'évaluation de la viabilité cellulaire à différentes concentrations en siARN (0,1 à 2 μM) complexé à un ratio N/P = 9 avec **cRAFT(Arg₃)₄**

Ces résultats indiquent une bonne efficacité de transfection et l'absence de toxicité cellulaire sur une gamme de concentration en siARN comprise entre 0,1 et 1 μM.

IV. Conclusion

Dans ce chapitre, une nouvelle méthode efficace et rapide de criblage a été développée dans le but de découvrir de nouveaux clusters préparés autour de liaisons acylhydrazones et

capables de complexer l'ADN. Les études d'émission de fluorescence et de migration d'électrophorèse sur gel ont permis de révéler l'impact de la nature des plateformes et des ligands sur le potentiel complexant des composés. Ainsi, les composés cationiques protonnés et la chiralité jouent un rôle dans la complexation de l'ADN. Ces études ont permis de conclure sur l'efficacité des systèmes tétravalents cycliques fonctionnalisés avec des résidus *L*-arginines **cRAFT(L-Arg)₄** et **cRAFT(Arg₃)₄**. Ce sont ces deux clusters qui ont fait l'objet d'étude de toxicité et de vectorisation de siARN dans des cellules cancéreuses. Le complexe **cRAFT(Arg₃)₄** est ainsi capable de transférer l'acide nucléique double brin au sein de la cellule sans aucune toxicité significative jusqu'à une concentration de 1 µM en siARN.^[36] Ainsi, ces systèmes biomoléculaires pourront être utilisés comme vecteurs artificiels pour le transport d'oligonucléotides d'intérêt thérapeutique. Des travaux supplémentaires comme la fonctionnalisation de la seconde face de la plateforme par des chaînes lipophiles pourraient permettre à ces systèmes d'améliorer encore leur capacité à transférer des acides nucléiques.^[37]

V. Références

- [1] a) RNA interference: a chemist's perspective, J. W. Gaynor, B. J. Campbell, R. Cosstick, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 4169-4184; b) Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems, D. Reischl, A. Zimmer, *Nanomedicine: NBM*, **2009**, 5, 8-20; c) RNA Transport (Partly) Revealed!, J. D. Richter, *Neuron*, **2004**, 43, 442-443.
- [2] Silencing disease genes in the laboratory and the clinic, J. K. Watts, D. R. Corey, *J. Pathol.*, **2012**, 226, 365-379.
- [3] a) Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture, J. Haensler, F. C. Szoka, *Bioconjug. Chem.*, **1993**, 4, 372-379; b) Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers, J. F. Kukowska-Latallo, A. U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D. A. Tomalia, J. R. Baker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 4897-4902; c) *In Vitro* Gene Delivery by Degraded Polyamidoamine Dendrimers, M. X. Tang, C. T. Redemann, F. C. Szoka, *Bioconjug. Chem.*, **1996**, 7, 703-714; d) Formation of Supramolecular Structures between DNA and Starburst Dendrimers Studied by EPR, CD, UV, and Melting Profiles, M. F. Ottaviani, F. Furini, A. Casini, N. J. Turro, S. Jockusch, D. A. Tomalia, L. Messori, *Macromolecules*, **2000**, 33, 7842-7851; e) Polyplexes Assembled with Internally Quaternized PAMAM-OH Dendrimer and Plasmid DNA Have a Neutral Surface and Gene Delivery Potency, J. H. Lee, Y.-b. Lim, J. S. Choi, Y. Lee, T.-i. Kim, H. J. Kim, J. K. Yoon, K. Kim, J.-s. Park, *Bioconjug. Chem.*, **2003**, 14, 1214-1221.
- [4] a) Synthesis of a Barbell-like Triblock Copolymer, Poly(L-lysine) Dendrimer-block-Poly(ethylene glycol)-block-Poly(L-lysine) Dendrimer, and Its Self-Assembly with Plasmid DNA, J. S. Choi, D. K. Joo, C. H. Kim, K. Kim, J. S. Park, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 474-480; b) *In Vitro* Gene Transfection Using Dendritic Poly(L-lysine), M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Niidome, H. Aoyagi, *Bioconjug. Chem.*, **2002**, 13, 510-517.
- [5] The Lower-Generation Polypropylenimine Dendrimers Are Effective Gene-Transfer Agents, B. Zinselmeyer, S. Mackay, A. Schatzlein, I. Uchegbu, *Pharm Res*, **2002**, 19, 960-967.
- [6] a) Amphiphilic Dendrimers: Novel Self-Assembling Vectors for Efficient Gene Delivery, D. Joester, M. Losson, R. Pugin, H. Heinzlmann, E. Walter, H. P. Merkle, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 1486-1490; b) High-Affinity Multivalent DNA Binding by Using Low-Molecular-Weight Dendrons, M. A. Kostianen, J. G. Hardy, D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 2556-2559.
- [7] Remnant cationic dendrimers block RNA migration in electrophoresis after monophasic lysis, J.-H. S. Kuo, Y.-L. Lin, *J. Biotechnol.*, **2007**, 129, 383-390.
- [8] a) Self-Immolative Dendrimers, R. J. Amir, N. Pessah, M. Shamis, D. Shabat, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4494-4499; b) Bioactivation of Self-Immolative Dendritic Prodrugs by Catalytic Antibody 38C2, M. Shamis, H. N. Lode, D. Shabat, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 1726-1731; c) Substituent-dependent disassembly of self-immolative dendrimers, R. Perry, R. J. Amir, D. Shabat, *New J. Chem.*, **2007**, 31, 1307-1312; d) Remarkable drug-release enhancement with an elimination-based AB₃ self-immolative dendritic amplifier, A. Sagi, E. Segal, R. Satchi-Fainaro, D. Shabat, *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 3720-3727; e) Self-immolative dendritic probe for direct detection of triacetone triperoxide, E. Sella, D. Shabat, *Chem. Commun.*, **2008**, 5701-5703; f) Geometric Disassembly of Dendrimers: Dendritic Amplification, M. L. Szalai, R. M. Kevwitch, D. V. McGrath, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 15688-15689; g) Synthesis and degradation of photolabile dendrimers based on o-nitrobenzyl ether photolabile cores, R. M. Kevwitch, D. V. McGrath, *New J. Chem.*, **2007**, 31, 1332-1336; h) "Cascade-Release Dendrimers" Liberate All End Groups upon a Single Triggering Event in the Dendritic Core, F. M. H. de Groot, C. Albrecht, R. Koekkoek, P. H. Beusker, H. W. Scheeren, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 4490-4494; i) Biological Evaluation of Polyester Dendrimer: Poly(ethylene oxide) "Bow-Tie" Hybrids with Tunable Molecular Weight and Architecture, E. R. Gillies, E. Dy, J. M. J. Fréchet, F. C. Szoka, *Mol. Pharm.*, **2005**, 2, 129-138; j) Biodegradable pH-Sensing Dendritic Nanoprobes for Near-Infrared Fluorescence Lifetime and Intensity Imaging, A. Almutairi, S. J. Guillaudeu, M. Y. Berezin, S. Achilefu, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 444-445; k) Monitoring the Biodegradation of Dendritic Near-Infrared Nanoprobes by *in Vivo* Fluorescence Imaging, A. Almutairi, W. J. Akers, M. Y. Berezin, S. Achilefu, J. M. J. Fréchet, *Mol. Pharm.*, **2008**, 5, 1103-1110.
- [9] "On-Off" Multivalent Recognition: Degradable Dendrons for Temporary High-Affinity DNA Binding, D. J. Welsh, S. P. Jones, D. K. Smith, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 4047-4051.
- [10] Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery, W. Zauner, M. Ogris, E. Wagner, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1998**, 30, 97-113.
- [11] Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids, C. W. Pouton, P. Lucas, B. J. Thomas, A. N. Uduehi, D. A. Milroy, S. H. Moss, *J. Controlled Release*, **1998**, 53, 289-299.
- [12] a) Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery, W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos, *J. Controlled Release*, **1999**, 60, 149-160; b) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine, O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1995**, 92, 7297-7301.
- [13] Self-assembly of biodegradable polyurethanes for controlled delivery applications, M. Ding, J. Li, H. Tan, Q. Fu, *Soft Matter*, **2012**, 8, 5414-5428.
- [14] a) Molecular Interactions between Tryptophan and Nucleic Acid Components in Frozen Aqueous Solutions, T. Montenay-Garestier, C. Helene, *Nature*, **1968**, 217, 844-845; b) A tryptophan-containing peptide recognizes

- and cleaves DNA at apurinic sites, T. Behmoaras, J.-J. Toulme, C. Helene, *Nature*, **1981**, 292, 858-859; c) Role of tryptophan repeats and flanking amino acids in Myb-DNA interactions, P. Saikumar, R. Murali, E. P. Reddy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 8452-8456.
- [15] Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA, C.-H. Hsu, C. Chen, M.-L. Jou, A. Y.-L. Lee, Y.-C. Lin, Y.-P. Yu, W.-T. Huang, S.-H. Wu, *Nucleic Acids Res.*, **2005**, 33, 4053-4064.
- [16] a) Smart Nanovehicles Based on pH-Triggered Disassembly of Supramolecular Peptide-Amphiphiles for Efficient Intracellular Drug Delivery, X. Xu, Y. Li, H. Li, R. Liu, M. Sheng, B. He, Z. Gu, *Small*, **2014**, 10, 1133-1140; b) Cooperative Hierarchical Self-Assembly of Peptide Dendrimers and Linear Polypeptides into Nanoarchitectures Mimicking Viral Capsids, X. Xu, H. Yuan, J. Chang, B. He, Z. Gu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 3130-3133; c) Bio-Inspired Supramolecular Hybrid Dendrimers Self-Assembled from Low-Generation Peptide Dendrons for Highly Efficient Gene Delivery and Biological Tracking, X. Xu, Y. Jian, Y. Li, X. Zhang, Z. Tu, Z. Gu, *ACS Nano*, **2014**, 8, 9255-9264; d) Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field, S. Svenson, D. A. Tomalia, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, 64, 102-115.
- [17] Degradable Hybrid Materials Based on Cationic Acylhydrazone Dynamic Covalent Polymers Promote DNA Complexation through Multivalent Interactions, C. Bouillon, D. Paolantoni, J. C. Rote, Y. Bessin, L. W. Peterson, P. Dumy, S. Ulrich, *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 14705-14714.
- [18] a) Functionalized Fullerene as an Artificial Vector for Transfection, E. Nakamura, H. Isobe, N. Tomita, M. Sawamura, S. Jinno, H. Okayama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, 39, 4254-4257; b) Multifunctionalised cationic fullerene adducts for gene transfer: design, synthesis and DNA complexation, C. Klumpp, L. Lacerda, O. Chaloin, T. D. Ros, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco, *Chem. Commun.*, **2007**, 3762-3764; c) Water-Soluble Fullerene (C₆₀) Derivatives as Nonviral Gene-Delivery Vectors, B. Sitharaman, T. Y. Zakharian, A. Saraf, P. Misra, J. Ashcroft, S. Pan, Q. P. Pham, A. G. Mikos, L. J. Wilson, D. A. Engler, *Mol. Pharm.*, **2008**, 5, 567-578; d) *In vitro* and *in vivo* gene delivery with tailor-designed aminofullerenes, E. Nakamura, H. Isobe, *Chem. Rec.*, **2010**, 10, 260-270; e) *In vivo* gene delivery by cationic tetraamino fullerene, R. Maeda-Mamiya, E. Noiri, H. Isobe, W. Nakanishi, K. Okamoto, K. Doi, T. Sugaya, T. Izumi, T. Homma, E. Nakamura, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107, 5339-5344.
- [19] Synthesis and Characterization of Water-Soluble Amino Fullerene Derivatives, C. F. Richardson, D. I. Schuster, S. R. Wilson, *Org. Lett.*, **2000**, 2, 1011-1014.
- [20] Gene delivery with polycationic fullerene hexakis-adducts, D. Sigwalt, M. Holler, J. Iehl, J.-F. Nierengarten, M. Nothisen, E. Morin, J.-S. Remy, *Chem. Commun.*, **2011**, 47, 4640-4642.
- [21] Amphiphilic Oligoethyleneimine- β -Cyclodextrin "Click" Clusters for Enhanced DNA Delivery, Á. Martínez, C. Bienvenu, J. L. Jiménez Blanco, P. Vierling, C. O. Mellet, J. M. García Fernández, C. Di Giorgio, *J. Org. Chem.*, **2013**, 78, 8143-8148.
- [22] Nanostructures of Cationic Amphiphilic Cyclodextrin Complexes with DNA, V. Villari, A. Mazzaglia, R. Darcy, C. M. O'Driscoll, N. Micali, *Biomacromolecules*, **2013**, 14, 811-817.
- [23] Dynamic Self-Assembly of Polycationic Clusters Based on Cyclodextrins for pH-Sensitive DNA Nanocondensation and Delivery by Component Design, L. Gallego-Yerga, M. J. González-Álvarez, N. Mayordomo, F. Santoyo-González, J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, F. Mendicuti, J. M. García Fernández, *Chem. Eur. J.*, **2014**, 20, 6622-6627.
- [24] Mannosyl-coated nanocomplexes from amphiphilic cyclodextrins and pDNA for site-specific gene delivery, A. Díaz-Moscoso, N. Guilloteau, C. Bienvenu, A. Méndez-Ardoy, J. L. Jiménez Blanco, J. M. Benito, L. Le Gourriérec, C. Di Giorgio, P. Vierling, J. Defaye, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Biomaterials*, **2011**, 32, 7263-7273.
- [25] a) Rapid Total Synthesis of DARPin pE59 and Barnase, S. K. Mong, A. A. Vinogradov, M. D. Simon, B. L. Pentelute, *ChemBioChem*, **2014**, 15, 721-733; b) Chemical synthesis of proteins using peptide hydrazides as thioester surrogates, J.-S. Zheng, S. Tang, Y.-K. Qi, Z.-P. Wang, L. Liu, *Nat. Protocols*, **2013**, 8, 2483-2495.
- [26] Natural Peptides as Building Blocks for the Synthesis of Large Protein-like Molecules with Hydrazone and Oxime Linkages, K. Rose, W. Zeng, P.-O. Regamey, I. V. Chernushevich, K. G. Standing, H. F. Gaertner, *Bioconjug. Chem.*, **1996**, 7, 552-556.
- [27] Dynamic Expression of DNA Complexation with Self-assembled Biomolecular Clusters, E. Bartolami, Y. Bessin, V. Gervais, P. Dumy, S. Ulrich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, 54, 10183-10187.
- [28] CSI-FID: High throughput label-free detection of DNA binding molecules, K. E. Hauschild, J. S. Stover, D. L. Boger, A. Z. Ansari, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19, 3779-3782.
- [29] a) Specificity landscapes of DNA binding molecules elucidate biological function, C. D. Carlson, C. L. Warren, K. E. Hauschild, M. S. Ozers, N. Qadir, D. Bhimsaria, Y. Lee, F. Cerrina, A. Z. Ansari, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, 107, 4544-4549; b) A Simple, High-Resolution Method for Establishing DNA Binding Affinity and Sequence Selectivity, D. L. Boger, B. E. Fink, S. R. Brunette, W. C. Tse, M. P. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 5878-5891.
- [30] Arginine clustering on calix[4]arene macrocycles for improved cell penetration and DNA delivery, V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Nat. Commun.*, **2013**, 4, 1721.
- [31] Structural Mimicry of Retroviral Tat Proteins by Constrained β -Hairpin Peptidomimetics: Ligands with High Affinity and Selectivity for Viral TAR RNA Regulatory Elements, Z. Athanassiou, R. L. A. Dias, K. Moehle, N. Dobson, G. Varani, J. A. Robinson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 6906-6913.

- [32] A Tailor-Made Specific Anion-Binding Motif in the Side Chain Transforms a Tetrapeptide into an Efficient Vector for Gene Delivery, M. Li, S. Schlesiger, S. K. Knauer, C. Schmuck, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 2941-2944.
- [33] Multivalent presentation of the cell-penetrating peptide nona-arginine on a linear scaffold strongly increases its membrane-perturbing capacity, A. Chakrabarti, J. J. Witsenburg, M. D. Sinzinger, M. Richter, R. Wallbrecher, J. C. Cluitmans, W. P. R. Verdurmen, S. Tanis, M. J. W. Adjobo-Hermans, J. Rademann, R. Brock, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*, **2014**, *1838*, 3097-3106.
- [34] Identification and Characterization of a New Family of Cell-penetrating Peptides: Cyclic Cell-Penetrating Peptides, L. Cascales, S. T. Henriques, M. C. Kerr, Y.-H. Huang, M. J. Sweet, N. L. Daly, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.*, **2011**, *286*, 36932-36943.
- [35] a) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells, S. M. Hammond, E. Bernstein, D. Beach, G. J. Hannon, *Nature*, **2000**, *404*, 293-296; b) Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing, Glen F. Deleavey, Masad J. Damha, *Chem. Biol.*, *19*, 937-954.
- [36] Multivalent DNA recognition by self-assembled clusters: deciphering structural effects by fragments screening and evaluation as siRNA vectors, E. Bartolami, Y. Bessin, N. Bettache, M. Gary-Bobo, M. Garcia, P. Dumy, S. Ulrich, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 9427-9438.
- [37] Utilizing Combinatorial Chemistry and Rational Design: Peptidic Tweezers with Nanomolar Affinity to DNA Can Be Transformed into Efficient Vectors for Gene Delivery by Addition of a Lipophilic Tail, H. Y. Kuchelmeister, S. Karczewski, A. Gutschmidt, S. Knauer, C. Schmuck, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 14016-14020.

Chapitre 4

***Inhibition enzymatique multivalente par
des clusters peptidiques d'iminosucre***

Chapitre 4 : Inhibition enzymatique multivalente par des clusters peptidiques d'iminosucres

I. Contexte.....	120
A. <i>Anhydrase carbonique</i>	121
B. <i>Glycosidase</i>	125
C. <i>Positionnement du projet</i>	130
II. Synthèse et préparation des composés	131
A. <i>Conception</i>	131
B. <i>Synthèse des peptides modifiés</i>	132
C. <i>Synthèse des iminosucres</i>	134
D. <i>Synthèse des clusters</i>	137
III. Tests d'inhibition enzymatique.....	143
IV. Conclusion	148
V. Références.....	149

I. Contexte

Depuis quelques années l'utilisation de systèmes multivalents s'est étendue à l'inhibition enzymatique. La multiplication des inhibiteurs apportée par la multivalence a permis d'accroître l'inhibition et la sélectivité. Les quatre mécanismes de reconnaissance multivalente connus peuvent affecter l'affinité et la sélectivité pour une cible. Ce sont : la chélation, l'effet de groupe (cluster), la liaison à un site secondaire ou encore la formation de liaisons successives par effet statistique (Chapitre 1).^[1] La nature du mécanisme de reconnaissance est fonction de la nature de la cible mais également du ligand. La multivalence créée, va générer de nouvelles structures organisées dans les trois dimensions selon des arrangements spatiaux variés. Ainsi, les inhibiteurs enzymatiques monovalents vont fonctionnaliser des systèmes linéaires,^[2] des dendrimères,^[3] des plate-formes cycliques^[4] ou bien des supports sphériques comme les fullerènes^[5] ou encore les nanoparticules,^[6] dans le but d'exploiter au maximum les effets de la multivalence.

Au cours de ces dernières années, différentes enzymes ont fait l'objet d'inhibition multivalente.^[7] Deux d'entre elles semblent présenter un attrait grandissant : les anhydrases carboniques et les glycosidases (Tableau 1).

Tableau 1. Tableau récapitulatif des cibles des systèmes multivalents pour l'inhibition enzymatique

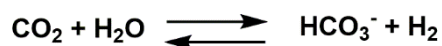
Entrée	Cible enzymatique	Plate-forme	Ligand	Puissance relative (rp)	Valence (n)	Réf
1	glycosidases	oligoéthylèneglycol	iminosucre	7,6 (JbMan)	3	[8]
		calixarène		267 (JbMan)	4	
2	glycosidases	porphyrine	iminosucre	800 (JbMan)	4	[9]
		sucre		19 (JbMan)	8	
3	glycosidases	fullerène C ₆₀	iminosucre	2147 (JbMan)	12	[5]
				200 (GCCase)	7	
4	glycosidases	β-cyclodextrine	iminosucre	17 (GCCase)	14	[10]
				9900 (JbMan)	21	
5	glycosidases	polymères dextrans	iminosucre	444-109142 (JbMan)	23-902	[11]
6	glycosidases	aliphatique, aromatique	zanamivir	1000 (sialidase)	2	[12] [13]
				100 (sialidase)	3-4	
7	glycosidases	acide polyglutamique	zanamivir	~500000 (p.r.a.)	~47	[14] [15]

8	anhydrases carboniques	nanoparticules	sulfonamide	72 (hCA II), 14 (hCA IX)	12-15	[6a] [6b]
9	anhydrases carboniques	peptide	sulfonamide	3 (<i>in vivo</i>)	2	[16]
10	anhydrases carboniques	flexible	sulfonamide	50 (hCA II dimérique)	2	[17]
11	anhydrases carboniques	dendrimères PAMAM	sulfonamide	6 (hCA II), 13 (hCA IX)	4	[18]
				206 (hCA II), 23 (hCA IX)	8	
				688 (hCA II), 65 (hCA IX)	16	
11	anhydrases carboniques	dendrimères PAMAM	sulfonamide	9142 (hCA II), 93 (hCA IX)	32	[18]
				9142 (hCA II), 93 (hCA IX)	32	
12	anhydrases carboniques	fullerène C ₆₀	Coumarine	5 (hCA II), 3,5 (hCA IX)	12	[19]
13	protéases	β-cyclodextrine	(aminométhyl)benzène	28333 (β-tryptase)	2	[20]
14	β-tryptase (sérine protéase)	cycle fusionné	guanidinium	101613	2	[21]
15	protéases	polyéthylène glycol	tripeptide aldéhyde	90 (protéasome)	2	[22]
16	protéases	acide polyaminohexanoïque	peptide	607 (protéasome)	2	[23]
17	protéases	peptide	benzamidine	7931 (thrombine)	2	[24]
18	phosphorylase glycogène	benzène substitué	sucre	3	3	[25]
19	oxydoréductases	benzène substitué	aminophénylarsénoxyde	10	3	[26]
20	5-lipoxygénase	pentaéarithrol	acide caféique	4	38	[27]

La liste des exemples présentés ici n'est pas exhaustive et certains de ces exemples vont être détaillés par la suite.

A. Anhydrase carbonique

Les anhydrases carboniques (CA) sont une famille très répandue de métallo-enzymes utilisées pour la catalyse de la réaction réversible d'hydratation du dioxyde de carbone (Équation 1).^[28] Les molécules engagées dans cette réaction (CO₂, HCO₃⁻, H⁺) étant ubiquitaires dans la totalité du monde du vivant (bactéries, archéobactéries, eucaryotes), l'enzyme est elle-même présente dans la majeure partie des cellules des organismes. Les anhydrases carboniques sont impliquées dans de nombreux phénomènes à la fois physiologiques et pathologiques comme par exemple la gluconéogénèse, la lipogénèse. Elles provoquent également le développement de pathogènes. Elles présentent également, dans le cas de la CA IX et de la CA XII, une grande aptitude à dégénérer des cellules et ainsi, à induire la formation de tumeurs cancéreuses.^[28]



Équation 1. Réaction de déshydratation réversible du dioxyde de carbone en ion bicarbonate

Le site actif de la plupart des isoformes d'anhydrase carbonique contient un ion de zinc (Zn^{2+}) indispensable à l'activité catalytique de l'enzyme.^[29] Le zinc est coordonné aux chaînes latérales de trois histidines situées au fond du site actif de l'enzyme, profond de 15 Å. Sa quatrième liaison est générée avec une molécule d' H_2O . En se liant au zinc, l'eau va devenir plus nucléophile. Assisté par des liaisons hydrogènes avec un résidu thréonine acceptant un proton et deux autres molécules d'eau, l'ion OH^- va être formé plus facilement. Le site actif contient également une poche hydrophobe permettant d'accueillir la molécule de CO_2 . Cette zone est située à proximité de l'ion hydroxyle, permettant ainsi à l'espèce nucléophile d'attaquer le dioxyde de carbone pour générer une molécule de bicarbonate (Figure 1). Les CA des mammifères existent sous 12 isoformes actifs, présents dans le cytosol ou liés à la membrane cytoplasmique.

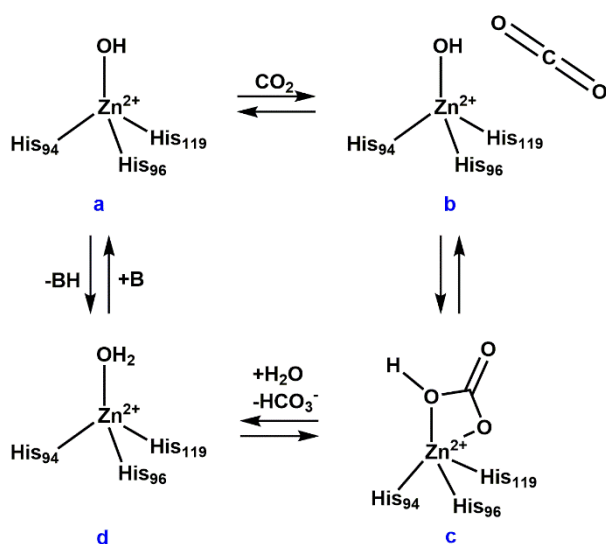


Figure 1. Mécanisme d'action des anhydrases carboniques. Avec **a** : la forme active de l'enzyme avec l'ion Zn^{2+} coordonné au groupement hydroxyle ; **b** : la molécule de CO_2 , placée dans une poche hydrophobe du site actif, subit une attaque nucléophile de l'hydroxyle ; **c** : une molécule de bicarbonate est relarguée par l'ajout d'une molécule d'eau pour générer l'enzyme sous sa forme acide inactive **d**

Deux grandes classes d'inhibiteurs de CA (CAIs) complexant les métaux ont été développées :

1) des anions, de type isothiocyanate ou 2) les sulfonamides non-substitués et leurs dérivés comme par exemple les sulfamates ou encore les sulfamides (Figure 2). Dans le premier cas, les inhibiteurs vont créer une liaison avec l'ion de zinc au niveau du site actif de l'enzyme, en substituant le groupement non protéique (OH^-) coordonné au zinc. L'inhibition est induite par l'absence de site de coordination libre sur l'atome de zinc pour générer l'intermédiaire pentavalent avec le CO_2 . La deuxième approche repose sur l'addition des inhibiteurs à la sphère de coordination du métal pour générer une espèce bipyramidale-trigonale (Figure 3).^[28] Dans ce cas d'inhibition compétitive par les sulfonamides, la ligation du zinc avec l'eau est

rendue impossible. Certains des composés développés, suivant un mode d'action relatif à un de ces deux mécanismes, sont devenus des cibles thérapeutiques importantes pour la recherche pharmaceutique et montrent une activité intéressante en tests cliniques.^[30]

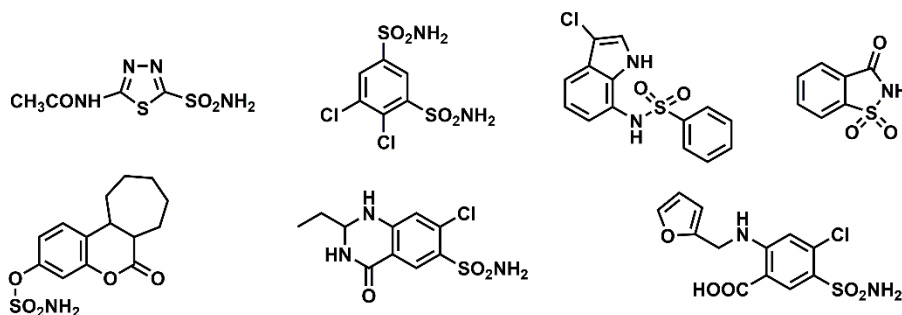


Figure 2. Structures d'inhibiteurs d'anhydrases carboniques

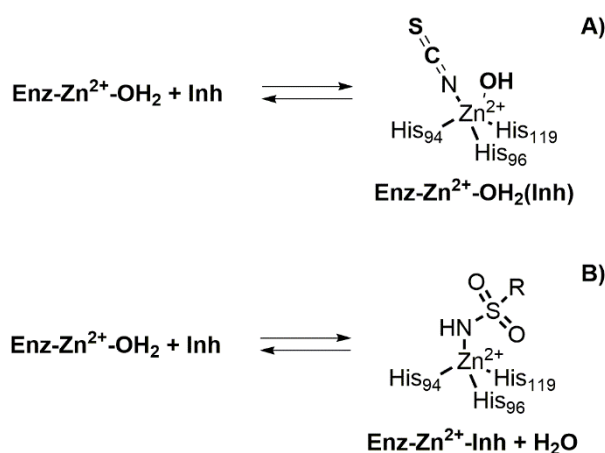


Figure 3. Mécanismes d'inhibition des anhydrases carboniques. A) Réaction d'addition des inhibiteurs anioniques pour générer une espèce bipyramidale-trigonale ; B) Réaction de substitution des sulfonamides et de ces analogues pour former un dérivé tétraédrique

Diverses approches ont été rapportées dans la littérature pour combiner une sélectivité convenable et une bonne puissance d'inhibition des anhydrases carboniques.^[29] La synthèse d'actifs multivalents ainsi décrite semble être une stratégie intéressante.

C'est en 2009 que les premiers travaux sur la multivalence dans le domaine ont été initiés. Une comparaison de l'activité inhibitrice de bis-sulfamates aliphatiques face à leurs homologues monovalents a été engagée. Les résultats des expériences ont permis de constater que le système divalent possède une meilleure affinité pour la forme humaine (h) hCA IX par rapport à la hCA I. Le résultat opposé est observé dans le cas des monosulfamates. Des études conjointes de cristallographie et de modélisation moléculaire ont permis de découvrir la présence d'un site d'intérêt au niveau des acides aminés 130-136 pour permettre d'améliorer la sélectivité de reconnaissance, en modifiant la structure de la molécule.^[31]

Les avantages de l'approche bivalente pour l'inhibition des anhydrases carboniques ont été confirmés en 2012. En effet, alors que les systèmes monovalents inhibent les CA avec une constante d'inhibition atteignant le nanomolaire, les ligands bivalents inhibent à des concentrations de l'ordre du picomolaire. Cependant, la longueur de l'espaceur entre les deux ligands ne doit pas être négligée pour permettre une inhibition de la cible efficace.^[17] Après optimisation, l'efficacité de l'inhibition a pu être multipliée d'un facteur 10 pour les isoformes hCA II, IX et XII.^[32]

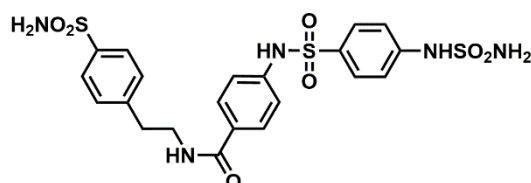


Figure 4. Exemple d'un inhibiteur bivalent de l'anhydrase carbonique hCA II^[32]

Une approche multivalente de valence supérieure à 2, grâce à la fonctionnalisation de plateformes a également fait l'objet d'un certain nombre de travaux. En 2008, des travaux ont été réalisés sur l'inhibition de l'isoforme extracellulaire de l'anhydrase carbonique CA IX par des inhibiteurs sulfonamides greffés sur des nanoparticules d'or (Figure 5A). Malgré des effets faibles sur l'activité d'inhibition du système, cette étude s'est révélée très intéressante du point de vue de la sélectivité, nettement accrue pour la CA IX.^[6b]

Des travaux récents ont mis en évidence le rôle de l'effet multivalent parfois positif ou négatif (Chapitre 1) sur l'inhibition des anhydrases carboniques (Figure 5B).^[6a] L'effet de multivalence peut effectivement affecter l'affinité (effet chélate et effet statistique) et la sélectivité (effet cluster et assistance par la présence d'un site secondaire). Ainsi le ligand monovalent va être sélectif d'une enzyme, dans ce cas hCA II ($K_i(\text{hCA II})/K_i(\text{hCA IX}) = 1,25$) alors que le cluster multivalent inhibera plus une autre anhydrase carbonique, hCA IX ($K_i(\text{hCA II})/K_i(\text{hCA IX}) = 0,24$).

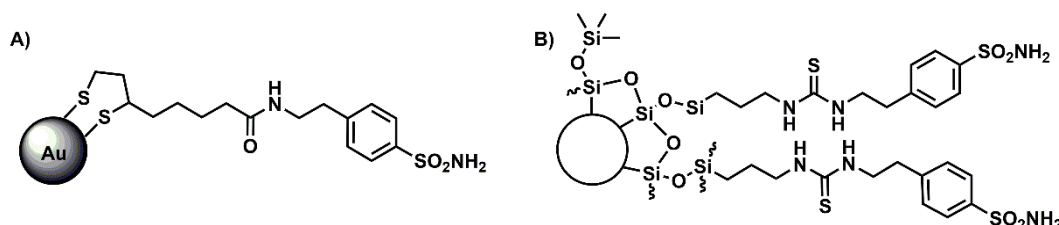


Figure 5. Inhibiteurs multivalents de l'anhydrase carbonique assemblés sur des nanoparticules : A) d'or et B) de silice

L'effet de multivalence a également été étudié sur l'inhibition de plusieurs isoformes de CA. Pour cela, des dendrimères de poly(amidoamines) (PAMAM) ont été fonctionnalisés avec des inhibiteurs de type sulfonamide. L'accroissement du nombre de ligands, en évoluant d'une génération 0 à 3 de dendrimères, révèle la puissance de l'effet de multivalence face à l'activité

des hCA II, V, VII, IX, XII et XIV.^[18] La même année, des coumarines sont fixées à des plate-formes fullerènes pour tester l'apport de la multivalence de ce système. Aucun effet de multivalence n'est observé en comparaison avec le monomère. L'inhibition est cependant accrue par la présence des 12 ligands coumarines à la surface de la plate-forme C₆₀. La sélectivité est également améliorée entre les isoformes testés.^[19]

Dans le but d'augmenter encore l'inhibition des systèmes et la sélectivité pour une cible donnée, des études cristallographiques ont été engagées. Les résultats obtenus sur les différents isoformes de CA montrent des petites variations dans la nature des acides aminés proches du site actif. Ainsi, des sites de reconnaissance secondaires ont pu être mis en évidence. La conception de nouveaux systèmes multivalents va pouvoir être envisagée avec le développement d'un processus de ligations multi-points (Schéma 1).^[33]

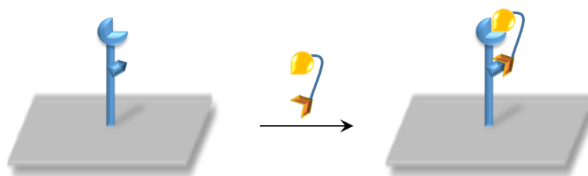


Schéma 1. Mode de liaison multivalent basé sur la reconnaissance de sites secondaires

De nouvelles méthodes de préparation de composés multivalents émergent ces dernières années comme l'auto-assemblage et la chimie combinatoire dynamique.^[34] L'approche par auto-assemblage s'est récemment révélée intéressante pour générer des structures variées selon une approche ascendante (dite bottom-up). Cette méthode, rarement appliquée à l'inhibition des anhydrases carboniques, a cependant permis d'identifier un système bivalent parmi une bibliothèque de 111100 composés liés à une matrice d'ADN, inhibant l'anhydrase carbonique IX.^[35]

B. Glycosidase

Les glycosidases sont une famille enzymatique impliquée dans l'hydrolyse des liaisons glycosidiques. Ces liaisons sont présentes dans les glycoconjugués ainsi que dans les di-, les oligo- ou les polysaccharides. L'hydrolyse des liaisons glycosidiques peut être réalisée selon deux voies (Figure 6).^[36] La première est un mécanisme d'inversion de configuration. Il induit la préparation de l'anomère de configuration opposée, en clivant la liaison. Le second mécanisme est dit de rétention de configuration, car comme son nom l'indique, la configuration n'est pas modifiée. Ces enzymes ubiquitaires jouent un rôle important dans la plupart des processus biologiques essentiels.^[37] Elles sont également impliquées dans des maladies comme le diabète de type II ou encore la maladie de Gaucher qui se traduit par une surcharge lysosomale.

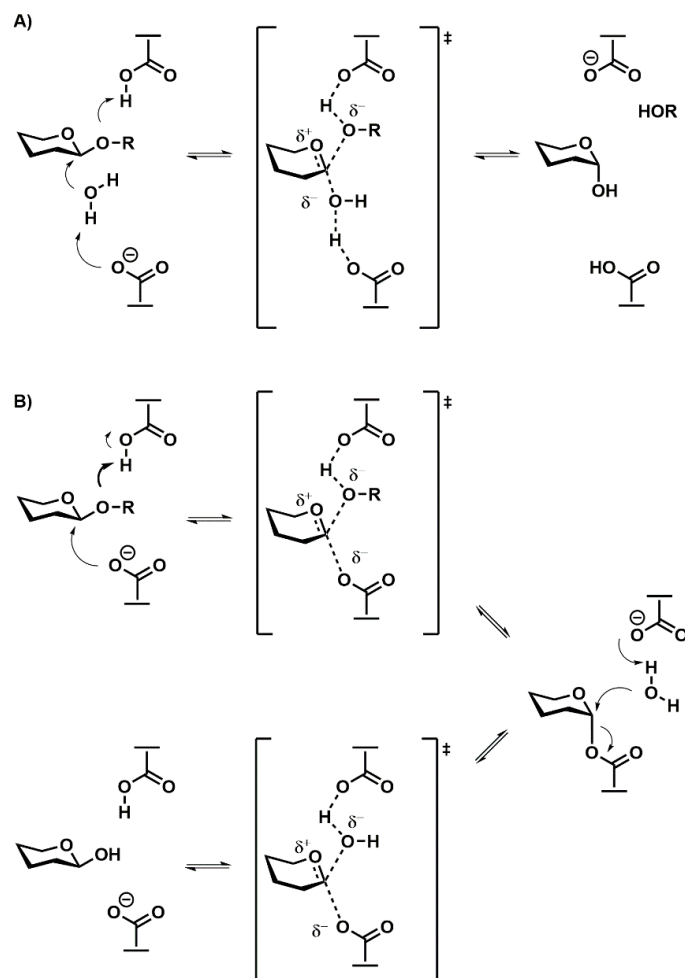


Figure 6. Catalyse de l'hydrolyse de liaisons glycosidiques par un mécanisme A) d'inversion de configuration ; B) de rétention de configuration

La glycosidase est alors étudiée pour tenter de trouver des inhibiteurs permettant de contrôler son activité. Parmi ces inhibiteurs, les iminosucre simulent l'état de transition de la catalyse d'hydrolyse des liaisons glycosidiques au sein du site actif. Des iminosucre tels que la deoxynojirymicine (DNJ), isolée des racines de mûriers, et la deoxymannojirymicine (DMJ) sont ainsi devenus des outils importants pour l'inhibition des glycosidases. Deux molécules sont déjà vendues sur le marché, le Zavesca® (Actelion) et le Miglitol® (Bayer) pour le traitement, respectivement, de la maladie de Gaucher et du diabète de type 2 (Figure 7). Ces composés présentent une puissance d'inhibition relativement modérée (de l'ordre du micromolaire) et une faible sélectivité. La stratégie de multivalence a donc été envisagée pour tenter de combler ces déficiences. Ainsi, des systèmes di- et tri-valents d'minosucre de type DNJ liés par une plate-forme flexible de type oligoéthylèneglycol ont vu le jour (Figure 8). Les tests d'inhibition réalisés sur le composé trivalent ont montré une augmentation de l'inhibition enzymatique de l' α -mannosidase extraite de *Canavalia ensiformis* (JbMan) de 7,6 fois, soit un potentiel relatif par iminosucre de 2,5. La multivalence a ainsi permis de montrer un apport de sélectivité pour les différentes glycosidases.^[8]

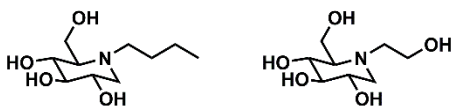


Figure 7. Iminosucre thérapeutiques monovalents Zavesca® (gauche) et Miglitol® (droite)

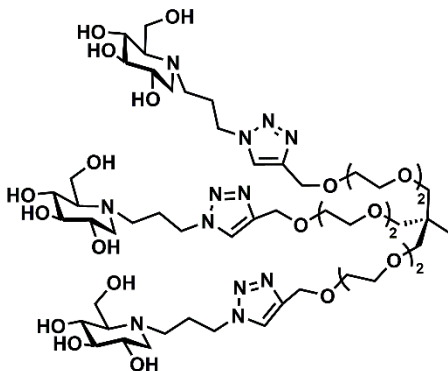


Figure 8. Système flexible trivalent fonctionnalisé par des iminosucre de type deoxynojirimicine pour l'inhibition des glycosidases

La multivalence s'est également développée autour de la fonctionnalisation d'un certain nombre de plate-formes d'autres natures telles que les fullerènes,^[38] les sucres,^[9,39] les calixarènes^[9,39-40] ou encore les cyclodextrines.^[10b,10c,41]

La préparation d'un fullerène C₆₀ dodécavalant a permis d'observer une augmentation de 2147 fois la puissance d'inhibition pour l' α -mannosidase extraite de *Canavalia ensiformis*, soit un pouvoir accru de 179 fois par unité d'minosucre par rapport à l'minosucre monovalent (Figure 9).

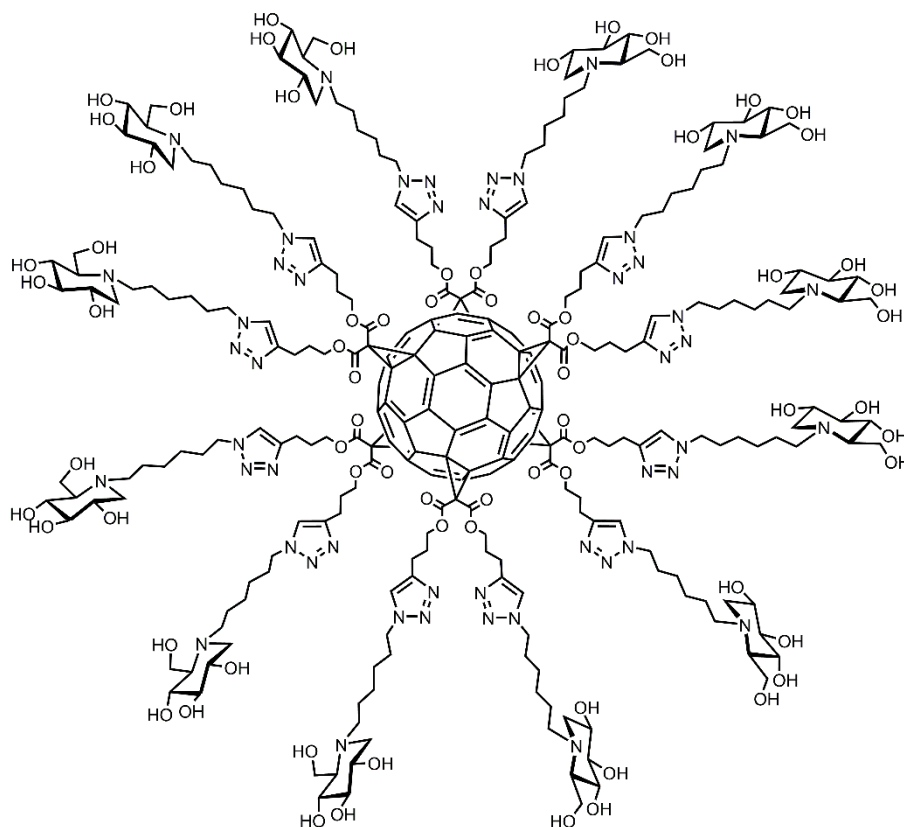


Figure 9. Fullerène dodécavalant fonctionnalisé par des ligands iminosucre pour l'inhibition enzymatique

Dans le cas des plate-formes à base de β -cyclodextrines, l'effet de la multivalence est observé, avec la préparation d'un cluster heptavalent. Ce système offre une activité d'inhibition 200 fois supérieure à celle du monomère pour la β -glycocérébrosidase (GCCase). Son homologue tétradécavalent ne permet pas d'observer une contribution de l'effet de multivalence supérieure à celle du système heptavalent (Figure 10).^[10a] Cette différence doit s'expliquer par la présence d'un autre paramètre que l'effet de multivalence pour gérer l'inhibition enzymatique. L'existence d'un effet statistique ou d'un effet stérique est alors proposée.

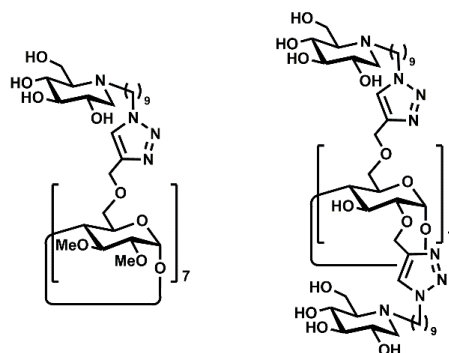


Figure 10. Cyclodextrines fonctionnalisées par des iminosucre pour l'inhibition des glycosidases

Afin d'étudier ce phénomène, un certain nombre de cyclodextrines et de fullerènes fonctionnalisés par des iminosucre sont synthétisés à différentes valences (valence = 7, 12, 14) en utilisant des longueurs d'espaceurs variables pour la connexion entre la plate-forme et

le ligand.^[10b,41] Dans ce contexte, l'accroissement de la valence a montré une claire augmentation de l'activité des systèmes sur l'inhibition de l' α -mannosidase extraite de *Canavalia ensiformis*. De la même manière, la longueur des espaceurs impacte sur l'inhibition. Plus la distance entre la plate-forme est importante et meilleure sera l'inhibition. Des espaceurs longs facilitent l'accès du ligand au site actif.

Des études complémentaires ont alors été réalisées pour comprendre le mode de complexation de ces systèmes avec leur cible. Des expériences de titration calorimétrique isotherme (ITC) ont permis de montrer un gain enthalpique favorisé par des réactions exothermiques. Une compensation enthalpie-entropie est également observée. Ces résultats d'ITC indiquent une stœchiométrie 1/1 pour les complexes formés entre le cluster et l'enzyme. Cette conclusion écarte tout effet cluster pour expliquer l'effet de multivalence.^[41] Basé sur la microscopie par force atomique et la diffusion dynamique de la lumière, un autre groupe a démontré en utilisant différents systèmes multivalents d'iminosucres, qu'au contraire, l'effet cluster est à l'origine de l'effet de multivalence.^[9] Ces expériences ont pourtant été réalisées avec la même enzyme, l' α -mannosidase de *Canavalia ensiformis*. Finalement, une suggestion a été proposée concernant la complexation simultanée des inhibiteurs multivalents au site catalytique et à un site secondaire (Schéma 1).^[38a] Cette interaction, du type reconnaissance des lectines, permettrait d'expliquer l'augmentation de l'effet multivalent des inhibiteurs.

Tout comme dans le cas de l'anhydrase carbonique, des systèmes d'auto-assemblage apparaissent pour l'inhibition multivalente de glycosidases. Ainsi, un analogue de glycoprotéines est généré par l'auto-assemblage de polypeptides fonctionnalisés par des iminosucres.^[2] Cette nanoparticule s'est avérée être un puissant inhibiteur de glycosidase. La ligation des groupes actifs est réalisée via une cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre.^[42] Les systèmes peuvent être fonctionnalisés à différents degrés pour atteindre jusqu'à 25 dérivés de déoxynojirymicine. Une capacité d'inhibition 3440 fois supérieure au monomère est mesurée (Figure 11).

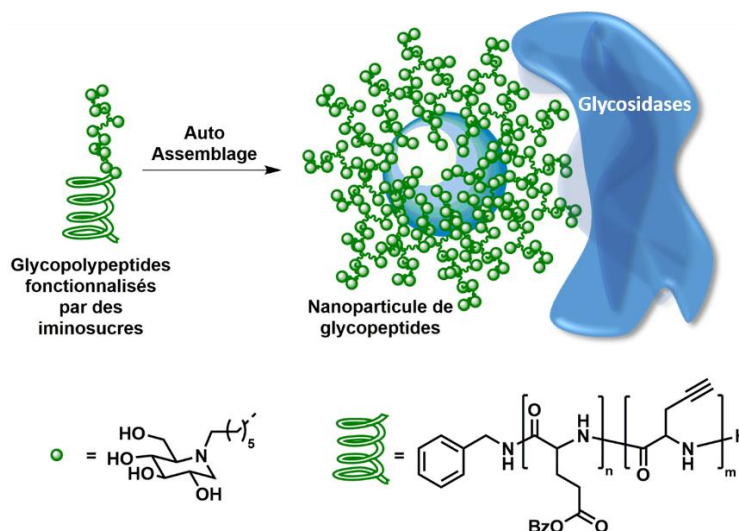


Figure 11. Auto-assemblage de glycopolypeptides d'iminosucre organisés en nanoparticules micellaires pour l'inhibition enzymatique multivalente de glycosidases

Une étude architecturale des supports est également réalisée pour tester l'effet, au niveau de l'inhibition enzymatique, de l'organisation des iminosucre sur une plate-forme cyclodextrine. Ainsi, les résidus iminosucre sont fonctionnalisés sur une face de la plate-forme, sur l'autre face ou bien sur les deux simultanément.^[41]

Les différents exemples présentés montrent le grand intérêt porté à l' α -mannosidase de *Canavalia ensiformis*. C'est en effet l'enzyme pour laquelle la plupart des effets inhibiteurs sont observés.^[2,4b,8-10,11,37a,37b,40] Cette métallo-enzyme de zinc suit un mécanisme d'hydrolyse conservateur.^[43]

C. Positionnement du projet

L'amélioration de l'inhibition des glycosidases est toujours au cœur des travaux de nombreuses équipes tant l'enjeu sur la santé est important. Les nouveaux systèmes doivent apporter une meilleure affinité et une meilleure sélectivité afin d'améliorer l'inhibition des glycosidases. Afin de répondre à ces critères, il semble intéressant de suivre une stratégie de multivalence. Ainsi, l'objectif de notre étude repose sur la construction de nouveaux clusters fonctionnalisés de manière multivalente par le biais de plusieurs unités d'iminosucre. Il est proposé ici de tester l'effet de la pré-organisation des plate-formes dont les bras sont orientés dans une même direction et sur une seule face de cette plate-forme. Le pouvoir d'inhibition du peptide linéaire équivalent sera testé, pour déterminer l'intérêt ou non, de travailler avec une structure contrainte. Ces peptides seront fonctionnalisés avec des ligands iminosucre via des ligations n'utilisant pas de métaux. (Schéma 2).

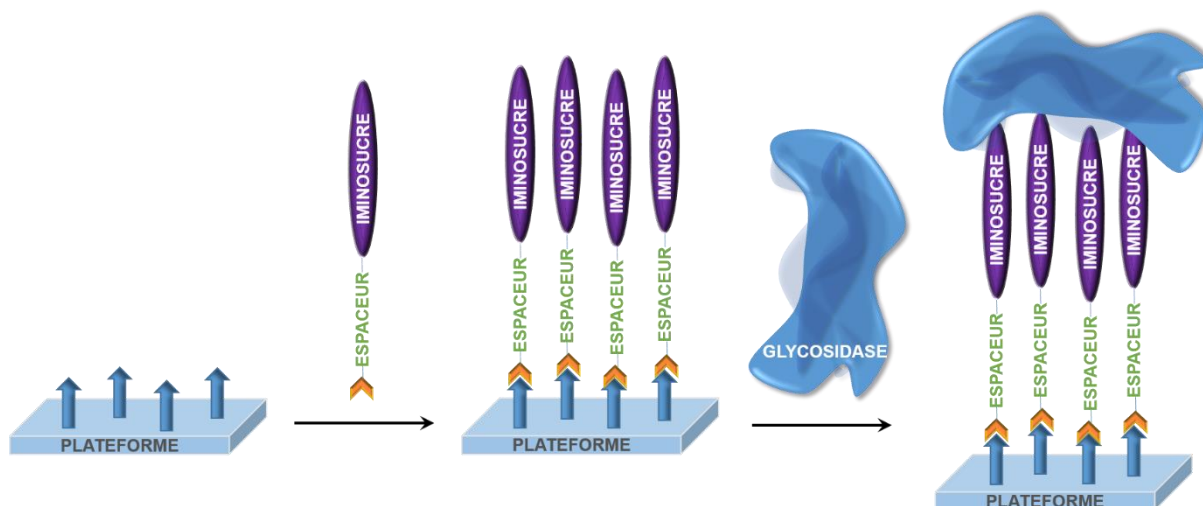


Schéma 2. Représentation schématique de la préparation des inhibiteurs multivalents de glycosidases

II. Synthèse et préparation des composés

A. Conception

Le choix de la plate-forme s'est tourné vers une structure peptidique. Les peptides sont choisis pour leur facilité de synthèse et de fonctionnalisation. Ils présentent, de plus, le net avantage d'être hydrosolubles et il est aisé de moduler leur séquence. Dans le cadre de ce travail, des décapeptides vont être préparés puis fonctionnalisés par des iminosucre. La littérature consacrée à l'inhibition enzymatique montre que la plupart des composés préparés à ce jour, ont été générés par une ligation azoture-alcyne catalysée au cuivre, pour additionner l'iminosucre. Outre le fait que cette réaction soit très efficace et ne génère aucun produit secondaire, la présence du cuivre est un frein à une application *in vivo*. En effet, les nombreux cycles thiazoles créés, peuvent piéger le cuivre par complexation. Afin d'éviter toute probabilité de toxicité induite par la présence de cuivre, la fonctionnalisation des plate-formes peptidiques de ce projet est réalisée par des liaisons click n'utilisant pas de métaux. Ainsi, les ligations thiol-maléimide et oxime ont été envisagées, pour la facilité à introduire les groupements. Dans le cas de la thiol-maléimide, l'iminosucre devra être construit avec un groupement terminal thiol et les peptides fonctionnalisés par des maléimides. Pour l'oxime, le ligand iminosucre portera une fonction oxyamine réagissant avec les groupes glyoxaldéhydes présents sur les peptides. Deux longueurs de bras espaceurs seront testées pour la préparation de ces systèmes inhibiteurs de glycosidases.

B. Synthèse des peptides modifiés

1. Plate-formes RAFT maléimides

Cette plate-forme peptidique est construite par une succession de 10 acides aminés commerciaux. Quatre *L*-Lys(Boc)-OH vont être intégrées à la séquence et permettront au peptide d'être fonctionnalisé dans un deuxième temps par des groupements maléimides. La préparation de la molécule est réalisée par SPPS automatique. Le décapeptide synthétisé par l'automate est clivé en condition d'acide faible pour donner, après purification par HPLC préparative, le composé **10** prêt à être cyclisé. L'étape de cyclisation est engagée à une concentration de 0,5 mM pour préparer la plate-forme **11**. Elle est ensuite suivie de la déprotection des chaînes latérales des résidus lysines. Le décapeptide cyclique **cRAFT(Lys)₄** est finalement obtenu avec un rendement de 50% après purification par chromatographie RP-HPLC (Figure 12). La plate-forme est ensuite engagée dans une quadruple réaction de transestérification induite par les amines ε des groupements lysines (Figure 12). Des liaisons amides vont ainsi être créées.^[44] La fonctionnalisation des résidus lysines par les groupements maléimides est réalisée après la synthèse SPPS. Ce choix est fait pour éviter des réactions secondaires entre les maléimides et les nucléophiles présents dans le milieu lors du couplage peptidique.

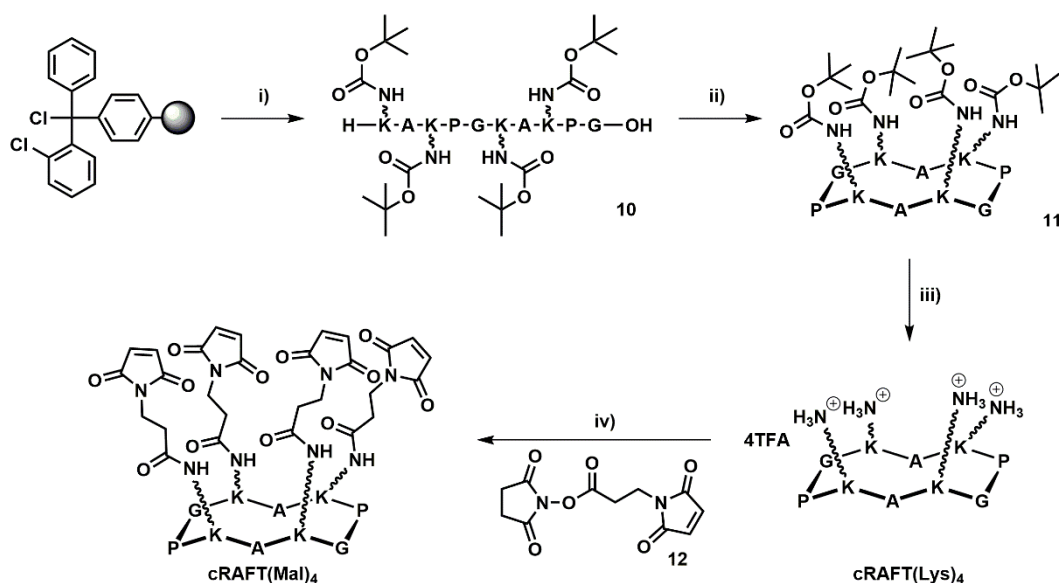


Figure 12. Voie de synthèse de la plate-forme peptidique **cRAFT(Lys)₄**. i) a : Fmoc-Gly-OH, Fmoc-AA-OH, Pipéridine/DMF (2/8), DIEA, DMF, micro-ondes, Δ, SPPS, b : TFA/CH₂Cl₂ (1/99), 38% ; ii) PyBOP, DIEA, DMF 0,5mM; iii) TFA/H₂O/TIS (95/2,5/2,5), 50% ; iv) **12**, phosphate buffer pH 7,2/ACN (6/4), 77%

En parallèle à cette plate-forme cyclique, un décapeptide analogue, mais cette fois-ci linéaire, est synthétisé. Le but est d'évaluer l'influence de la pré-organisation sur l'inhibition enzymatique (Figure 13). Pour cela, la séquence peptidique est réalisée par SPPS suivant le même protocole que pour le composé **10**. Cependant, suite à la déprotection finale du

groupement Fmoc, la résine est reprise dans une solution de CH_2Cl_2 /anhydride acétique. L'anhydride acétique va induire l'acétylation de la terminaison N-terminale du système. Après avoir répétée une seconde fois l'étape de protection de l'amine terminale, la résine est clivée et les groupements Boc protégeant les chaînes latérales des lysines déprotégés par l'action d'une solution acide de TFA/ H_2O /TIS (95/2,5/2,5). Le peptide est alors précipité, lyophilisé puis purifié par HPLC préparative pour obtenir le produit tétra-aminé **IRAF(TLys)₄** prêt à être fonctionnalisé par des groupements maléimides.

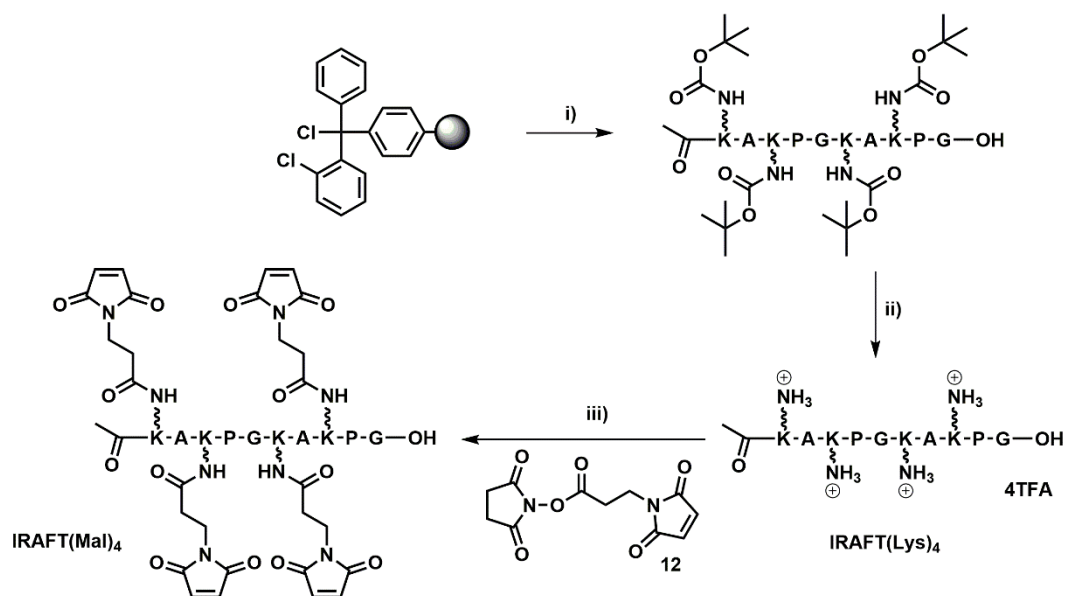


Figure 13. Préparation du peptique linéaire tétra-fonctionnalisé **IRAF(TMal)₄** par des groupements maléimides. Avec i) a : Fmoc-Gly-OH, Fmoc-AA-OH, Pipéridine/DMF (2/8), DIEA, DMF, micro-ondes, Δ , SPPS, b : TFA/ CH_2Cl_2 (1/99) ; ii) TFA/ H_2O /TIS (95/2,5/2,5), 80% ; iii) **12**, ACN/Tampon phosphate 100mM pH 7,2 (4/6)

L'influence sur l'inhibition enzymatique de la longueur du bras espaceur entre la plate-forme et l'iminosucre va pouvoir être étudiée avec ces peptides. Il semble également intéressant de vérifier si la nature de la liaison liant les ligands à la plate-forme induit des différences au niveau de l'inhibition enzymatique. L'effet de la pré-organisation du système sera à nouveau testé par la préparation d'un deuxième type de plate-forme peptidique.

2. Plate-formes RAFT aldéhydes

Les plate-formes peptidiques utilisées pour la préparation de liaisons oximes sont identiques à celles préparées au cours du Chapitre 2, où elles étaient engagées dans la formation de systèmes multivalents fonctionnalisés par des liaisons acylhydrazones. Ces peptides sont fonctionnalisés par des aldéhydes glyoxyliques au nombre de quatre avant le couplage avec les ligands oxyamines. Ainsi, les composés **cRAFT(AlD)₄** et **IRAF(TAlD)₄** (Figure 14) sont préparés selon la procédure SPPS décrite précédemment.^[45] Grâce à ces deux plate-formes, l'effet de la pré-organisation des systèmes multivalents sera étudié sur l'inhibition des glycosidases.

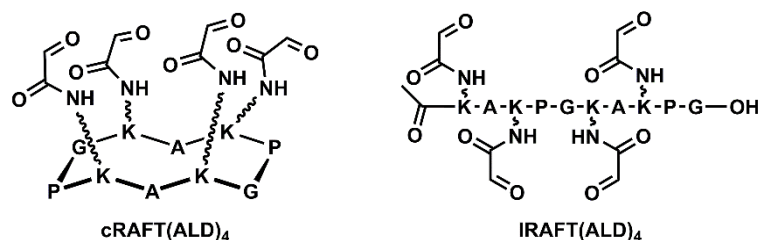


Figure 14. Structures chimiques des plate-formes peptidiques cyclique (**cRAFT(ALD)₄**) et linéaire (**IRAF(T)(ALD)₄**)
 Les quatre plate-formes étant synthétisées, les ligands doivent à leur tour être préparés pour permettre la formation de systèmes multivalents par ligations click.

C. Synthèse des iminosucres

La première famille d'iminosucres préparée repose sur la fonctionnalisation de ces inhibiteurs par une chaîne alkyle d'une longueur de 4 ou 8 carbones portant en son extrémité un thiol. Ce groupement ouvre la possibilité d'engager ce produit dans une ligation thiol-maléimide (Figure 15).

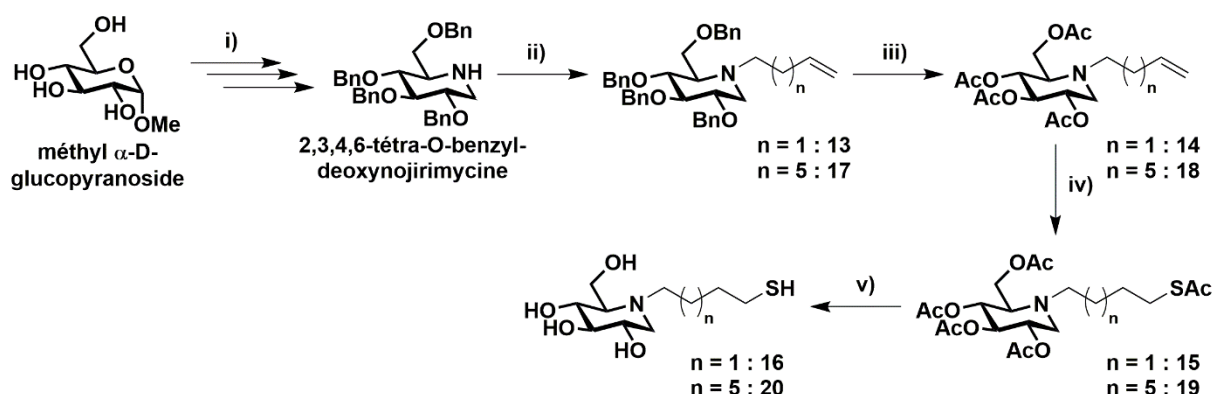


Figure 15. Voie de synthèse des iminosucres **16** et **20** fonctionnalisés avec des chaînes alkyles portant un thiol terminal. Avec i) a : NaH, BnBr, b : AcOH, H₂SO₄, c : LiAlH₄, d : Oxydation de Swern, e : NH₄.HCO₂, NaBH₃CN, MeOH. Rdt : 14% ; ii) pour n=1 : tosylate de 3-butèn-1-ol, sym-collidine, 79% ; pour n=5 : bromure d'alkyl, sym-collidine, 80% ; iii) BCl₃ 1M, CH₂Cl₂, MeOH, Et₃N, pyridine, anhydride acétique, 75% ; iv) DPAP, acide thioacétique, MeOH (n=1), CH₂Cl₂ (n=5), 64-70% ; v) NH₃ 2M, MeOH

Le composé 2,3,4,6-tétra-O-benzyl-deoxynojirimycine est préparé, à l'échelle du gramme. Cinq étapes sont nécessaires pour sa préparation à partir du méthyl α -D-glucopyranoside avec un rendement global de 14%. La première de ces cinq étapes est la protection des hydroxyles par des groupements benzyles. Il s'en suit la déprotection de l'éther en milieu fortement acide, puis d'une réduction en présence de LiAlH₄. Une oxydation de l'alcool anomérique est ensuite réalisée dans les conditions de Swern. L'iminosucre est finalement obtenu après une étape d'amination réductrice.^[46] Dans un premier temps, l'alkylation de cette deoxynojirimycine a été réalisée dans des conditions décrites dans la littérature. Cette étape nécessite un travail à haute température et une irradiation micro-ondes pour offrir des rendements compris entre 40 et 81%.^[5,10b] Cependant, pour éviter l'emploi de solvant à haut point d'ébullition, une

approche d'activation thermique en l'absence de solvant est développée pour la fonctionnalisation de l'amine cyclique (Figure 15). La chaîne butyle qui va permettre de créer le bras court de l'iminosucre est insérée via un dérivé tosylate. L'utilisation d'un dérivé bromé plus réactif pourrait entraîner un phénomène de sur-alkylation. Dans le cas de la deoxynojirymicine fonctionnalisée par un bras long, l'amine joue le rôle de nucléophile en attaquant un dérivé 8-bromo-1-octène. L'hypothèse faite d'une éventuelle sur-alkylation est alors écartée. Les réactions de fonctionnalisation sont ainsi réalisées pour atteindre un rendement de 80% dans les deux cas. Les iminosucres benzylés **13** et **17** ont ensuite subi une étape de déprotection des groupements aromatiques. Immédiatement, ces hydroxyles nouvellement libres sont protégés par des acétates pour donner les composés **14** et **18**, respectivement pour $n = 1$ et 5. Une réaction de thiol-ène est réalisée pour fonctionnaliser l'alcène terminal et introduire ainsi un groupement thiol acétylé. Pour cela, l'iminosucre et le thiol sont mis en présence d'un générateur de radicaux, le DPAP, sous rayonnement UV à 365 nm (Figure 16). Ce couplage permet d'obtenir les deux produits protégés **15** et **19** avec un rendement supérieur à 64%. Les cinq groupements acétates sont éliminés par traitement basique, en présence d'une solution d'ammoniac à 2 M. Les deux iminosucres recherchés **16** et **20** sont obtenus, respectivement, pour le composé à bras court et celui portant le bras long. Ces deux composés sont utilisés tels quels pour la réaction avec les maléimides, sans analyse complémentaire pour éviter la formation de disulfure.

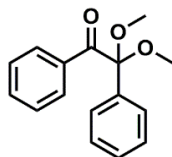


Figure 16. Structure du générateur de radicaux, le 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone (DPAP)

En parallèle, la synthèse d'autres résidus iminosucres est engagée pour produire des dérivés oxyamines avec des espaceurs fonctionnalisés par des chaînes alkyles de longueurs variées (Figure 17).

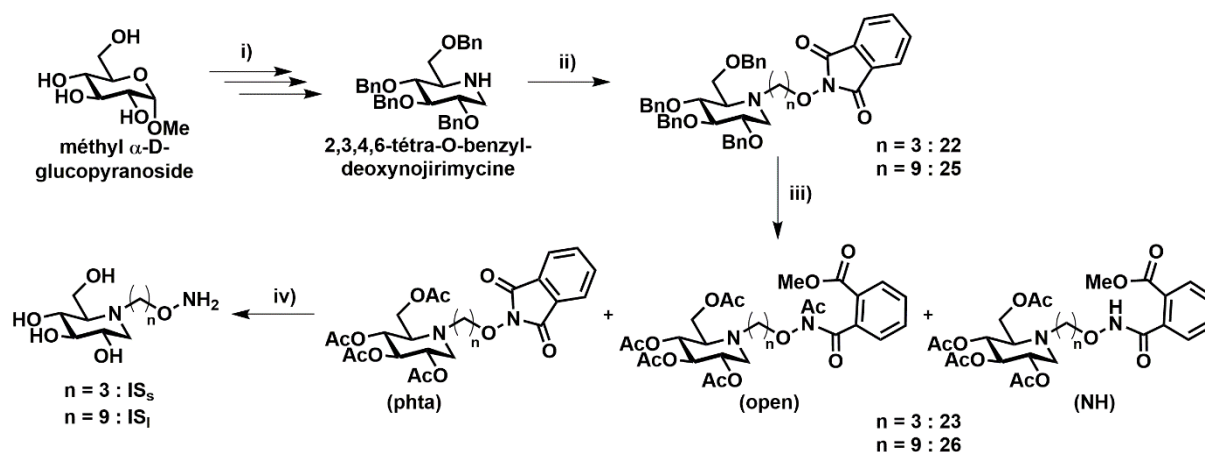


Figure 17. Voie de synthèse des iminosucres oxyamines **IS_s** et **IS_i**. Avec i) a : NaH, BnBr, b : AcOH, H₂SO₄, c : LiAlH₄, d : Oxydation de Swern, e : NH₄.HCO₂, NaBH₃CN, MeOH. Rdt : 14% ; ii) bromure d'alkyl (pour n=3 : 2-(3-bromopropoxy)isoindoline-1,3-dione **21**, n=9 : 1-Bromo-9-phthalimidoxy-nonane **24**), sym-collidine, 80% ; iii) BCl₃ 1M, CH₂Cl₂, MeOH, Et₃N, pyridine, anhydride acétique, 86% ; iv) NH₃ 2M, MeOH, 88%

Les cinq étapes conduisant à l'iminosucre 2,3,4,6-tétra-O-benzyl-deoxynojirimycine sont communes à celles présentées précédemment pour la synthèse des dérivés thiols. Cette voie de synthèse est donc très intéressante puisqu'un même intermédiaire peut être utilisé pour la préparation de quatre iminosucres finaux. La seconde étape de fonctionnalisation repose sur l'utilisation de chaînes alkyles présentant 3 ou 9 carbones qui joueront le rôle d'espaceur entre l'iminosucre et la plate-forme peptidique. Ces dérivés carbonés sont préparés à partir de composés dibromés dont l'une des extrémités subit une substitution nucléophile par l'attaque d'un groupement *N*-hydroxyphthalimide (Figure 18).^[47] Les deux produits **21** et **24** sont obtenus après purification par chromatographie sur gel de silice avec des rendements compris entre 75 et 83%.

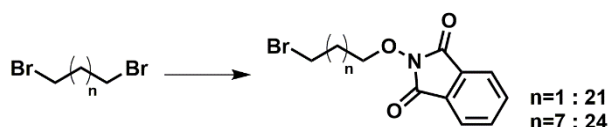


Figure 18. Synthèse des dérivés bromoalkyls fonctionnalisés par des groupements *N*-hydroxyphthalimides, **21** (n=1) et **24** (n=7)

Une fois le dérivé bromé additionné à l'iminosucre, une étape de déprotection des groupements benzyliques est réalisée, suivie de la protection de ces mêmes hydroxyles par des groupements acétates. Deux des méthodes classiques de débenzylation, H₂ Pd/C et Na/NH_{3(l)} (conditions de Birch) se sont avérées destructrices de la liaison oxyamine, connue pour sa fragilité.^[48] C'est la méthode utilisant le trichloroborane qui est finalement retenue malgré l'ouverture partielle du phthalimide. Cette ouverture est provoquée par une attaque nucléophile du méthanol, facilitée par la chélation des groupements carbonyles par l'acide de Lewis. Les groupements hydroxyles et l'amine secondaire du système sont protégés en plaçant le composé en milieu basique, en présence d'anhydride acétique. Ces étapes

successives de déprotection-protection sont indispensables pour éliminer les sels formés lors de l'élimination des benzyles par du BCl_3 dans le méthanol. Après purification par chromatographie sur gel de silice, un mélange de trois composés, l'un sous la forme phtalimide recherchée (**phtha**), un second avec le groupement ouvert (**open**) et un troisième ouvert et déprotégé (**NH**) est obtenu (Figure 17). Les ratios molaires pour chaque composé sont déterminés par RMN ^1H de 2,1 : 1,46 : 0 et 3,7 : 2,0 : 1 pour le bras court **23** et le bras long **26**, respectivement (Figure 19).

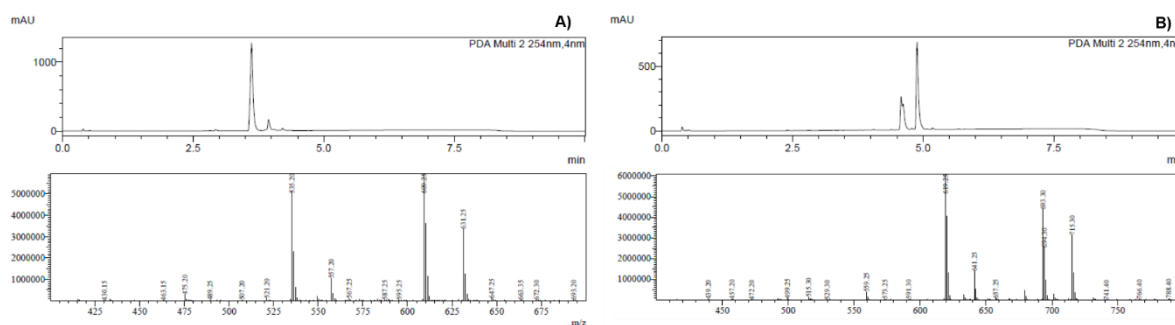


Figure 19. Analyses LCMS (Méthode D) des mélanges de composés sous forme phtalimide et ouvertes pour les bras : A) court **23**, calculé pour la forme phtalimide pour $[\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_{11}+\text{H}]^+$ 535,18, mesuré 535,20 ; et B) long **26**, calculé pour la forme phtalimide pour $[\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_{11}+\text{H}]^+$ 619,28, mesuré 619,25, avec en haut les chromatogrammes HPLC et en bas les spectres de masse

Le mélange est engagé dans la réaction suivante sans étape de purification supplémentaire. Ainsi, le système est solubilisé dans une solution d'ammoniac à 2 M, puis agité à température ambiante durant la nuit sous atmosphère d'argon. Les produits finaux **IS_s** et **IS_l** sont obtenus en tant que solides blancs avec de bons rendements (< 88%), après purification par chromatographie sur gel de silice.

Les quatre ligands d'intérêt et les plate-formes étant synthétisés, les clusters peuvent être préparés via la formation de liaisons click de types thiol-maléimides et oximes.

D. Synthèse des clusters

i. Systèmes Thiol-Maléimides

La préparation des systèmes peptidiques est réalisée dans un tampon aqueux de phosphate de sodium à pH 7,2. Les plate-formes sont fonctionnalisées par des iminosucres via des liaisons de type thiol-maléimides. La vitesse de liaison est augmentée pour une concentration en plate-forme de 5 mM et 1,3 éq de thiol par position maléimide.^[49] Ainsi, chacun des deux iminosucres est mélangé successivement à l'une et l'autre des plate-formes pour aboutir à la formation de quatre nouveaux systèmes multivalents (Figure 20).

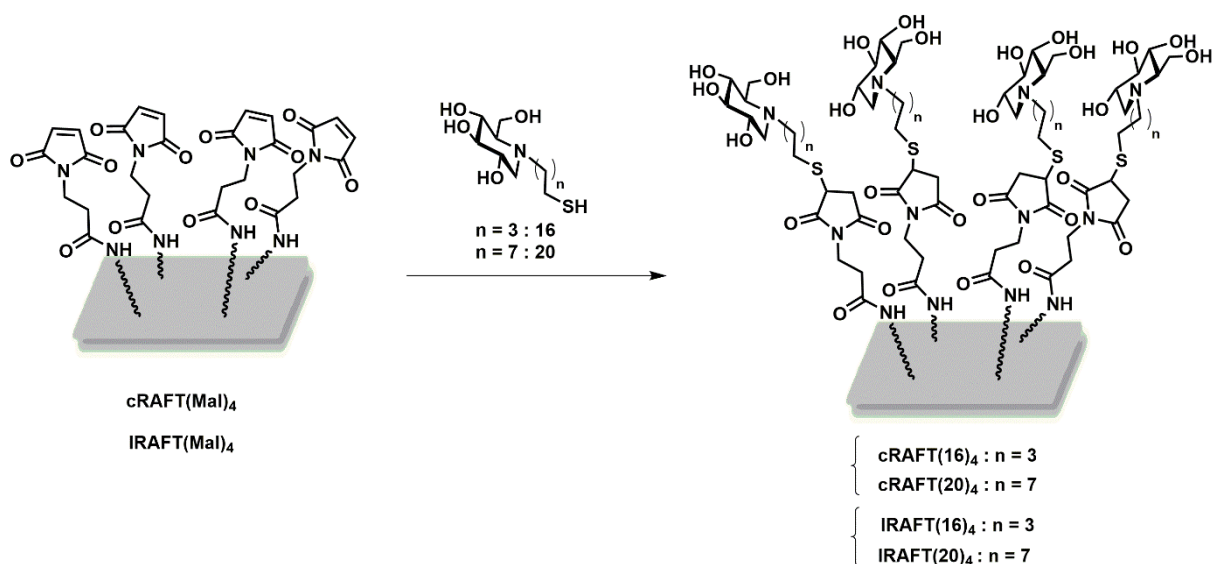


Figure 20. Préparation des quatre systèmes peptidiques tétravalents

Le suivi réactionnel des ligations est réalisé par LCMS. La plate-forme **cRAFT(Mal)₄** est placée dans le tampon, puis une solution de l'minosucre dans un mélange DMSO/tampon (28/72) est additionnée. Le système est agité durant 24h à 37°C. L'analyse LCMS du milieu en présence de l'minosucre avec le long bras espaceur **20**, a permis d'identifier un pic à 2,26 min avec une masse correspondant au produit recherché tétra-chargé (Figure 21). Le mélange n'étant pas purifiable par HPLC préparative, il est envisagé de réaliser une chromatographie d'exclusion stérique sur gel (Sephadex®) LH20 dans H₂O/MeOH. Les constituants du mélange sont alors séparés selon leur poids moléculaire en migrant entre des particules de tailles comprises entre 30 et 100 µm. Ainsi, les composés de poids moléculaires les plus élevés (comme le produit recherché) migrent le plus rapidement et sont les premiers à éluer. Les fractions obtenues, contenant le composé **cRAFT(20)₄**, présentent un certain nombre d'impuretés qui ne permettent pas d'engager le produit dans des tests d'inhibition enzymatique.

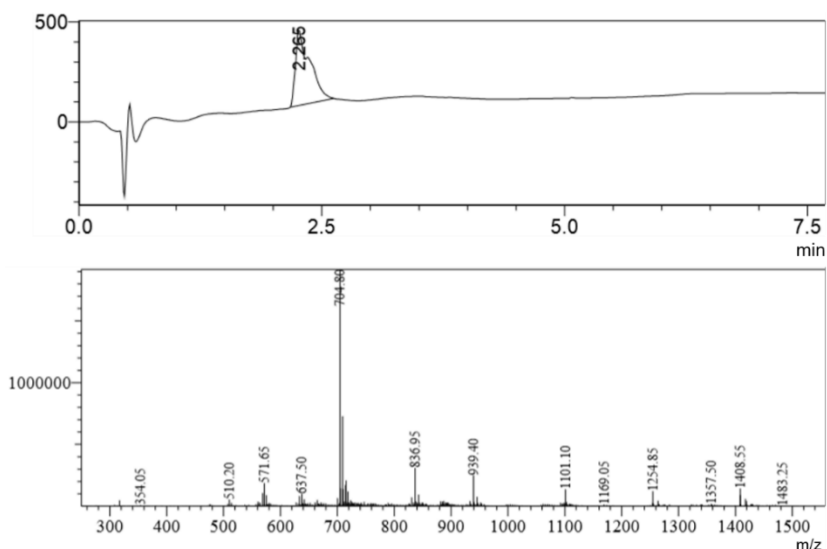


Figure 21. Analyse LCMS (Méthode J) du milieu réactionnel **cRAFT(Mal)₄** et de l'iminosucre **20** dans un tampon phosphate 100mM à pH 7,2 après 5 jours à 37°C, calculé pour $[C_{128}H_{214}N_{22}O_{38}S_4+3H+Na]^{4+}$ 705,36, mesuré 704,80

Le pH du milieu est mesuré à une valeur autour de 4-5. Une solution basique est alors ajoutée pour corriger la valeur est atteindre un pH de 8 favorable à la formation d'une liaison thiol-maléimide. Ce changement de pH reste sans succès et le produit n'est plus observé par LCMS. L'hypothèse de la formation de disulfure entre les ligands thiols est alors proposée. Afin d'éviter ce phénomène, l'addition d'une phosphine dans le milieu a été réalisée. Dix équivalents de tricarboxyéthylphosphine (TCEP) par ligand iminosucre sont ajoutés au milieu.^[50] L'analyse LCMS du mélange réactionnel de **cRAFT(16)₄** a permis d'observer la masse du composé di-, tri- et tétra-chargé. La masse n'est pas détectée par MALDI-ToF, mais l'HR-ESI-MS confirme le résultat de la LCMS. Lorsque ce mode opératoire est appliqué à la synthèse de **cRAFT(20)₄**, le chromatogramme HPLC dévoile un pic à un temps de rétention identique à celui du système fonctionnalisé avec le bras court **cRAFT(16)₄**. La masse obtenue par la MS est, elle aussi, la même. Après avoir répété ces expériences pour écarter toutes erreurs de manipulation, ce résultat est confirmé. Dans le cas de la plate-forme linéaire, c'est également la masse et le temps de rétention attendus pour le système **IRAF(16)₄** qui sont obtenus au cours de l'expérience avec le bras long. L'hypothèse d'une attaque nucléophile du TCEP sur la plate-forme est proposée. Elle entraînerait la formation d'un cluster de type phosphonium **cRAFT(phosphonium)₄** (Figure 22).^[51] Afin de confirmer cette hypothèse, une RMN du phosphore du composé a été réalisée et montre la présence d'un signal de ³¹P, caractéristique des phosphoniums (Figure 23).

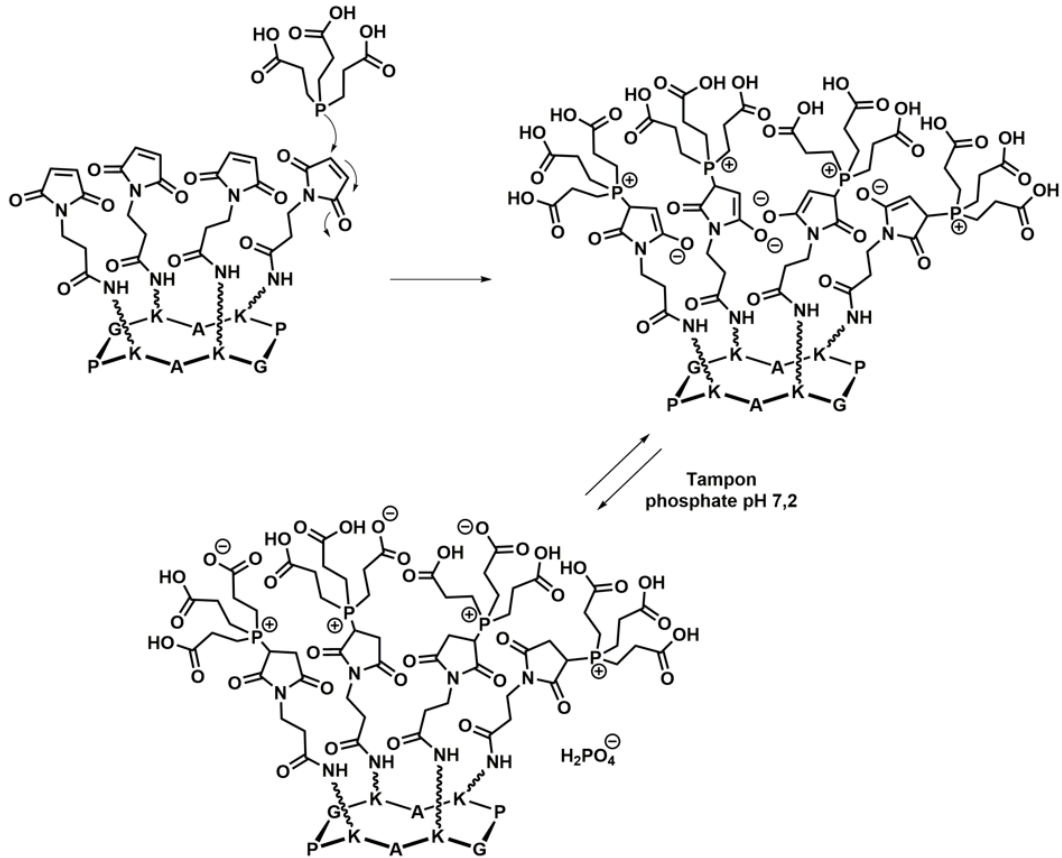


Figure 22. Hypothèse de préparation et structure du composé **cRAFT(phosphonium)₄** formé par le mélange dans un tampon phosphate à 100mM et pH 7,2 de TCEP, **cRAFT(Mal)₄** et d'un iminosucre au choix **16** ou **20**. Structure déterminée à partir du spectre de masse

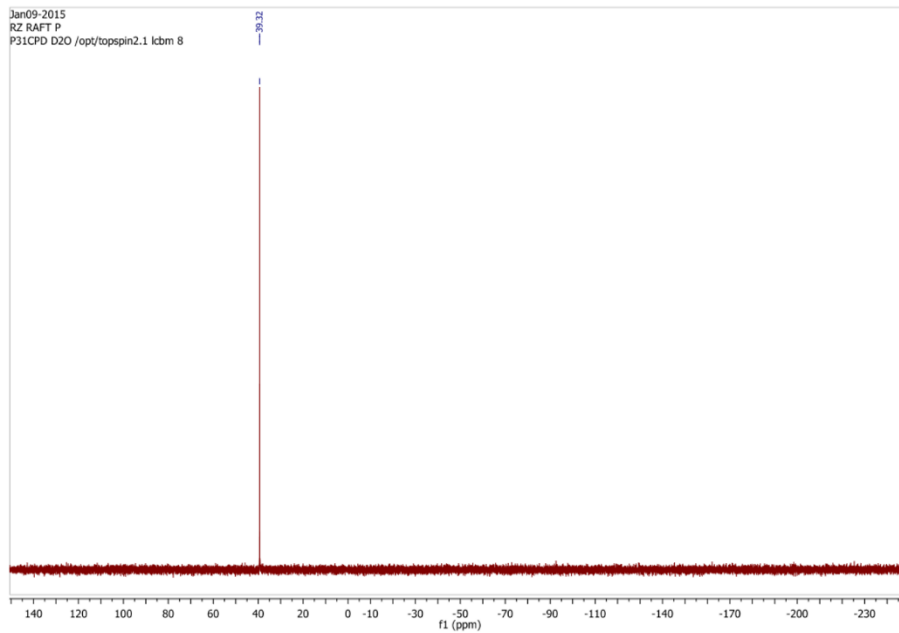


Figure 23. Spectre ^{31}P RMN du système **cRAFT(phosphonium)₄**, purifié par HPLC semi-préparative, issu du mélange de TCEP, **cRAFT(Mal)₄** et de l'iminosucre **16** dans un tampon phosphate 100mM à pH 7,2

Pour contourner la formation de ce composé **cRAFT(phosphonium)₄**, la phosphine est conservée mais le milieu est thermostaté à 37°C pour accélérer un éventuel déplacement de l'équilibre thermodynamique (Figure 24). L'objectif est de tendre vers la construction du système thiol-maléimide en dégradant les liaisons phosphoniums. Malheureusement, les analyses LCMS ne montrent pas la formation du cluster recherché. Etant donné que le phosphonium possède une masse identique à celle du cluster fonctionnalisé par l'iminosucre à bras court **16**, les expériences suivantes ont été réalisées avec l'iminosucre **20**. Ainsi toutes ambiguïtés sur la présence d'ylures sont écartées.

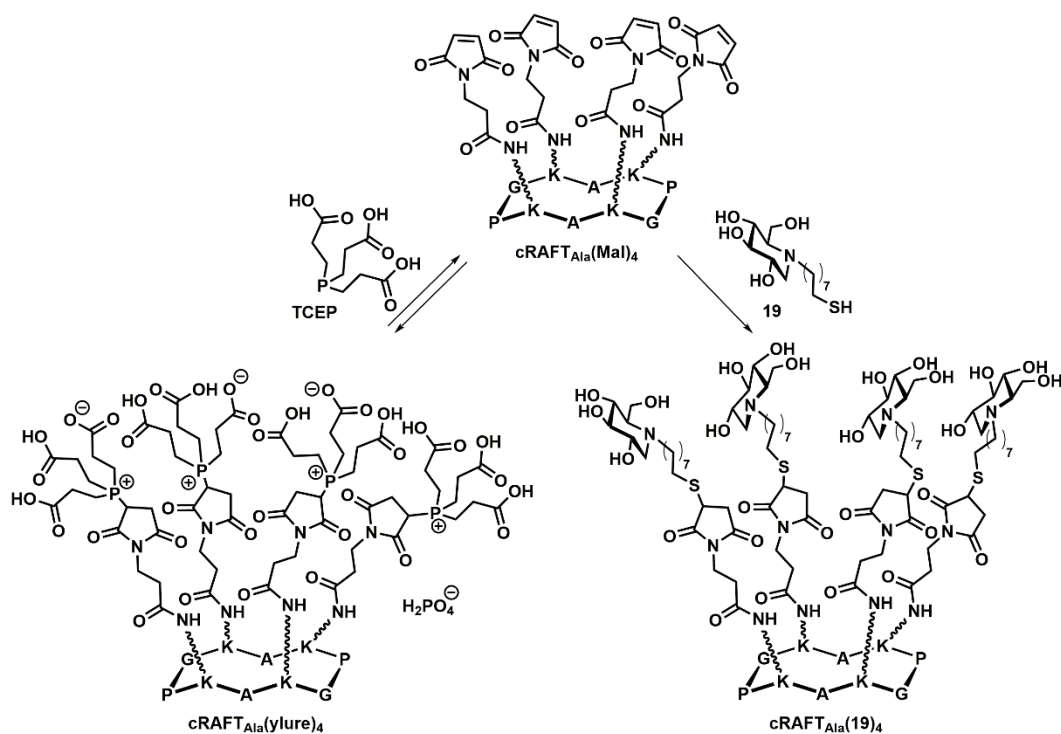


Figure 24. Expérience d'échanges de liaisons phosphoniums vers la formation de ligations thiol-maléimides

Des tests de stabilité du composé **cRAFT(phosphonium)₄** ont été réalisés dans des milieux tamponnés de pH variés. Ils indiquent que le composé est instable en conditions basiques (Figure 25). Ainsi, le retour incomplet vers la formation de la plate-forme **cRAFT(Mal)₄** est observé dans des conditions de pH basiques et des clusters phosphoniums de valence réduite sont générés.

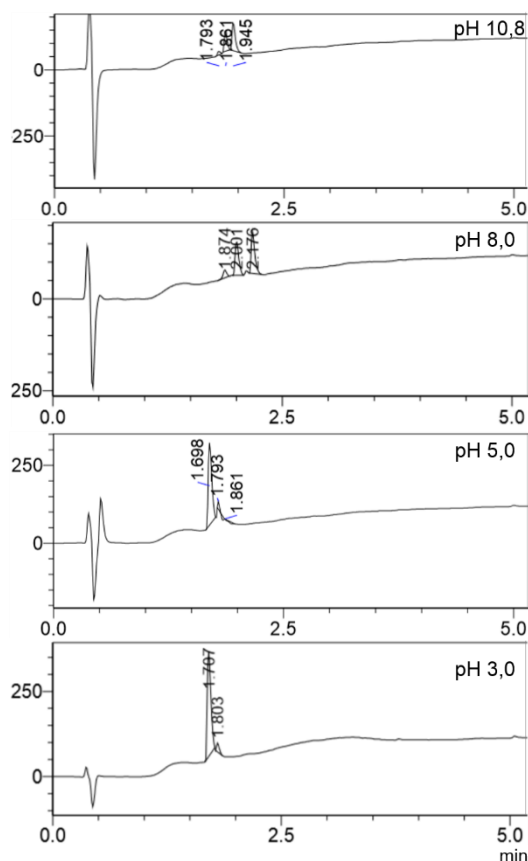


Figure 25. Etude de la stabilité du composé ylure **cRAFT(phosphonium)₄** à 1,70min à différents pH après 3 jours (Méthode J). De bas en haut : pH 3,0, 5,0, 8,0 et 10,8

Le test de stabilité du cluster **cRAFT_{Ala}(phosphonium)₄** a montré qu'à un pH de 10,8, le système n'est pas présent dans le milieu. Basés sur ces résultats, la synthèse est engagée dans un milieu aqueux tamponné avec 100 mM de Na₂CO₃ à pH 10,8 à 37°C. Après 2 jours de réaction, l'analyse LCMS indique la présence du **cRAFT_{Ala}(phosphonium)₄**. Après vérification du pH de la solution, la mesure indique une valeur d'acidité élevée (pH 3). Différentes bases (triéthylamine, NaOH, NaHCO₃^[52]) ont été successivement testées sans permettre d'aboutir au résultat escompté.

Faute de résultats encourageants pour la synthèse de ces composés thiol-maléimides, la suite du travail s'est tournée vers la préparation de systèmes oximes.

ii. Systèmes Oximes

La préparation de systèmes multivalents fonctionnalisés grâce à des liaisons oximes a déjà fait l'objet d'un certain nombre de travaux dans la littérature.^[53] Un criblage de différents pH compris entre 1,0 et 8,0, est réalisé pour confirmer, par des analyses LCMS, la faisabilité de clusters oximes à pH 3,0 (H₂O, 0,1% TFA). La préparation des clusters multivalents va s'opérer, comme précédemment, à une concentration de 1 mM en plate-forme peptidique

(Figure 26). Conformément à la littérature, 8 éq d'iminosucres (2 éq par aldéhyde) sont additionnés au milieu réactionnel.

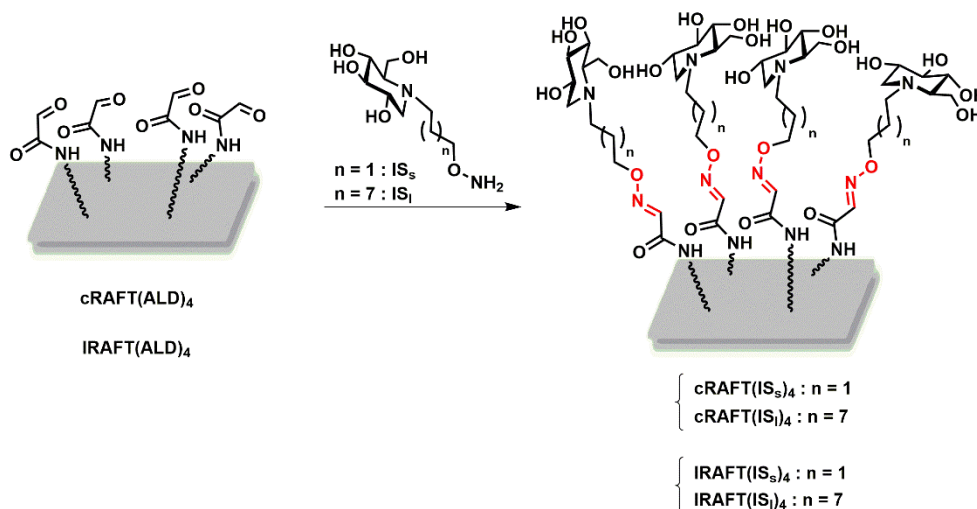


Figure 26. Préparation des quatre systèmes tétravalents oximes

Les systèmes sont ensuite analysés par LCMS après quelques heures de réaction à température ambiante. Chacun des quatre composés tétravalents est généré, dans un premier temps, à l'échelle analytique puis, la préparation est étendue sur quelques milligrammes de plate-forme. Les produits recherchés purs sont obtenus après purification par HPLC semi-préparative. Ainsi, les quatre clusters d'iminosucres, **cRAFT(IS_s)₄**, **cRAFT(IS_l)₄**, **IRAFT(IS_s)₄** et **IRAFT(IS_l)₄** sont obtenus après purification avec des rendements compris entre 40 et 70% (Tableau 2).

Tableau 2. Masses et rendements obtenus pour les quatre clusters d'iminosucres construits via des liaisons oximes

Composé	cRAFT(IS _s) ₄	cRAFT(IS _l) ₄	IRAFT(IS _s) ₄	IRAFT(IS _l) ₄
Masse (mg)	5,9	6,0	4,1	7,1
Rendement (%)	57	47	40	70

Ces quatre systèmes tétravalents sont alors engagés dans des tests d'inhibition enzymatique et plus particulièrement des glycosidases.

III. Tests d'inhibition enzymatique

En fonctionnalisant l'ensemble des quatre composés par des ligands iminosucres de type DNJ, l'objectif visé, est d'évaluer leur inhibition envers les glycosidases. L' α -mannosidase de *Canavalia ensiformis* montre, comme indiqué dans l'introduction, les résultats les plus intéressants d'inhibition. L'évaluation de l'inhibition des clusters multivalents est donc réalisée sur cette enzyme dans une solution tamponnée de phosphate-citrate (100 mM) à pH 5,5. Pour

optimiser l'activité de l'enzyme et pour la répétabilité de l'expérience, il est indispensable de contrôler la valeur du pH ainsi que la température. En effet, les conditions de pH et de température sont déterminantes pour que l'enzyme soit fonctionnelle (Figure 27).

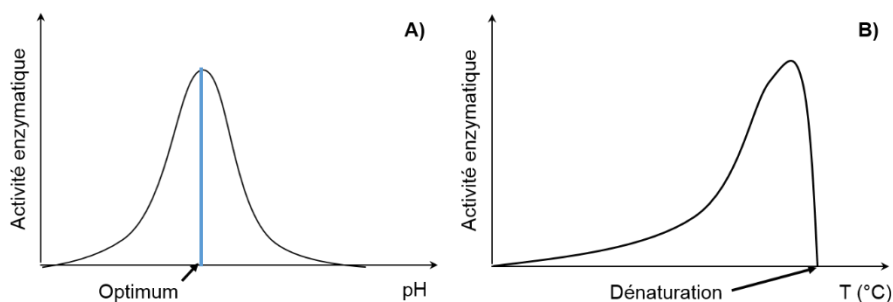


Figure 27. Influence des facteurs physico-chimiques sur l'efficacité enzymatique avec A) l'effet du pH et B) l'impact de la température

Par le biais de ce test, l'effet de la pré-organisation du système ainsi que celui de la longueur des chaînes carbonées liant l'iminosucre au peptide, sont évalués. Les constantes d'inhibition K_i sont déterminées par spectrométrie UV-visible. Pour cela, l'activité résiduelle d'hydrolyse de l'enzyme pour le 4-nitrophenyl α -D-mannoside est mesurée (Figure 28). Par un effet "push-pull" induit par les groupements NO_2 mésomère attracteur et O^- mésomère donneur, le produit chromogénique formé absorbe dans le visible. L'enzyme et l'inhibiteur multivalent sont pré-incubés à 37°C . Après 10 min, la réaction est stoppée par addition de Na_2CO_3 puis l'absorbance du système est mesurée à 405 nm. Ces 10 minutes correspondent à la vitesse initiale de la cinétique enzymatique pour agir sur le substrat (zone linéaire correspondant aux conditions initiales avant le plateau). Pour chacun des composés, l'expérience est réalisée à des concentrations différentes en substrat. Chaque test est répété deux fois.

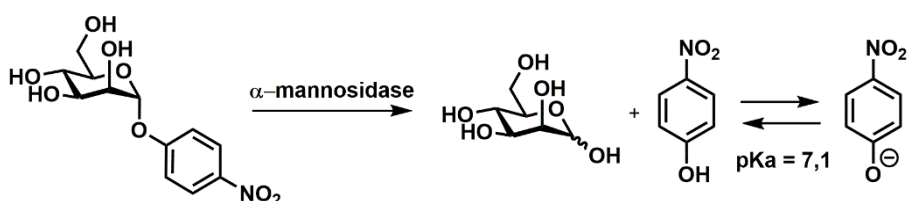
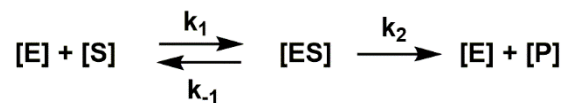


Figure 28. Hydrolyse du composé 4-nitrophenyl- α -D-mannoside par l' α -mannosidase

Michaelis et Menten ont été les premiers à proposer une théorie de cinétique enzymatique en phase homogène en 1913.^[54] Le principe de ce modèle repose sur l'hypothèse que l'on travaille dans des conditions initiales. L'analyse du système est réalisée à la vitesse initiale alors que le produit P est inexistant. Il ne doit pas y avoir d'équilibre de la réaction de formation du produit P. La deuxième hypothèse nécessite de considérer qu'un équilibre est rapidement atteint entre les concentrations en enzyme [E], en substrat [S] et en complexe enzyme-substrat [ES]. En d'autres termes, la concentration en complexe enzyme-substrat est considérée comme constante (Équation 2). Ces simplifications ont permis d'aboutir à une équation de

formation du produit reposant sur trois constantes de vitesse k_1 , k_{-1} et k_2 (Équation 3). L'étape de génération du produit régie par k_2 est généralement limitante.



Équation 2. Système enzymatique après simplification par les hypothèses émises par Michaelis-Menten

$$V = \frac{V_{Max} [S]}{K_M + [S]} \text{ où } K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Équation 3. Equation de Michaelis-Menten. Avec V , la vitesse initiale, K_M , la constante de Michaelis-Menten et V_{Max} , la vitesse initiale maximale

Ce modèle est représenté selon un graphe montrant l'évolution de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat dans le milieu (Figure 29). L'asymptote de cette hyperbole, décrivant l'équation de Michaelis-Menten, représente la vitesse maximale (V_{Max}) atteinte dans les conditions initiales.

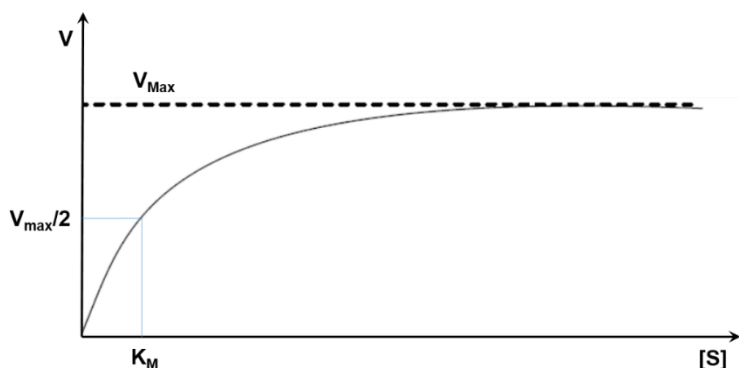


Figure 29. Représentation de Michaelis-Menten décrivant l'évolution de la vitesse de la réaction de catalyse enzymatique en fonction de la concentration en substrat

Les paramètres K_M et V_{Max} , pour plus de précisions, sont déterminés après linéarisation de l'équation de Michaelis-Menten. La représentation de Lineweaver-Burk est classiquement choisie dans le cas des inhibitions d' α -glycosidases. La valeur de la constante d'inhibition K_i est alors déterminée selon l'Équation 4 en traçant le graphique de Lineweaver-Burk (Figure 30).

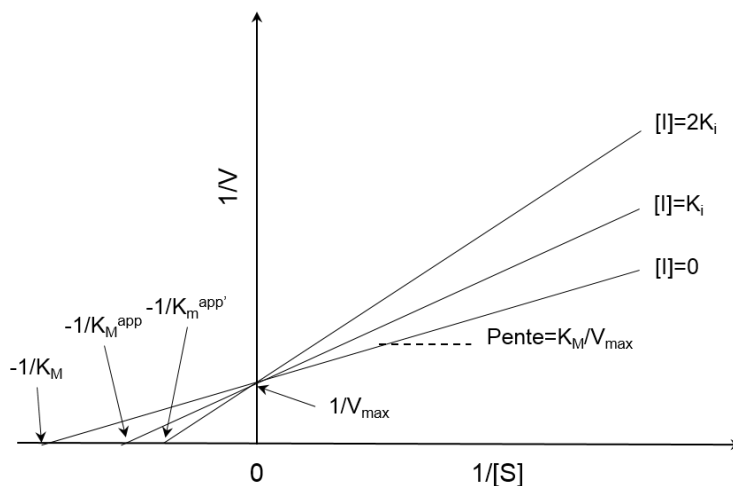


Figure 30. Représentation en double inverse de Lineweaver-Burk dans le cas d'une inhibition compétitive

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M (1 + \frac{[I]}{K_i})}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Équation 4. Equation de Lineweaver-Burk d'inhibition compétitive. Avec V : vitesse initiale, K_M : constante de Michaelis (s'apparente à l'affinité de l'enzyme pour son substrat), [I] : concentration en inhibiteur, K_i : constante d'inhibition, V_{max} : vitesse initiale max, [S] : concentration en substrat (4-nitrophenyl- α -D-mannoside)

Ainsi, chacun des quatre systèmes est testé pour déterminer leurs constantes d'inhibition pour l' α -mannosidase de *Canavalia ensiformis* (Tableau 3). Le composé cyclique fonctionnalisé par l'espaceur court **cRAFT(IS_s)₄** présente un K_i de $58 \pm 8,2\mu\text{M}$ alors que son homologue portant le bras long, **cRAFT(IS_l)₄**, présente une inhibition plus importante avec une constante atteignant les $3,2 \pm 0,33\mu\text{M}$. Cette expérience montre l'intérêt d'avoir de longues chaînes entre les plate-formes et les iminosucres pour, certainement, permettre une meilleure accessibilité à la cible. En se penchant sur les résultats obtenus pour les molécules linéaires, les différences sont moins notables. Des valeurs de $1,86 \pm 0,45\mu\text{M}$ et $1,36 \pm 0,33 \mu\text{M}$ sont obtenues, respectivement pour les espaceurs court et long. En étudiant l'organisation des plate-formes, il est facile de constater que la présence d'une pré-organisation induit une moins bonne inhibition pour l'enzyme dans le cas des bras courts. Des hypothèses ont été envisagées afin de tenter d'expliquer ce phénomène. La présence d'un site secondaire de reconnaissance a été évoquée. La flexibilité des molécules linéaires peut éventuellement favoriser l'accès à ce deuxième site, améliorant ainsi l'inhibition. Le cluster cyclique **cRAFT(IS_s)₄** ne présente peut-être pas une distance suffisantes, entre deux iminosucres, pour atteindre ce site. Cette explication a d'ailleurs déjà été proposée dans un exemple de la littérature.^[38a] Une autre proposition permettant d'expliquer ce phénomène repose sur une inhibition réalisée par la complexation par chélation de l'enzyme. De la même manière, la distance entre les sites d'inhibition est peut-être plus grande que l'espace entre les résidus iminosucres. Une troisième hypothèse suggère la gêne stérique que peut apporter l'utilisation de la plate-forme peptidique

cyclique. En augmentant la longueur de la chaîne carbonée ou en supprimant la pré-organisation de la plate-forme, cette gêne stérique est réduite, voire même éliminée. Cette inhibition limitée est uniquement observée dans le cas du **cRAFT(IS_s)₄** puisque dans le cas du **cRAFT(IS_i)₄**, les bras longs des iminosucres "compensent" l'effet de la pré-organisation.

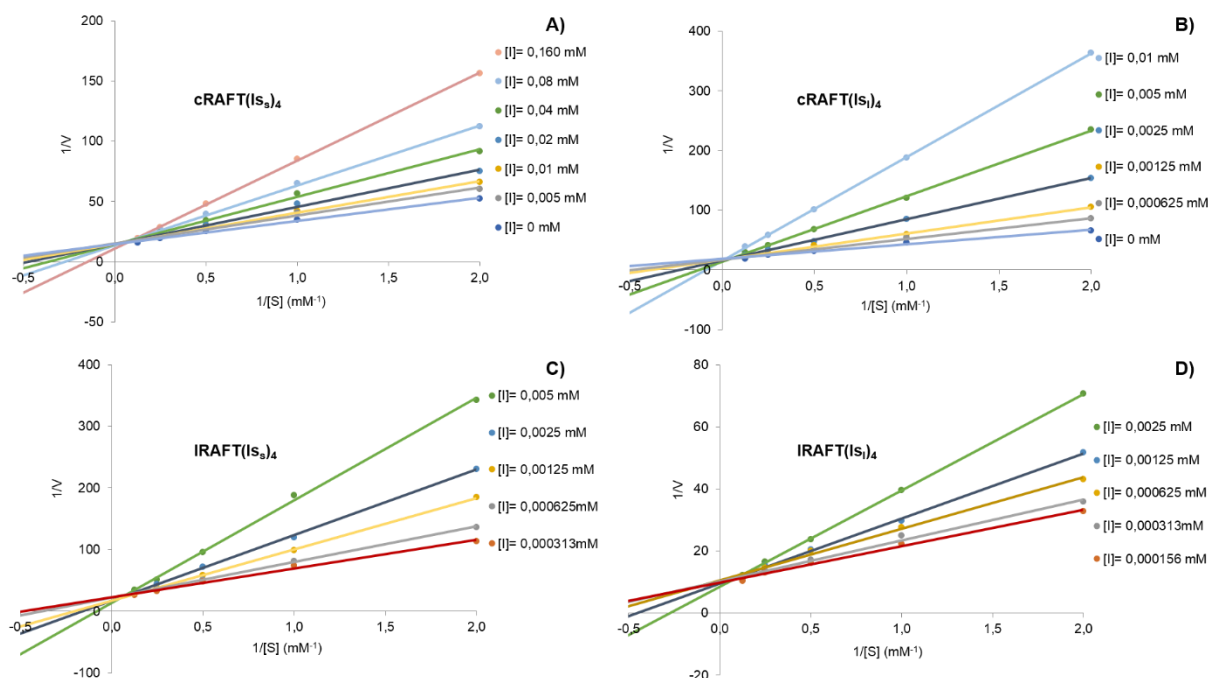


Figure 31. Représentation de Lineweaver-Burk pour chacun des quatre systèmes. A) **cRAFT(IS_s)₄**, B) **cRAFT(IS_i)₄**, C) **IRAF(T(IS_s)₄)** et D) **IRAF(T(IS_i)₄)**

La puissance inhibitrice des clusters a fait l'objet d'une comparaison avec la déoxynojirimycine (DNJ) choisie comme monomère de référence (Tableau 3). L'effet de multivalence est amplifié en l'absence de pré-organisation de la plate-forme et varie selon la longueur des espaceurs. La puissance effective de chaque unité d'iminosucre est directement liée à cet effet généré par la multivalence.

Tableau 3. Pouvoir inhibiteur des systèmes multivalents oximes sur l' α -mannosidase de *Canavalia ensiformis*

Composé	cRAFT(IS_s)₄	cRAFT(IS_i)₄	IRAF(T(IS_s)₄)	IRAF(T(IS_i)₄)	DNJ
K _i (μ M)	58 \pm 8,2	3,2 \pm 0,33	1,86 \pm 0,45	1,36 \pm 0,33	400
rp (puissance relative)	8,6	156,2	268,8	367,6	1
rp/n	1,7	31,2	52,6	76,9	1

IV. Conclusion

Au cours de ce chapitre, la construction de clusters d'iminosucres par ligations en l'absence de métaux a été réalisée. Une étude sur l'impact de la longueur des chaînes carbonées des bras espaceurs, entre la plate-forme et le résidu iminosucre, a été effectuée. Ainsi, les voies de synthèse de quatre ligands ont été développées en parallèle de la préparation de quatre plate-formes peptidiques, cycliques ou linéaires, portant des fonctions maléimides ou aldéhydes glyoxyliques. Malgré des problèmes rencontrés pour la formation et la purification des bioconjugués thiol-maléimides tétravalents, le travail a permis d'aboutir à la création de liaisons oximes pour générer quatre nouveaux systèmes multivalents.

Des tests d'inhibition enzymatique réalisés sur l' α -mannosidase de *Canavalia ensiformis* ont permis de déterminer la valeur de la constante d'inhibition de chacun des systèmes. Ainsi, après analyse des résultats, ce sont les composés linéaires qui offrent une puissance d'inhibition nettement supérieure à celle des composés cycliques. En effet, alors que la molécule cyclique à bras courts dévoile un K_i d'une valeur relativement élevée, son homologue linéaire possède quant à lui un pouvoir inhibiteur 31 fois plus important. La longueur des bras espaceurs entre les ligands et la plate-forme s'est avérée être un critère contrôlant l'inhibition. L'inhibition enzymatique peut ainsi être augmentée en substituant un ligand portant une chaîne carbonée de trois atomes avec un espaceur à neuf carbones.

Ce travail rapporte la première synthèse de clusters d'iminosucres multivalents assemblés par une ligation sans métaux. Cette étude a confirmé l'importance d'un espaceur entre le ligand et le peptide. Cette plate-forme cyclique induit certainement une gêne stérique pour la reconnaissance.^[55]

V. Références

- [1] Synthetic Multivalent Ligands as Probes of Signal Transduction, L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 2348-2368.
- [2] Iminosugar-based glycopolyptides: glycosidase inhibition with bioinspired glycoprotein analogue micellar self-assemblies, C. Bonduelle, J. Huang, T. Mena-Barragan, C. Ortiz Mellet, C. Decroocq, E. Etame, A. Heise, P. Compain, S. Lecommandoux, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 3350-3352.
- [3] Biomedical applications of dendrimers: a tutorial, M. A. Mintzer, M. W. Grinstaff, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 173-190.
- [4] a) Low-generation dendrimers with a calixarene core and based on a chiral C₂-symmetric pyrrolidine as iminosugar mimics, M. Marradi, S. Cicchi, F. Sansone, A. Casnati, A. Goti, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2012**, *8*, 951-957; b) Synthesis of the first examples of iminosugar clusters based on cyclopeptoid cores, M. L. Lepage, A. Meli, A. Bodlener, C. Tarnus, F. De Riccardis, I. Izzo, P. Compain, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2014**, *10*, 1406-1412.
- [5] Glycosidase Inhibition with Fullerene Iminosugar Balls: A Dramatic Multivalent Effect, P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 5753-5756.
- [6] a) Fluorescent Silica Nanoparticles with Multivalent Inhibitory Effects towards Carbonic Anhydrases, N. Touisni, N. Kanfar, S. Ulrich, P. Dumy, C. T. Supuran, A. Mehdi, J.-Y. Winum, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 10306-10309; b) Carbonic Anhydrase Inhibitor Coated Gold Nanoparticles Selectively Inhibit the Tumor-Associated Isoform IX over the Cytosolic Isozymes I and II, M. Stiti, A. Cecchi, M. Rami, M. Abdaoui, V. Barragan-Montero, A. Scozzafava, Y. Guari, J.-Y. Winum, C. T. Supuran, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16130-16131.
- [7] Emerging trends in enzyme inhibition by multivalent nanoconstructs, N. Kanfar, E. Bartolami, R. Zelli, A. Marra, J.-Y. Winum, S. Ulrich, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 9894-9906.
- [8] Multivalent iminosugars to modulate affinity and selectivity for glycosidases, J. Diot, M. I. Garcia-Moreno, S. G. Gouin, C. Ortiz Mellet, K. Haupt, J. Kovensky, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 357-363.
- [9] Topological Effects and Binding Modes Operating with Multivalent Iminosugar-Based Glycoclusters and Mannosidases, Y. Brissonnet, C. Ortiz Mellet, S. Morandat, M. I. Garcia Moreno, D. Deniaud, S. E. Matthews, S. Vidal, S. Šesták, K. El Kirat, S. G. Gouin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 18427-18435.
- [10] a) Cyclodextrin-Based Iminosugar Click Clusters: The First Examples of Multivalent Pharmacological Chaperones for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders, C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, K. Ikeda, N. Asano, P. Compain, *ChemBioChem*, **2012**, *13*, 661-664; b) The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Architectural Parameters with Cyclodextrin-based Iminosugar Click Clusters, C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 13825-13831; c) A Systematic Investigation of Iminosugar Click Clusters as Pharmacological Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease, A. Joosten, C. Decroocq, J. de Sousa, J. P. Schneider, E. Etamé, A. Bodlener, T. D. Butters, P. Compain, *ChemBioChem*, **2014**, *15*, 309-319.
- [11] Polymeric Iminosugars Improve the Activity of Carbohydrate-Processing Enzymes, Y. Brissonnet, S. Ladevèze, D. Tezé, E. Fabre, D. Deniaud, F. Daligault, C. Tellier, S. Šesták, M. Remaud-Simeon, G. Potocki-Veronese, S. G. Gouin, *Bioconjug. Chem.*, **2015**, *26*, 766-772.
- [12] a) Dimeric Zanamivir Conjugates with Various Linking Groups Are Potent, Long-Lasting Inhibitors of Influenza Neuraminidase Including H5N1 Avian Influenza, S. J. F. Macdonald, R. Cameron, D. A. Demaine, R. J. Fenton, G. Foster, D. Gower, J. N. Hamblin, S. Hamilton, G. J. Hart, A. P. Hill, G. G. A. Inglis, B. Jin, H. T. Jones, D. B. McConnell, J. McKimm-Breschkin, G. Mills, V. Nguyen, I. J. Owens, N. Parry, S. E. Shanahan, D. Smith, K. G. Watson, W.-Y. Wu, S. P. Tucker, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 2964-2971; b) Potent and Long-Acting Dimeric Inhibitors of Influenza Virus Neuraminidase Are Effective at a Once-Weekly Dosing Regimen, S. J. F. Macdonald, K. G. Watson, R. Cameron, D. K. Chalmers, D. A. Demaine, R. J. Fenton, D. Gower, J. N. Hamblin, S. Hamilton, G. J. Hart, G. G. A. Inglis, B. Jin, H. T. Jones, D. B. McConnell, A. M. Mason, V. Nguyen, I. J. Owens, N. Parry, P. A. Reece, S. E. Shanahan, D. Smith, W.-Y. Wu, S. P. Tucker, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2004**, *48*, 4542-4549.
- [13] Highly potent and long-acting trimeric and tetrameric inhibitors of influenza virus neuraminidase, K. G. Watson, R. Cameron, R. J. Fenton, D. Gower, S. Hamilton, B. Jin, G. Y. Krippner, A. Luttick, D. McConnell, S. J. F. Macdonald, A. M. Mason, V. Nguyen, S. P. Tucker, W.-Y. Wu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 1589-1592.
- [14] Attaching zanamivir to a polymer markedly enhances its activity against drug-resistant strains of influenza a virus, A. K. Weight, J. Haldar, L. Álvarez de Cienfuegos, L. V. Gubareva, T. M. Tumpey, J. Chen, A. M. Klibanov, *J. Pharm. Sci.*, **2011**, *100*, 831-835.
- [15] Synthesis and anti-Influenza evaluation of polyvalent sialidase inhibitors bearing 4-guanidino-Neu5Ac2en derivatives, T. Honda, S. Yoshida, M. Arai, T. Masuda, M. Yamashita, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2002**, *12*, 1929-1932.
- [16] a) A bivalent small molecule-drug conjugate directed against carbonic anhydrase IX can elicit complete tumour regression in mice, N. Krall, F. Pretto, D. Neri, *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, 3640-3644; b) A Small-Molecule Drug Conjugate for the Treatment of Carbonic Anhydrase IX Expressing Tumors, N. Krall, F. Pretto, W. Decurtins, G. J. L. Bernardes, C. T. Supuran, D. Neri, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 4231-4235.

- [17] Dependence of Avidity on Linker Length for a Bivalent Ligand–Bivalent Receptor Model System, E. T. Mack, P. W. Snyder, R. Perez-Castillejos, B. Bilgiçer, D. T. Moustakas, M. J. Butte, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 333-345.
- [18] a) Dendrimers incorporating benzenesulfonamide moieties strongly inhibit carbonic anhydrase isoforms I–XIV, F. Carta, S. M. Osman, D. Vullo, Z. AlOthman, C. T. Supuran, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 6453-6457; b) Poly(amidoamine) Dendrimers with Carbonic Anhydrase Inhibitory Activity and Antiglaucoma Action, F. Carta, S. M. Osman, D. Vullo, A. Gullotto, J.-Y. Winum, Z. AlOthman, E. Masini, C. T. Supuran, *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 4039-4045.
- [19] Exploring carbonic anhydrase inhibition with multimeric coumarins displayed on a fullerene scaffold, M. Abellan-Flos, M. Tanc, C. T. Supuran, S. P. Vincent, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 7445-7451.
- [20] Bivalent inhibition of human β -tryptase, N. Schaschke, G. Matschiner, F. Zettl, U. Marquardt, A. Bergner, W. Bode, C. P. Sommerhoff, L. Moroder, *Chem. Biol.*, **2001**, *8*, 313-327.
- [21] T. Selwood, K. C. Elrod, N. M. Schechter, in *Biological Chemistry, Vol. 384*, **2003**, p. 1605.
- [22] a) Synthesis of bivalent inhibitors of eucaryotic proteasomes, G. Loidl, H.-J. Musiol, M. Groll, R. Huber, L. Moroder, *J. Pept. Sci.*, **2000**, *6*, 36-46; b) Bivalency as a principle for proteasome inhibition, G. Loidl, M. Groll, H.-J. Musiol, R. Huber, L. Moroder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 5418-5422.
- [23] Dimerized Linear Mimics of a Natural Cyclopeptide (TMC-95A) Are Potent Noncovalent Inhibitors of the Eukaryotic 20S Proteasome, A. Desvergne, E. Genin, X. Maréchal, N. Gallastegui, L. Dufau, N. Richy, M. Groll, J. Vidal, M. Reboud-Ravaux, *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 3367-3378.
- [24] Design and evaluation of novel bivalent thrombin inhibitors based on amidinophenylalanines, T. Steinmetzer, M. Renatus, S. Künzel, A. Eichinger, W. Bode, P. Wikström, J. Hauptmann, J. Stürzebecher, *Eur. J. Biochem.*, **1999**, *265*, 598-605.
- [25] Probing multivalency for the inhibition of an enzyme: glycogen phosphorylase as a case study, S. Cecioni, O.-A. Argintaru, T. Docsa, P. Gergely, J.-P. Praly, S. Vidal, *New J. Chem.*, **2009**, *33*, 148-156.
- [26] Multivalency in the Inhibition of Oxidative Protein Folding by Arsenic(III) Species, A. Sapra, D. Ramadan, C. Thorpe, *Biochemistry*, **2015**, *54*, 612-621.
- [27] Synthesis and 5-lipoxygenase inhibitory activity of new cinnamoyl and caffeoyl clusters, J. Doiron, L. H. Boudreau, N. Picot, B. Villebonet, M. E. Surette, M. Touaibia, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 1118-1121.
- [28] Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators, C. T. Supuran, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, *7*, 168-181.
- [29] Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms?, V. Alterio, A. Di Fiore, K. D'Ambrosio, C. T. Supuran, G. De Simone, *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 4421-4468.
- [30] Carbonic anhydrases: from biomedical applications of the inhibitors and activators to biotechnological use for CO₂ capture, C. T. Supuran, *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.*, **2013**, *28*, 229-230.
- [31] Carbonic Anhydrase Inhibitors. Comparison of Aliphatic Sulfamate/Bis-sulfamate Adducts with Isozymes II and IX as a Platform for Designing Tight-Binding, More Isoform-Selective Inhibitors, R. M. Vitale, V. Alterio, A. Innocenti, J.-Y. Winum, S. M. Monti, G. De Simone, C. T. Supuran, *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 5990-5998.
- [32] Development of Potent Carbonic Anhydrase Inhibitors Incorporating Both Sulfonamide and Sulfamide Groups, K. D'Ambrosio, F.-Z. Smaine, F. Carta, G. De Simone, J.-Y. Winum, C. T. Supuran, *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 6776-6783.
- [33] Out of the active site binding pocket for carbonic anhydrase inhibitors, K. D'Ambrosio, S. Carradori, S. M. Monti, M. Buonanno, D. Secci, D. Vullo, C. T. Supuran, G. De Simone, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, 302-305.
- [34] Combining supramolecular chemistry with biology, D. A. Uhlenheuer, K. Petkau, L. Brunsveld, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 2817-2826.
- [35] a) Dual-display of small molecules enables the discovery of ligand pairs and facilitates affinity maturation, M. Wichert, N. Krall, W. Decurtins, R. M. Franzini, F. Pretto, P. Schneider, D. Neri, J. Scheuermann, *Nat Chem*, **2015**, *7*, 241-249; b) Selection of Carbonic Anhydrase IX Inhibitors from One Million DNA-Encoded Compounds, F. Buller, M. Steiner, K. Frey, D. Mircsof, J. Scheuermann, M. Kalisch, P. Bühlmann, C. T. Supuran, D. Neri, *ACS Chem. Biol.*, **2011**, *6*, 336-344.
- [36] Glycosidase Mechanisms: Anatomy of a Finely Tuned Catalyst, D. L. Zechel, S. G. Withers, *Acc. Chem. Res.*, **2000**, *33*, 11-18.
- [37] a) Synthesis and biological properties of multivalent iminosugars, R. Zelli, J.-F. Longevial, P. Dumy, A. Marra, *New J. Chem.*, **2015**, *39*, 5050-5074; b) The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: A New, Rapidly Emerging Topic in Glycoscience, P. Compain, A. Bodlener, *ChemBioChem*, **2014**, *15*, 1239-1251; c) Multivalent Inhibitors for Carbohydrate-Processing Enzymes: Beyond the "Lock-and-Key" Concept, S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 11616-11628.
- [38] a) Fullerene-sp²-Iminosugar Balls as Multimodal Ligands for Lectins and Glycosidases: A Mechanistic Hypothesis for the Inhibitory Multivalent Effect, R. Rísquez-Cuadro, J. M. García Fernández, J.-F. Nierengarten, C. Ortiz Mellet, *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 16791-16803; b) Generalized Anomeric Effect in gem-Diamines: Stereoselective Synthesis of α -N-Linked Disaccharide Mimics, E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, C. O. Mellet, J. M. García Fernández, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 3306-3309; c) sp²-Iminosugar O-, S-, and N-Glycosides as Conformational Mimics of α -Linked Disaccharides; Implications for Glycosidase Inhibition, E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, P. M. Nieto, J. Angulo, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 8527-8539.
- [39] Correction to "Topological Effects and Binding Modes Operating with Multivalent Iminosugar-Based Glycoclusters and Mannosidases", Y. Brissonnet, C. Ortiz Mellet, S. Morandat, M. I. Garcia Moreno, D.

- Deniaud, S. E. Matthews, S. Vidal, S. Šesták, K. El Kirat, S. G. Gouin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 6773-6773.
- [40] Synthesis and glycosidase inhibition properties of triazole-linked calixarene–minosugar clusters, A. Marra, R. Zelli, G. D'Orazio, B. La Ferla, A. Dondoni, *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 9387-9393.
- [41] The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Valency, Peripheral Ligand Structure, and Topology with Cyclodextrin-Based Iminosugar Click Clusters, C. Decroocq, A. Joosten, R. Sergent, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *ChemBioChem*, **2013**, *14*, 2038-2049.
- [42] Biologically Active Polymersomes from Amphiphilic Glycopeptides, J. Huang, C. Bonduelle, J. Thévenot, S. Lecommandoux, A. Heise, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 119-122.
- [43] Jack bean α -mannosidase: Amino acid sequencing and *N*-glycosylation analysis of a valuable glycomics tool, B. S. Gnanesh Kumar, G. Pohlentz, M. Schulte, M. Mormann, N. Siva Kumar, *Glycobiology*, **2014**, *24*, 252-261.
- [44] Practical synthesis of maleimides and coumarin-linked probes for protein and antibody labelling via reduction of native disulfides, H. Y. Song, M. H. Ngai, Z. Y. Song, P. A. MacAry, J. Hobley, M. J. Lear, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 3400-3406.
- [45] a) Chemoselectively Template-Assembled Glycoconjugates as Mimics for Multivalent Presentation of Carbohydrates, O. Renaudet, P. Dumy, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 243-246; b) Multivalent DNA recognition by self-assembled clusters: deciphering structural effects by fragments screening and evaluation as siRNA vectors, E. Bartolami, Y. Bessin, N. Bettache, M. Gary-Bobo, M. Garcia, P. Dumy, S. Ulrich, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 9427-9438.
- [46] Large-Scale Synthesis of the Glucosylceramide Synthase Inhibitor N-[5-(Adamantan-1-yl-methoxy)-pentyl]-1-deoxynojirimycin, T. Wennekes, B. Lang, M. Leeman, G. A. v. d. Marel, E. Smits, M. Weber, J. v. Wiltenburg, M. Wolberg, J. M. F. G. Aerts, H. S. Overkleef, *Org. Process Res. Dev.*, **2008**, *12*, 414-423.
- [47] S-[ω -(Aminoöxy)alkyl]isothiuronium Salts, ω,ω' -Bis(aminoöxy)alkanes and Related Compounds, L. Bauer, K. S. Suresh, *J. Org. Chem.*, **1963**, *28*, 1604-1608.
- [48] Synthesis of glycosylated- β (1-4)-amino(methoxy) and -oxyamino carbohydrate analogues, O. Renaudet, P. Dumy, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 2127-2135.
- [49] M. Galibert, Thèse, Université Joseph Fourier (Grenoble), **2010**.
- [50] Synthesis of Galactoclusters by Metal-Free Thiol “Click Chemistry” and Their Binding Affinities for *Pseudomonas aeruginosa* Lectin LecA, C. Ligeour, L. Dupin, A. Marra, G. Vergoten, A. Meyer, A. Dondoni, E. Souteyrand, J.-J. Vasseur, Y. Chevolut, F. Morvan, *Eur. J. Org. Chem.*, **2014**, *2014*, 7621-7630.
- [51] Assembly of Dimethyl Acetylenedicarboxylate and Phosphanes with Aldehydes Leading to γ -Lactones Bearing α -Phosphorus Ylides as Wittig Reagents, J.-C. Deng, F.-W. Chan, C.-W. Kuo, C.-A. Cheng, C.-Y. Huang, S.-C. Chuang, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, *2012*, 5738-5747.
- [52] Access to Biomolecular Assemblies through One-Pot Triple Orthogonal Chemoselective Ligations, M. Galibert, O. Renaudet, P. Dumy, D. Boturn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 1901-1904.
- [53] a) Oxime Ligation: A Chemoselective Click-Type Reaction for Accessing Multifunctional Biomolecular Constructs, S. Ulrich, D. Boturn, A. Marra, O. Renaudet, P. Dumy, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 34-41; b) High Affinity Glycodendrimers for the Lectin LecB from *Pseudomonas aeruginosa*, N. Berthet, B. Thomas, I. Bossu, E. Dufour, E. Gillon, J. Garcia, N. Spinelli, A. Imbert, P. Dumy, O. Renaudet, *Bioconjug. Chem.*, **2013**, *24*, 1598-1611; c) Synthesis of heteroglycoclusters by using orthogonal chemoselective ligations, B. Thomas, M. Fiore, I. Bossu, P. Dumy, O. Renaudet, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2012**, *8*, 421-427; d) Expanding the scope of oxime ligation: facile synthesis of large cyclopeptide-based glycodendrimers, B. Thomas, N. Berthet, J. Garcia, P. Dumy, O. Renaudet, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 10796-10798.
- [54] One hundred years of Michaelis–Menten kinetics, A. Cornish-Bowden, *Perspect. Sci.*, **2015**, *4*, 3-9.
- [55] A metal-free synthetic approach to peptide-based iminosugar clusters as novel multivalent glycosidase inhibitors, E. Bartolami, R. Zelli, J.-F. Longevial, Y. Bessin, P. Dumy, A. Marra, S. Ulrich, **2015**, *Manuscript submitted*.

Chapitre 5

***Synthèse d' α -PNA portant des triazines
fonctionnalisées comme analogues de
nucléobases***

Chapitre 5 : Synthèse d' α -PNA portant des triazines fonctionnalisées comme analogues de nucléobases

I. Contexte	154
A. <i>Les analogues d'acide nucléique</i>	<i>154</i>
B. <i>Positionnement du projet.....</i>	<i>157</i>
II. Construction de châssis multivalents pour la reconnaissance d'oligonucléotides	158
A. <i>Conception.....</i>	<i>158</i>
B. <i>Synthèse des motifs diaminotriazines</i>	<i>159</i>
C. <i>Synthèse peptidique</i>	<i>163</i>
III. Conclusion	168
IV. Références	170

I. Contexte

A. Les analogues d'acide nucléique

La synthèse d'analogues de biomolécules présente un grand intérêt en sciences de la santé. De tels composés peuvent être impliqués dans des interactions non-covalentes multivalentes avec des biomolécules naturelles.^[1] Parmi ces biomolécules, la reconnaissance de l'acide désoxyribonucléique présente un grand intérêt tant il est régulièrement impliqué dans des problèmes de santé variés. L'instabilité des oligonucléotides en milieu biologique a conduit à la construction de nouveaux types de biomolécules plus stables, capables de pénétrer la paroi cellulaire, et solubles en milieu intracellulaire. Ces caractéristiques sont nécessaires pour une hybridation efficace et durable avec les acides nucléiques ciblés. Ces analogues d'oligonucléotides fonctionnalisés présentent des capacités de reconnaissance et d'interactions non-covalentes avec la biomolécule naturelle.^[2] Ils peuvent notamment être appliqués à des stratégies antisens.^[3] La chimie combinatoire dynamique a contribué à la découverte de nouveaux analogues d'oligonucléotidiques.^[4] Des analogues de cytosines fonctionnalisées ont été développés depuis quelques années. Ces acides nucléiques modifiés augmentent leur pouvoir complexant par une combinaison des reconnaissances de type Watson-Crick et Hoogsteen.^[5] Parmi ces composés, des cytosines modifiées par un bras fonctionnalisé avec un guanidinium ont montré une amélioration de l'hybridation pour les acides nucléiques par rapport à leur homologue naturel (Figure 1).^[6] Outre la stabilisation des complexes par des liaisons hydrogènes via les appariements Watson-Crick et Hoogsteen, il est à présent connu que les bases interagissent également via les interactions de type π - π .^[7] Cette fonctionnalisation représente un avantage en approche antisens avec une différence de température de fusion (T_m) du double brin atteignant 18°C supplémentaire par rapport à l'acide nucléique non modifié.^[8e]

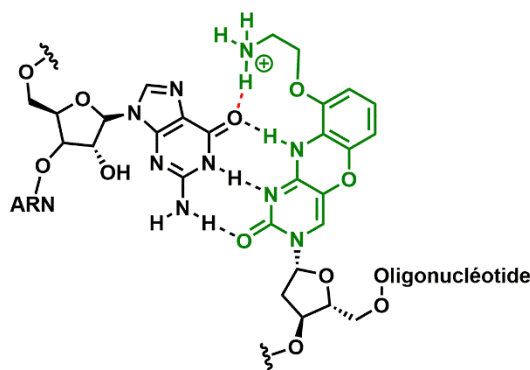


Figure 1. Cytosines modifiées par un groupement guanidinium (en vert) pour renforcer l'interaction avec les guanines nucléotidiques. Avec en rouge la liaison hydrogène créée^[6]

Des châssis peptidiques sont également utilisés comme analogues d'oligonucléotides. Les Peptides d'Acides Nucléiques (PNA) sont des plateformes basées sur une unité de répétition de même longueur que celle des acides nucléiques naturels (Figure 2).^[8] La structure de ces PNA est basée sur une succession d'unité *N*-(2-aminoéthyl)-glycine fonctionnalisées par des bases nucléiques. Les PNA ont une grande adaptabilité de leur conformation comme le prouve leur capacité à créer des duplex, des triplex voir même des quadruplex^[9] à la fois avec d'autres PNA^[10], l'ADN sous sa forme A et B,^[11] ainsi qu'avec l'ARN^[12]. Le complexe ainsi formé est stabilisé par des liaisons hydrogènes entre les biomolécules à la fois par des appariements de Watson-Crick et d'Hoogsteen dans le cas des triplex.^[13]

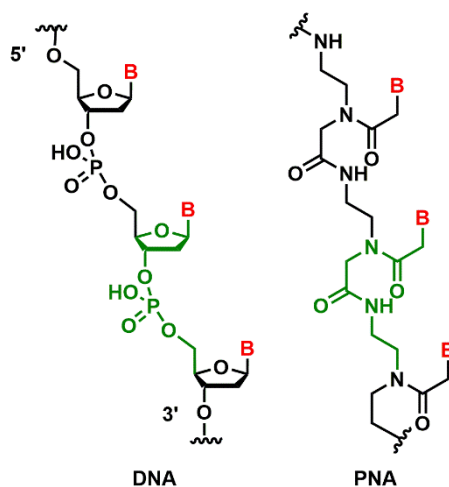


Figure 2. Structures de l'ADN et d'un PNA avec l'unité de répétition en vert constituée de six atomes

Le PNA est classiquement synthétisé sur support solide par création de liaisons amides. Il est possible de fonctionnaliser dans un second temps le squelette PNA en utilisant l'effet template de l'oligonucléotide cible pour créer la biomolécule synthétique (Figure 3).^[14] La fonctionnalisation est possible via la ligation des bases nucléotidiques selon différentes approches : par amination réductrice, utilisant l'approche de chimie combinatoire dynamique et par la formation de liaison amide par acylation des amines du squelette PNA.



Figure 3. Synthèse de PNA par effet template d'acide nucléique

Une approche rationnelle basée sur la fonctionnalisation du châssis PNA est également envisageable pour permettre de développer de nouveaux systèmes.^[15] L'intérêt pourrait être d'apporter de la multivalence aux châssis pour accroître l'hybridation de l'oligonucléotide.

Ces biomolécules synthétiques présentent un grand intérêt pour leur activité antisens. En effet, en se liant à l'acide nucléique, le PNA rend la transcription impossible.^[16] De même, si la cible

est l'ARN, c'est la traduction qui est alors avortée, le ribosome ne peut, en effet, créer la protéine qu'à partir de simple brin (Figure 2).^[3,17]

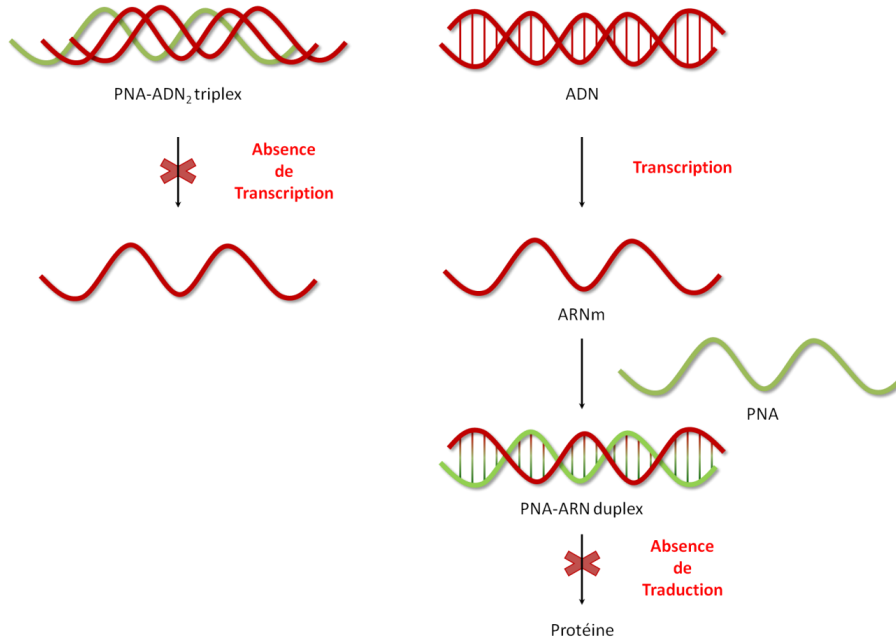


Figure 4. Stratégie antisens des PNA avec l'ADN et l'ARN

Afin d'améliorer l'hybridation avec les oligonucléotides, la structure des PNA a été modifiée pour créer de nouveaux squelettes ou encore développer des analogues de bases nucléiques (Figure 5).^[18] Les groupes cyanuryles, notamment, ont été proposés pour la reconnaissance des thymines car ils présentent un profil donneur-accepteur-donneur de liaisons hydrogènes dans le cas, par exemple, d'une fonctionnalisation pour générer la diaminotriazine.^[19] Ce réactif trichloré est connu pour être facilement et sélectivement fonctionnalisable. Il a pour ces raisons été très largement utilisé comme synthon en chimie organique et supramoléculaire.^[20]

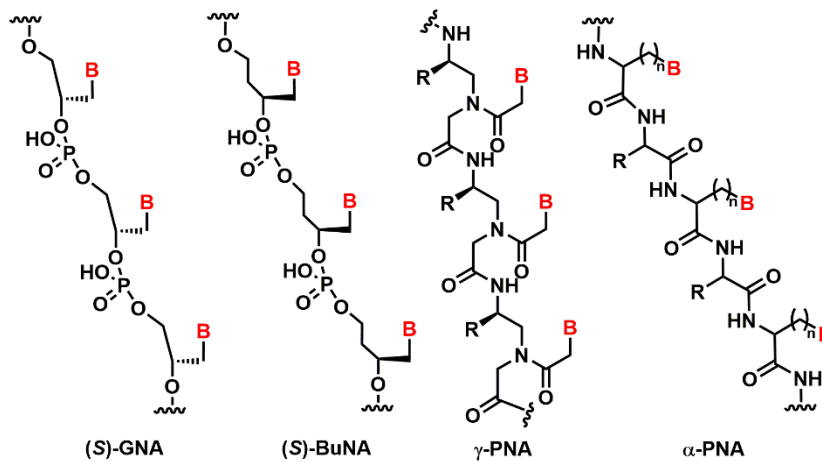


Figure 5. Structures de quelques analogues synthétiques de l'ADN, fonctionnalisés par des bases nucléiques **B**. Avec (S)-GNA pour Glycol Nucleic Acid, (S)-BuNA pour Butyl Nucleic Acid.^[8a,18b,18d,21]

Les α -PNA^[22] sont une classe de PNA basés sur un squelette d'acides aminés α , capables de complexer à la fois l'ADN et l'ARN.^[23] Ces dernières années, il a été démontré que les α -PNA, fonctionnalisés grâce à des diaminotriazines (Figure 6), hybrident l'ARN via un appariement de type Watson-Crick. Les valeurs de T_m mesurées pour des dodécapeptides atteignent 58°C.^[21] Des triplex d'oligothymines- α -PNA fonctionnalisés par des groupements mélamines ont par la suite été étudiés. Le triplex est ainsi obtenu grâce à la capacité de la mélamine à reconnaître les thymines sur ses deux faces.^[24]

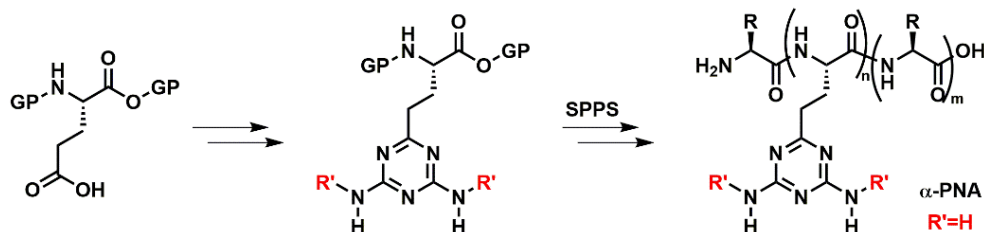


Figure 6. Voie de synthèse précédemment développée pour la synthèse des α -PNA. Avec GP pour les groupes protecteurs

B. Positionnement du projet

La reconnaissance des oligonucléotides nécessitant d'être toujours plus efficace et précise, les α -PNA offrent une large diversité de nouveaux squelettes peptidiques sur la base des acides aminés. L'hybridation d'oligonucléotides est ensuite modélisée par la fonctionnalisation des acides aminés grâce à des groupements présentant une reconnaissance pour les bases nucléotidiques. Ce travail vise à améliorer l'affinité et la sélectivité de l'hybridation des α -PNA en introduisant de la multivalence. Cette approche consiste en la préparation d'acides aminés modifiés par des groupements fonctionnalisés et capables de former des liaisons hydrogènes avec l'acide nucléique (Schéma 1). La multivalence ainsi créée va être utilisée pour augmenter le pouvoir complexant par rapport à de simples bases nucléotidiques.

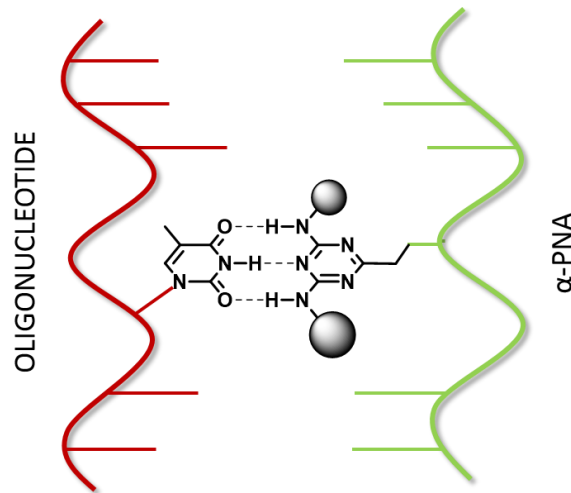


Schéma 1. Représentation schématique de l'hybridation d'une thymine de l'ADN avec l' α -PNA fonctionnalisé d'une diaminotriazine via des liaisons hydrogènes. Avec les sphères grises représentant les groupements fonctionnelles pouvant permettre la formation d'interactions secondaires et générer de la multivalence

II. Construction de châssis multivalents pour la reconnaissance d'oligonucléotides

A. Conception

Dans le but de construire des plate-formes multivalentes appliquées à la reconnaissance d'acides nucléiques, il est proposé ici de fonctionnaliser un acide aminé d'origine naturelle sur sa chaîne latérale alcool par un motif diaminotriazine. Ce groupement *N,N,O*-triazine permet de former trois liaisons hydrogènes avec la thymine^[25] ou un analogue contenant un imide.^[26] Afin d'améliorer l'hybridation de type Watson-Crick entre la base naturelle et le système synthétique, les triazines vont être fonctionnalisées par des amines secondaires pour permettre de générer de la multivalence (Figure 7).

Les monomères d'acide aminé fonctionnalisés sont engagés dans une synthèse peptidique permettant ainsi une approche modulaire. Le nombre et l'organisation des motifs triazines pourra ainsi être modifiés pour générer des homo- ou des hétéro-polymères α -PNA.

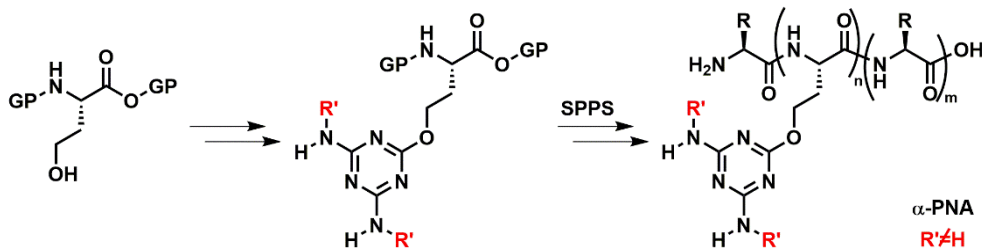


Figure 7. Voie de synthèse proposée pour la préparation d' α -PNA portant des diaminotriazines comme analogues de bases nucléiques. Avec GP pour les groupements protecteurs

B. Synthèse des motifs diaminotriazines

La construction des briques monovalentes est initialisée par la substitution de l'un des trois atomes de chlore du chlorure de cyanuryle par le groupement hydroxyle de la Boc-*L*-sérine-OMe. Le résidu sérine présente l'intérêt de créer un espaceur de deux atomes entre le squelette peptidique et le motif diaminotriazine, tout comme celui de l' α -PNA précédemment décrit et permettant l'hybridation de l'ARN.^[21] La fonctionnalisation de l'acide aminé par le groupement aromatique est réalisée à 0°C pour éviter une seconde substitution de chlorure sur le même groupement triazine. L'étape suivante repose sur la substitution des deux autres atomes de chlore par les amines secondaires et nécessite de maintenir le milieu à reflux en présence de base durant la réaction. Ces conditions se sont révélées trop dures pour le composé chloré qui est dégradé. La triazine est un bon groupement partant et des éliminations électrophiles ont déjà été observées avec cet acide aminé.^[27] Les produits formés lors de cette élimination sont la Boc-déshydroalanine-OMe et le groupement 4,6-dichloro-2-hydroxy-1,3,5-triazine (Figure 8).^[28]

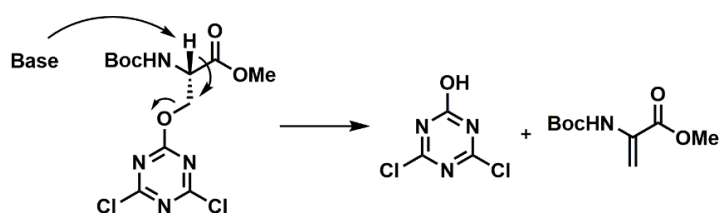


Figure 8. Mécanisme proposé pour la dégradation de la Boc-*L*-sérine-OMe

Dans le but de conserver le motif *N,N,O*-triazine et d'éviter ce mécanisme de β -élimination, le choix de la *L*-homosérine s'est avéré être le plus cohérent. Il permet, en outre, de minimiser les variations de longueur du bras espaceur et son impact sur la complexation avec l'oligonucléotide cible. Il est supposé que ce carbone apportera de la flexibilité au squelette compensant ainsi cette différence de longueur de chaîne.

L'amine α de la *L*-homosérine est dans un premier temps protégée par un groupement *tert*-butoxycarbonyl en condition basique, suivie de la protection du carboxylate par l'iodométhane avant que le produit ne soit isolé par chromatographie sur gel de silice (Figure 9).^[29] Lors de l'analyse RMN ^1H , un ratio molaire 77/23 du mélange **A/B** (méthyl (*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-homoserinate/lactone) est alors observé (Figure 10).

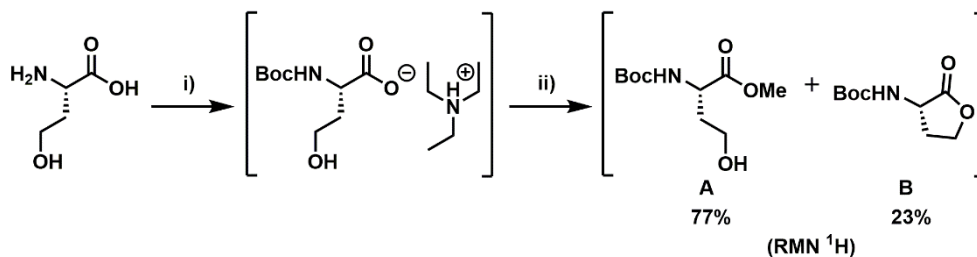


Figure 9. Synthèse du composé méthyl (*tert*-butoxycarbonyl)-*L*-homosérinate **A**. Réactifs et conditions: i) triéthylamine, Boc₂O, acétone/H₂O 1/1, ta; ii) iodométhane, DMF anhydre, 0°C puis reflux.

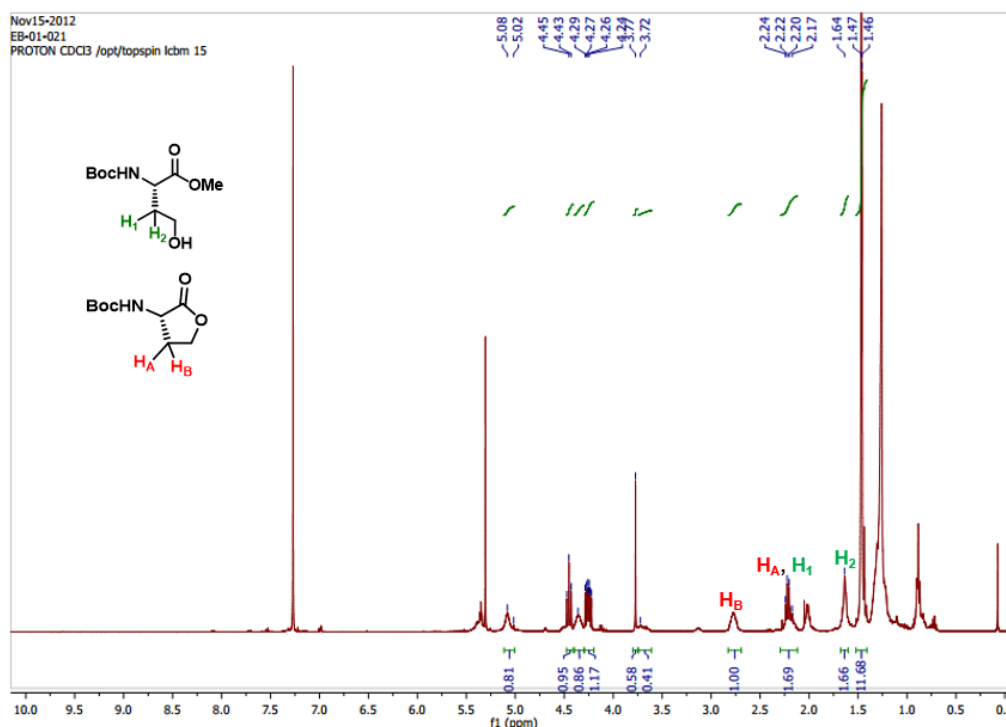


Figure 10. Spectre RMN ¹H du mélange **A/B** (77/23) dans CDCl₃

Il est alors envisagé de protéger le groupement hydroxyle du résidu *L*-homosérine avec du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilane pour éviter la transestérification de l'alcool.^[30] Cette étape est suivie de la protection en milieu basique de l'amine α et de l'acide carboxylique de l'homosérine par du chloroformate de benzyle en une seule étape (Figure 11). Malgré une optimisation réalisée en augmentant le nombre d'équivalents en groupement protecteur, puis par l'utilisation d'alcool benzylique ou de bromure de benzyle, le rendement de cette étape ne dépasse pas les 16% en composé diprotégé après purification par chromatographie sur gel de silice. La protection du groupement hydroxyle est alors abandonnée.

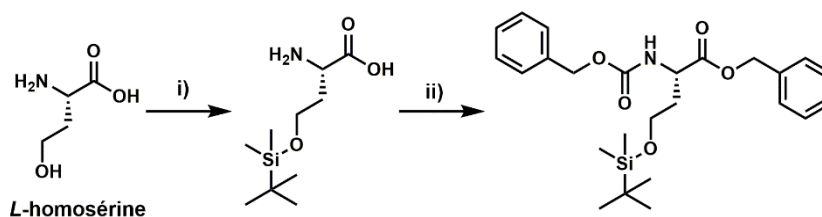


Figure 11. Voie de synthèse proposée pour la protection du groupement hydroxyle de la *L*-homosérine pour éviter la formation de la lactone. Réactifs et conditions : i) TBDMS-Cl, DBU, acétonitrile anh., 82% ; ii) Cbz-Cl, NaHCO₃ 1M, 16%

Les tests d'optimisation se sont alors tournés sur l'ouverture de la lactone.^[31] La *L*-homosérine est protégée par le chloroformate de benzyle au niveau de son amine α puis le mélange brut contenant entre 5 et 25% molaire de lactone est engagé dans une étape d'ouverture de la lactone en condition basique (NaOH) (Figure 12). L'équilibre entre le produit linéaire et la lactone est étroit et la conversion n'est pas complète. Le bromure de benzyle est ensuite ajouté au carboxylate après concentration à sec et le produit diprotégé est obtenu avec un rendement de 54% après purification par colonne sur gel de silice. Cette purification s'avère être difficile car le résiduel de lactone migre de manière quasi similaire au résidu homosérine diprotégé. Un meilleur rendement serait souhaitable puisque ces étapes de protection sont les premières de la voie de synthèse et l'acide aminé est assez onéreux.

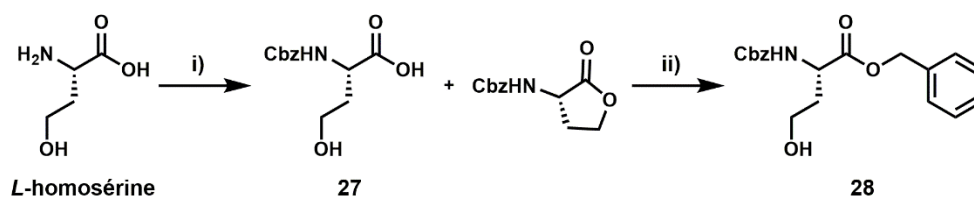


Figure 12. Voie de synthèse proposée pour l'ouverture de la lactone. Réactifs et conditions : i) Cbz-Cl, NaHCO₃ 1M ; ii) a) : NaOH, H₂O, EtOH, b) BnBr, DMF, 54%

Après une étude approfondie des divers tests de protection réalisés au cours de l'optimisation, il a été constaté par chromatographie sur couche mince que la proportion en lactone est augmentée lors de la concentration au rotavapor. Ainsi, des tests de concentration à sec du produit sous vide ont été réalisés dans un bain maintenu à 20°C pour limiter la formation de lactone et obtenir **27** avec un rendement brut de 93%. Les résultats se sont avérés être un réel succès et ont permis d'obtenir le produit diprotégé avec un rendement de 96% de composé **28** pur.

Le premier chlore de la triazine est ensuite substitué par l'hydroxyle de la *L*-homosérine en condition basique à 0°C dans du THF. Il est important de maintenir cette température car si l'on travaille à température ambiante, un second chlore du groupement cyanuryle pourrait être substitué puis le troisième atome dans le cas où l'on travaillerait à reflux (Figure 13).^[20,32]

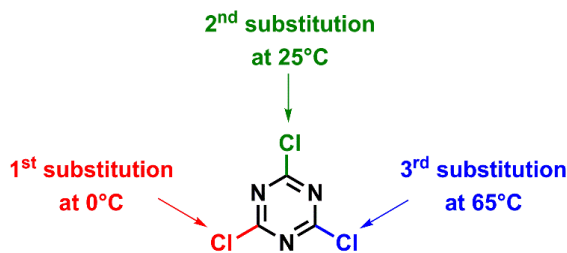


Figure 13. Réactivité différentielle des atomes de chlore de la 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine^[20,32]

Le produit dichloré **29** est alors isolé par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 79%. L'intérêt de cette voie de synthèse est d'être commune aux différents monomères qui pourront être développés en substituant les deux atomes de chlore restant (Figure 14). Au cours de ce travail, une première fonctionnalisation a été réalisée avec un groupement *n*-butylamine et une seconde voie de synthèse a permis la fonctionnalisation de la triazine par le diaminopentane mono-protégé par un groupement trityl **33**.

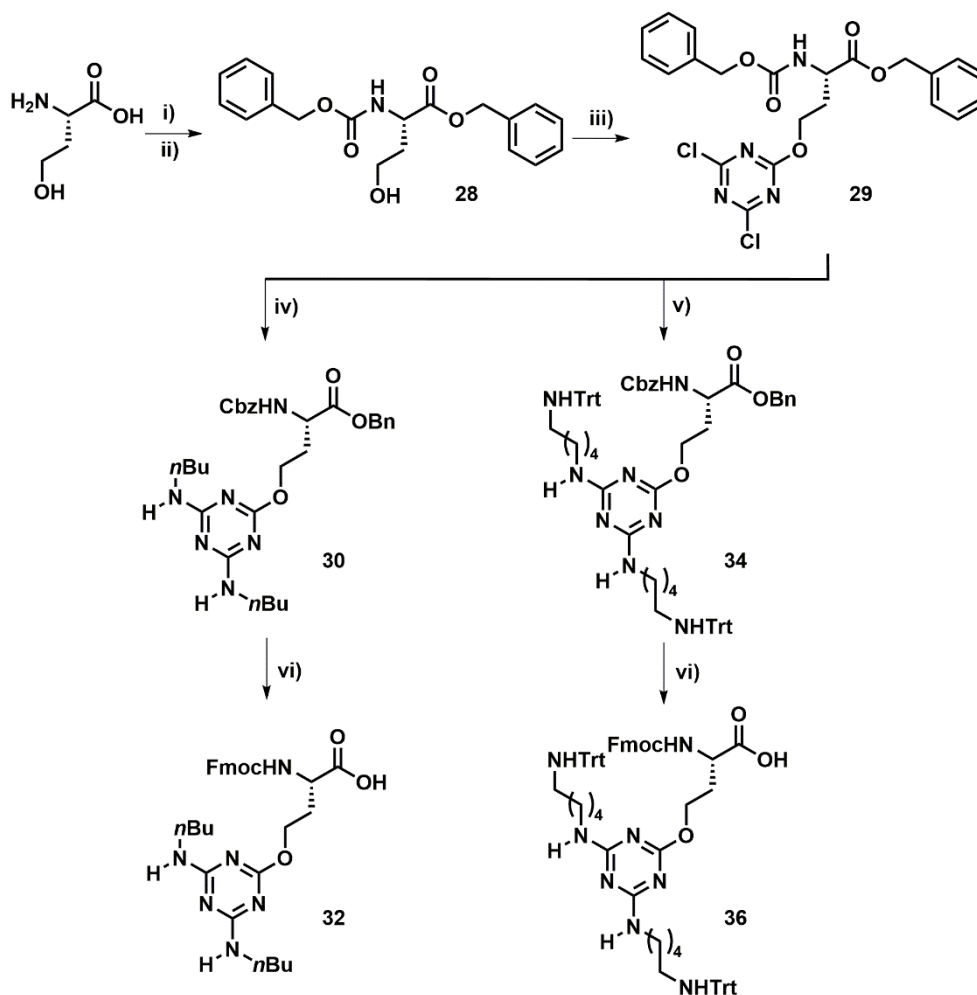


Figure 14. Synthèse des dérivés de *L*-homosérine portant des diaminotriazines fonctionnalisées. Réactifs et conditions : i) Chloroformate de benzyle, NaHCO₃, 93% ; ii) Bromure de benzyl, DIEA, DMF, 96% ; iii) chlorure de cyanuryle, DIEA, THF, 0°C, 79% ; iv) *n*-butylamine, DIEA, THF, reflux, 87% ; v) **33**, DIEA, THF, reflux, 70% ; vi) a) Pd/C, H₂, 93-97% b) *N*-(9-Fluorénylméthoxycarbonyloxy)succinimide, Na₂CO₃, 72-79%.

L'étape de double fonctionnalisation via des réactions de substitution nucléophile est donc réalisée à reflux pour donner les produits **30** et **34** avant la déprotection de l'amine α et de l'acide carboxylique en conditions anhydres (Figure 15).^[21]

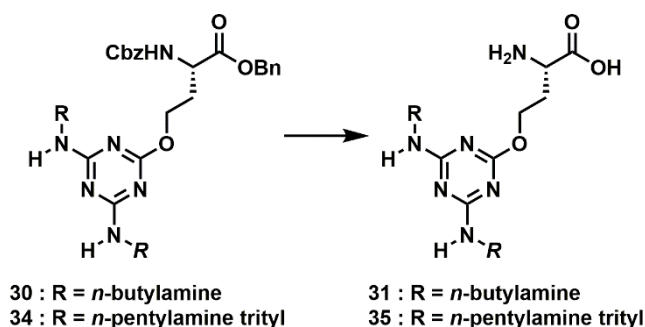


Figure 15. Déprotection de l'amine α et de l'acide carboxylique de la *L*-homosérine fonctionnalisée. Réactifs et conditions : Pd/C, H₂, MeOH, 93-97%

L'amine libre est ensuite protégée par un groupement Fmoc à partir du réactif Fmoc-OSu pour obtenir le monomère final qui va être engagé dans la synthèse peptidique.^[33] Cette étape a nécessité une optimisation car les essais initiaux basés sur une protection avec le chlorure de fluorénylméthoxycarbonyl, ont permis de synthétiser **32** et **36** avec un rendement faible compris entre 10 et 40% seulement (Figure 14).

Les acides aminés modifiés **32** et **36** sont ainsi préparés en six étapes avec un rendement global compris entre 43 et 47%. Cette voie de synthèse offre la possibilité de fonctionnaliser la triazine avec des amines de natures variées et de moduler la gamme des futurs α -PNAs.

C. Synthèse peptidique

Les motifs diaminotriazines monovalents préparés précédemment sont engagés dans la synthèse peptidique de plate-formes α -PNAs fonctionnalisés. L'acide aminé **32** est sélectionné pour la préparation d'un peptide alternant avec le résidu *L*-aspartate ou la *L*-alanine pour former respectivement l' α -PNA **Asp-Triaz** et l' α -PNA **Ala-Triaz** ou encore pour la préparation d'homopeptides α -PNA **Triaz-Triaz** (Figure 16). Les α -PNA alternés sont connus pour adopter une structure secondaire favorable à l'hybridation d'oligothymines.^[21] L'aspartate est notamment envisagé pour améliorer la solubilité du peptide en milieu aqueux.

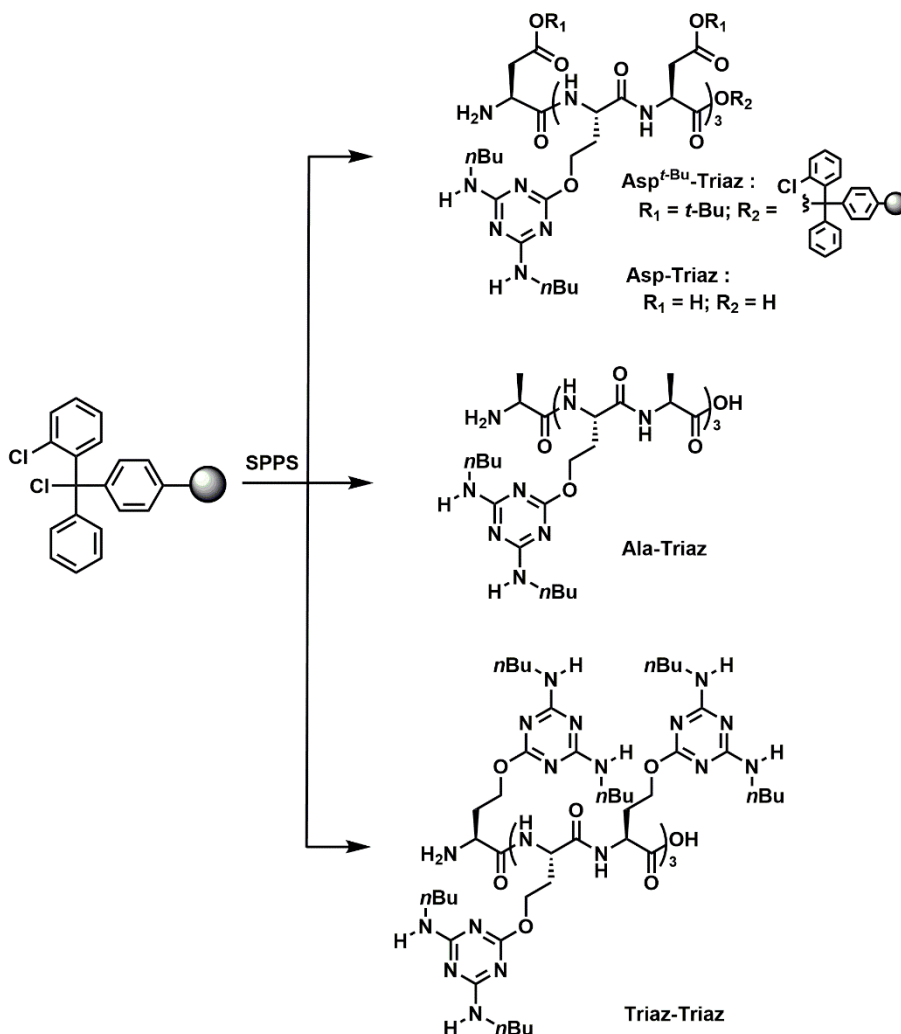


Figure 16. Synthèse des α -PNA alternés (α -PNA **Asp-Triaz**, **Ala-Triaz**) et homopeptide (**Triaz-Triaz**) par synthèse peptidique sur support solide (SPPS) sur une résine de chlorure de 2-chlorotrityle

Les α -PNAs sont préparés sur support solide par synthèse manuelle en utilisant une résine de chlorure de 2-chlorotrityle.^[34] Les rendements de chacun des couplages peptidiques sont calculés à partir de la valeur d'absorbance UV mesurée à 301 nm après déprotection du groupement Fmoc.^[35] Des optimisations des conditions de synthèse ont été réalisées sur la préparation de l' α -PNA **Asp-Triaz**. Les premiers tests ont été effectués dans le DMF avec HBTU en tant qu'agent de couplage et les rendements d'étapes obtenus atteignaient 40 à 70% (Figure 17, condition 1). Etant inacceptable pour la première étape, l'acide aminé qui va être couplé, est pré-activé avec l'agent de couplage durant une période d'environ 20 minutes (Figure 17, condition 2). Une légère augmentation du rendement est observée et les conditions mises au point sur ce test sont conservées. Le remplacement de l'agent de couplage HBTU par l'HATU a permis d'atteindre un rendement compris entre 70 et 80% (Figure 17, condition 3). Il faut noter qu'un rendement d'étape de 80% peut être très acceptable pour une réaction isolée, mais dans le cas d'une synthèse peptidique avec cinq couplages, le rendement global obtenu pour la synthèse ne peut alors pas dépasser les 33%. Les dernières optimisations sont

réalisées en remplaçant le DMF par un mélange NMP/DMF (4/1) pour atteindre des rendements par étape, supérieurs à 95% (Figure 17, condition 4). Suite aux divers tests effectués, les conditions retenues pour la synthèse peptidique des α -PNAs permettent d'atteindre 70% de rendement global sur cinq étapes alors que seulement 10% était obtenu dans les conditions initiales (Figure 18).

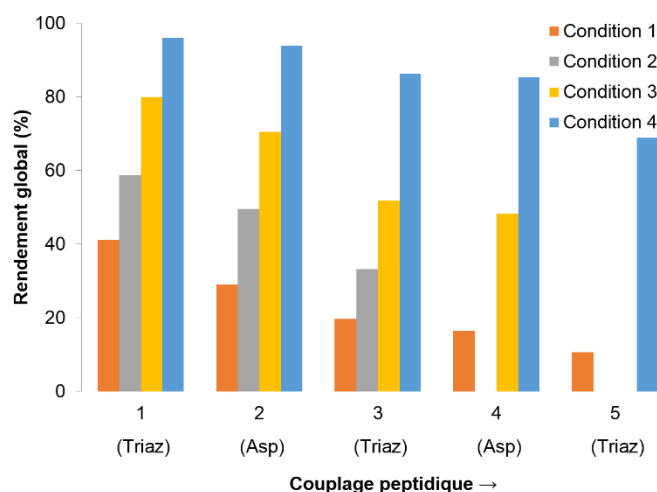


Figure 17. Optimisation des procédures de synthèse peptidique sur chaque étape pour préparer l' α -PNA alterné (**Asp-Triaz**). Condition 1 : HBTU, DMF ; Condition 2 : HBTU, DMF, pré-activation et double couplage ; Condition 3 : HATU, DMF, pré-activation et double couplage ; Condition 4 : HATU, NMP/DMF, pré-activation et double couplage

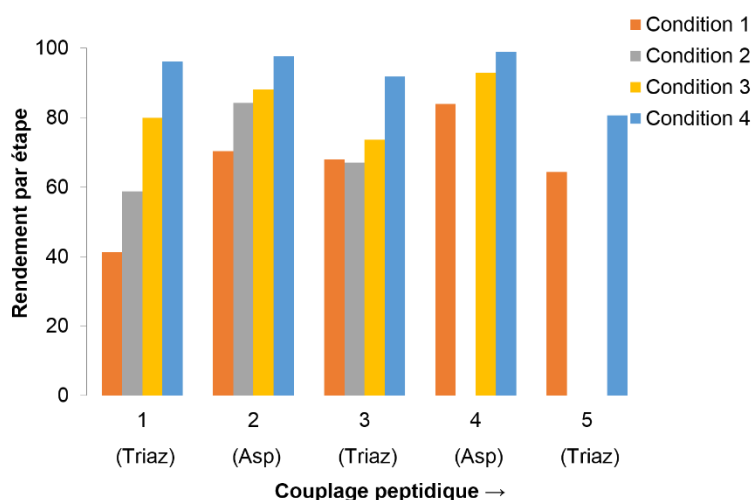


Figure 18. Optimisation des procédures de synthèse peptidique pour préparer l' α -PNA alterné (**Asp-Triaz**) sur le rendement global. Condition 1 : HBTU, DMF ; condition 2 : HBTU, DMF, pré-activation et double couplage ; condition 3 : HATU, DMF, pré-activation et double couplage ; condition 4 : HATU, NMP/DMF, pré-activation et double couplage

Ainsi, l' α -PNA **Asp-Triaz** et l' α -PNA **Ala-Triaz** ou encore l'homopeptide α -PNA **Triaz-Triaz** sont préparés selon les conditions définis. Malgré des rendements très convenables lors des étapes de couplage de l' α -PNA **Asp-Triaz**, le clivage de la résine et la déprotection de l' α -PNA

Asp^{t-Bu}-Triaz ne permettent pas d'aboutir au composé attendu. La formation du produit déprotégé est observée par analyse LC-MS mais il est rapidement dégradé en présence de la solution de clivage TFA/CH₂Cl₂. L'origine de la dégradation pourrait s'expliquer par la formation de l'aspartimide qui a déjà été rapportée dans le cas de séquences peptidiques riches en résidus aspartates (Figure 19).^[36]

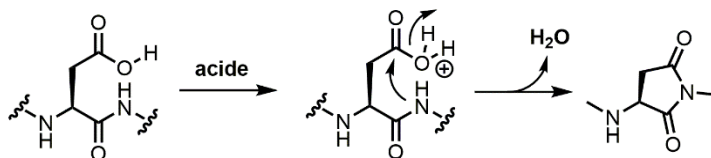


Figure 19. Mécanisme de formation de l'aspartimide

Diverses tentatives d'optimisations ont été envisagées. La réduction de la proportion en TFA dans la solution de déprotection et de clivage a été testée dans un premier temps (Figure 20). Ces premiers tests ont été effectués sur le 5-mer du dérivé protégé en utilisant une solution de TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5) (Figure 20A). La conversion complète est observée pour former le produit attendu (■) éluant à 3,0 min ainsi qu'un composé secondaire majoritaire à la longueur d'onde de 214 nm avec un temps de rétention de 2,7 min, donc plus hydrophile. Il a ensuite été envisagé de réduire les proportions en acide en testant des mélanges jusqu'à 1/99 (TFA/CH₂Cl₂). L'apparition d'un autre produit est alors observée à 1,8 min et la proportion en acide devient trop faible pour la déprotection des chaînes latérales carboxylées des aspartates.

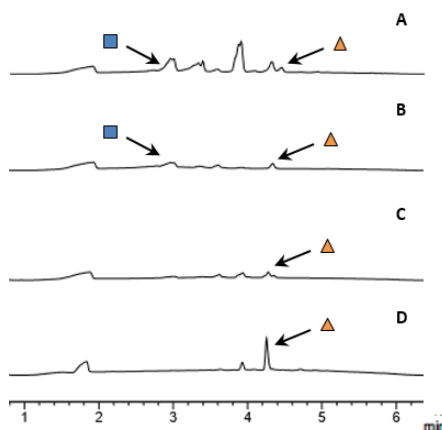


Figure 20. Chromatogrammes HPLC (Méthode E) des essais d'optimisation de l'étape de déprotection du 5-mer du Fmoc- α -PNA Asp^{t-Bu}-Triaz (▲) en Fmoc- α -PNA **Asp-Triaz** (■). Conditions de bas en haut : A : TFA/TIS/H₂O (95/2,5/2,5) ; B : TFA/CH₂Cl₂ (50/50) ; C : TFA/CH₂Cl₂ (10/90) ; D : TFA/CH₂Cl₂ (1/99)

Il a alors été envisagé de poursuivre les investigations en faisant varier la température pour l'abaisser jusqu'à 0°C en suivant l'évolution du système au cours du temps par suivi HPLC (Figure 21). Cette étude, réalisée sur le 6-mer de l' α -PNA **Asp-Triaz** avec l'amine α libre, a permis de montrer que 10 minutes à température ambiante sont indispensables pour observer

le produit recherché alors qu'il n'apparaît qu'après 30 minutes lorsque la température est abaissée à 0°C. Après 30 minutes de déprotection à température ambiante, le produit totalement déprotégé est majoritaire à 3,8 min, mais déjà des produits secondaires apparaissent. L'abaissement de la température ralentit la déprotection et des intermédiaires restent présents après 1 h de réaction. La diminution de la température ne permet donc pas de sélectivement favoriser la déprotection du peptide en évitant la formation des composés indésirables.

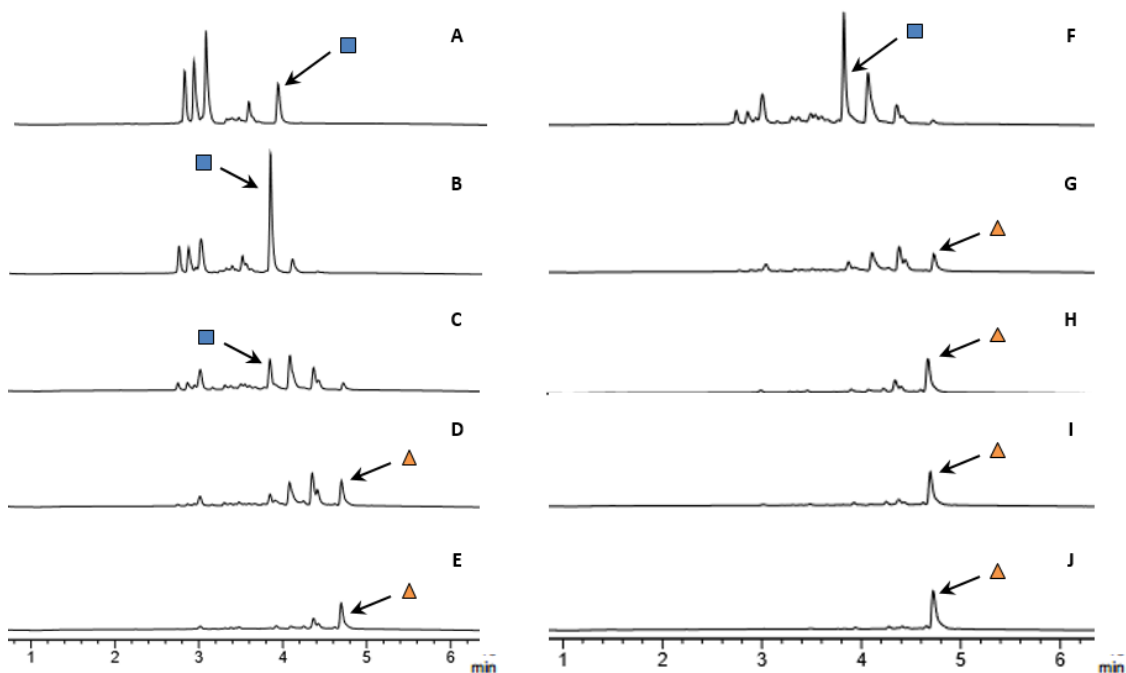


Figure 21. Etude HPLC (Méthode E) des tests d'optimisation de l'étape de déprotection du 6-mer de l' α -PNA Asp^{Bu}-Triaz (▲) en α -PNA Asp-Triaz à différentes températures (■). Conditions : TFA/CH₂Cl₂ (95/5) à température ambiante (gauche) durant A : 1 h; B: 30 min; 10 min; 5 min; 2 min ou à 0°C (droite) pour F : 1 h; G : 30 min; H : 10 min; I : 5 min; J : 2 min

Pour finir, il a été envisagé de modifier la nature même de l'acide en testant l'acide formique (pKa = 3,7) au lieu de l'acide trifluoroacétique (pKa = 0,3) (Figure 22). Une analyse LCMS après 30 minutes montre que la durée est insuffisante pour consommer le réactif. Après 18 h, le produit totalement déprotégé est majoritaire lors de l'analyse du milieu réactionnel pour un mélange 1/1 d'acide formique/CH₂Cl₂ ou 100% d'acide formique, mais il reste des intermédiaires de déprotection après ce long temps de réaction.

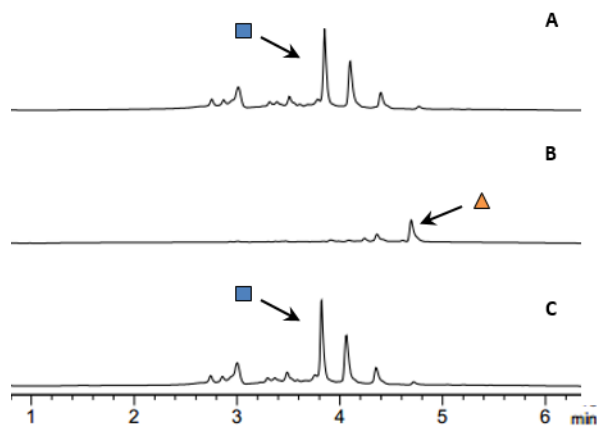


Figure 22. Chromatogrammes HPLC (Méthode E) des essais d'optimisation de l'étape de déprotection du 6-mer de l' α -PNA Asp^{t-Bu}-Triaz (▲) en α -PNA Asp-Triaz (■) avec l'acide formique. Conditions : Acide formique après A : 18 h; B : 30 min; Acide formique/CH₂Cl₂ après C : 18 h

Afin de compléter les essais de déprotection sur les peptides, des tests de stabilité des acides aminés modifiés ont alors été réalisés visant à étudier s'ils résistaient ou non aux conditions de clivage et de déprotection. Les expériences ont été réalisées en faisant varier les proportions en acide trifluoroacétique (95% à 10%) et la nature du co-solvant (TIS, H₂O, CH₂Cl₂) puis les milieux ont été analysés par LCMS indiquant la stabilité des résidus.

En se basant sur l'hypothèse de formation de l'aspartimide, le résidu alternant avec les homosérines modifiées est donc remplacé par la Fmoc-L-alanine ou le résidu homosérine **32** à la place du résidu Fmoc-L-Asp^{t-Bu}. L'hypothèse de formation de l'aspartimide est alors renforcée par le fait que l' α -PNA **Ala-Triaz** et l'homopeptide α -PNA **Triaz-Triaz** sont beaucoup plus robustes aux conditions de clivage et notamment au traitement acide. Les peptides sont alors clivés avec la solution habituelle de TFA/CH₂Cl₂ 95/5 puis purifiés par HPLC semi-préparative sur phase inverse pour donner les α -PNA **Ala-Triaz** et α -PNA **Triaz-Triaz** avec des rendements globaux isolés de 10% et 28% respectivement.^[37]

III. Conclusion

Ce travail a décrit la conception et la synthèse de dérivés de la L-homosérine portant un motif N,N,O-diaminotriazine, lui-même fonctionnalisé, dans le but de créer des sites potentiels de reconnaissance multivalente pour les acides nucléiques. Ces composés ont ainsi été préparés avec un rendement global sur les six étapes de synthèse atteignant les 45%. Il a été démontré que ces résidus d'acides aminés modifiés peuvent ensuite être engagés dans la synthèse manuelle sur support solide d' α -PNA pour créer des peptides homopolymères α -PNA **Triaz-Triaz** ou encore des peptides alternés comme l' α -PNA **Ala-Triaz**. Les bras aminés fonctionnalisant le groupement triazine vise à augmenter le pouvoir complexant de cet analogue d'oligonucléotides connu pour son hybridation avec la base nucléique naturelle

thymine. Le développement de ces nouveaux châssis ouvre sur la possibilité d'améliorer les capacités d'hybridation de ces systèmes synthétiques pour créer une reconnaissance non-covalente multivalente. Pour atteindre cet objectif, un travail d'optimisation de la synthèse est nécessaire. Le choix de bras fonctionnels et leur fixation sur les châssis peptidiques sera également indispensable pour aboutir à la construction de puissants systèmes de reconnaissance d'acides nucléiques.

IV. Références

- [1] Ligand binding to nucleic acids and proteins: Does selectivity increase with strength?, H.-J. Schneider, *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, *43*, 2307-2315.
- [2] 2'-O-Appended Polyamines that Increase Triple-Helix-Forming Oligonucleotide Affinity are Selected by Dynamic Combinatorial Chemistry, L. Azéma, K. Bathany, B. Rayner *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 2513-2516.
- [3] Designing Chemically Modified Oligonucleotides for Targeted Gene Silencing, Glen F. Deleavey, Masad J. Damha, *Chem. Biol.*, *19*, 937-954.
- [4] Probing secondary interactions in biomolecular recognition by dynamic combinatorial chemistry, S. Ulrich, P. Dumy, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 5810-5825.
- [5] a) Combined nucleobase and backbone modifications enhance DNA duplex stability and preserve biocompatibility, A. H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, 253-259; b) Fluorescence and Hybridization Properties of Peptide Nucleic Acid Containing a Substituted Phenylpyrrolocytosine Designed to Engage Guanine with an Additional H-Bond, F. Wojciechowski, R. H. E. Hudson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 12574-12575; c) Structure-Function Studies on a Synthetic Guanosine Receptor That Simultaneously Binds Watson-Crick and Hoogsteen Sites, J. R. Quinn, S. C. Zimmerman, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 7459-7467; d) Direct Observation of a Cytosine Analogue that Forms Five Hydrogen Bonds to Guanosine: Guanidino G-Clamp, C. J. Wilds, M. A. Maier, V. Tereshko, M. Manoharan, M. Egli, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 115-117; e) A Cytosine Analogue Capable of Clamp-Like Binding to a Guanine in Helical Nucleic Acids, K.-Y. Lin, M. D. Matteucci, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 8531-8532.
- [6] A cytosine analog that confers enhanced potency to antisense oligonucleotides, W. M. Flanagan, J. J. Wolf, P. Olson, D. Grant, K.-Y. Lin, R. W. Wagner, M. D. Matteucci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 3513-3518.
- [7] Replacing the Nucleobases in DNA with Designer Molecules, E. T. Kool, *Acc. Chem. Res.*, **2002**, *35*, 936-943.
- [8] a) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide, P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, *Science*, **1991**, *254*, 1497-1500; b) Peptide Nucleic Acid. A Molecule with Two Identities, P. E. Nielsen, *Acc. Chem. Res.*, **1999**, *32*, 624-630.
- [9] Formation of a PNA₂-DNA₂ Hybrid Quadruplex, B. Datta, C. Schmitt, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 4111-4118.
- [10] Quadruplex Formation by a Guanine-Rich PNA Oligomer, B. Datta, M. E. Bier, S. Roy, B. A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 4199-4207.
- [11] Solution structure of a peptide nucleic acid-DNA duplex, M. Eriksson, P. E. Nielsen, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **1996**, *3*, 410-413.
- [12] Triple-Helical Recognition of RNA Using 2-Aminopyridine-Modified PNA at Physiologically Relevant Conditions, T. Zengeya, P. Gupta, E. Rozners, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 12593-12596.
- [13] a) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature*, **1993**, *365*, 566-568; b) Peptide Nucleic Acids (PNAs) Containing Thymine Monomers Derived from Chiral Amino Acids: Hybridization and Solubility Properties of D-Lysine PNA, P. E. Nielsen, G. Haaïma, A. Lohse, O. Buchardt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 1939-1942; c) A Nucleic Acid Triple Helix Formed by a Peptide Nucleic Acid-DNA Complex, L. Betts, J. A. Josey, J. M. Veal, S. R. Jordan, *Science*, **1995**, *270*, 1838-1841.
- [14] Templated Synthesis of Peptide Nucleic Acids via Sequence-Selective Base-Filling Reactions, J. M. Heemstra, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 11347-11349.
- [15] Modulating the Hybridization Property of PNA with a Peptoid-Like Side Chain, X.-W. Lu, Y. Zeng, C.-F. Liu, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 2329-2332.
- [16] a) Specific and nonspecific inhibition of transcription by DNA, PNA, and phosphorothioate promoter analog duplexes, S. E. Hamilton, M. Iyer, J. C. Norton, D. R. Corey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, *6*, 2897-2900; b) Extending Recognition by Peptide Nucleic Acids (PNAs): Binding to Duplex DNA and Inhibition of Transcription by Tail-Clamp PNA-Peptide Conjugates, K. Kaihatsu, R. H. Shah, X. Zhao, D. R. Corey, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 13996-14003; c) Subnanomolar antisense activity of phosphonate-peptide nucleic acid (PNA) conjugates delivered by cationic lipids to HeLa cells, T. Shiraishi, R. Hamzavi, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.*, **2008**, *36*, 4424-4432; d) Nanomolar Cellular Antisense Activity of Peptide Nucleic Acid (PNA) Cholic Acid ("Umbrella") and Cholesterol Conjugates Delivered by Cationic Lipids, T. Shiraishi, P. E. Nielsen, *Bioconjug. Chem.*, **2012**, *23*, 196-202.
- [17] a) Antisense PNA tridecamers targeted to the coding region of ha-ras mRNA arrest polypeptide chain elongation, N. Dias, S. Dheur, P. E. Nielsen, S. Gryaznov, A. Van Aerschot, P. Herdewijn, C. Hélène, T. E. Saison-Behmoaras, *J. Mol. Biol.*, **1999**, *294*, 403-416; b) RNA Hairpin Invasion and Ribosome Elongation Arrest by Mixed Base PNA Oligomer, N. Dias, C. Sénamaud-Beaufort, E. I. Forestier, C. Auvin, C. Hélène, T. Ester Saison-Behmoaras, *J. Mol. Biol.*, **2002**, *320*, 489-501.
- [18] a) Peptide-based nucleic acid surrogates incorporating ser[CH₂B]-gly subunits, P. Garner, J. U. Yoo, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 1275-1278; b) A Simple Cytosine to G-Clamp Nucleobase Substitution Enables Chiral γ -PNAs to Invade Mixed-Sequence Double-Helical B-form DNA, V. Chenna, S. Rapireddy, B. Sahu, C. Ausin, E. Pedroso, D. H. Ly, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 2388-2391; c) DyNAs: Constitutional Dynamic Nucleic Acid Analogues, N. Sreenivasachary, D. T. Hickman, D. Sarazin, J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 8581-

- 8588; d) Design, synthesis, biophysical and primer extension studies of novel acyclic butyl nucleic acid (BuNA), V. Kumar, K. R. Gore, P. I. Pradeepkumar, V. Kesavan, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 5853-5865; e) Base-Pairing Properties of a Structural Isomer of Glycerol Nucleic Acid, P. Karri, V. Punna, K. Kim, R. Krishnamurthy, *Angew. Chem.*, **2013**, *125*, 5952-5956; f) Self-Assembling Sequence-Adaptive Peptide Nucleic Acids, Y. Ura, J. M. Beierle, L. J. Leman, L. E. Orgel, M. R. Ghadiri, *Science*, **2009**, *325*, 73-77.
- [19] a) Cyanuryl peptide nucleic acid: synthesis and DNA complexation properties, R. Vysabhatar, K. N. Ganesh, *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 1314-1318; b) Computational Insights into the Interactions between DNA and siRNA with "Rigid" and "Flexible" Triazine Dendrimers, G. M. Pavan, M. A. Mintzer, E. E. Simanek, O. M. Merkel, T. Kissel, A. Danani, *Biomacromolecules*, **2010**, *11*, 721-730; c) Synthesis, structural determination and dynamic behavior of 2-chloro-4,6-bis(pyrazolylamino)-1,3,5-triazines, A. Diaz-Ortiz, J. Elguero, C. Foces-Foces, A. d. I. Hoz, A. Moreno, S. Moreno, A. Sanchez-Migallon, G. Valiente, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 4451-4457.
- [20] 1,3,5-Triazine-Based Synthons in Supramolecular Chemistry, P. Gamez, J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, *2006*, 29-42.
- [21] Mapping the Landscape of Potentially Primordial Informational Oligomers: Oligodipeptides and Oligodipeptoids Tagged with Triazines as Recognition Elements, G. K. Mittapalli, K. R. Reddy, H. Xiong, O. Munoz, B. Han, F. De Riccardis, R. Krishnamurthy, A. Eschenmoser, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 2470-2477.
- [22] a) α -PNA: A Novel Peptide Nucleic Acid Analogue of DNA, N. M. Howarth, L. P. G. Wakelin, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 5441-5450; b) The α -Helical Peptide Nucleic Acid Concept: Merger of Peptide Secondary Structure and Codified Nucleic Acid Recognition, Y. Huang, S. Dey, X. Zhang, F. Sönnichsen, P. Garner, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 4626-4640.
- [23] α -Helical Peptide Nucleic Acids (α PNAs): A New Paradigm for DNA-Binding Molecules, P. Garner, S. Dey, Y. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 2405-2406.
- [24] Discrete Assembly of Synthetic Peptide–DNA Triplex Structures from Polyvalent Melamine–Thymine Bifacial Recognition, Y. Zeng, Y. Pratumyot, X. Piao, D. Bong, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 832-835.
- [25] a) Synthesis of Novel Homo-N-Nucleoside Analogs Composed of a Homo-1,4-Dioxane Sugar Analog and Substituted 1,3,5-Triazine Base Equivalents, Q. Yu, D. Schwidom, A. Exner, P. Carlsen, *Molecules*, **2008**, *13*, 3092; b) Combinatorial synthesis of galactosyl-1,3,5-triazines as novel nucleoside analogues, S. Wang, W. S. Lee, H.-H. Ha, Y.-T. Chang, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 6924-6926; c) Imprinted polymer layer for recognizing double-stranded DNA, O. Slinchenko, A. Rachkov, H. Miyachi, M. Ogiso, N. Minoura, *Biosens. Bioelectron.*, **2004**, *20*, 1091-1097.
- [26] a) A New Series of Dendrimers Containing Two Ferrocenyl Units and a Fréchet Dendron around a Triazine Nucleus, D. Xu, W. Wang, D. Gesua, A. E. Kaifer, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 4517-4520; b) Controlling allostery using redox chemistry, M. H. Al-Sayah, N. R. Branda, *Chem. Commun.*, **2002**, 178-179.
- [27] Efficient Mitsunobu Reactions with N-Phenylfluorenyl or N-Trityl Serine Esters, R. J. Cherney, L. Wang, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 2544-2546.
- [28] Master thesis, R. Noël, **2012**.
- [29] Cyclic hydroxamates, especially multiply substituted [1,2]oxazinan-3-ones, S. Wolfe, M.-C. Wilson, M.-H. Cheng, G. V. Shustov, C. I. Akuche, *Can. J. Chem.*, **2003**, *81*, 937-960.
- [30] a) Potent, Novel in Vitro Inhibitors of the Pseudomonas aeruginosa Deacetylase LpxC, T. Kline, N. H. Andersen, E. A. Harwood, J. Bowman, A. Malanda, S. Endsley, A. L. Erwin, M. Doyle, S. Fong, A. L. Harris, B. Mendelsohn, K. Mdluli, C. R. H. Raetz, C. K. Stover, P. R. Witte, A. Yabannavar, S. Zhu, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 3112-3129; b) Synthesis of a Serine-Based Neuraminic Acid C-Glycoside, Q. Wang, R. J. Linhardt, *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 2668-2672.
- [31] a) Synthesis of L-canaline and γ -functional 2-aminobutyric acid derivatives, A. J. Ozinskas, G. A. Rosenthal, *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 5047-5050; b) Synthesis of D,L- γ -hydroxyphosphinothricin, a potent new inhibitor of glutamine synthetase, D. M. Walker, J. F. McDonald, E. W. Logusch, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 1710-1711.
- [32] Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis, G. Blotny, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 9507-9522.
- [33] Synthesis of fluorescein-labelled O-mannosylated peptides as components for synthetic vaccines: comparison of two synthetic strategies, M. A. Brimble, R. Kowalczyk, P. W. R. Harris, P. R. Dunbar, V. J. Muir, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 112-121.
- [34] Modular Nucleic Acid Surrogates. Solid Phase Synthesis of α -Helical Peptide Nucleic Acids (α PNAs), P. Garner, S. Dey, Y. Huang, X. Zhang, *Org. Lett.*, **1999**, *1*, 403-406.
- [35] Solid-phase reaction monitoring—Chemical derivatization and off-bead analysis, C. Kay, O. E. Lorthioir, N. J. Parr, M. Congreve, S. C. McKeown, J. J. Scicinski, S. V. Ley, *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, *71*, 110-118.
- [36] Aspartimide formation in peptide chemistry: occurrence, prevention strategies and the role of N-hydroxylamines, R. Subirós-Funosas, A. El-Faham, F. Albericio, *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 8595-8606.
- [37] Synthesis of α -PNA containing a functionalized triazine as nucleobase analogue, E. Bartolami, A. Gilles, P. Dumy, S. Ulrich, *Tetrahedron Lett.*, **2015**, *56*, 2319-2323.

Chapitre 6

***Auto-assemblage de cages peptidiques
par ligations click***

Chapitre 6 : Auto-assemblage de cages peptidiques par ligations click

I. Contexte.....	174
A. Cages	174
1. Matériaux poreux	174
2. Cages Moléculaires.....	175
B. Cages assemblées à partir de macromolécules biologiques	177
C. Cages formées à partir d'ADN	177
D. Cages formées à partir de peptides	178
E. Positionnement du projet	179
II. Synthèse des espaceurs et des peptides cycliques	180
A. Conception.....	180
B. Synthèse des peptides cycliques (RAFT).....	180
1. RAFT non modifiés.....	180
2. RAFT modifiés	180
C. Préparation des espaceurs	181
1. Synthèse des espaceurs oxyamine-hydrazides.....	181
2. Synthèse des espaceurs thiol-hydrazides	182
III. Formation d'une cage peptidique par amination réductrice	183
IV. Cage oxazolidine	184
V. Cage acylhydrazone - oxime	185
VI. Cage pont disulfure - acylhydrazone	189
VII. Cage acylhydrazone - thiol-maléimide.....	191
A. Synthèse séquentielle	192
B. Ligations simultanées.....	197
VIII. Conclusion.....	199
IX. Références.....	201

I. Contexte

A. Cages

Les cages sont des systèmes semi-clos tridimensionnels. Ils permettent d'encapsuler et de délivrer des principes actifs. Les cages définissent un environnement avec une cavité. Les propriétés de cet espace restreint sont différentes de celles du milieu environnant. Les cages sont utilisées pour des applications vastes, outre l'encapsulation, elles sont impliquées dans la catalyse *in situ*,^[1] le transport de biomolécules ou encore la protection de systèmes instables.^[2]

1. Matériaux poreux

Certaines de ces cages se forment autour de métaux en créant des liaisons de coordinations dynamiques.^[3] Ces matériaux poreux, fortement ordonnés, sont générés grâce à l'assemblage de ligands organiques rigides, liés entre eux par des métaux (Figure 1). La taille et l'environnement chimique de cette cavité sont dépendants de la nature et de la longueur de ces molécules organiques.^[4] Ces matériaux appartiennent à la famille des MOF pour "Metal-Organic Framework".^[5] Des liaisons faibles de type hydrogène ou encore des interactions π - π sont présentes pour consolider l'édifice. Les liaisons et le quadrillage ainsi créés vont induire différentes possibilités structurales des pores : des sites ponctuels formant des cavités (0D),^[6] des voies transversales (1D),^[7] des couches (2D)^[8] ou encore des réseaux de voies interconnectées dans les trois dimensions de l'espace^[9]. Certains systèmes sont même instables en l'absence de leur cible et nécessitent un ligand pour s'organiser.^[10] Les MOF possèdent diverses propriétés selon la taille des pores telles que la capacité de stockage et d'adsorption des gaz,^[11] d'échanges ou encore de transformations organiques^{[12],[13]} Certains d'entre eux sont capables de piéger des molécules de CO₂. Ces composés présentent alors un intérêt grandissant du point de vue environnemental.^[14]

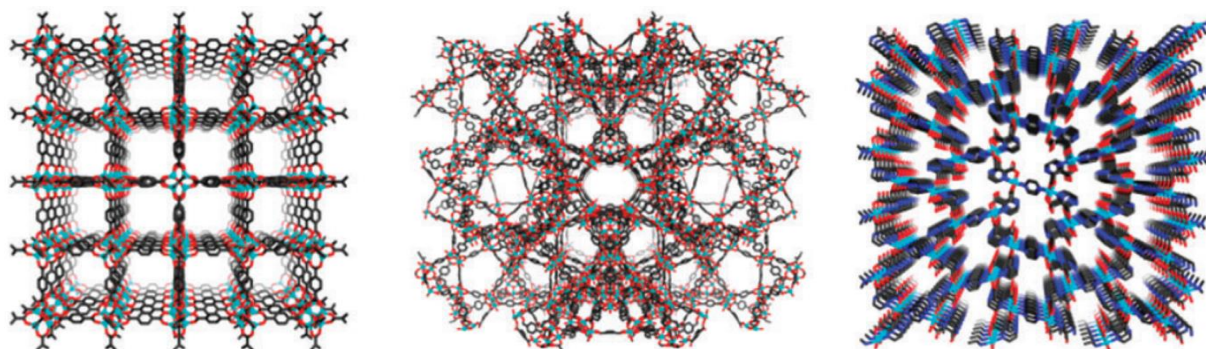


Figure 1. Représentation de structures de MOF^[11]

2. Cages Moléculaires

En parallèle des MOF, des cages moléculaires ont également été développées. En 2013, par exemple, un tétraèdre formé par la coordination d'imines aromatiques avec des atomes de Fe^{II} a permis de générer une cavité offrant un volume supérieur à 950 \AA^3 . La cage est ainsi capable d'accueillir un fullerène et le système peut absorber la lumière UV-visible.^[15] Les cages moléculaires synthétisées via des liaisons covalentes sont peu répandues. En effet, la contrainte d'irréversibilité de la plupart des liaisons covalentes entraîne une chute du rendement. Une fois la liaison réalisée, le système ne peut pas s'auto-corriger et ceci implique généralement un nombre important d'étapes de protection/déprotection nécessitant d'isoler le produit au terme de chaque étape. Dans le cas où la cage désirée est le produit cinétique, cette approche reste à ce jour la plus efficace.

Dans notre cas, l'objectif est de préparer des cages thermodynamiques pour permettre l'auto-corrrection et car les réactions sont réversibles et contrôlables, le procédé "one-pot" est alors plus avantageux. Parmi les travaux rapportés dans la littérature et présentant le même but, la chimie covalente dynamique a été envisagée pour générer ces cages en une seule étape.^[16] Cette approche repose sur la possibilité du système à s'auto-corriger, dans le cas où le produit cinétique est différent du produit thermodynamique. Des travaux, rapportés dans la littérature, confortent l'idée de pouvoir accéder à des cages en tant que produit thermodynamique plus stable que les formes ouvertes.^[13; 17] Les ponts disulfures ont permis, par exemple, d'illustrer la construction de cages de tailles variées par le mélange de deux composés dithiols en milieu oxydant.^[16] Les liaisons imines ont été, à ce jour, les ligations les plus répandues dans la préparation de cages moléculaires. La formation d'esters boroniques a également permis la préparation de ce genre de systèmes.^[13; 17-18] En 2012, une cage organique a été préparée par la création de 12 liaisons imines (Schéma 1).^[19] Cette molécule s'avère être poreuse à l'eau et peut absorber réversiblement jusqu'à 20% massique d'eau.^[20]

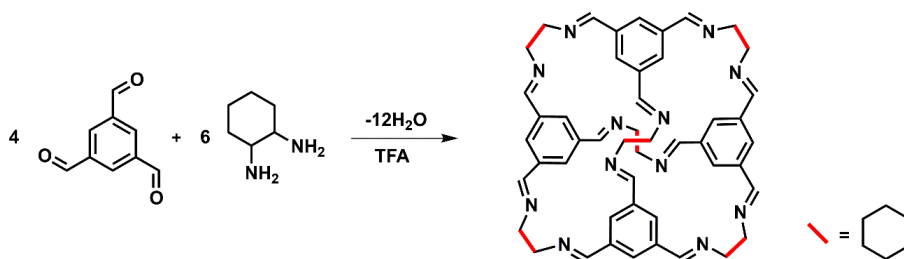


Schéma 1. Formation simultanée de 12 liaisons imines par mélange de 4 trialdéhydes et 6 molécules de diamines pour créer ce composé capable d'absorber réversiblement 20% d'eau

Les calix[4]resorcinarènes tétrafonctionnalisés ont également attirés l'attention d'un certain nombre d'équipes de recherche, et se sont montrés d'un grand intérêt pour la préparation de cages moléculaires.^[21] Une cage a été créée avec ce support en une seule étape, par auto-

assemblage de 18 composants (Schéma 2).^[22] Le produit de synthèse ainsi préparé possède une cavité d'environ 1700 Å³. Les auteurs envisagent différents rôles pour cet octaèdre, comme, analogues de transporteurs de pesticides ou de médicaments, agents de détoxification de l'eau ou encore réacteur moléculaire pour la synthèse organique. L'effet du solvant sur le système a ensuite été étudié. Ce travail a permis de développer de nouvelles cages solubles dans le THF et le dichlorométhane. Ainsi, un tétraèdre et un carré anti-prismatique sont préparés respectivement avec 12 et 24 composants (Schéma 2). Ils viennent compléter les premiers tests réalisés dans le chloroforme.^[23]

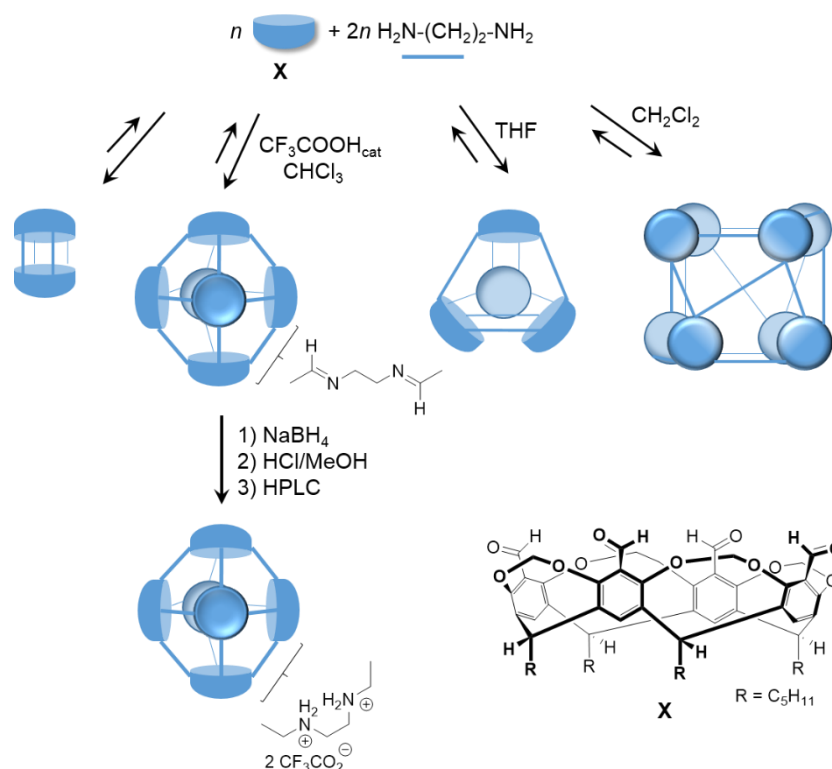


Schéma 2. Condensation de 12, 18 ou 24 composants par contrôle thermodynamique pour la formation de cages supramoléculaires

Les ligations dynamiques utilisées pour la préparation des cages ont permis de générer par auto-correction des systèmes caractéristiques d'un composé ciblé. Les molécules encapsulées peuvent être des molécules aromatiques,^[24] des ions^[25]... La présence de la cible peut favoriser la formation d'un composé. L'effet template a ainsi ouvert la possibilité de développer des systèmes spécifiques et uniques pour l'encapsulation d'une molécule.^[26] Une fois la cible reconnue, il est intéressant, dans certaines conditions, de pouvoir diminuer l'affinité et dissocier le complexe. La dynamique des liaisons a alors été utilisée comme un atout pour le relargage de l'hôte encapsulé.^[27]

B. Cages assemblées à partir de macromolécules biologiques

Les biomolécules peuvent être impliquées dans la construction de cages. La possibilité de contrôler l'organisation conformationnelle de macromolécules biologiques, telles que les protéines, permet d'envisager l'utilisation de ces systèmes pour la construction de cages.^[28] La structuration des protéines pour construire des systèmes d'architecture contrôlée est un domaine émergent mais quelques exemples existent. Des structures tridimensionnelles tétraédriques, triangulaires et cubiques ont été construites par l'auto-assemblage de deux protéines reliées entre elles par un motif en hélice α de quatre résidus (Figure 2).^[29] La contrainte architecturale imposée par l'espaceur sous forme d'hélice α va être à l'origine de l'organisation des douze sous-unités d'aldolase trimérique KDPGal et de douze sous-unités du domaine dimérique de la protéine FkpA. Ce modèle d'organisation par auto-assemblage d'un dimère et d'un trimère de protéines pour la construction de cage a été employé à plusieurs reprises avec succès.^[28b; 30]

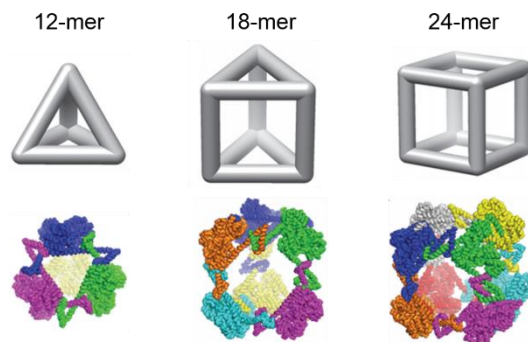


Figure 2. Exemples de structures tridimensionnelles de cages construites à partir de protéines proposées par modélisation moléculaire^[29]

C. Cages formées à partir d'ADN

De nombreux travaux ont montré l'étendue des possibilités d'organisation de l'ADN. Des formes et des objets variés ont pu être développés. Différents types de mécanismes régissent l'assemblage de l'acide nucléique.^[31] Parmi eux, on trouve l'assemblage supramoléculaire de l'ADN,^[32] l'organisation tridimensionnelle de l'oligonucléotide (Figure 3)^[33] et pour finir l'origami d'ADN^[34]. Des cages auto-assemblées sont préparées par appariement des bases selon Watson-Crick.^[35]

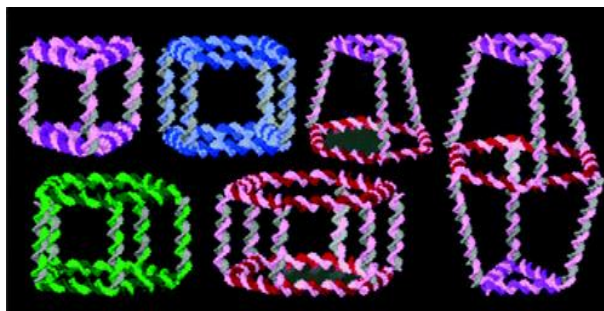


Figure 3. Exemples d'organisation tridimensionnelle de simples brins d'ADN et d'ADN cycliques pour construire des cages triangulaires, cubiques, pentamériques et hexamériques, des hétéroprismes ou encore des biprismes^[36]

D. Cages formées à partir de peptides

Tout comme les protéines et l'ADN, les peptides sont engagés dans la construction de cages. Des systèmes sphériques uni-lamellaires d'un diamètre approximatif de 100 μM ont été développés.^[37] Leur préparation repose sur une stratégie d'auto-assemblage d'unités peptidiques par la préparation de ponts disulfures selon un motif de nid d'abeille (Figure 4). Le réseau hexagonal peut ensuite se refermer pour générer la cage tridimensionnelle. Comme pour les autres systèmes d'encapsulation, l'utilisation de ligations à caractère réversible est nécessaire pour permettre le relargage contrôlé des hôtes.

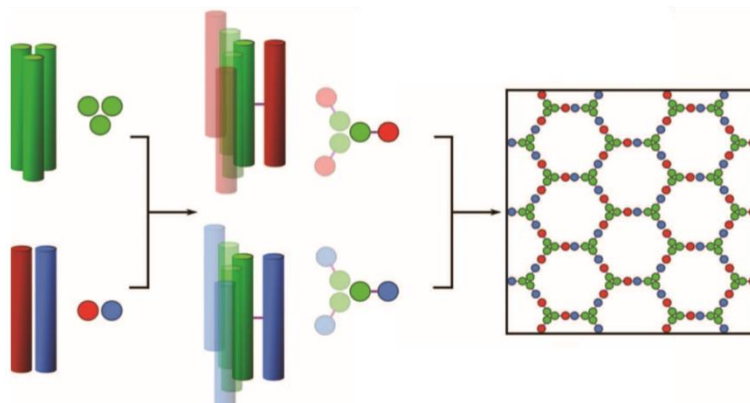
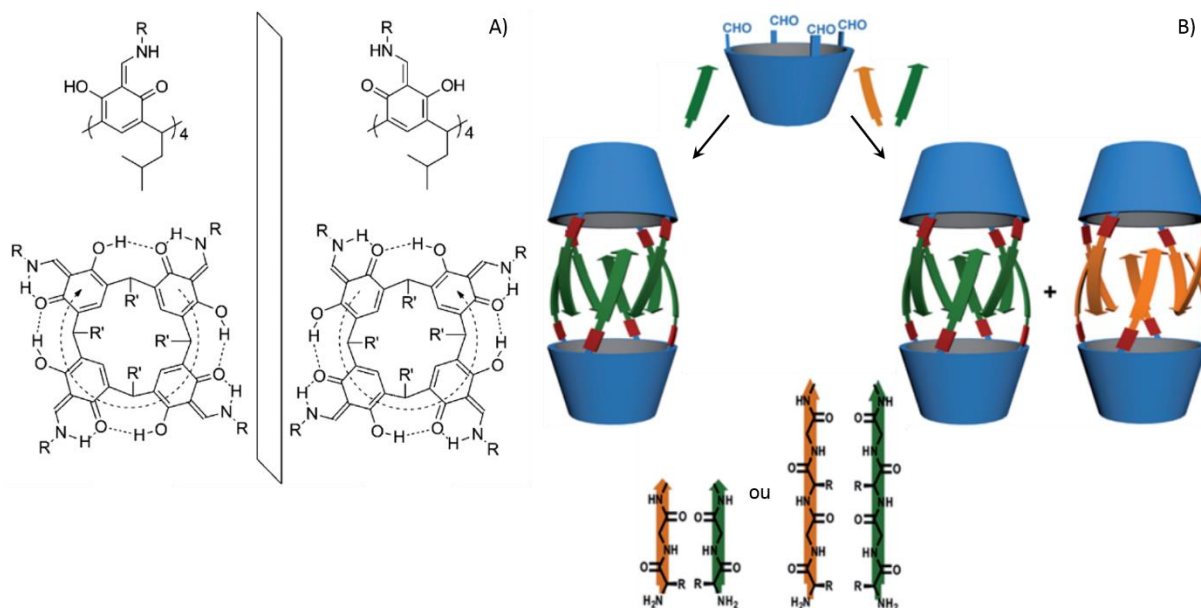


Figure 4. Conception et approche par auto-assemblage pour la préparation de cages peptidiques via la formation d'un réseau hexagonal par des ponts disulfures^[37]

D'autres cages basées sur l'auto-assemblage de peptides de chiralité variées sur des châssis de type résorcinarène. La fonctionnalisation via des liaisons imines va induire la construction de diastéréoisomères, stabilisés sous forme énamine, présentant une symétrie en C^4 . Les cages vont présenter une homotopie de chiralité (Figure 5).^[38]



E. Positionnement du projet

Les cages sont à présent bien connues et un certain nombre de méthode de synthèse ont vu le jour pour optimiser la préparation de ces systèmes et leur rendement. L'intérêt majeur du travail de construction de cages de biomolécules est la solubilité dans l'eau des systèmes générés.

Afin de générer des systèmes d'encapsulation, des châssis sont liés via des ligations click. Une partie au moins de ces ligations est réversible et apporte une dynamique favorisant les échanges pour conduire au composé thermodynamique. L'objectif vise à générer par auto-assemblage des cages de biomolécules solubles en milieu aqueux. Le travail va s'orienter autour de la construction de cages, dont les plate-formes sont reliées entre elles par des espaceurs de taille et de nature variées (Schéma 3). Ces espaceurs sont, soit directement présents sur la plate-forme, soit sont des petites molécules liées aux surfaces peptidiques par des liaisons click.

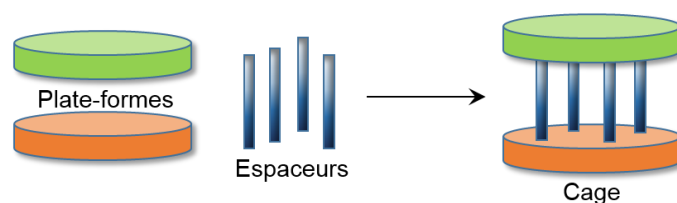


Schéma 3. Représentation schématique de préparation des cages de biomolécules

II. Synthèse des espaceurs et des peptides cycliques

A. Conception

Ce chapitre est basé sur la préparation de cages à partir de plate-formes peptidiques, parmi lesquelles, certaines ont été développées lors des précédents chapitres. Les châssis possèdent quatre sites de fonctionnalisation qui vont être utilisés pour la fixation d'espaceurs, ou bien vont directement réagir avec le site d'une autre plate-forme. La nature des espaceurs va être principalement tournée vers des choix peptidiques pour offrir une versatilité. Une nouvelle cage peut ainsi être préparée en modifiant la séquence du peptide. Des espaceurs bi-fonctionnels seront synthétisés puis testés. Les ligations choisies devront alors préférentiellement être chimio-sélectives et orthogonales pour réagir sélectivement sur la fonction désirée. Les différents couples de ligations étudiés seront :

- acylhydrazone - oxime
- pont disulfure - acylhydrazone
- acylhydrazone - thiol-maléimide

B. Synthèse des peptides cycliques (RAFT)

1. RAFT non modifiés

Les peptides cycliques constitués de résidus aminés non modifiés sont synthétisés par SPPS automatique. Les quatre résidus pointant sur l'une des faces du peptide sont selon la ligation envisagée, des sérines, des cystéines ou encore des lysines portant respectivement des groupements hydroxyles, thiols et amines (Figure 6). La nature des deux acides aminés orientés sur l'autre face de la plate-forme va varier entre l'alanine et l'arginine s'il est nécessaire d'apporter un caractère hydrophile au système.

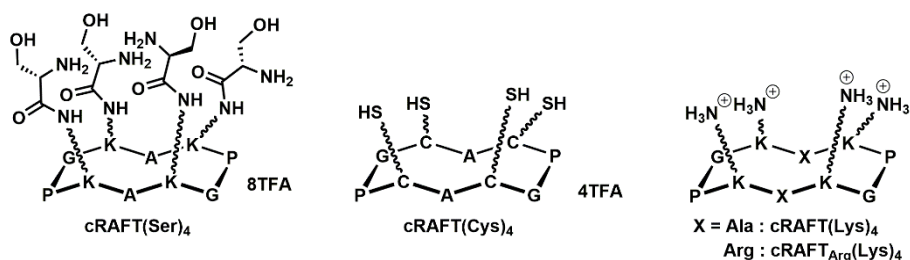


Figure 6. Structures des RAFT non modifiés : **cRAFT(Ser)₄**, **cRAFT(Cys)₄**, **cRAFT(Lys)₄**, **cRAFT_{Arg}(Lys)₄**

2. RAFT modifiés

La préparation de ces deux systèmes peptidiques a été préalablement présentée lors des Chapitre 2 et 3. La plate-forme **cRAFT(ALD)₄** impliquée dans la préparation de plusieurs clusters est à nouveau utilisée dans ce chapitre (Figure 7).^[39]

RAFT-4-Maléimides : **cRAFT(Mal)₄**, **cRAFT_{Arg}(Mal)₄**. La voie de synthèse et le protocole de **cRAFT(Mal)₄** sont identiques pour la préparation de la plate-forme **cRAFT_{Arg}(Mal)₄** (Figure 7). Ces composés multivalents, mentionnés ci-dessus, sont préparés à partir de la plate-forme peptidique portant les quatre lysines.

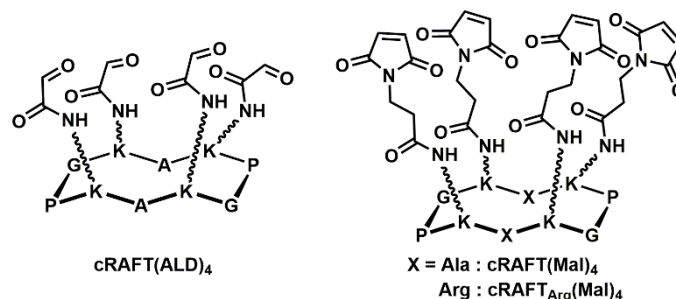


Figure 7. Structures des RAFT issus de l'assemblage de résidus modifiés : **cRAFT(ALD)₄**, **cRAFT(Mal)₄**, **cRAFT_{Arg}(Mal)₄**

C. Préparation des espaceurs

1. Synthèse des espaceurs oxyamine-hydrazides

La synthèse des espaceurs oxyamine-hydrazides repose sur la fonctionnalisation de la glycine et de la *L*-arginine à la fois sur leurs extrémités C- et N-terminale. L'extrémité C-terminale est fonctionnalisée, en premier, par une fonction hydrazide. La fonction oxyamine est générée par une réaction de couplage entre l'amine α de l'acide aminé et un ester activé **41** préalablement synthétisé (Figure 8). La synthèse des deux résidus oxyamine-hydrazides est engagée sur support solide (Figure 9). Les produits **42** et **44** sont obtenus purs après précipitation. Par souci de simplicité, le résidu glycine est initialement choisi pour faciliter l'analyse des produits préparés.

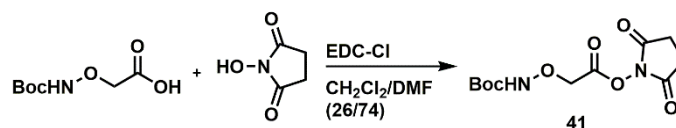


Figure 8. Synthèse de l'ester activé **41** à partir du réactif *N*-Boc-aminoxyacetic acid

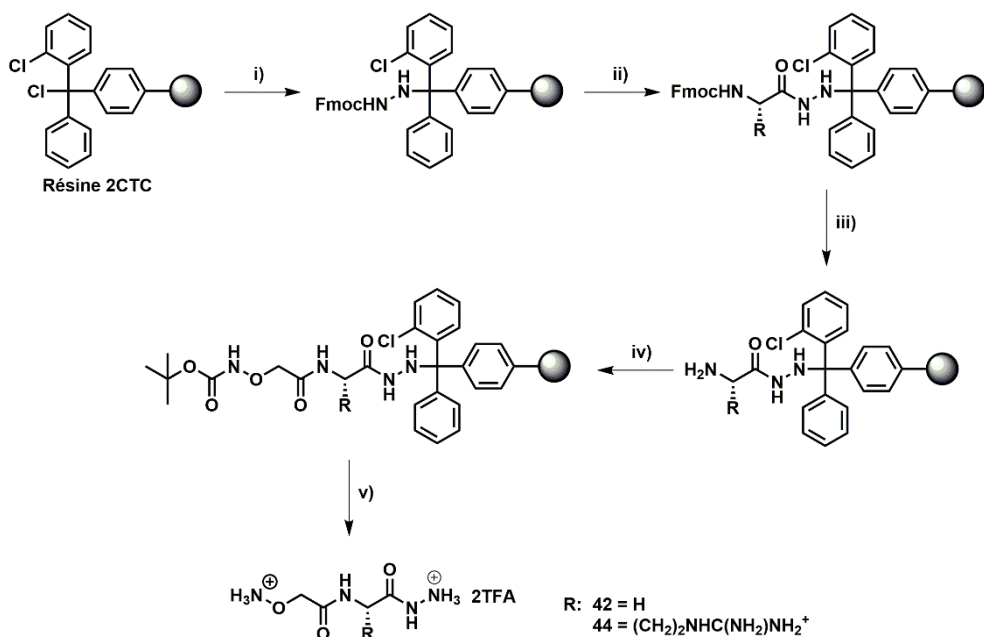


Figure 9. Voie de synthèse sur support solide des espaceurs oxyamine-hydrazides. Réactifs et conditions : i) Fmoc-hydrazide, DIEA; ii) a : déprotection: pipéridine, b : couplage peptidique: Fmoc-AA-OH, HATU, DIEA; iii) pipéridine; iv) **41**, DIEA; v) TFA/H₂O/TIS

2. Synthèse des espaceurs thiol-hydrazides

La préparation des ligands hydrazides suit le même protocole que celui présenté dans le Chapitre 2, pour la synthèse des résidus aminés hydrazides. Les deux composés synthétisés sont le thioglycolate hydrazide **45** ainsi que l'acide aminé *L*-cystéine hydrazide **46**. Ils possèdent un groupement thiol sur une extrémité. Cette fonction peut être engagée dans les ligations de types thiol-maléimides et la formation de ponts disulfures. Sur l'autre extrémité de la molécule se trouve un groupement hydrazide. L'acide carboxylique du réactif est couplé avec la résine chlorure de 2-chlorotrityl (2-CTC), préalablement fonctionnalisée par le Fmoc-carbazate (Figure 10). Après clivage de la résine, la fonction hydrazide est obtenue.

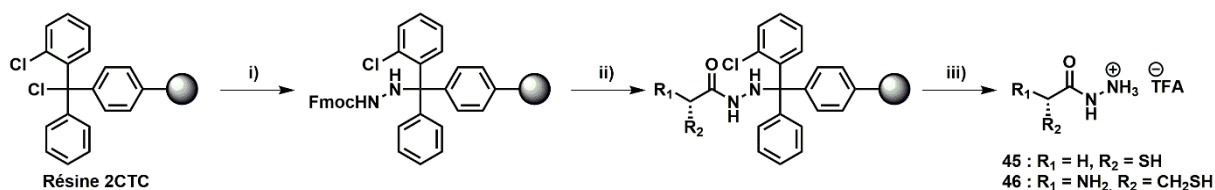


Figure 10. Voie de synthèse sur support solide des espaceurs thiol-hydrazides. Réactifs et conditions : i) Fmoc-hydrazide, DIEA; ii) a : déprotection: pipéridine, b : couplage peptidique: thioglycolate ou Fmoc-*L*-Cys-OH, HATU, DIEA, pipéridine; iii) TFA/H₂O/TIS

Le thioglycolate hydrazide **45** permet de tester la faisabilité des réactions de couplage en évitant l'éventuel rôle nucléophile de l'amine α de **46**, réagissant sur les maléimides.

III. Formation d'une cage peptidique par amination réductrice

L'approche initiale de ce travail est tournée vers le test des ligations en l'absence d'espaceur, pour s'assurer par une preuve de concept que la dimérisation des châssis est possible. Ces expériences sont alors réalisées à l'échelle analytique. La stratégie de construction de cages plus complexes sera abordée dans un second temps avec l'addition des espaceurs.

Le premier essai envisagé pour la préparation de cage, a été la synthèse d'imines (Figure 11). Cette condensation ne génère que des molécules d'eau et possède l'intérêt d'être réversible en milieu aqueux. Pour fixer l'équilibre du milieu, un ajout de cyanoborohydrure de sodium est effectué pour réduire chimiosélectivement la liaison imine.

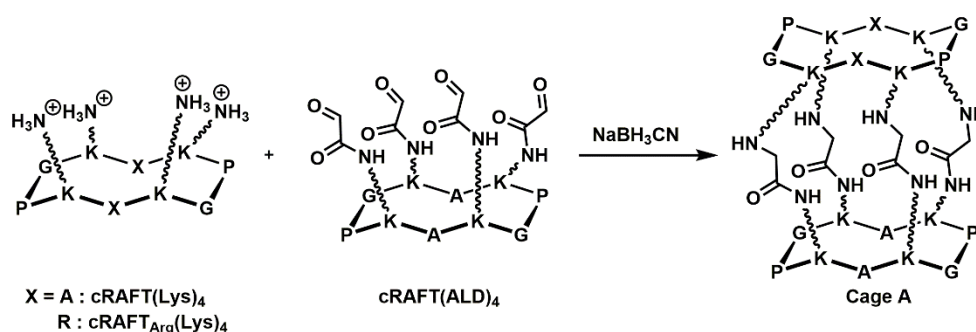


Figure 11. Voie de synthèse des cages formées par la réduction de quatre liaisons imines

La construction de la cage est initialement engagée en mélangeant, en quantité équimolaire, les plate-formes peptidiques **cRAFT_{Arg}(Lys)₄** et **cRAFT(ALD)₄**. Après 36 h, le réducteur NaBH_3CN est additionné au milieu pour générer des amines secondaires stables. L'analyse LCMS du milieu, contenant des quantités équimolaires en plate-formes après 24 h, montre une consommation complète des réactifs. La masse de la cage est observée avec la présence de produits secondaires. Afin de faciliter la purification de la cage, différentes conditions ont été testées. Le châssis **cRAFT(Lys)₄** étant moins polaire, il est proposé dans le but de ralentir l'élution de la cage formée. Des essais sont réalisés en parallèle dans le méthanol et dans un milieu tamponné (100 mM d'acétate de sodium, pH 6,0) avec soit 1, soit avec 10 équivalents de **cRAFT(Lys)₄**. La masse de la cage est observée dans chacune des conditions testées mais c'est le test dans le méthanol en présence d'un excès de **cRAFT(Lys)₄** qui montre les meilleurs résultats (Figure 12). Les analyses par MALDI-ToF confirment ces résultats. Cette expérience est une preuve de concept sur la possibilité de générer des cages à partir de châssis peptidiques pré-organisés.

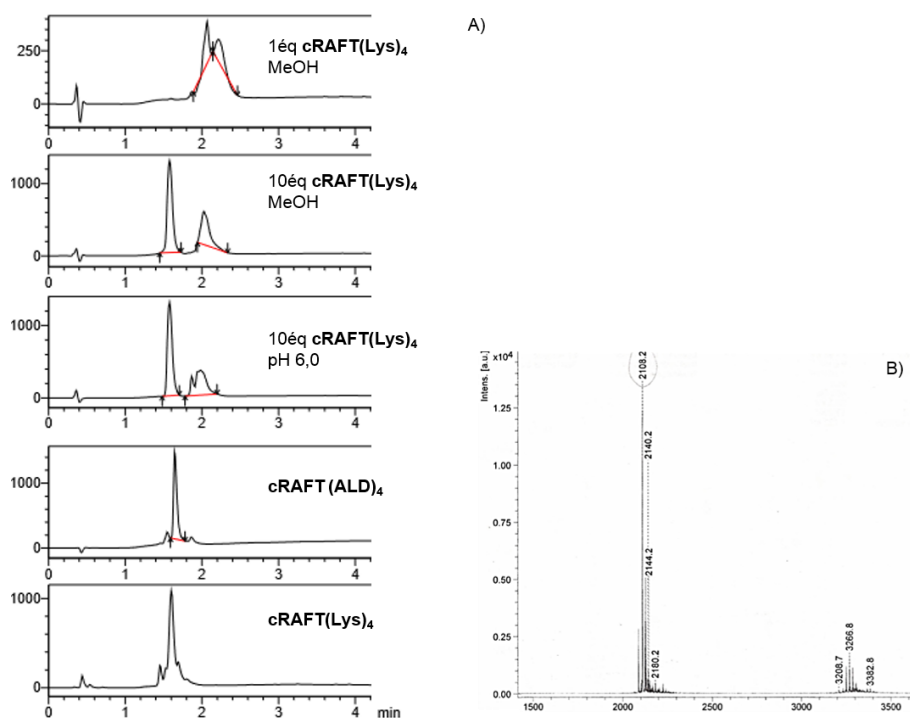


Figure 12. Etude HPLC et MALDI-ToF (HCCA) de la synthèse de la cage formée par des ligations imines réduites à un temps de rétention de 2,06 min (Méthode J). Calculée pour $[C_{96}H_{156}N_{28}O_{24}+Na]^+$ 2108,18, mesurée 2108,17

La conception de nouvelles plate-formes peptidiques doit être envisagée car à l'état actuel, seule une cage peut être générée. En introduisant des espaceurs, une diversité dans la nature des systèmes pourra être créée.

IV. Cage oxazolidine

La liaison oxazolidine est générée par la réaction de condensation d'un α -amino alcool sur un aldéhyde. Tout comme pour la condensation en imine, la formation de la liaison entraîne la libération d'une molécule d' H_2O . L'hydrolyse de la liaison est, dans ce cas, également possible. La construction des cages est engagée par le mélange en quantité équimolaire de **cRAFT(Ser)₄** avec la plate-forme **cRAFT(ALD)₄** (Figure 13). Afin d'optimiser la préparation de ces ligations, un criblage est réalisé à différents pH, compris entre 3,0 et 7,2. Les milieux réactionnels sont ensuite analysés par LCMS après 24 h à température ambiante (Figure 14). La masse de la cage est détectée sous sa forme di-chargée dans le cas de la solution tamponnée à pH 6,0. Malgré le fait que l'analyse des chromatogrammes montre la présence d'impuretés, la réalisation de cette expérience est une nouvelle preuve de la possibilité à générer des cages peptidiques.

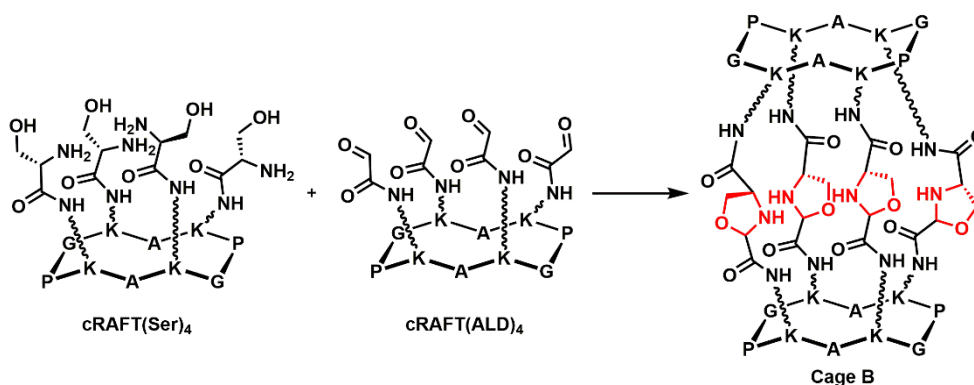


Figure 13. Voie de synthèse des cages oxazolidines

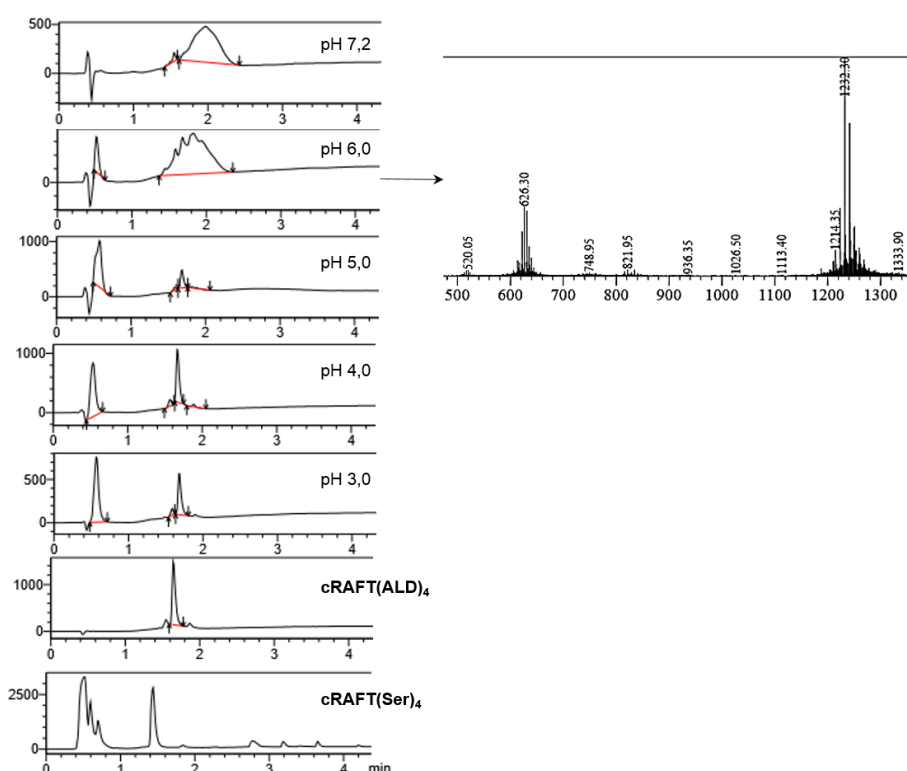


Figure 14. Criblage par LCMS de différents pH pour la préparation de cages oxazolidines (Méthode J). Avec la cage à $t_R = 1,8$ min, masse calculée pour $[C_{108}H_{168}N_{32}O_{32}+K+H]^{2+}$ 1232,6, mesurée 1232,3

Dans le cas de cette cage, des optimisations dans la conception des plateformes peuvent également être réalisées. Ce travail est une preuve de concept que cette ligature est possible, mais ici aussi, la synthèse d'espaces, pour la préparation de nouveaux systèmes peut être proposée.

V. Cage acylhydrazone - oxime

La construction des cages basées sur la préparation de ligatures oximes et acylhydrazones est réalisée autour d'une nouvelle stratégie. Des ligands sont synthétisés, dans le but d'introduire des espaces entre les plate-formes. Ces ligands vont ainsi ouvrir des

perspectives sur une plus large variété de cages. Dans le cas de ce système, les deux ligations ne sont pas orthogonales, mais l'oxime présente une stabilité supérieure à l'acylhydrazone. L'acylhydrazone peut alors s'échanger uni-directionnellement pour générer l'oxime. Le but est alors d'étudier cette uni-directionnalité. L'hypothèse avancée serait d'avoir, dans un premier temps, la formation de quatre liaisons oximes, puis, la génération des acylhydrazones permettant de fermer la cage.

Stratégie simultanée. 1 éq de la plate-forme **cRAFT(ALD)₄** est placé dans un milieu d'H₂O avec 0,1% de TFA, puis, 2 éq d'espaceur, portant une oxyamine d'une part et un hydrazide sur l'autre extrémité, sont ensuite additionnés à la solution (Figure 15). Le composé **42**, issu de la fonctionnalisation de la glycine, va être utilisé majoritairement par soucis de simplicité. La molécule **44** contenant le résidu arginine est engagé seulement dans quelques essais.

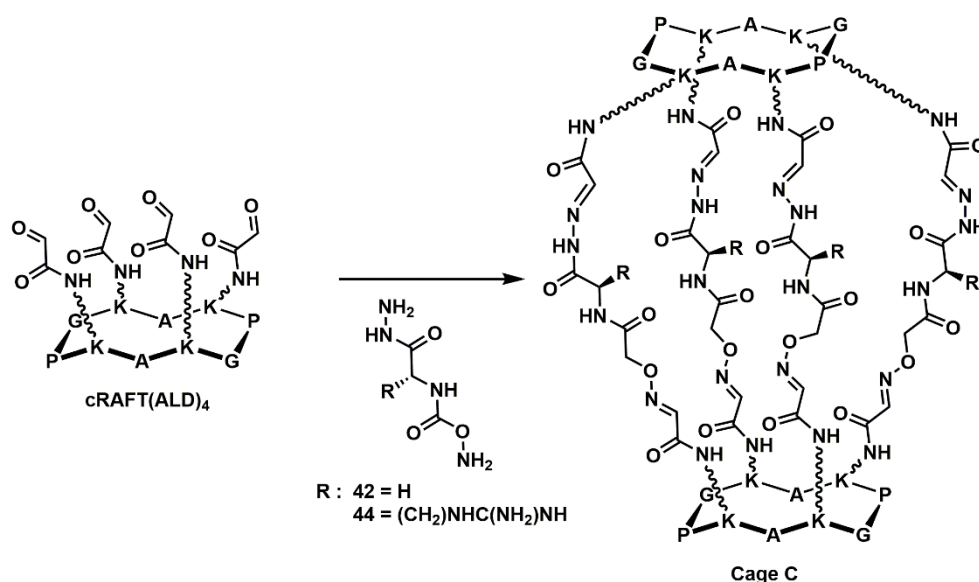


Figure 15. Voie de synthèse de la cage oxime - acylhydrazone

La préparation des deux cages (l'une avec l'espaceur glycine **42** et l'autre avec l'arginine **44**) est dans un premier temps réalisée dans différents tampons aqueux, comme pour la plupart des systèmes multivalents précédemment étudiés. Ainsi les réactions tests sont engagées dans des milieux de pH compris entre 3,0 et 7,2. Après 24 h à température ambiante, les systèmes sont analysés par LCMS (Figure 16). D'autres analyses ont été réalisées à des temps plus long sans observer d'évolutions. Une masse pouvant correspondre aux cages di-chargées est observée. En combinant les chromatogrammes des deux systèmes d'encapsulation, c'est la solution aqueuse tamponnée à pH 5,0 qui est la plus favorable à leur préparation.

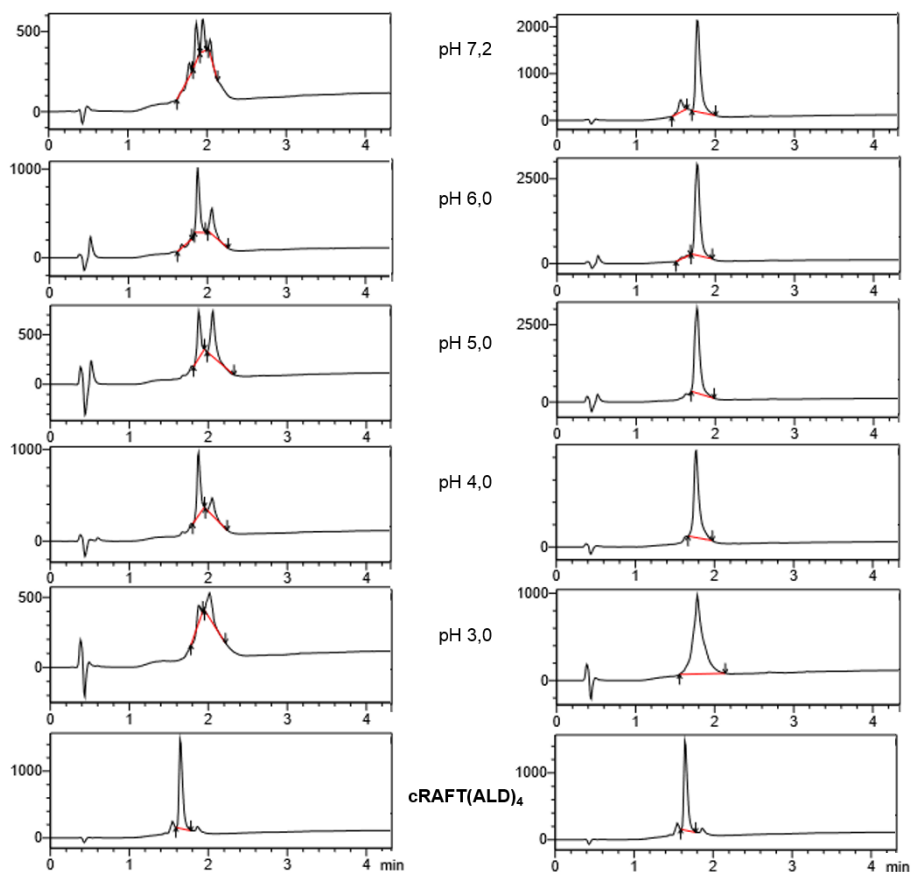


Figure 16. Chromatogrammes HPLC des différentes solutions aqueuses utilisées pour la préparation des cages oxime - acylhydrazone de la glycine (gauche) et de l'arginine (droite) (Méthode J)

Cette cage présente cependant un inconvénient notable, qui est l'absence de contrôle de sa configuration (Schéma 4). Il semble difficile de s'assurer que les espaceurs soient organisés de manière parallèle.

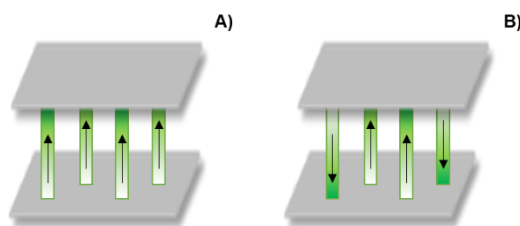


Schéma 4. Représentation de la directionnalité des espaceurs sur une plate-forme. Avec A) des espaceurs parallèles et B) des espaceurs sans directionnalité

Stratégie séquentielle. L'objectif est de former les quatre ligations oximes sur une même plate-forme et toutes les acylhydrazones sur l'autre. Afin d'aboutir à cette configuration, seul 1 éq de plate-forme **cRAFT(ALD)₄** va être mis en présence de 4 ou 8 éq de composé glycine **42**. Cette approche en deux étapes est réalisée pour favoriser la préparation de l'intermédiaire oxime et palier au problème identifié dans le Schéma 4. Le suivi LCMS réalisé après une journée montre la présence d'une molécule pontée oxime-acylhydrazone (Figure 17). En effet, la spectrométrie de masse indique des masses correspondant à la cage di et tétra-chargée.

La masse du tri-chargé n'est cependant pas observée. L'hypothèse alors proposée repose sur la présence du composé ponté et de son di-chargé. Ces molécules pontées possèdent, en effet, des masses correspondant à celles de la cage sous ses formes di- et tétra-chargées. Sept jours à température ambiante ne montrent pas de conversion par HPLC et le pic à un temps de rétention de 2,05 min reste visible. Une étude approfondie des premiers essais réalisés et montrant une masse correspondant à la cage di-chargée, s'avère être également des molécules pontées.

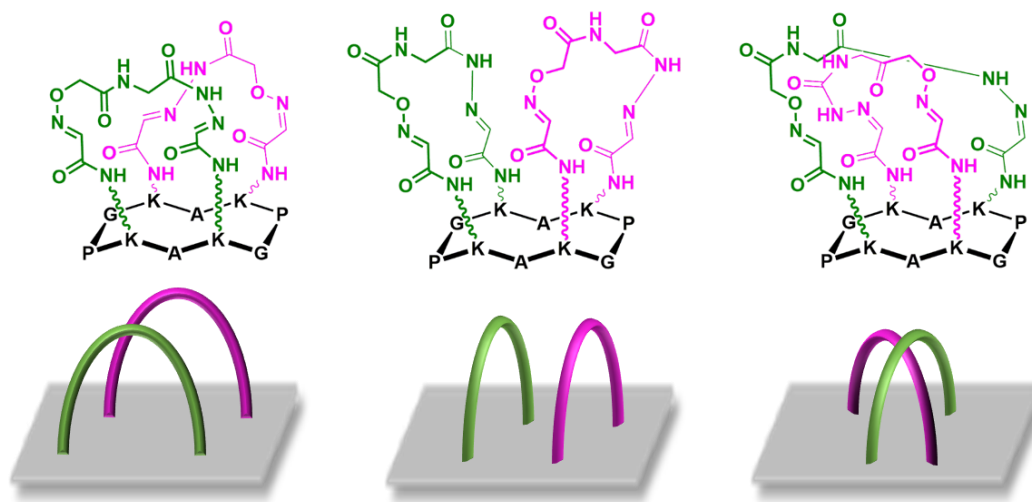


Figure 17. Structures supposées de la molécule pontée, formée lors des expériences de préparation de la cage

Afin de favoriser la formation de la cage, les systèmes avec 4 et 8 équivalents d'espaceur sont chauffés à 90°C durant plusieurs heures sans favoriser la formation de la cage.

L'aniline est également envisagée comme catalyseur nucléophile en préparant un tampon d'acétate de sodium - aniline (100mM, pH 5,0). Dès l'ajout de l'espaceur, l'apparition d'un précipité est observée. Après 7 jours, le milieu est centrifugé et le surnageant séparé du précipité. Le solide blanc est solubilisé dans le DMSO et les deux milieux sont analysés par LCMS sans permettre de visualiser la masse du produit recherché.

Finalement, le fait d'accroître la concentration en espaceur **42** à 100 éq et de se placer dans un milieu H₂O 0,1% de TFA à pH 3,0 (favorable à l'oxime) a permis d'observer la masse du composé supposé tétra-oxime (Figure 18) sous ses formes di- et tri-chargées à un temps de rétention de 1,84 min (Figure 19). Le chromatogramme HPLC indique la présence de plusieurs produits non identifiés correspondant probablement à des isomères de constitution avec la formation de ligations acylhydrazones. La masse du composé ponté n'est cependant pas observée.

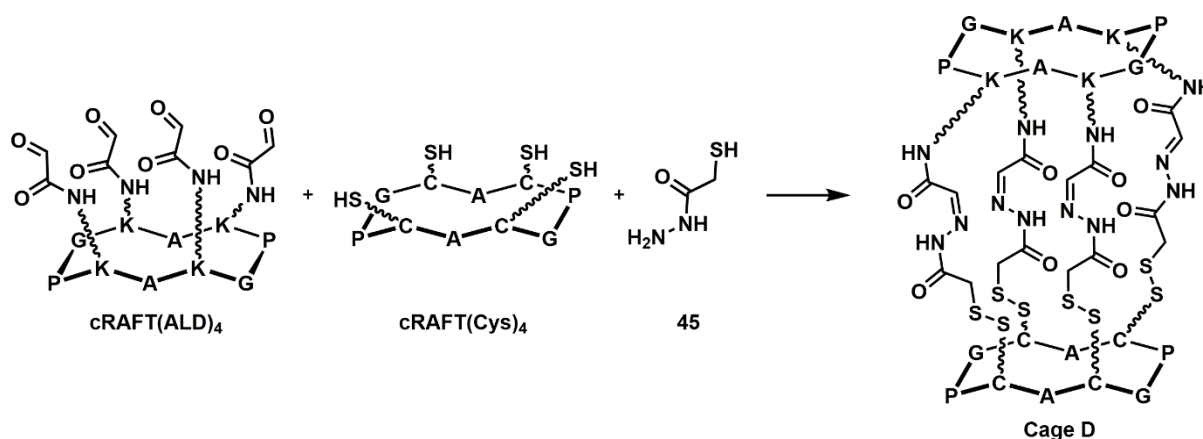
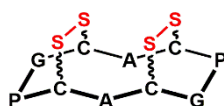


Figure 20. Voie de synthèse de la cage disulfure - acylhydrazone

Les conditions optimales de synthèse de cette nouvelle cage sont criblées en réalisant six essais dans des solutions tampons à différents pH. Les milieux réactionnels vont ainsi avoir un pH fixé entre 5,0 et 10,8. Le pH 5,0 correspond aux conditions optimales pour les ligations acylhydrazones (Chapitre 2), alors que les solutions à pH 10,8 font parties des conditions les plus basiques rencontrées dans la littérature pour la préparation de ponts disulfures.^[40] Les six milieux réactionnels issus du mélange des deux plate-formes avec les 4 éq d'espaceur thioglycolate hydrazide **45** sont analysés par LCMS après 96 h à température ambiante. Aucun de ces systèmes ne présente le ratio m/z attendu de la cage par spectrométrie de masse.

Afin de favoriser la formation des ponts disulfures, du diiode est ajouté jusqu'au maintien d'une coloration brune du milieu (16 éq). L'iode est un oxydant, il favorise alors la formation de ponts disulfures. Ainsi, 48 h après l'ajout de l'iode dans les milieux, l'analyse LCMS montre un pic majoritaire présent sur chacun des chromatogrammes, éluant à un temps de rétention de 2,13 min. Ce produit correspond à la masse de la plate-forme **cRAFT(Cys)₄** oxydée portant deux ponts disulfures entre les résidus cystéines de la molécule (Figure 21). Ce type de châssis permet en effet de générer des disulfures comme ceci a été démontré préalablement.^[41] Un test dans le DMF n'a pas permis de visualiser la cage non plus.


 Figure 21. Structure potentielle de la plate-forme **cRAFT(Dis)₄** deux fois oxydée

Pour tenter de contourner la génération des ponts disulfures intramoléculeaires, une approche de synthèse séquentielle a été proposée. Dans un premier temps, la formation des ponts disulfures est engagée, entre les cystéines de **cRAFT(Cys)₄** et le thiol du composé **45**. Ces tests sont réalisés dans des milieux de pH compris entre 3,0 et 10,8, ainsi que dans le DMF. La réaction est alors effectuée selon une stratégie "one-pot" en additionnant séquentiellement les réactifs. Les analyses LCMS des expériences, après 72 h à température ambiante,

indiquent l'absence de pic correspondant à la cage (Figure 22). Le **cRAFT(ALD)₄** est consommé mais le produit de la ligation acylhydrazone n'est pas identifié. Cependant en observant les chromatogrammes à pH 4,0 et 5,0 favorable à la ligation, l'élargissement du pic à un temps de rétention d'environ 2,1 min est visible. Le produit élué peut être à un temps de rétention proche du composé **cRAFT(Dis)₄**. Les chromatogrammes indiquent également un ralentissement de la formation de ponts disulfures sur la plate-forme **cRAFT(Cys)₄** avec l'acidification du milieu. L'oxydation est ralentie. A partir d'un pH de 6,0, le chromatogramme obtenu des milieux tamponnés jusqu'à un pH de 10,8 indiquent, quant à eux, la présence de **cRAFT(Dis)₄**.

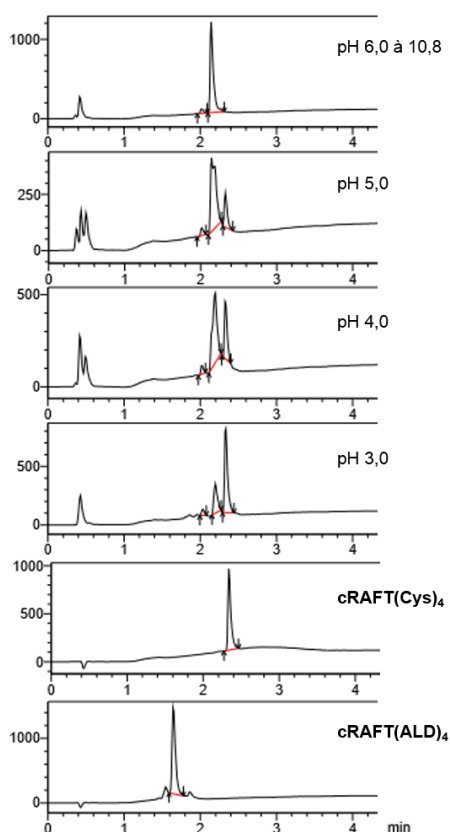


Figure 22. Etude des conditions de pH pour la préparation de ponts disulfures (Méthode J)

La préparation des cages de type pont disulfure - acylhydrazone est alors abandonnée.

VII. Cage acylhydrazone - thiol-maléimide

Les cages impliquant les liaisons acylhydrazones - thiol-maléimides sont le fruit du mélange d'une plate-forme **cRAFT_x(Mal)₄** avec **cRAFT(ALD)₄** et d'espaceurs portant un thiol sur une extrémité et un hydrazide sur l'autre. Ces ligands sont les mêmes espaceurs que ceux utilisés précédemment pour les cages pont disulfure – acylhydrazones. Ainsi, des liaisons thiol-maléimides et acylhydrazones doivent être générées pour créer la cage.

A. Synthèse séquentielle

La synthèse séquentielle repose sur la préparation de la cage en deux étapes. Ce processus peut être réalisé de deux manières. La première possibilité repose sur la formation de la liaison acylhydrazone en premier, suivie de la préparation de la thiol-maléimide. La seconde, quant à elle, commence par la création initiale de la ligation thiol-maléimide puis de l'acylhydrazone.

Notre travail s'est, dans un premier temps, tourné vers la première possibilité avec la préparation des liaisons acylhydrazones (Figure 23).

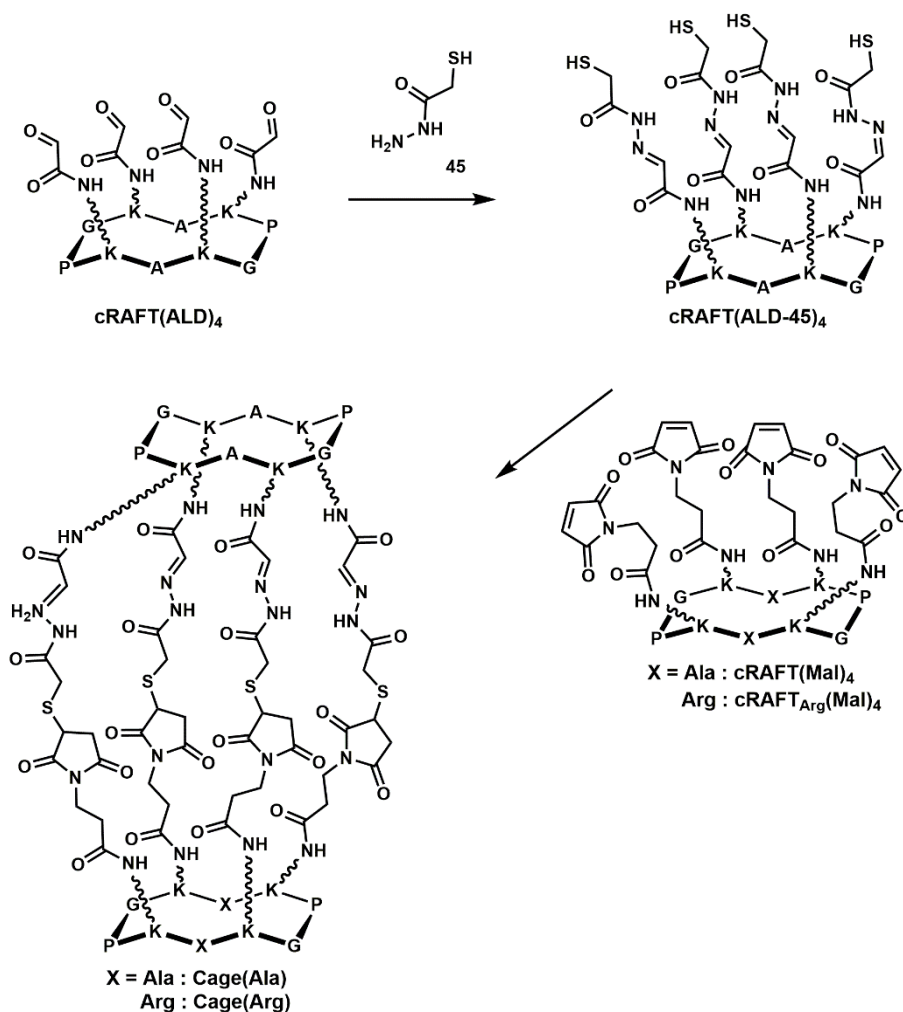


Figure 23. Voie de synthèse des cages acylhydrazone - thiol-maléimides en deux étapes avec la formation des acylhydrazones dans un premier temps dans un milieu tamponné d'acétate de sodium (100 mM, pH 5,0)

La préparation des liaisons acylhydrazones est réalisée dans les conditions favorables à cette ligation déterminée précédemment (Chapitre 2). Les premiers essais sont effectués avec le composé thioglycolate hydrazide **45**, qui est le plus simple espaceur portant à la fois le groupement hydrazide et la fonction thiol. L'essai analytique réalisé indique la présence du produit attendu grâce à l'observation de sa masse par analyse LCMS (Figure 24). Le

chromatogramme HPLC montre cependant que le produit est nettement minoritaire, et l'accroissement de la durée de réaction ne permet pas de former efficacement ce système.

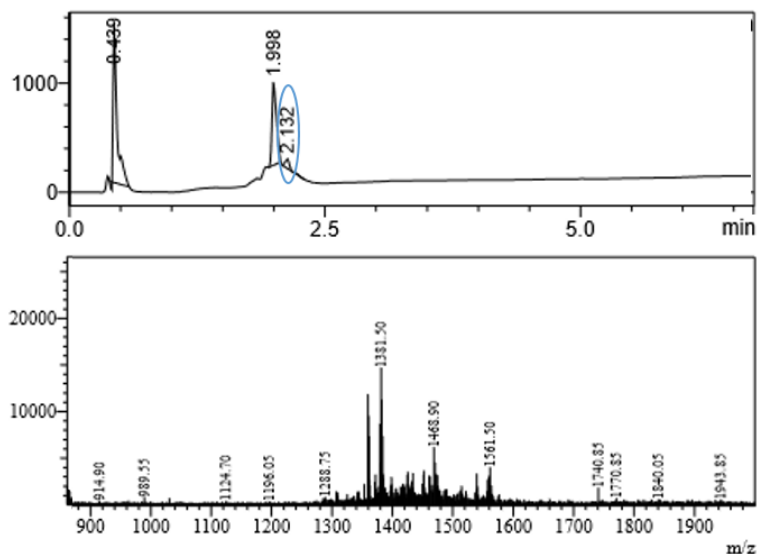


Figure 24. Chromatogramme et spectre LCMS du milieu réactionnel de la plate-forme **cRAFT(ALD)₄** tétra-fonctionnalisée par **45** via des liaisons acylhydrazones (Méthode J). Calculé pour $[C_{60}H_{94}N_{22}O_{18}S_4+Na]^+$ 1561,6, mesuré 1561,3 à un temps de rétention de 2,13 min, entouré en bleu.

Une expérience comparable est réalisée avec la cystéine hydrazide **45** et permet de confirmer ces résultats. Une hypothèse est émise concernant la nature des impuretés comme étant des produits intermédiaires de la réaction. Il est alors proposé d'augmenter la concentration en plate-forme (20 mM) pour accélérer la vitesse de réaction et déplacer l'équilibre vers la formation de **cRAFT(ALD-45)₄**. L'apparition d'un précipité est observée puis le milieu réactionnel est ensuite lyophilisé et engagé sans purification dans la seconde étape. Le système est repris dans un mélange tampon phosphate (100 mM, pH 7,2)/DMF 1/1 puis la plate-forme **cRAFT(Mal)₄** est additionnée. L'analyse LCMS de cette nouvelle expérience ne permet pas d'observer la cage. Une hypothèse est envisagée sur l'éventuelle formation de ponts disulfures intramoléculaires sur **cRAFT(ALD-45)₄**. La préparation de liaisons de type thiol-maléimide serait alors impossible.

La seconde stratégie est alors mise en œuvre. La réaction de formation des thiol-maléimides est réalisée préalablement à l'acylhydrazone (Figure 25).

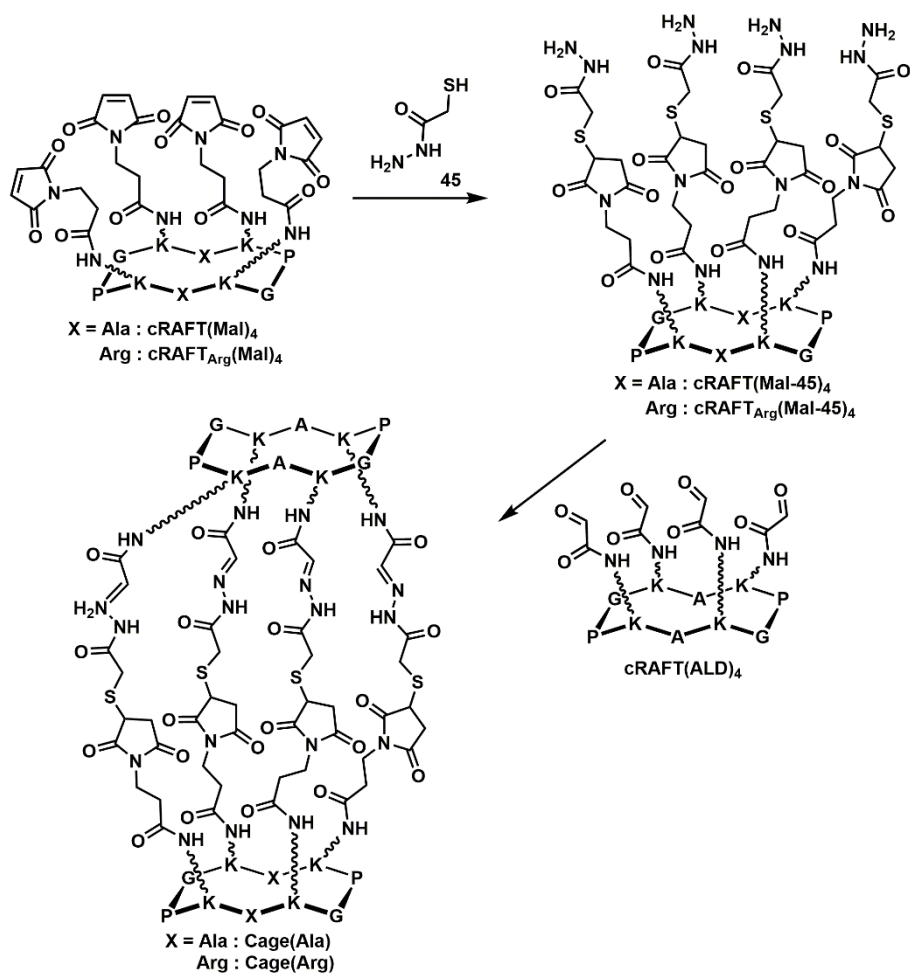


Figure 25. Voie de synthèse des cages acylhydrazone - thiol-maléimides en deux étapes avec la formation des thiol-maléimides dans un premier temps dans une solution tamponnée avec 100 mM de phosphate à pH 7,2

La préparation de la cage est réalisée avec la formation des ligations thiol-maléimides entre la plate-forme tétra-fonctionnalisée et le composé thioglycolate hydrazide **45**. La première étape repose sur l'addition de Michael, de l'espaceur via son groupement thiol, sur la plate-forme **cRAFT(Mal)**₄. La purification du composé tétra-fonctionnalisé ainsi formé est réalisée par HPLC sur phase inverse pour donner un rendement isolé de 43% en **cRAFT(Mal-45)**₄. L'analyse MALDI-ToF a permis de confirmer la nature du produit formé. L'homologue **cRAFT(Mal-46)**₄ fonctionnalisé par **46** est pour sa part obtenu avec un rendement isolé de 50%.

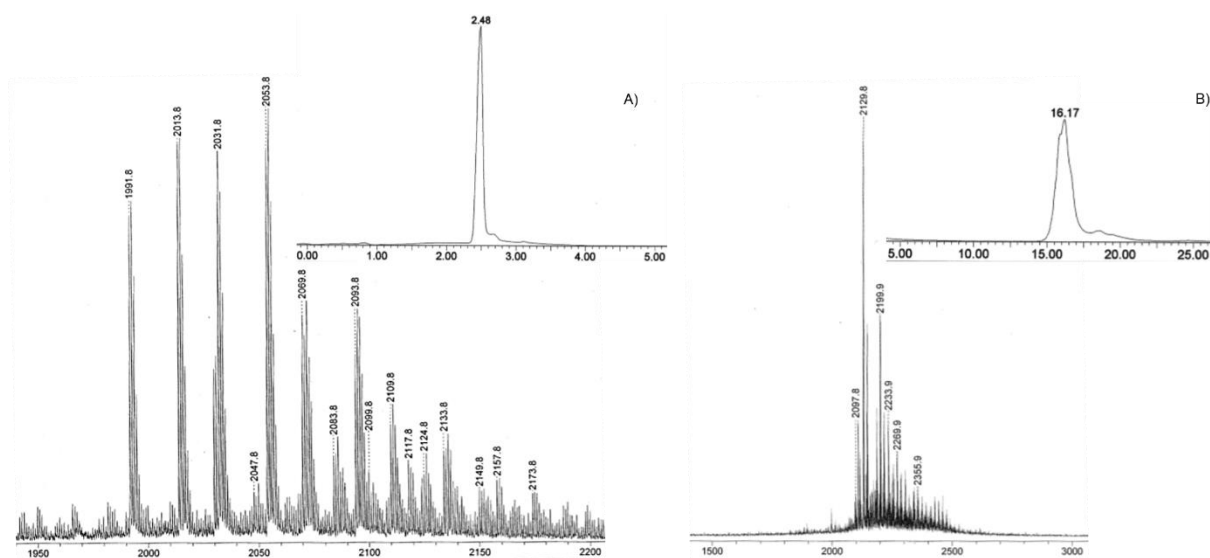


Figure 26. Chromatogrammes HPLC et spectres MALDI-ToF des composés : A) **cRAFT(Mal-45)₄** $t_R = 2,48$ min (Méthode D), calculée pour $[C_{90}H_{122}N_{26}O_{26}S_4+K]^+$ 2029,79, mesurée 2029,81 et B) **cRAFT(Mal-46)₄** $t_R = 16,17$ min (Méthode C), calculée pour $[C_{84}H_{134}N_{30}O_{26}S_4+Na]^+$ 2129,90, mesurée 2129,84

Des tests de solubilité ont été nécessaires à l'obtention d'un système homogène lors de la seconde étape. Ainsi, une solution tampon d'acétate de sodium (100 mM, pH 5,0) favorable à la préparation des liaisons acylhydrazones a été envisagée dans un premier temps. Un précipité blanc est observé. Les essais suivants sont réalisés dans un mélange 1/1 entre le tampon à pH 5,0 et le DMF, le DMF seul et le DMSO. Afin de favoriser la ligation et d'augmenter sa cinétique, les différents milieux sont chauffés à 50°C durant 4 jours. Les analyses LCMS et MALDI-ToF réalisées après retour à température ambiante montrent la formation de la cage avec un certain nombre de produits secondaires (Figure 27).

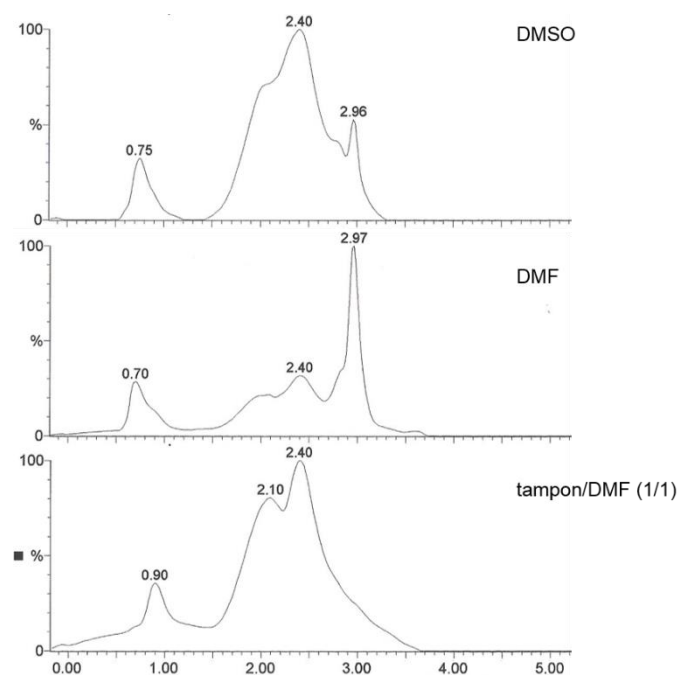


Figure 27. Chromatogrammes HPLC des milieux chauffés à 50°C durant 4 jours (Méthode A).

L'ensemble des tests est alors effectué à température ambiante à l'échelle analytique. Ils sont ensuite analysés par HPLC analytique et MALDI-ToF, et montrent la présence de la cage (Figure 28). L'étude des chromatogrammes révèle la présence d'un épaulement précédant le pic du produit recherché à 2,78 min. En combinant les résultats des expériences réalisées à 50°C et de celles effectuées à température ambiante, les chromatogrammes révèlent que le DMF est le solvant dans lequel la cage est la plus stable face à une augmentation de température.

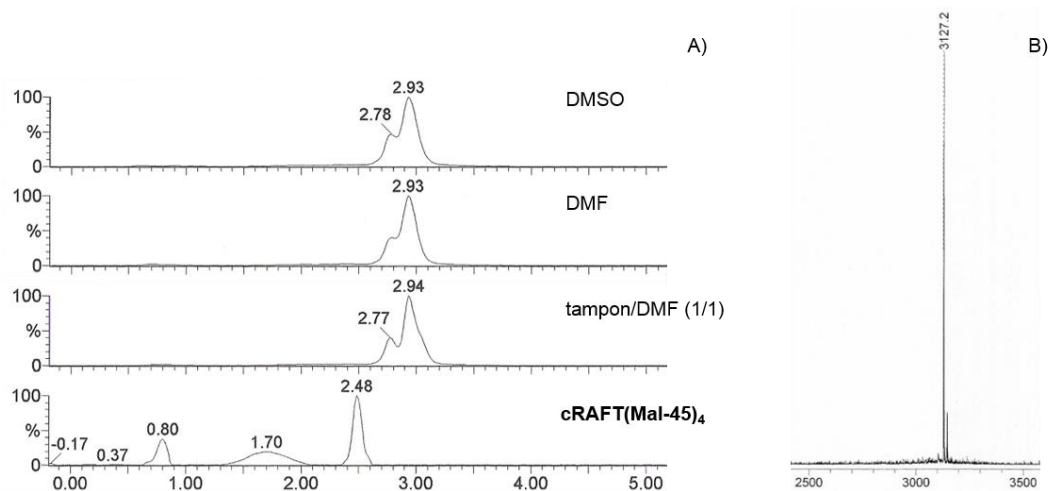


Figure 28. Comparaison des conditions de synthèse de la seconde étape de préparation de **Cage(Ala)** (Méthode A) et MALDI-ToF (HCCA). Calculée pour $[C_{132}H_{192}N_{40}O_{40}S_4+Na]^+$ 3128,31, mesurée 3128,37

La **Cage(Ala)** est soluble dans le DMF, mais en substituant les résidus alanines de **cRAFT_{Arg}(Mal)₄** par des arginines, l'objectif est d'étudier la solubilité de la cage dans H₂O. Afin d'éviter la formation de produits secondaires issus du couplage de l'excédent d'espaceur thiol-hydrazide, le nombre d'équivalents en ligand est limité à 4 éq soit 1 éq par aldéhyde. L'étape de fonctionnalisation de **cRAFT_{Arg}(Mal)₄** est alors engagée dans un tampon phosphate (100 mM, pH 7,2) en présence de **45** comme décrit pour le châssis alanine. L'analyse HPLC du milieu réactionnel montre un pic unique sur le chromatogramme (Figure 29).

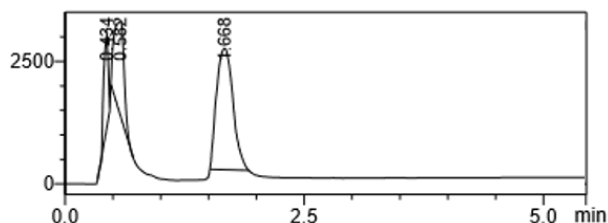


Figure 29. Chromatogramme HPLC du milieu réactionnel du décapeptide **cRAFT_{Arg}(Mal-45)₄** fonctionnalisé par quatre thiohydrydrazides via des liaisons maléimides (Méthode J)

Au vu de la pureté du milieu réactionnel et pour éviter l'étape intermédiaire de purification de **cRAFT_{Arg}(Mal-45)₄**, il serait intéressant d'engager le produit sans purification dans les ligations acylhydrazones. La construction de la cage pourrait ainsi être réalisée selon une approche

"one-pot", en l'absence de purification de l'intermédiaire **cRAFT_{Arg}(Mal-45)₄**. Le défi reste de trouver un moyen de changer la nature du solvant pour la deuxième étape, puisque les essais précédents ont montré la capacité à former la cage uniquement en conditions de pH 5,0 et en présence de DMF. L'addition de Michael de la première étape impliquant une catalyse basique, ces conditions de pH acide ne sont pas favorables. Deux solutions sont alors testées. La première repose sur la synthèse du composé multivalent **cRAFT_{Arg}(Mal-45)₄** dans le DMF, compatible ensuite avec la deuxième étape de formation de la cage. L'autre essai repose sur la préparation de l'intermédiaire **cRAFT_{Arg}(Mal-45)₄** dans un milieu tamponné par de l'acétate de triéthyl ammonium (TEAA) (100 mM, pH 7,2). Ce tampon présente l'avantage d'être constitué de sels volatils, éliminables par lyophilisation. Le phosphate, précédemment utilisé pour tamponner le milieu réactionnel, ne présente pas cette caractéristique. En utilisant le TEAA, le système est lyophilisé une fois la préparation de **cRAFT_{Arg}(Mal-45)₄** réalisée, puis le produit séché. La plate-forme est ensuite solubilisée dans le DMF et engagée dans l'ultime étape.

L'analyse LCMS de chacun de ces deux milieux montre la formation de **cRAFT_{Arg}(Mal-45)₄**. L'ajout d'1 éq de plate-forme **cRAFT(ALD)₄** a permis d'aboutir à la cage dans des conditions analytiques (Figure 30).

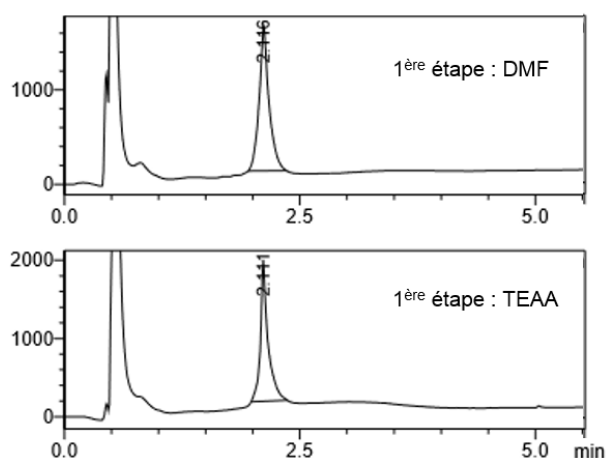


Figure 30. Comparaison des conditions de la seconde étape de formation de la cage (Méthode J)

A l'heure de la rédaction de ce manuscrit, le travail de changement d'échelle est en cours afin de pouvoir isoler la **Cage(Arg)**. Les futurs travaux se porteront sur la construction de la cage avec l'espaceur **46**. La nature des espaceurs pourra ensuite être diversifiée en créant de petits peptides avec une extrémité thiol, et l'autre, hydrazide.

B. Ligations simultanées

La stratégie de synthèse en deux étapes successives, mettant en jeu à la fois des ligations de types thiol-maléimides et acylhydrazones, a montré la possibilité de générer des cages.

L'objectif est à présent d'étudier la préparation de ces cages selon une stratégie simultanée dite "one-pot".

Les premiers essais à l'échelle analytique, ont permis d'observer la construction de la **Cage(Ala)** dans un mélange tampon phosphate (100 mM, pH 6,0)/DMF (1/1) ainsi que dans le DMF seul. Le DMF permet d'obtenir des résultats satisfaisants, tout comme pour l'approche de ligation en deux temps. L'essai à l'échelle du milligramme est alors réalisé dans le DMF en mélangeant les deux plate-formes **cRAFT(Mal)**₄ et **cRAFT(ALD)**₄ avec 4 éq de thioglycolate hydrazide **45** (Figure 31).

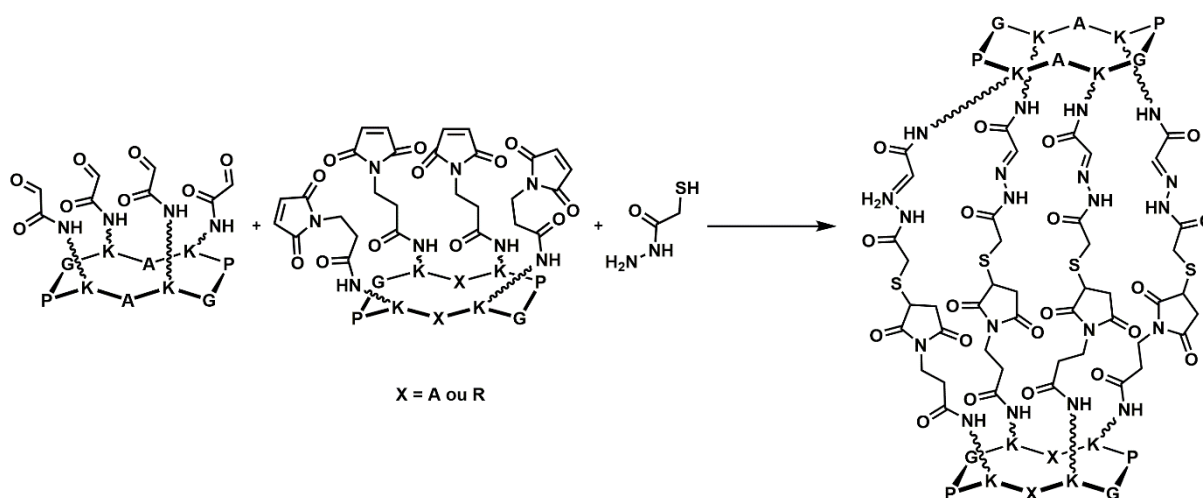


Figure 31. Voie de synthèse de la cage thiol-maléimide - acylhydrazone par l'approche simultanée

Après purification par HPLC semi-préparative sur phase inverse, la **Cage(Ala)** est obtenue avec un rendement de 10%. L'analyse MALDI-ToF confirme ce résultat (Figure 32).

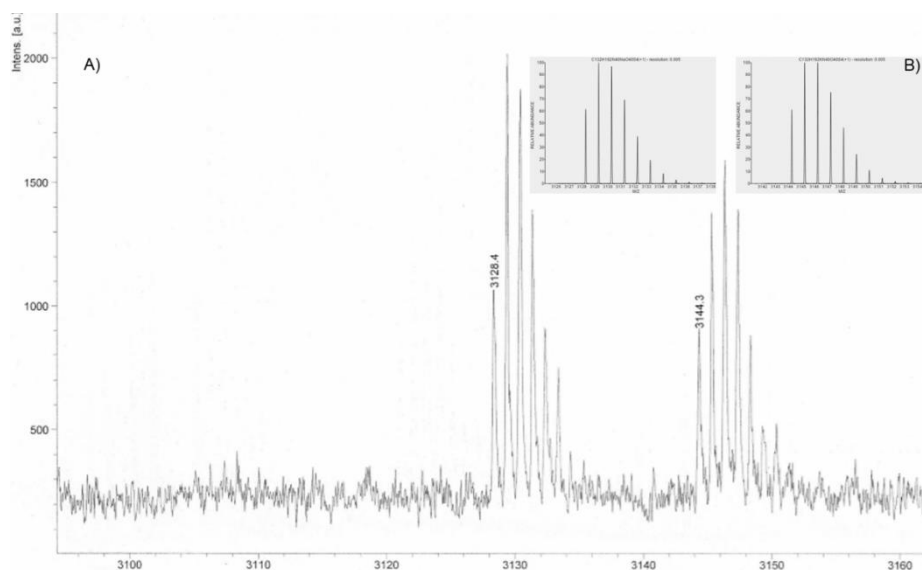


Figure 32. Analyse MALDI-ToF de la **Cage(Ala)** synthétisée par l'approche simultanée. Calculée pour $[C_{132}H_{192}N_{40}O_{40}S_4+Na]^+$ 3128,31, mesurée 3128,37 et $[C_{132}H_{192}N_{40}O_{40}S_4+K]^+$ 3144,27, mesurée 3144,33 avec A) le profil isotopique obtenu et B) le profil isotopique théorique^[42]

Un mode opératoire identique est appliqué à la synthèse de l'homologue arginine **Cage(Arg)**. Cette fois-ci, 4,6 mg sont isolés avec un rendement atteignant 33%, après purification. Cette augmentation de rendement par rapport à la **Cage(Ala)** peut s'expliquer par une meilleure solubilité du système, facilitant ainsi la purification par HPLC sur phase inverse. Les analyses LCMS et MALDI-ToF confirment quant à elles l'obtention de la cage (Figure 34).

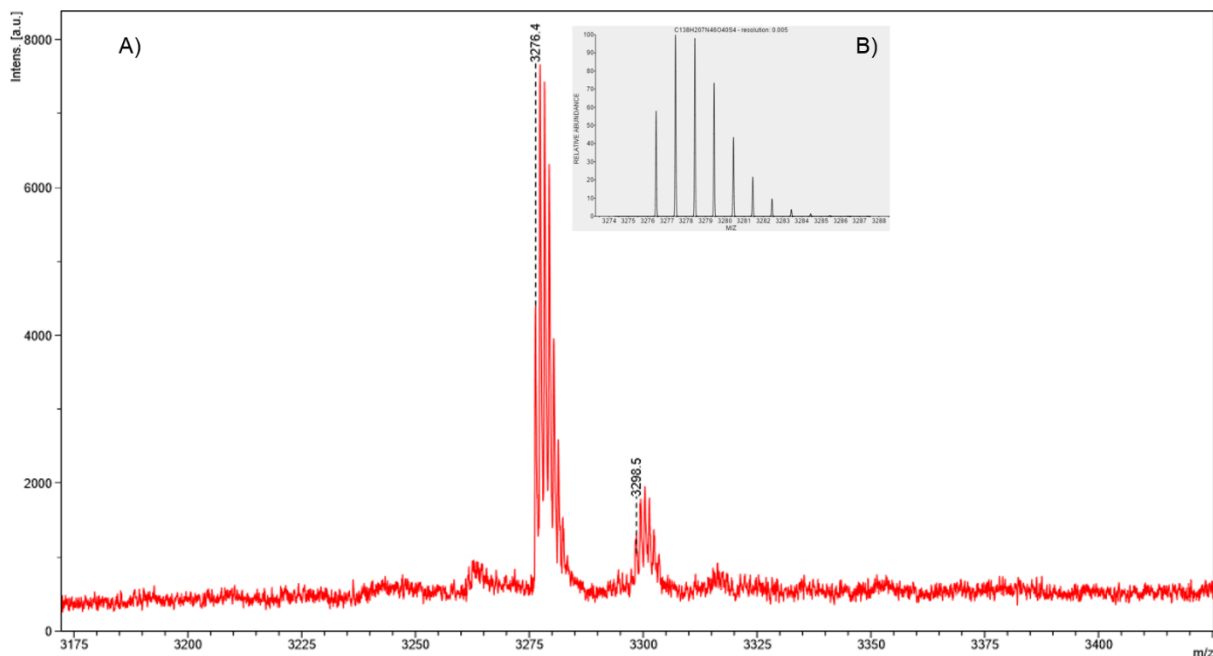


Figure 33. Spectre MALDI-ToF confirmant la synthèse en une étape de la **Cage(Arg)**. Calculée pour $[C_{138}H_{206}N_{46}O_{40}S_4+H]^+$ 3276,36, mesurée 3276,44 avec A) le profil isotopique obtenu et B) le profil isotopique théorique^[42]

L'étude de la cristallisation de ces cages, dans le but de déterminer la taille de la cavité et la nature des composés pouvant être encapsulés, serait d'un grand intérêt pour mieux connaître ce système. Une fois ces caractéristiques connues, il serait intéressant de varier la longueur et la nature des espaceurs. Ceci permettrait de travailler l'architecture des cages et ainsi de créer des systèmes dont la taille des cavités serait différente.

VIII. Conclusion

Ce chapitre a montré la difficulté à trouver des conditions de synthèse optimales pour la préparation de cages. Malgré une expertise déjà développée pour un certain nombre de ligations, la présence d'une seconde fonction entraîne des difficultés dans la construction de ces cages multivalentes.

Cependant, le travail fourni pour la préparation de ces cages peptidiques a permis de créer une nouvelle catégorie de systèmes, la cage thiol-maléimide - acylhydrazone. Deux approches ont été développées et étudiées, l'une pour la préparation des cages en deux étapes successives et la seconde en réalisant les couplages de manière simultanée. Ainsi, ces

expériences ont permis d'aboutir à l'isolation de deux macromolécules issues de l'approche simultanée avec des rendements de 10 à 33%. Ces composés sont différenciés par la nature des résidus d'une des plate-formes peptidiques pour jouer sur la solubilité du système. Cette synthèse doit à présent être appliquée à une large variété d'espaceurs synthétiques et les composés générés devront faire l'objet d'une étude structurale sur les molécules cristallisées. Ces expériences devraient permettre d'obtenir des informations sur la taille de la cavité et ainsi permettre d'appréhender la nature des espèces pouvant être encapsulées. Le type de ligation choisi pour la préparation de tels systèmes n'est pas négligeable. Dans ce cas, la présence des acylhydrazones pourrait permettre de tester le potentiel dynamique des cages pour libérer, à terme, le contenu à proximité de sa cible.

IX. Références

- [1] a) Diels-Alder in Aqueous Molecular Hosts: Unusual Regioselectivity and Efficient Catalysis, M. Yoshizawa, M. Tamura and M. Fujita, *Science*, **2006**, *312*, 251-254; b) Stabilization of Labile Carbonyl Addition Intermediates by a Synthetic Receptor, T. Iwasawa, R. J. Hooley and J. Rebek, *Science*, **2007**, *317*, 493-496; c) Acid Catalysis in Basic Solution: A Supramolecular Host Promotes Orthoformate Hydrolysis, M. D. Pluth, R. G. Bergman and K. N. Raymond, *Science*, **2007**, *316*, 85-88.
- [2] White Phosphorus Is Air-Stable Within a Self-Assembled Tetrahedral Capsule, P. Mal, B. Breiner, K. Rissanen and J. R. Nitschke, *Science*, **2009**, *324*, 1697-1699.
- [3] a) Synthetic Strategies, Structure Patterns, and Emerging Properties in the Chemistry of Modular Porous Solids, O. M. Yaghi, H. Li, C. Davis, D. Richardson and T. L. Groy, *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, 474-484; b) Design, Chirality, and Flexibility in Nanoporous Molecule-Based Materials, D. Bradshaw, J. B. Claridge, E. J. Cussen, T. J. Prior and M. J. Rosseinsky, *Acc. Chem. Res.*, **2005**, *38*, 273-282; c) Efficient Self-Assembly of Di-, Tri-, Tetra-, and Hexavalent Hosts with Predefined Geometries for the Investigation of Multivalency, I. Linder, S. Leisering, R. Puttreddy, N. Rades, K. Rissanen and C. A. Schalley, *Chem. Eur. J.*, **2015**, n/a-n/a.
- [4] Metal-organic frameworks: a new class of porous materials, J. L. C. Rowsell and O. M. Yaghi, *Microporous Mesoporous Mater.*, **2004**, *73*, 3-14.
- [5] Metal-Organic Frameworks (MOFs), J. Zhou, Hong-Cai and S. Kitagawa, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 5415-5418.
- [6] Two Interpenetrating 3D Networks Which Generate Spacious Sealed-Off Compartments Enclosing of the Order of 20 Solvent Molecules in the Structures of $Zn(CN)(NO_3)(tpt)^{2/3} \cdot solv$ ($tpt = 2,4,6$ -tri(4-pyridyl)-1,3,5-triazine, $solv = \sim^{3/4}C_2H_2Cl_4 \cdot^{3/4}CH_3OH$ or $\sim^{3/2}CHCl_3 \cdot^{1/3}CH_3OH$), S. R. Batten, B. F. Hoskins and R. Robson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 5385-5386.
- [7] a) Open Square-Grid Coordination Polymers of the Dimensions $20 \times 20 \text{ \AA}$: Remarkably Stable and Crystalline Solids Even after Guest Removal, K. Biradha, Y. Hongo and M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 3843-3845; b) QMOF-1 and QMOF-2: Three-Dimensional Metal-Organic Open Frameworks with a Quartzlike Topology, J. Sun, L. Weng, Y. Zhou, J. Chen, Z. Chen, Z. Liu and D. Zhao, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 4471-4473; c) Interlocked Chiral Nanotubes Assembled from Quintuple Helices, Y. Cui, S. J. Lee and W. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 6014-6015; d) Rational Synthesis of Stable Channel-Like Cavities with Methane Gas Adsorption Properties: $[(Cu_2(pzdc)_2(L))_n]$ ($pzdc = \text{pyrazine-2,3-dicarboxylate}$; $L = \text{a Pillar Ligand}$), M. Kondo, T. Okubo, A. Asami, S.-i. Noro, T. Yoshitomi, S. Kitagawa, T. Ishii, H. Matsuzaka and K. Seki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, *38*, 140-143.
- [8] a) Two-Dimensional Sheets of Tetragonal Copper(II) Lattices: X-Ray Crystal Structure and Magnetic Properties of $[Cu(C_6O_4Cl_2)(C_4H_4N_2)]_n$, S. Kawata, S. Kitagawa, M. Kondo, I. Furuchi and M. Munakata, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1994**, *33*, 1759-1761; b) Novel Intercalation Host System Based on Transition Metal (Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+})-Chloranilate Coordination Polymers. Single Crystal Structures and Properties, S. Kawata, S. Kitagawa, H. Kumagai, T. Ishiyama, K. Honda, H. Tobita, K. Adachi and M. Katada, *Chem. Mater.*, **1998**, *10*, 3902-3912; c) X-Ray diffraction and magnetic studies on a series of isostructural divalent metal chloranilates with zigzag polymeric chain structures and on a dinuclear iron(III) chloranilate, B. F. Abrahams, K. D. Lu, B. Moubaraki, K. S. Murray and R. Robson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2000**, 1793-1797; d) Hybrid molecular magnets incorporating organic donors and other electroactive molecules, E. Coronado, J. R. Galán-Mascarós and C. J. Gómez-García, *Synth. Met.*, **1999**, *102*, 1459-1460; e) Selective amine intercalation behavior of $[Cd(1,5\text{-nds})(H_2O)_2]$, J. Cai, J.-S. Zhou and M.-L. Lin, *J. Mater. Chem.*, **2003**, *13*, 1806-1811; f) Intercalation of Alcohols in Ag Sulfonates: Topotactic Behavior Despite Flexible Layers, A. P. Côté, M. J. Ferguson, K. A. Khan, G. D. Enright, A. D. Kulynych, S. A. Dalrymple and G. K. H. Shimizu, *Inorg. Chem.*, **2002**, *41*, 287-292.
- [9] Designed layer assembly: a three-dimensional framework with 74% extra-framework volume by connection of infinite two-dimensional sheets, T. J. Prior, D. Bradshaw, S. J. Teat and M. J. Rosseinsky, *Chem. Commun.*, **2003**, 500-501.
- [10] Rational Design of a Novel Intercalation System. Layer-Gap Control of Crystalline Coordination Polymers, $\{[Cu(CA)(H_2O)_m](G)_n\}$ ($m = 2$, $G = 2,5$ -Dimethylpyrazine and Phenazine; $m = 1$, $G = 1,2,3,4,6,7,8,9$ -Octahydrophenazine), S. Kawata, S. Kitagawa, H. Kumagai, C. Kudo, H. Kamesaki, T. Ishiyama, R. Suzuki, M. Kondo and M. Katada, *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 4449-4461.
- [11] Selective gas adsorption and separation in metal-organic frameworks, J.-R. Li, R. J. Kuppler and H.-C. Zhou, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 1477-1504.
- [12] Functional Porous Coordination Polymers, S. Kitagawa, R. Kitaura and S.-i. Noro, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 2334-2375.
- [13] Organic cage compounds - from shape-persistency to function, G. Zhang and M. Mastalerz, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 1934-1947.

- [14] a) Carbon Dioxide Capture in Metal–Organic Frameworks, K. Sumida, D. L. Rogow, J. A. Mason, T. M. McDonald, E. D. Bloch, Z. R. Herm, T.-H. Bae and J. R. Long, *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 724-781; b) Perspective of microporous metal-organic frameworks for CO₂ capture and separation, Z. Zhang, Z.-Z. Yao, S. Xiang and B. Chen, *Energy Environ. Sci.*, **2014**, *7*, 2868-2899; c) Carbon capture in metal-organic frameworks-a comparative study, J. M. Simmons, H. Wu, W. Zhou and T. Yildirim, *Energy Environ. Sci.*, **2011**, *4*, 2177-2185.
- [15] Giant Electroactive M₄L₆ Tetrahedral Host Self-Assembled with Fe(II) Vertices and Perylene Bisimide Dye Edges, K. Mahata, P. D. Frischmann and F. Würthner, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 15656-15661.
- [16] Dynamic Combinatorial Libraries of Disulfide Cages in Water, K. R. West, K. D. Bake and S. Otto, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 2615-2618.
- [17] Shape-Persistent Organic Cage Compounds by Dynamic Covalent Bond Formation, M. Mastalerz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 5042-5053.
- [18] a) Recent advances in dynamic covalent chemistry, Y. Jin, C. Yu, R. J. Denman and W. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 6634-6654; b) Boronic acid building blocks: tools for self assembly, R. Nishiyabu, Y. Kubo, T. D. James and J. S. Fossey, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 1124-1150; c) Multicomponent Assembly of Boronic Acid Based Macrocycles and Cages, N. Christinat, R. Scopelliti and K. Severin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 1848-1852.
- [19] Porous organic cages, T. Tozawa, J. T. A. Jones, S. I. Swamy, S. Jiang, D. J. Adams, S. Shakespeare, R. Clowes, D. Bradshaw, T. Hasell, S. Y. Chong, C. Tang, S. Thompson, J. Parker, A. Trewin, J. Bacsá, A. M. Z. Slawin, A. Steiner and A. I. Cooper, *Nat. Mater.*, **2009**, *8*, 973-978.
- [20] Reversible water uptake by a stable imine-based porous organic cage, T. Hasell, M. Schmidtman, C. A. Stone, M. W. Smith and A. I. Cooper, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 4689-4691.
- [21] Self-assembled capsules based on tetrafunctionalized calix[4]resorcinarene cavitands, K. Kobayashi and M. Yamanaka, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 449-466.
- [22] One-Pot, 18-Component Synthesis of an Octahedral Nanocontainer Molecule, X. Liu, Y. Liu, G. Li and R. Warmuth, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 901-904.
- [23] Solvent Effects in Thermodynamically Controlled Multicomponent Nanocage Syntheses, X. Liu and R. Warmuth, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 14120-14127.
- [24] Self-Assembly of a Cavitand-Based Capsule by Dynamic Boronic Ester Formation, N. Nishimura and K. Kobayashi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 6255-6258.
- [25] a) Polyaza Cryptand Receptor Selective for Dihydrogen Phosphate, P. Mateus, R. Delgado, P. Brandão and V. Félix, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 8638-8646; b) Ion Pair-Driven Heterodimeric Capsule Based on Boronate Esterification: Construction and the Dynamic Behavior, K. Kataoka, T. D. James and Y. Kubo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 15126-15127.
- [26] Soft templates in encapsulation complexes, D. Ajami, L. Liu and J. Rebek Jr, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 490-499.
- [27] Dynamic Hemarcerands and Hemicarceplexes, S. Ro, S. J. Rowan, A. R. Pease, D. J. Cram and J. F. Stoddart, *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 2411-2414.
- [28] a) Directed Evolution of a Protein Container, B. Wörsdörfer, K. J. Woycechowsky and D. Hilvert, *Science*, **2011**, *331*, 589-592; b) Structure of a 16-nm Cage Designed by Using Protein Oligomers, Y.-T. Lai, D. Cascio and T. O. Yeates, *Science*, **2012**, *336*, 1129.
- [29] Structure of a designed protein cage that self-assembles into a highly porous cube, Y.-T. Lai, E. Reading, G. L. Hura, K.-L. Tsai, A. Laganowsky, F. J. Asturias, J. A. Tainer, C. V. Robinson and T. O. Yeates, *Nat. Chem.*, **2014**, *6*, 1065-1071.
- [30] Self-Assembling Nano-Architectures Created from a Protein Nano-Building Block Using an Intermolecularly Folded Dimeric de Novo Protein, N. Kobayashi, K. Yanase, T. Sato, S. Unzai, M. H. Hecht and R. Arai, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 11285-11293.
- [31] Assembling Materials with DNA as the Guide, F. A. Aldaye, A. L. Palmer and H. F. Sleiman, *Science*, **2008**, *321*, 1795-1799.
- [32] Supramolecular DNA assembly, C. K. McLaughlin, G. D. Hamblin and H. F. Sleiman, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 5647-5656.
- [33] From molecular to macroscopic via the rational design of a self-assembled 3D DNA crystal, J. Zheng, J. J. Birktoft, Y. Chen, T. Wang, R. Sha, P. E. Constantinou, S. L. Ginell, C. Mao and N. C. Seeman, *Nature*, **2009**, *461*, 74-77.
- [34] a) Programmable molecular recognition based on the geometry of DNA nanostructures, S. Woo and P. W. K. Rothemund, *Nat. Chem.*, **2011**, *3*, 620-627; b) Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, P. W. K. Rothemund, *Nature*, **2006**, *440*, 297-302; c) DNA Origami: The Art of Folding DNA, B. Saccà and C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 58-66.

- [35] a) Thermodynamics of base pairing, D. H. Turner, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1996**, 6, 299-304; b) Stability of DNA Duplexes with Watson–Crick Base Pairs: A Predicted Model, M. Sundaralingam and P. K. Ponnuswamy, *Biochemistry*, **2004**, 43, 16467-16476.
- [36] Modular Access to Structurally Switchable 3D Discrete DNA Assemblies, F. A. Aldaye and H. F. Sleiman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 13376-13377.
- [37] Self-Assembling Cages from Coiled-Coil Peptide Modules, J. M. Fletcher, R. L. Harniman, F. R. H. Barnes, A. L. Boyle, A. Collins, J. Mantell, T. H. Sharp, M. Antognozzi, P. J. Booth, N. Linden, M. J. Miles, R. B. Sessions, P. Verkade and D. N. Woolfson, *Science*, **2013**, 340, 595-599.
- [38] Dynamic Formation of Hybrid Peptidic Capsules by Chiral Self-Sorting and Self-Assembly, H. Jędrzejewska, M. Wierzbicki, P. Cmoch, K. Rissanen and A. Szumna, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 13760-13764.
- [39] Multivalent DNA recognition by self-assembled clusters: deciphering structural effects by fragments screening and evaluation as siRNA vectors, E. Bartolami, Y. Bessin, N. Bettache, M. Gary-Bobo, M. Garcia, P. Dumy and S. Ulrich, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 9427-9438.
- [40] a) Oxidative Folding of Peptides with Cystine-Knot Architectures: Kinetic Studies and Optimization of Folding Conditions, M. Reinwarth, B. Glotzbach, M. Tomaszowski, S. Fabritz, O. Avrutina and H. Kolmar, *ChemBioChem*, **2013**, 14, 137-146; b) Orthogonal breaking and forming of dynamic covalent imine and disulfide bonds in aqueous solution, M. E. Bracchi and D. A. Fulton, *Chem. Commun.*, **2015**, 51, 11052-11055; c) Solvent Composition Dictates Emergence in Dynamic Molecular Networks Containing Competing Replicators, G. Leonetti and S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137, 2067-2072.
- [41] Hepatocyte Targeting and Intracellular Copper Chelation by a Thiol-Containing Glycocyclopeptide, A. M. Pujol, M. Cuillel, O. Renaudet, C. Lebrun, P. Charbonnier, D. Cassio, C. Gateau, P. Dumy, E. Mintz and P. Delangle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 286-296.
- [42] ChemCalc: A Building Block for Tomorrow's Chemical Infrastructure, L. Patiny and A. Borel, *J. Chem. Inf. Model.*, **2013**, 53, 1223-1228.

Chapitre 7

Experimental Part

Chapitre 7 : Partie Expérimentale – Experimental Part

I. Materials and Methods	206
A. <i>Synthesis</i>	206
1. Linear and cyclic synthesis.....	206
2. Hydrazide peptide synthesis	207
3. Synthesis of PNA analogues	208
B. <i>Purification and Characterizations</i>	209
C. <i>Biophysical techniques and assays</i>	210
D. <i>Biological assays</i>	213
II. Multivalent clusters for DNA recognition	214
A. <i>Peptide scaffolds</i>	214
1. Dipeptides	214
2. Cyclic peptide	215
3. Linear peptide.....	216
B. <i>Hydrazide building blocks</i>	217
1. Solution approach	217
2. Solid phase synthesis.....	219
C. <i>Clusters</i>	222
III. Iminosugar clusters for the inhibition of glycosidases	227
A. <i>Peptide scaffolds</i>	227
1. Aldehyde scaffolds	227
2. Maleimide scaffolds	227
B. <i>Modified iminosugars</i>	229
C. <i>Clusters</i>	237
IV. Functionalized α-PNAs	239
A. <i>Modified amino acids</i>	239
B. <i>α-PNAs</i>	244
V. Peptide-based cages	244
A. <i>Peptide scaffolds</i>	244
1. Serine and Aldehyde scaffolds	244
2. Maleimide scaffolds	245
3. Cysteine scaffold.....	246
B. <i>Bifunctional spacers</i>	246
1. Hydrazide-oxime spacers	246
2. Thiol-hydrazide spacers.....	248
C. <i>Cages</i>	249
VI. References	251

I. Materials and Methods

A. Synthesis

All solvents and chemical reagents were purchased from commercial suppliers and used without further purifications. Dry solvents were purchased in anhydrous quality from Fisher Scientific (Acros). For dichloromethane, amylene was the stabilizer. Oligonucleotides were purchased from Eurogentec as RP-Cartridge purification or HPLC-RP purification (Ultrapure Gold, >95% purity) in dried format or from Sigma Aldrich for ctDNA. The nomenclatures of the novel compounds described were determined by ChemBioDraw Ultra software (version 13.0).

All the peptide syntheses developed in this thesis were based on a Fmoc strategy.

1. Linear and cyclic synthesis

Peptide synthesis. The automatic solid-phase peptide synthesis (SPPS) was carried out on a Liberty, CEM[®] instrument equipped with microwave. The following conditions were used:

Solid support: 2-chlorotrityl chloride resin.

Coupling conditions: Fmoc-AA-OH or **2** (3 eq.), HBTU (3 eq.), DIEA (5 eq.), DMF, 70°C for 5 min with microwave irradiation (0.25 mmol scale: 40 W, 0.1 mmol scale: 23 W). Double coupling (7 min) was used for arginine. In order to prevent diketopiperazine formation, the coupling of the amino acids next to Pro–Gly sequence was performed without heating or microwaves.

Deprotection conditions: piperidine/DMF (2/8). 75°C/40 W for 30 s, then 70°C/45 W for 3 min (twice).

Cleavage conditions: Peptides were cleaved by either mild or harsh conditions:

Mild conditions: TFA/CH₂Cl₂ (1/99) (3 x 3 min), then MeOH/pyridine (8/2).

Harsh conditions: TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) (5 mL) for 2 hours, then filtered and washed with CH₂Cl₂. This condition also affected the deprotection of the side groups.

In both cases, the filtrate was partially concentrated *in vacuo*, and precipitated with Et₂O. After centrifugation and removal of the supernatant, the compound was freeze dried.

Cyclization of the peptides. After cleavage of the resin using the mild conditions, the peptides (0.5 mM) were solubilized in dry DMF and 1.5 eq of PyBOP and 11 eq of DIEA were added to the solution. The mixture was stirred at room temperature for 30 min and the DMF was partially concentrated *in vacuo*. The cyclic peptide was precipitated by adding Et₂O and was centrifuged for 5 min (10000 tr/min). The supernatant was then removed and the resulting solid was dried to remove traces of solvent. The product was solubilized in MilliQ H₂O and freeze dried.

Deprotection of the peptides. Deprotection of the peptides was performed according to the cleavage procedure under harsh conditions described above.

Quantification of the resin loading. In order to determine the resin loading, 10 mg of resin were suspended in 1 mL of a solution of Piperidine/DMF (2/8) for 20 min and filtered. 100 μ L of the filtrate were dissolved in 9.9 mL of DMF and UV-Vis absorbance was measured at 301 nm. The resin charge was determined as:^[1]

$$\text{Resin loading (mmol/g)} = \frac{\text{Abs} \cdot V \cdot 10^3}{\epsilon \cdot v \cdot m \cdot l}$$

Équation 1. Resin loading where Abs represents the absorbance measured at 301 nm, V represents the total volume of solution prepared (μ L), ϵ represents the molar extinction coefficient for Fmoc: 7800 ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), v for the volume prior to dilution with DMF (μ L), m represents the mass of dried resin engaged in the deprotection (mg) and l represents the length of the cuvette (cm)

2. Hydrazide peptide synthesis

2-chlorotrityl chloride (2-CTC) resin loading with Fmoc-Gly-OH. The resin (3 g, 4.8 mmol $\text{Cl} \cdot \text{g}^{-1}$) was loaded with Fmoc-Gly-OH (4.3 g, 14.4 mmol) in presence of DIEA (4.2 mL, 24 mmol, 2 M) in 40 mL DMF/dichloromethane for 1.5 h. The resin was then filtered, washed with MeOH, DMF (3 \times), CH_2Cl_2 (2 \times), diethyl ether (1 \times) and dried *in vacuo*. The loading was quantified by UV-Vis spectroscopy as describe above.

Preparation of the Fmoc-hydrazine resin. DIEA (2.45 mL, 14.05 mmol) was added to a suspension of 2-chlorotrityl chloride resin (1.75 g, 2.81 mmol $\text{Cl} \cdot \text{g}^{-1}$) in NMP/DMSO (4/1) (9 mL). A solution of 9-fluorenylmethyl carbazate (Fmoc-hydrazide, 2.14 g, 8.43 mmol) in DMSO (9 mL) was then added and the mixture was stirred for 2 h. After filtration, capping was performed by mixing with MeOH for a few minutes. The resin was then filtered, washed with DMSO (3 \times), CH_2Cl_2 (2 \times), isopropanol (1 \times), CH_2Cl_2 (2 \times) and Et_2O (3 \times), and dried *in vacuo*. The loading was quantified by UV-Vis spectroscopy according to the procedure described above.

Hydrazide peptide coupling procedure. The procedure was inspired from the literature.^[2] The initial Fmoc deprotection was carried out as follows: the resin (500 mg, 0.195 mmol) was suspended in a solution of piperidine/NMP/DMSO (30/56/14) (2 mL). After 1 h, it was filtered, washed with DMSO (3 \times), CH_2Cl_2 (2 \times), isopropanol (1 \times), CH_2Cl_2 (2 \times), Et_2O (3 \times), and dried *in vacuo*. The resin was then suspended in a solution of NMP/DMSO (4/1) (500 μ L). The Fmoc-AA-OH (0.351 mmol) was pre-activated by addition, in a solution of NMP/DMSO (4/1) (1 mL), of DIEA (98 μ L, 0.585 mmol) and HATU (133.5 mg, 0.351 mmol). After 30 min, the mixture of pre-activated amino acid was added to the resin. After 3 hours, the resin was filtered and this

coupling procedure was repeated twice. The resin was then washed (DMSO (3x), CH₂Cl₂ (2x), isopropanol (1x), CH₂Cl₂ (2x) and Et₂O (3x)) and dried. Capping was carried out by suspending the resin in a solution of acetic anhydride/CH₂Cl₂ (1/1) (2 mL) for 20 min (procedure repeated twice). The resin was then filtered, washed (DMSO (3x), CH₂Cl₂ (2x), isopropanol (1x), CH₂Cl₂ (2x) and Et₂O (3x)) and dried *in vacuo*. The peptide was cleaved according to the general procedure for harsh cleavage conditions described above.

TNBS test. TNBS test is used for the control of the complete coupling reaction of free amino groups while SPPS occurring. TNBS test is performed by adding three drops of a solution of 1% of TNBS in DMF and 1 mL of a solution of DMF/DIEA (9/1) to a small quantity of resin beads in a tube. The mixture was left at room temperature for 30 min. Remaining of free amino functions resulted in a red coloration of the resin beads (positive TNBS test) while negative TNBS test resulted in colorless beads.

3. Synthesis of PNA analogues

General procedure for loading the resin. The chlorotriptyl resin (1.6 mmol/g chlorine loading) is swelled in a minimum of CH₂Cl₂. The Fmoc-AA-OH (3 eq/Cl) is dissolved in CH₂Cl₂ together with DIEA (5 eq/Cl) and added to the resin. After 90 minutes under mechanical stirring, the resin is washed 3 times with CH₂Cl₂/MeOH/DIEA (17/2/1), then CH₂Cl₂, DMF, CH₂Cl₂ and finally Et₂O and then dried under vacuum. Loading was determined using Fmoc dosage described above, giving amino acid loading about 0.60 mmol/g.

General procedure for coupling. The resin is swelled in the minimum of NMP/DMSO (4/1). The Fmoc amino acid (2 eq/free amine) is pre-activated in the same solvent (0.5 mM), by addition of HATU (1 eq/amino acid, added as a 0.5 M solution in NMP) and DIEA (2 eq/amino acid, added as a 2 M solution in NMP). A double coupling step was performed for each amino acid. Complete consumption of the peptide was evaluated by TNBS test.

General procedure for Fmoc deprotection. 1 mL of 30% piperidine in NMP/DMSO (4/1) was added to the resin. The mixture was stirred for 30 minutes, and then filtrated. This filtrate was then used in the Fmoc test for the quantification of coupling yields by UV absorption spectroscopy described above. The resin was further washed with NMP/DMSO 4/1 (3x), CH₂Cl₂ (3x), isopropanol (3x), CH₂Cl₂ (3x), Et₂O (3x), and concentrated *in vacuo*.

General resin cleavage procedure. The cleavage of the resin was realized according to the mild cleavage conditions described above. The combined filtrates were then concentrated to dryness to give the crude peptide.

B. Purification and Characterizations

TLC and column chromatography. Thin Layer Chromatography were performed on silica gel 60 F254 plates purchased from Merck with detection under UV light (254 nm) and / or staining with a ninhydrine solution in ethanol, followed by heating.

Flash column chromatography were performed^[3] on silica gel 60 (40 – 63 μm) purchased from Merck on a classical glass column.

NMR analysis. ¹H NMR spectra were recorded on Bruker Avance 400 spectrometer at 400MHz at the ENSCM. All spectra were referenced with respect to the residual solvent peak for the deuterated solvent (CHCl₃: 7.26 ppm, d⁶-DMSO: 2.50 ppm, CD₃OD: 3.31 ppm, D₂O: 4.79).^[4] Chemical shifts are given in parts per million. Peaks are reported as (δ , in ppm), multiplicity (s for singlet, d for doublet, t for triplet, q for quartet, dd for doublet of doublet, ddd for doublet of doublet of doublets, dddd for doublet of doublet of doublet of doublets, m for multiplet and br for broad), coupling constant (J in Hertz) and integration. The assigned proton is written in italic. Spectra were recorded at 25°C.

¹³C NMR spectra were recorded on Bruker Avance 400 spectrometer at 100MHz at the ENSCM. All spectra were referenced with respect to the residual solvent peak for the deuterated solvent (CHCl₃: 7.26 ppm, d⁶-DMSO: 2.50 ppm, CD₃OD: 3.31 ppm, D₂O: 4.79).^[4] Chemical shifts are given in parts per million. Peaks are reported as (δ , in ppm).

Mass spectrometry. ESI. ESI mass spectrometry analyses were carried out on a Waters Micromass ZQ mass spectrometer (positive mode). High resolution mass spectrometry analyses were carried out at the Laboratoire de Mesures Physiques, IBMM – Université Montpellier, and were obtained on a Waters Micromass QToF mass spectrometer (positive mode).

MALDI-ToF mass spectrometry. MALDI-ToF mass spectrometry was performed on an Ultraflex III ToF/ToF instrument (Bruker Daltonics, Wissembourg, France) by either Dr. Sonia CANTEL (IBMM, UMR 5247, Université de Montpellier) or at the Laboratoire de Mesures Physiques, IBMM – Université Montpellier.

HPLC. Analytical RP-HPLC analyses were performed on a Waters HPLC 2695 (EC Nucleosil 300-5 C18, (125 x 3 mm) column, Macherey-Nagel) equipped with a Waters 996 DAD detector with the following linear gradients of solvent B (acetonitrile 100%) into solvent A (TEAA 100 mM 95% and acetonitrile 5%): Method A: 0 to 95% of solvent B in 5 min; flow: 1 mL/min; Method B: 0 to 30% of solvent B in 45 min, Method C: 0 to 95% of solvent B in 45 min, or with the following linear gradients of solvent B (acetonitrile 90%, H₂O 9.9% and TFA 0.1%) into

solvent A' (H₂O 99.9% and TFA 0.1%): Method D: 5 to 100% of solvent B in 5 min; flow: 1 mL/min, Method E: 5 to 100% of solvent B in 45 min. Retention times (t_R) are given in minutes. *Semi-preparative RP-HPLC* were performed on a Waters 515 HPLC (VP Nucleodur 250-21 C18, HTec 7 μ m column, Macherey-Nagel) equipped with a Waters 2487 detector [HPLC 1] or on a Waters Prep LC Controller HPLC (XSelect CSH Prep C18, (250 x 30 mm) 5 μ m column, Macherey-Nagel) equipped with a Waters 2489 detector [HPLC 2].

LC-MS. LC-MS analysis were performed either on Waters instruments 2695 HPLC separation module equipped with a Nucleosil C18 column (Macherey-Nagel, 300 Å, 5 μ m 125 mm x 3 mm), connected to Waters 996 photodiode array detector and Waters micromass ZQ mass spectrometer [LC-MS 1] or on Shimadzu LCMS-2020 equipped with a Kinetex C18 column (Phenomenex, 100 Å, 2.6 μ m, 75 mm x 3 mm) [LC-MS 2].

For LC-MS 1, the flow is 1 mL/min and column is heated at 30°C. LC methods follow linear gradient of solvent B' (acetonitrile/H₂O/TFA 90%/9.9%/0.1%) in solvent A' (H₂O/TFA 99.9%/0.1%): Method D: 5 to 100% of solvent B' in 5 min, Method F: 5 to 100% of solvent B' in 23 min and Method G: 5 to 30% of solvent B' in 45 min and then 30 to 100% of solvent B' in 5 min.

For LC-MS 2, the flow is 1 mL/min and column is heated at 40°C. LC methods follow linear gradient of solvent B'' (acetonitrile/TFA 99.9%/0.1%) in solvent A'' (H₂O/TFA 99.9%/0.1%): Method H: 5 to 100% of solvent B'' in 5 min, Method I: 5 to 30% of solvent B'' in 45 min, then 30 to 100% of solvent B'' in 5min; or follow linear gradient of solvent B''' (acetonitrile/Formic Acid 99.9%/0.1%) in solvent A''' (H₂O/Formic acid 99.9%/0.1%): Method J: 5 to 100% of solvent B''' in 5 min. Retention times (t_R) are given in minutes.

UV-Vis. UV-Vis absorption was recorded using a HP 8453 UV-Vis spectrophotometer at ENSCM or a JASCO, J-815 CD Spectrometer at the Laboratoire de Mesures Physiques, IBMM – Université Montpellier.

C. Biophysical techniques and assays

α -mannosidase inhibition assays. α -mannosidase inhibition assays were performed by UV-Vis spectroscopy on a Thermo, Multiskan Ascent 354 Spectrometer. The experiments were carried out by Renaud ZELLI and Pr. Alberto MARRA (Glycochemistry & Molecular Recognition, IBMM, UMR 5247). Inhibition constant (K_i) values were determined by spectrophotometry, measuring the residual hydrolytic activities of α -mannosidase from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) against 4-nitrophenyl α -D-mannopyranoside. Each assay was carried out in phosphate-citrate buffer at pH 5.5. The reactions were initiated by addition of enzyme to a solution of the substrate in the absence or presence of various concentrations

of iminosugar derivative. The mixture was incubated for 10 min at 37 °C and the reaction was quenched by addition of 1M aqueous Na₂CO₃. The absorbance of the resulting mixture was determined at 405 nm. Ki determination and enzyme inhibition mode were determined from the slope of Lineweaver-Burk plots and double reciprocal analysis.

Fluorescence displacement assay. *Ethidium bromide (EtBr) displacement assays* were carried on a Hitachi Fluorescence Spectrophotometer F-2500 and samples were prepared in 3 mL quartz cuvette for N/P=80 experiments and in 0.5 mL quartz cuvette for N/P=2 experiments. Excitation wavelength was set at 546 nm and emission was measured at 590 nm. The low salt buffer contained 100 mM of Sodium Acetate, 10 μM EDTA and 9.4 mM of NaCl. The high salt buffer contained 100 mM of Sodium Acetate, 10 μM EDTA and 150 mM of NaCl. Ethidium bromide was dissolved in the buffer to provide 42 μM concentration and the fluorescence was measured. Calf-thymus DNA (ctDNA) (Sigma-Aldrich) was added from a solution in MilliQ H₂O to provide the desired N/P. Molecules of interest solutions (20-500 mM depending on the compound) were added in microliter portions. The fluorescence measurement was recorded after shaking the solution a few seconds. Formula used for calculating Relative Fluorescence Emission of cluster-ctDNA complex in %:

$$\text{Relative Fluorescence Emission (\%)} = \left(\frac{I_{\text{EtBr-DNA}} - I}{I_{\text{EtBr-DNA}} - I_{\text{EtBr}}} \right)$$

Équation 2. Relative Fluorescence Emission where $I_{\text{EtBr-DNA}}$ represents the fluorescence emission of the EtBr-ctDNA intercalation complex, I represents the measured fluorescence emission, and I_{EtBr} represents the fluorescence emission of EtBr in the absence of ctDNA

Automated microplate reader for ethidium bromide displacement assays. Screening of various scaffolds and building blocks by EtBr displacement assays were carried on a SAFAS Monaco Xenius XML instrument in COSTAR 96-Well plates. Aldehyde scaffolds (20 mM) and hydrazide building blocks **Hyd** (160 mM) were mixed in MilliQ H₂O, in each well, and left overnight at room temperature. Low salt pH 5.0 buffer, ctDNA, and EtBr were then added (final concentration in scaffold: 1 mM). The plates was shaken by orbital agitation (16 Hz, 120 s), and the fluorescence emission was measured during 1 s using a 1200 V voltage and a bandwidth of 6 nm for excitation and 10 nm for emission.

Gel retardation assays. Gel retardation assays were carried out by Dr. Yannick BESSIN (Glycochemistry & Molecular Recognition, IBMM, UMR 5247). The experiments were performed with plasmid DNA were performed using 100 ng of 5.7 kilobase pair expression vector pET-15b (Novagen), which were mixed with the appropriate amounts of ligand (in order to reach the desired N/P ratio) in 0.5x TAE (20 mM Tris-acetate/0.5 mM EDTA, pH 8.0) or 0.5x TBE (20 mM Tris-borate/0.5 mM EDTA, pH 8.0) buffer to obtain a final volume of 10 μL. 2 μL

of Blue 6x loading dye (Fisher Scientific) was added, after which 12 μL was run on a 0.7% agarose gel (50 V). DNA was visualized with SYBER Safe (Life Technologies) or SafeView Plus™ Nucleic Acid Stain (Euromedex). The reference for the gel is GeneRuler 1 kb DNA ladder (250 to 10 000 bp) from Fischer Scientific. Gel retardation assays with siRNA were performed as follows: the cluster: siRNA complexes at a desired N/P were prepared in RNase free water with 300 ng of eGFP siRNA. Electrophoresis was carried out on a 1% wt vol⁻¹ agarose gel in 1x TBE at 55 V for 1 h. The GelRed-stained siRNA was visualized on an ultraviolet transilluminator with a camera.

Isothermal Titration Calorimetry. Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were carried out by Dr. Virginie GERVAIS (IPBS, UMR 5247, CNRS, Université de Toulouse) on a Microcal ITC200 instrument (Microcal), at 25°C. Calf thymus DNA (ctDNA) was suspended into a HEPES buffer (100 mM HEPES, EDTA 10 μM and NaCl 9.4 mM, pH 7.2). DNA concentrations per nucleotide were determined by UV absorbance at 260 nm using the molar absorption coefficient (6600 M⁻¹ cm⁻¹). The ligands were suspended in the same buffered aqueous solution. Experiments consisted of a series of 20 x 2 μl injections of ligand (200–500 μM) into the ctDNA (20–50 μM) containing thermostatic cell (initial delay of 60 s, duration of 4 s and spacing of 180 s). Control experiments were carried out to calculate the heats of dilution for ligand titrated into buffer. The corrected binding isotherms were fitted for a single-site binding model using non-linear least squares analysis to obtain values of equilibrium binding constant (K_a), stoichiometry and enthalpy changes (ΔH) associated with DNA binding. Origin 7.0 software was used for data acquisition and manipulation.

Transmission Electronic Microscopy. Transmission Electronic Microscopy assays were performed on a JEOL 1200 EXII 120 kV instrument at the Laboratoire de Microscopie électronique et analytique, ICGM – Université Montpellier. The compounds were fixed on a full grid of carbon (300 mesh). The sample was then placed under electron flux. The resolution of this technique allow the observation of systems measuring more than 1 nm.

Dynamic light scattering. Particle size measurements were carried out by Dr. Nadir BETTACHE and Dr. Magali GARY-BOBO (IBMM, UMR 5247) on a Zetasizer Nano ZS (Malvern, United Kingdom) with transparent ZEN0040 disposable microcuvette cells (40 μL) at 25°C. The cluster:siRNA complexes were prepared at a defined N/P ratio with a siRNA concentration of 1 μM . Measurements were performed immediately after the complexes formation and after 1 h incubation. Then, NaCl solution was added at a final concentration of 154 mM and measurement was repeated.

D. Biological assays

Biological assays were performed by Dr. Nadir BETTACHE and Dr. Magali GARY-BOBO (IBMM, UMR 5247).

siRNA assays. The MCF7-luc cell line derived from MCF7 human breast cancer cells by stable transfection of firefly luciferase gene (PCDNA 3.1 CMV-Luc-SVNeo) were generously provided by Dr P. Balaguer (ICM Montpellier, France). Selection of resistant clones was performed by geneticin addition at 1 mg.mL⁻¹ until experiments. Cells were grown in phenol red-free F12/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cy3-labeled non-coding siRNA was purchased from Eurogentec (Serring, Belgium). The siRNA targeting sequence for luciferase (AACTTACGCTGAGTACTTCGA) was purchased from QIAGEN. The sense sequence is CUUACGCUGAGUACUUCGA and the antisense sequence is UCGAAGUACUCAGCGUAAG. The MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) assay kit was purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). The cluster: siRNA complexes were prepared as follows: the clusters **cRAFT(Hyd)₄** (20 mM in filtered RNase-free water) were vortexed for 5 s, ultrasonically mixed for 5 min, mixed with siRNA in order to reach the desired N/P, and incubated at room temperature for 20 min.

Fluorescence microscopy. MCF7-luc cells were seeded at a density of 50 000 cells per well and incubated for 24 h in a 8-well tissue culture chambers (Sarstedt, Germany) before treatment. The cells were incubated with **cRAFT(Arg₃)₄**-Cy3-labeled siRNA complexes at a molar ratio of 25/1 (N/P = 9) in OptiMEM (Invitrogen) for 4 h. These cells were then fixed with 500 µl of cold 4% PFA for 30 min and washed twice with PBS. The nuclei were stained using a DAPI solution (Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). Images were taken with an inverted fluorescence microscope (Leica DMRB, Leica Microsystems GmbH, Germany) and analyzed using ImageJ software.

Cell luciferase assay. MCF7-luc cells were seeded at a density of 5000 cells per well in 96-well white opaque tissue culture plates in 150 µl complete culture medium and incubated for 24 h. The cells were then washed with PBS and incubated with various cluster: siRNA complex formulations in OptiMEM at 37 °C for 4 h. Thereafter, 50 µl of 40% serum containing medium was added. Two days after transfection, expression of luciferase was assessed by addition into culture medium of luciferin (10⁻³ M, final concentration) purchased from Promega (France). Living cell luminescence was measured 10 min after by a multilabel plate reader (Wallac1420,

PerkinElmer, USA) for 5 s. Values are expressed as percentage of luciferase activity compared to non-treated wells (set as 100%).

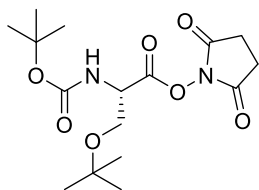
Cytotoxicity assay. The cytotoxicity of cluster: siRNA complexes was determined by the MTT assay. In brief, MCF7-luc cells were seeded at 5000 cells per well in clear, flat-bottomed, 96-well plates (Costar) 24 h before treatment. After being washed, 150 μ l of OptiMEM that contained the cluster: siRNA complexes at different N/P ratios was added to the wells and incubated for 4 h. Thereafter, 50 μ l of 40% serum containing medium was added, and the cytotoxicity of the relevant reagents was determined by the MTT assay after 48 h. The absorbance at 540 nm was read on a plate reader (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific, France). The results obtained from triplicate wells were averaged and normalized to the value obtained from the non-treated cells.

II. Multivalent clusters for DNA recognition

A. Peptide scaffolds

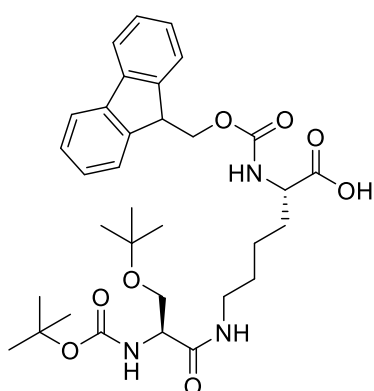
1. Dipeptides

2,5-dioxopyrrolidin-1-yl *N*-(tert-butoxycarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-*L*-serinate **1**.^[5] To a stirred solution of Boc-*L*-Ser(*t*Bu)-OH (5.0 g, 19.1 mmol) and *N*-hydroxysuccinimide (2.35 g, 20.5



mmol) in EtOAc/1,4-dioxane (1/1, 180 mL) cooled on ice bath were added dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (4.2 g, 20.5 mmol). After 3h30 stirring at room temperature under argon, the reaction mixture was filtered through a pad of celite with EtOAc and the collected filtrate was

concentrated *in vacuo*. The obtained oily residue was taken into EtOAc and washed with 1M aqueous hydrochloride solution, 5 % aqueous NaHCO₃ solution (2x), water (2x) and brine (2x). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. **1** was obtained as a white solid in quantitative yield (6.88 g, 19.2 mmol). LC-MS **1** t_R : 4.47 min (Method D); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.41 (d, ³J=9.0, 1H, CH-NH), 4.78 (d, ³J=9.0, 1H, CH-NH), 3.93-3.91 (m, 1H, CH-CH-H-O), 3.66-3.64 (m, 1H, CH-CH-H-O), 2.82 (s, 4H, CO-CH₂-CH₂-CO), 1.46 (s, 9H, CO-O-C(CH₃)₃), 1.20 (s, 9H, CH₂-O-C(CH₃)₃); HR-ESI-MS: calcd for [C₁₆H₂₆N₂O₇+H]⁺ 359.17, found 359.66.

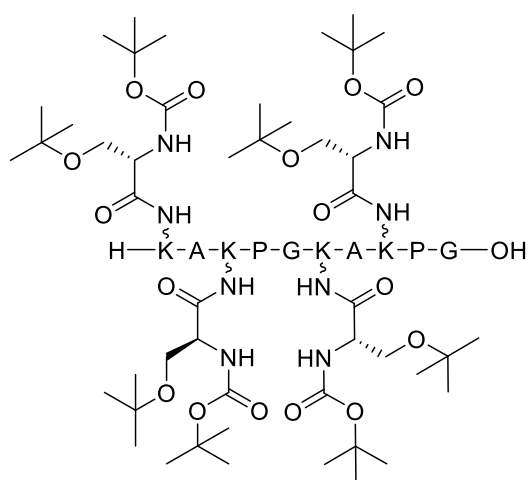
*N*²-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*N*⁶-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-*L*-seryl)-*L*-lysine^[5] **2**.

A solution of **1** (6.8 g, 19.1 mmol) in CH₂Cl₂ (67.5 mL) was added dropwise over 30 min to a stirred suspension of Fmoc-*L*-Lys-OH (9.3 g, 25.3 mmol) and DIEA (13.2 mL, 75.8 mmol) in CH₂Cl₂ (109 mL). After 3h30 stirring at room temperature under argon, the mixture was concentrated *in vacuo*. The remaining residue was solubilized in EtOAc and washed with 10 % aqueous citric acid solution (2x), saturated aqueous NaHCO₃ solution (2x), water (2x), and brine (2x). The organic phase was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to give **2** as a white solid in quantitative

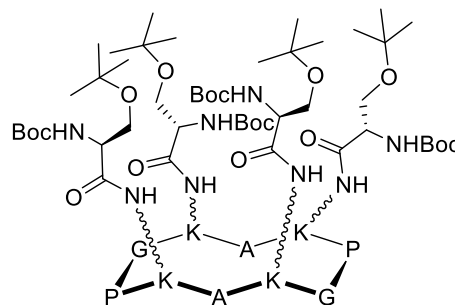
yield. LC-MS 1 t_R: 5.01 min (Method D); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.68 (d, ³J=7.5, 2H, 2(C_{ar}-H)), 7.53 (m, 2H, 2(C_{ar}-H)), 7.34-7.21 (m, 4H, 4(C_{ar}-H)), 6.54 (s, 1H, NH), 5.60 (s, 1H, NH), 5.42 (s, 1H, NH), 4.32-4.13 (m, 7H, CH-CH₂-CH₂, CH-CH₂-O, C_{ar}-CH-CH₂, C_{ar}-CH-CH₂), 3.69 (m, 1H, CH-CH-H-O), 3.33-3.22 (m, 3H, CH-CH-H-O, CH-CH₂-CH₂), 1.84-1.32 (m, 4H+9H, CH-CH₂-CH₂-CH₂, CH-CH₂-CH₂-CH₂, CO-O-C(CH₃)₃), 1.09 (s, 9H, O-C(CH₃)₃); HR-ESI-MS: calcd for [C₃₃H₄₅N₃O₈+H]⁺ 612.32, found 612.69.

2. Cyclic peptide

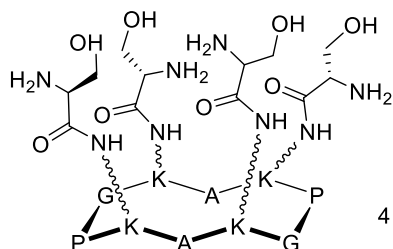
IRAF(Toc-Ser(OtBu))₄ **3**.^[6] The 2-CTC resin was manually loaded with Fmoc-Gly-OH according to the general procedure yielding a loading of 0.31 mmol/g of resin. **3** was synthesized according to the general procedure for linear and cyclic peptide synthesis on 0.25 mmol. The linear peptide was purified by semi-preparative HPLC 2 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (0 → 40% → 65% → 100% acetonitrile 0.1% TFA (10 min/25 min/10 min)) to obtain **3** as a white solid (222.6 mg, 43%). LC-MS 1 t_R: 4.90 min (Method D); HR-ESI-MS: calcd for [C₉₂H₁₆₅N₁₈O₂₇+2H]²⁺ 978.10, found 979.72.



cRAFT(Boc-Ser(OtBu))₄ 4.^[6] **3** was cyclized according to the general procedure for cyclisation of linear peptides. **4** was obtained as a white solid (283.1 mg, quantitative yield). LC-MS 1 t_R: 5.70 min (Method D); HR-ESI-MS: calcd for [C₉₂H₁₆₂N₁₈O₂₆+2H]²⁺ 968.60, found 970.22.

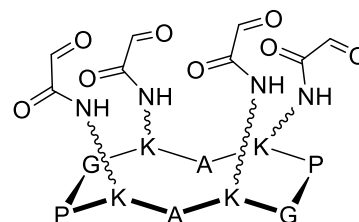


cRAFT(Ser)₄ 4.^[6] **4** was deprotected according to the general procedure for harsh conditions of deprotection. **cRAFT(Ser)₄** was obtained as a white solid (100.6 mg, 71%). LC-MS 1 t_R: 2.06 min (Method D); HR-ESI-MS: calcd for [C₅₆H₉₈N₁₈O₁₈+2H]²⁺ 656.36, found 657.16. MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₅₆H₉₈N₁₈O₁₈+Na]⁺ 1333.72, found 1333.70.



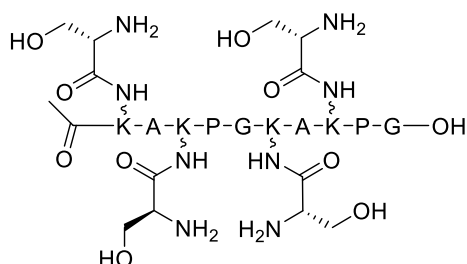
4 TFA

cRAFT(ALD)₄ 4.^[6] NaIO₄ (615.0 mg, 2.6 mmol) was added to a solution of **cRAFT(Ser)₄** (341.0 mg, 0.260 mmol) in H₂O mQ (10 mM). After 2 hours stirring, **cRAFT(ALD)₄** was then purified by semi-preparative HPLC 2 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (0 → 40% → 65% → 100% acetonitrile 0.1% TFA (10 min/25 min/15 min)) to obtain the **cRAFT(ALD)₄** as a white powder (182 mg, 59%). HPLC: t_R: 2.10 min (Method A); LC-MS 2 t_R: 1.65 min (Method J); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₅₂H₇₈N₁₄O₁₈+Na]⁺ 1209.98, found 1209.57.

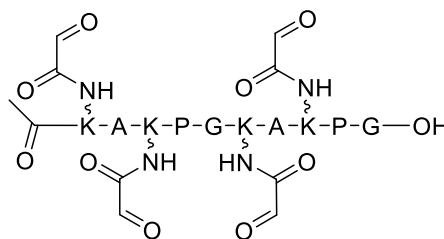


3. Linear peptide

N-Acetate IRAFT(Ser)₄ 5. The 2-CTC resin was manually loaded with Fmoc-Gly-OH according to the general procedure yielding a loading of 0.31 mmol/g of resin. **5** was synthesized according to the general procedure for linear and cyclic peptide synthesis on 0.25 mmol. After the ligation of the last dipeptide **2**, and Fmoc deprotection, *N*-ter was acetylated with 10 mL of a solution of acetic anhydride/CH₂Cl₂ (50/50) for 20 min. The acetylation was repeated another time for 20 min. Then, resin was cleaved according to the general procedure under harsh conditions described above. **5** was obtained as a white solid (326 mg, 71%). LC-MS 2 t_R: 1.65 min (Method H); HR-ESI-MS: calcd for [C₅₈H₁₀₂N₁₈O₂₀+H]⁺ 1371.75, found 1371.30.



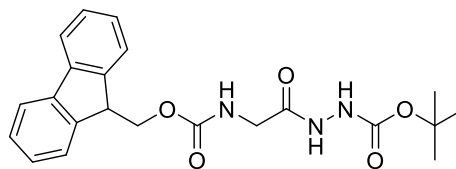
IRAF(TALD)₄. NaIO₄ (403.0 mg, 1.8 mmol) was added to a solution of **6** (326.0 mg, 0.18 mmol) in H₂O mQ (10 mM). After 2 hours stirring, **IRAF(TALD)₄** was then purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (0 → 25% → 100% acetonitrile, 0.1% TFA (25 min/10 min)) to obtain the **IRAF(TALD)₄** as a white solid (104.0 mg, 47%). LC-MS 2 t_R: 1.61 min (Method H); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₅₄H₈₂N₁₄O₂₀+K]⁺ 1285.58, found 1285.52.



B. Hydrazide building blocks

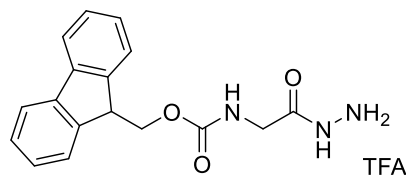
1. Solution approach

tert-butyl 2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)glycyl)hydrazine-1-carboxylate **6**. A solution of HBTU (1.53 g, 4.04 mmol) in DMF (8.1 mL) were added to a solution of Fmoc-Gly-OH (1 g, 3.36 mmol) in DMF (16.8 mL). Then, a solution of DIEA (2.0 mL, 11.8 mmol) in NMP (3.8 mL) was mixed to the solution before



adding *tert*-butyl carbazate (444 mg, 3.36 mmol). The reaction mixture was stirred for 1h30 at room temperature before being concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in EtOAc and washed with saturated aqueous solution of NH₄Cl (3x). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. Crude product was then purified by flash chromatography (SiO₂, Petroleum ether/EtOAc 5/5) which gave **6** as a white solid (230 mg, 83%). LCMS 2 t_R: 3.01 min (Method J); ¹H NMR (MeOD; 400 MHz) δ 7.77 (d, ³J=7.4, 2H, C_{ar}H), 7.64 (d, ³J=7.4, 2H, C_{ar}H), 7.37 (dd, ³J=7.4, 2H, C_{ar}H), 7.29 (dd, ³J=7.4, 2H, C_{ar}H), 4.33 (d, ³J=7.0, 2H, Fmoc-CH₂), 4.19 (t, ³J=7.0, 1H, C_{ar}-CH-CH₂), 3.85 (s, 2H, CH₂CO), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (MeOD; 100 MHz) δ 171.8, 158.9, 157.7, 145.2, 142.5, 128.7, 128.1, 126.2, 120.9, 82.0, 68.2, 43.5, 40.4, 28.5; HR-ESI-MS: calcd for [C₂₂H₂₅N₃O₅+Na]⁺ 434.1692, found 434.1696.

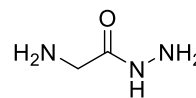
(9H-fluoren-9-yl)methyl (2-hydrazinyl-2-oxoethyl)carbamate **7**. **6** (217 mg, 0.527 mmol) was deprotected according to the general procedure in harsh conditions. **7** was obtained as a white



solid (151.5 mg, 68%). LCMS 2 t_R: 3.89 min (Method J); ¹H NMR (MeOD; 400 MHz) δ 7.80 (d, ³J=7.6, 2H, C_{ar}H), 7.66 (d, ³J=7.2, 2H, C_{ar}H), 7.41-7.38 (m, 2H, C_{ar}H), 7.33-7.29 (m, 2H, C_{ar}H), 4.39 (d, ³J=6.9, 2H, Fmoc-CH₂), 4.23 (d, ³J=6.9, 1H, C_{ar}-CH-CH₂), 3.88 (s, 2H, CH-CO); ¹³C NMR (MeOD; 100 MHz) δ 171.0, 159.1, 145.2,

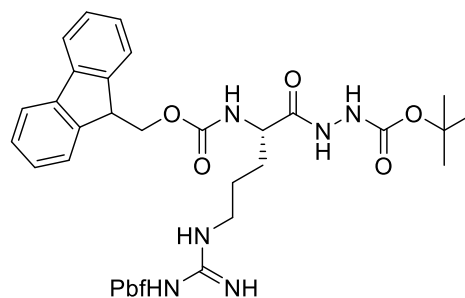
142.6, 128.8, 128.2, 126.2, 120.9, 68.3, 43.3; HR-ESI-MS: calcd for $[C_{17}H_{17}N_3O_3+H]^+$ 312.1348, found 312.1347.

2-aminoacetohydrazide **GlyHyd**. A solution of **7** (144.6 mg; 0.34 mmol) in DMF/Piperidine 8/2 (4 mL) was stirred at room temperature for 1h. The reaction mixture was then concentrated *in vacuo* and Et₂O was added to precipitate the desired compound. The mixture was centrifuged and the precipitate was then dried. Precipitation was repeated three times. The crude product was dissolved in H₂O 0.1% TFA and freeze dried. Compound **GlyHyd** was obtained as a white solid (19.3 mg, 28%). ¹H NMR (D₂O; 400 MHz) δ 3.88 (s, 2H, CH₂-CO); ¹³C NMR (CD₃OD; 100 MHz) δ 166.9, 162.4 (q, ³J(C,F)=35, 1C, F₃C-C=O), 119.2 (q, ¹J(C,F)=290, 1C, F₃C), 40.3.



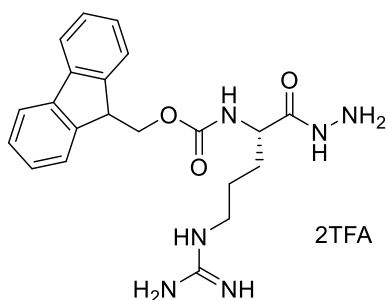
tert-butyl 2-(N²-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-N^ω-((2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)sulfonyl)-L-arginyl)hydrazine-1-carboxylate **8**. A solution of HBTU

(136.5 mg, 0.36 mmol) in DMF (740 μL) was added to a solution of Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH (200 mg, 0.31 mmol) in DMF (1.5 mL). Then, a solution of DIEA (188 μL, 1.08 mmol) in NMP (352 μL) was added to the mixture. *tert*-butyl carbazate (41.0 mg, 0.31 mmol) was then added and the reaction mixture was



stirred for 4h at room temperature before being concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in EtOAc and washed with saturated aqueous solution of NH₄Cl (3x). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was then purified by flash chromatography (SiO₂, CH₂Cl₂/EtOAc 5/5) which gave **8** as a white solid (230.6 mg, 97%). LCMS 2 t_R: 4.78 min (Method J); ¹H NMR (MeOD; 400 MHz) δ 7.78 (d, ³J=7.6, 2H, C_{ar}H), 7.66-7.63 (m, 2H, C_{ar}H), 7.37 (dd, ³J=7.4, 2H, C_{ar}H), 7.31-7.27 (m, 2H, C_{ar}H), 4.42-4.32 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.21 (t, 1H, C_{ar}-CH-CH₂), 4.12 (dd, ³J=8.4, ³J=9.2, 1H, CH-CO), 3.23-3.13 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH), 2.96 (s, 2H, CH₂-C(CH₃)₂), 2.58 (s, 3H, C_{ar}-CH₃), 2.51 (s, 3H, C_{ar}-CH₃), 2.06 (s, 3H, C_{ar}-CH₃), 1.86-1.74 (m, 1H, CH-CH-H), 1.69-1.53 (m, 3H, CH-CH-H, CH-CH₂-CH₂), 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.42 (s, 6H, 2(C(CH₃)₂)); ¹³C NMR (D₂O; 100 MHz) δ 159.9, 158.3, 157.5, 145.4, 145.1, 142.6, 139.4, 134.4, 133.5, 128.8, 128.2, 126.2, 126.0, 120.9, 118.4, 87.6, 67.9, 54.5, 50.8, 44.0, 31.7, 30.6, 28.7, 28.5, 19.6, 18.5, 18.4, 12.5; HR-ESI-MS: calcd for $[C_{39}H_{50}N_6O_8S+H]^+$ 763.3492, found 763.3489.

(9H-fluoren-9-yl)methyl (S)-(5-guanidino-1-hydrazinyl-1-oxopentan-2-yl)carbamate **9. 8** (95.0 mg, 0.124 mmol) was deprotected according to the general procedure in harsh conditions. **9**

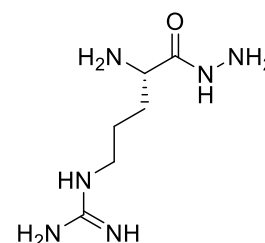


was obtained as a white solid (60.7 mg, 77%). LCMS 2 t_R : 2.57 min (Method J); 1H NMR (MeOD; 400 MHz) δ 7.80 (d, $^3J=7.6$, 2H, $C_{ar}H$), 7.67 (m, 2H, $C_{ar}H$), 7.39 (dd, $^3J=7.4$, 2H, $C_{ar}H$), 7.31 (dd, $^3J=7.4$, 2H, $C_{ar}H$), 4.44-4.35 (m, 2H, Fmoc- CH_2), 4.24-4.18 (m, 2H, C_{ar} - CH - CH_2 , CH -CO), 3.21 (t, $^3J=6.6$, 2H, CH_2 -NH-C(NH)NH $_2$), 1.94-1.85 (m, 1H, CH- CH -H), 1.79-1.58 (m, 3H, CH- CH -H, CH- CH_2 - CH_2); ^{13}C NMR (MeOD; 100 MHz) δ

173.1, 158.6, 145.1, 142.6, 128.8, 128.2, 126.1, 121.0, 68.1, 54.5, 41.8, 29.8, 26.1; HR-ESI-MS: calcd for $[C_{21}H_{26}N_6O_3+H]^+$ 411.2145, found 411.2150.

(S)-1-(4-amino-5-hydrazinyl-5-oxopentyl)guanidine **L-ArgHyd**. A

solution of **9** (60.7 mg, 0.95 mmol) in DMF/Piperidine (8/2) (9 mL) was stirred at room temperature for 1h. The reaction mixture was concentrated and Et $_2$ O was added to precipitate the desired compound. The mixture was centrifuged and the precipitate was dried. The

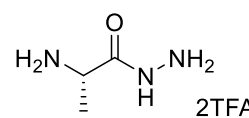


precipitation was repeated three times. Then, the crude product was freeze dried and **L-ArgHyd** was obtained as a white solid (15.0 mg, 38%). 1H NMR (D $_2$ O; 400 MHz) δ 3.71 (t, $^3J=7.0$, 1H, CH -CO), 3.14 (t, $^3J=6.8$, 2H, CH_2 -NH-C(NH)NH $_2$), 1.82-1.74 (m, 2H, CH- CH_2 - CH_2); ^{13}C NMR (D $_2$ O/MeOD 1/1; 100 MHz) δ 169.9, 158.3, 53.1, 41.7, 29.4, 25.1; $[\alpha]_D^{18}$: +15.3 (H $_2$ O, $c=1.0$); HR-ESI-MS: calcd for $[C_6H_{16}N_6O+H]^+$ 189.1464, found 189.1466.

2. Solid phase synthesis

(S)-2-aminopropanehydrazide **AlaHyd**. **AlaHyd** was synthesized

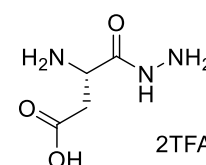
according to the general procedure for the hydrazide peptide coupling (21.2 mg, 67%). 1H NMR (D $_2$ O; 400 MHz) δ 4.19 (q, $^2J=7.0$, 1H, H $_2$ N-



CH), 1.57 (d, $^2J=7.0$, 3H, CH- CH_3); ^{13}C NMR (D $_2$ O; 100 MHz) δ 169.2, 163.1 (q, $^3J(C,F)=35$, 1C, F $_3$ C-C=O), 117.8 (q, $^1J(C,F)=290$, 1C, F $_3$ C-), 47.9, 16.2; $[\alpha]_D^{20}$: +8.1 (H $_2$ O, $c=1.0$); HR-ESI-MS: calcd for $[C_3H_9N_3O+H]^+$ 104.0824, found 104.0822.

(S)-3-amino-4-hydrazinyl-4-oxobutanoic acid **AspHyd**. **AspHyd** was

synthesized according to the general procedure for the hydrazide peptide coupling (19.2 mg, 53%). 1H NMR (D $_2$ O; 400 MHz) δ 4.43 (m, 1H, CH- CH_2), 3.08 (m, 2H, CH- CH_2 -CO); ^{13}C NMR (D $_2$ O; 100 MHz) δ 172.3, 167.3, 163.1

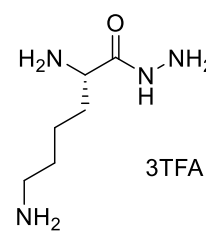


(q, $^2J(C,F)=35$, 1C, F $_3$ C-C=O), 117.8 (q, $^1J(C,F)=290$, 1C, F $_3$ C-), 48.5, 34.6; $[\alpha]_D^{20}$: +17.4 (H $_2$ O, $c=1.0$); HR-ESI-MS: calcd for $[C_4H_9N_3O_3+H]^+$ 148.0722, found 148.0720.

(S)-2,6-diaminohexanehydrazide **LysHyd**. **LysHyd** was synthesized

according to the general procedure for the hydrazide peptide coupling (37.1 mg, 84%). ¹H NMR (D₂O; 400 MHz) δ 4.08 (t, ²J=7.0, 1H, H₂N-CH), 2.99 (t, ²J=7.6, 2H, CH₂-NH₂), 1.94 (m, 2H, CH₂-CH₂-NH₂), 1.70 (m, 2H, CH-CH₂);

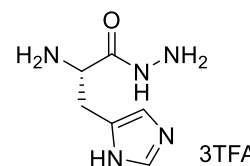
¹³C NMR (D₂O; 100 MHz) δ 168.2, 163.1 (q, ²J(C,F)=35, 1C, F₃C-C=O), 117.8 (q, ¹J(C,F)=290, 1C, F₃C-), 51.8, 39.0, 30.1, 26.3, 21.2; [α]_D²⁰: +16.8 (H₂O, c=1.0); HR-ESI-MS: calcd for [C₆H₁₆N₄O+H]⁺ 161.1402, found 161.1402.



(S)-2-amino-3-(1H-imidazol-5-yl)propanehydrazide **HisHyd**. **HisHyd**

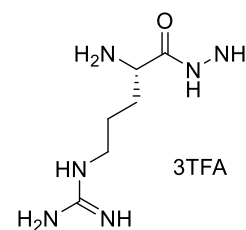
was synthesized according to the general procedure for the hydrazide peptide coupling (26.1 mg, 68%). ¹H NMR (D₂O; 400 MHz) δ 8.72 (s, 1H, HN-CH=N), 7.46 (s, 1H, C=CH-N), 4.36 (t, ³J=7.0, 1H, CH-CH₂); ¹³C

NMR (D₂O; 100 MHz) δ 166.6, 163.1 (q, ²J(C,F)=35, 1C, F₃C-C=O), 135.6, 125.4, 118.6, 117.8 (q, ¹J(C,F)=290, 1C, F₃C-), 50.9, 25.8; [α]_D²⁰: +18.0 (H₂O, c=1.0); HR-ESI-MS: calcd for [C₆H₁₁N₅O+H]⁺ 170.1042, found 170.1041.

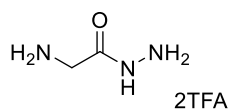


(S)-1-(4-amino-5-hydrazinyl-5-oxopentyl)guanidine **L-ArgHyd**. **L-**

ArgHyd was synthesized according to the general procedure for the hydrazide peptide coupling (14.2 mg, 81%). The characterizations were in accordance to the one describe above in the solution approach section.



2-aminoacetohydrazide **GlyHyd**. **GlyHyd** was synthesized according to the general procedure

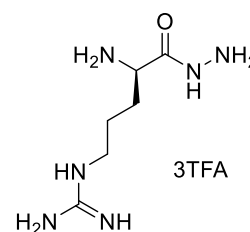


for the hydrazide peptide coupling (60.6 mg, Quantitative yield) and characterization are in accordance to the one obtained with the solution approach.

(R)-1-(4-amino-5-hydrazinyl-5-oxopentyl)guanidine **D-ArgHyd**. **D-**

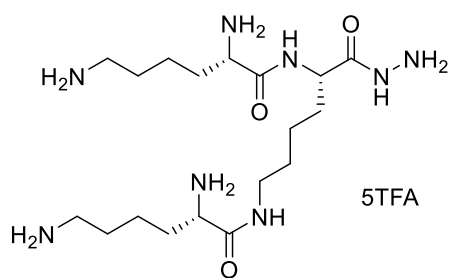
ArgHyd was synthesized according to the general procedure for the hydrazide peptide coupling (67.6 mg, 75%). ¹H NMR (D₂O; 400 MHz) δ 4.15 (t, ³J=6.6, 1H, CHCH₂), 3.24 (t, ³J=6.8, 2H, CH₂-NH), 2.02-1.95 (m, 2H, CH-CH₂), 1.73-1.65 (m, 2H, CH₂CH₂NH); ¹³C NMR (D₂O; 100 MHz)

δ 168.1, 163.1 (q, ²J(C,F)=35, 1C, F₃C-C=O), 156.9, 117.8 (q, ¹J(C,F)=290, 1C, F₃C-), 51.6, 40.3, 27.8, 23.5; [α]_D²⁰: -7.2 (H₂O, c=1.0); HR-ESI-MS: calcd for [C₆H₁₆N₆O+H]⁺ 189.1464, found 189.1464.

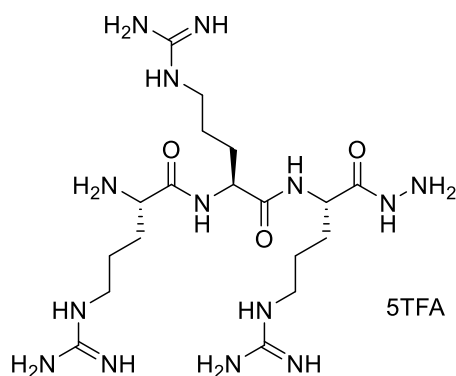


(2*S*,2'*S*)-*N,N'*-((*S*)-6-hydrazinyl-6-oxohexane-1,5-diyl)bis(2,6-diaminohexanamide) **G₁-**

LysHyd. **G₁-LysHyd** was synthesized according to the general procedure for the hydrazide



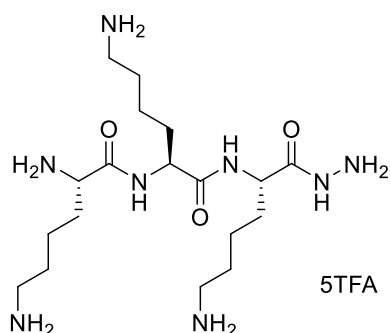
peptide coupling using Fmoc-*L*-Lys(Fmoc)-OH. The second coupling reaction was carried out with doubled quantities of reagents. Finally, the resin was cleaved according to the harsh conditions described in general procedure to afford **G₁-LysHyd** as a white solid (230.8 mg, 84%). ¹H NMR (MeOD; 400 MHz) δ 4.40 (bs, 1H, *CH*-CH₂), 3.96(bs, 1H, *CH*-CH₂), 3.85 (bs, 1H, *CH*-CH₂), 3.25 (bs, 2H, *CH*₂-NH), 2.95 (bs, 4H, *CH*₂-NH), 1.89-1.47 (m, 18H, 3*CH*-CH₂-CH₂, 3*CH*₂-CH₂-CH₂, 3*CH*₂-NH₂); ¹³C NMR (MeOD; 100 MHz) δ 170.2, 170.0, 54.3, 53.9, 53.6, 40.3, 40.3, 32.3, 32.1, 31.9, 29.8, 28.1, 28.0, 24.1, 22.9, 22.5; [α]_D²⁰: +8.8 (H₂O, c=1.0); HR-ESI-MS: calcd for [C₁₈H₄₀N₈O₃+H]⁺ 417.3302, found 417.3299.

(*S*)-2-amino-5-guanidino-*N*-((*S*)-5-guanidino-1-(((*S*)-5-guanidino-1-hydrazinyl-1-oxopentan-2-yl)amino)-1-oxopentan-2-yl)pentanamide **Arg₃Hyd.** **Arg₃Hyd** was synthesized by SPPS on a

0.1 mmol scale using the Fmoc hydrazine resin prepared according to the general procedure for hydrazide peptide synthesis. After SPPS, the product was cleaved from the resin in mild conditions described in the general procedure. The crude product was then purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (20 → 70% → 100% acetonitrile, 0.1% TFA (45 min/10 min)) to afford a white solid after freeze-drying.

Final deprotection was carried out according to the general procedure for cleavage in harsh conditions. **Arg₃Hyd** was freeze dried and obtained as a white solid (48.8 mg, 46%). ¹H NMR (D₂O; 400 MHz) δ 4.43-4.37 (m, 2H, 2*CH*-CH₂), 4.12 (t, ³J=6.4, 1H, *CH*-CH₂), 3.26-3.23 (m, 6H, 3*CH*₂-NH), 1.99-1.80 (m, 6H, 3*CH*-CH₂), 1.76-1.61 (m, 6H, 3*CH*CH₂CH₂); ¹³C NMR (D₂O; 100 MHz) δ 173.6, 171.6, 169.7, 156.9, 53.7, 52.6, 52.0, 40.6, 40.4, 28.1, 28.0, 27.9, 24.4, 23.5; [α]_D²⁰: -5.6 (H₂O, c=1.0); HR-ESI-MS: calcd for [C₁₈H₄₀N₁₄O₃+H]⁺ 501.3486, found 501.3482.

(S)-2,6-diamino-N-(((S)-6-amino-1-(((S)-6-amino-1-hydrazinyl-1-oxohexan-2-yl)amino)-1-oxohexan-2-yl)hexanamide **Lys₃Hyd**. **Lys₃Hyd** was synthesized by SPPS on a 0.1 mmol scale



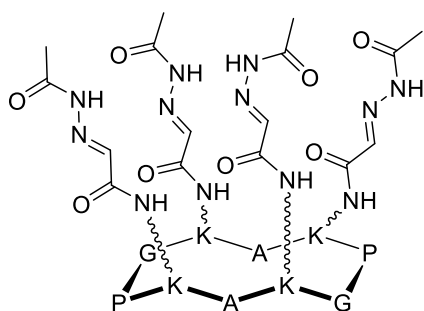
using the Fmoc hydrazine resin prepared according to the general procedure for hydrazide peptide synthesis. After SPPS, the product was cleaved from the resin in mild conditions described in the general procedure. The crude product was then purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (20 → 40% → 100% acetonitrile, 0.1% TFA (20 min/10 min)) to obtain a white solid

after freeze-drying. Final deprotection was carried out according to the general procedure for cleavage in harsh conditions. **Lys₃Hid** was freeze dried and obtained as a white solid (49.3 mg, 52%). ¹H NMR (D₂O; 400 MHz) δ 4.38-4.35 (m, 2H, 2CH-CH₂), 4.07 (t, ³J=6.0, 1H, CH-CH₂), 3.05-3.04 (m, 6H, 3CH₂-NH₂), 1.95-1.72 (m, 12H, 3CH-CH₂, 3CH₂-CH₂-NH₂), 1.55-1.45 (m, 6H, CH-CH₂-CH₂); ¹³C NMR (D₂O; 100 MHz) δ 173.6, 171.8, 169.7, 163.1 (q, ²J(C,F)=35, 1C, F₃C-C=O), 117.8 (q, ¹J(C,F)=290, 1C, F₃C-), 53.7, 52.8, 52.2, 39.2, 39.0, 30.6, 30.5, 30.3, 26.4, 26.3, 22.1, 22.0, 21.3; [α]_D²⁰: -11.6 (H₂O, c=1.0); HR-ESI-MS: calcd for [C₁₈H₄₀N₈O₃+H]⁺ 417.3302, found 417.3296.

C. Clusters

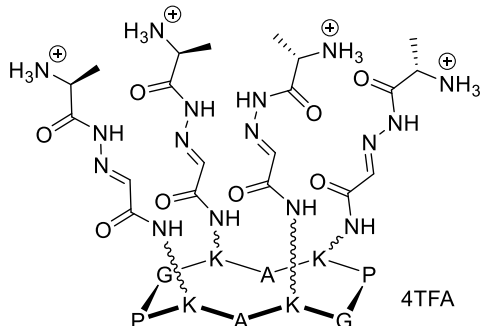
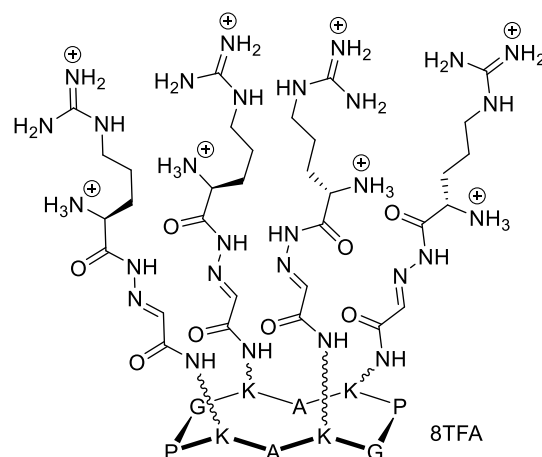
The clusters were self-assembled as described here.

A solution of hydrazide (200 mM) in MilliQ H₂O (2 mM/aldehyde) was added to a 1 mM solution of scaffold in AcO⁺Na buffer. The mixture was stirred overnight at room temperature. The media were then directly analyzed by HPLC and MALDI-ToF or HR-ESI-MS spectrometer without any further purification.



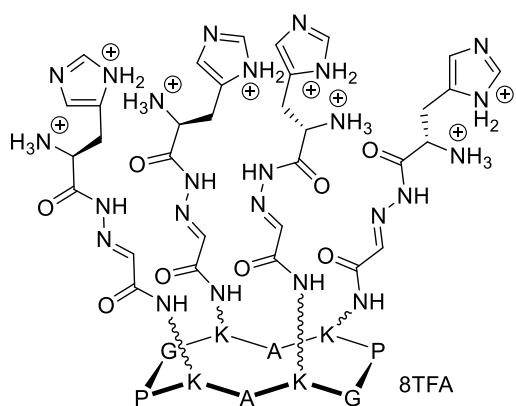
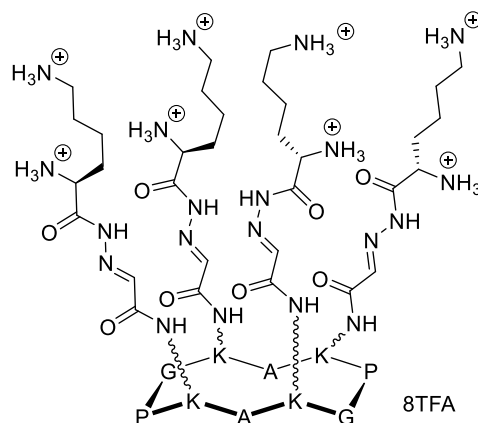
cRAFT(Ac)₄. HPLC t_R: 2.59 min (Method A); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₆₀H₉₄N₂₂O₁₈+Na]⁺ 1433.71, found 1433.69.

cRAFT(L-Arg)₄. HPLC t_R: 2.36 min (Method A);
MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₇₆H₁₃₄N₃₈O₁₈+H]⁺
1868.07, found 1868.05.



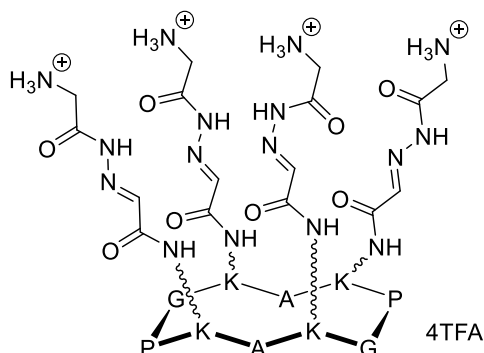
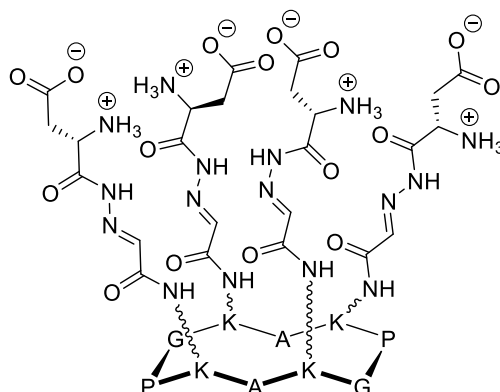
cRAFT(Ala)₄. MALDI-ToF (HCCA): calcd for
[C₆₄H₁₀₆N₂₆O₁₈+Na]⁺ 1549.82, found 1549.81.

cRAFT(Lys)₄. MALDI-ToF (HCCA): calcd for
[C₇₆H₁₃₄N₃₀O₁₈+Na]⁺ 1778.05, found 1777.99.



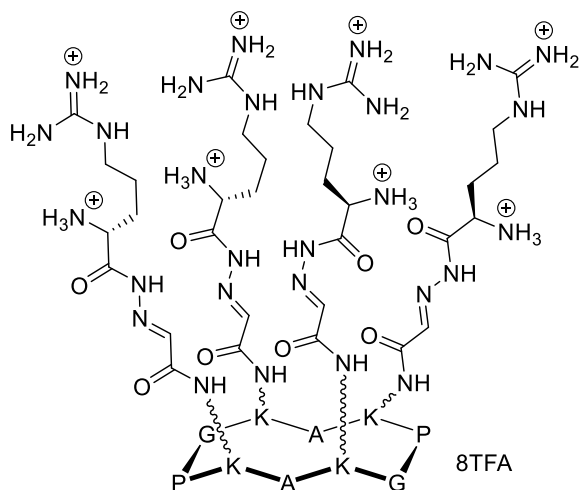
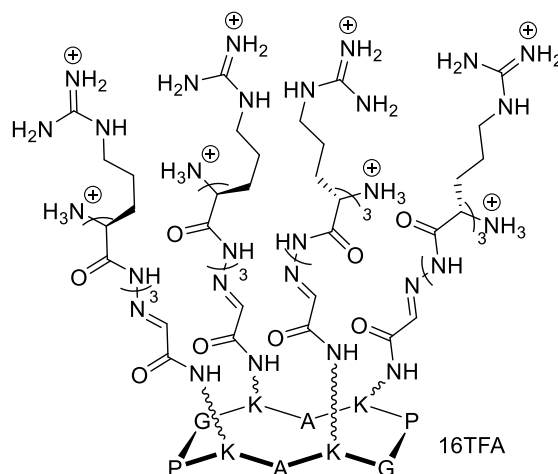
cRAFT(His)₄. MALDI-ToF (HCCA): calcd for
[C₇₆H₁₁₅N₃₄O₁₈+Na]⁺ 1814.91, found 1813.92.

cRAFT(Asp)₄. MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₆₈H₁₀₇N₂₆O₂₆+Na]⁺ 1726.78, found 1725.76.

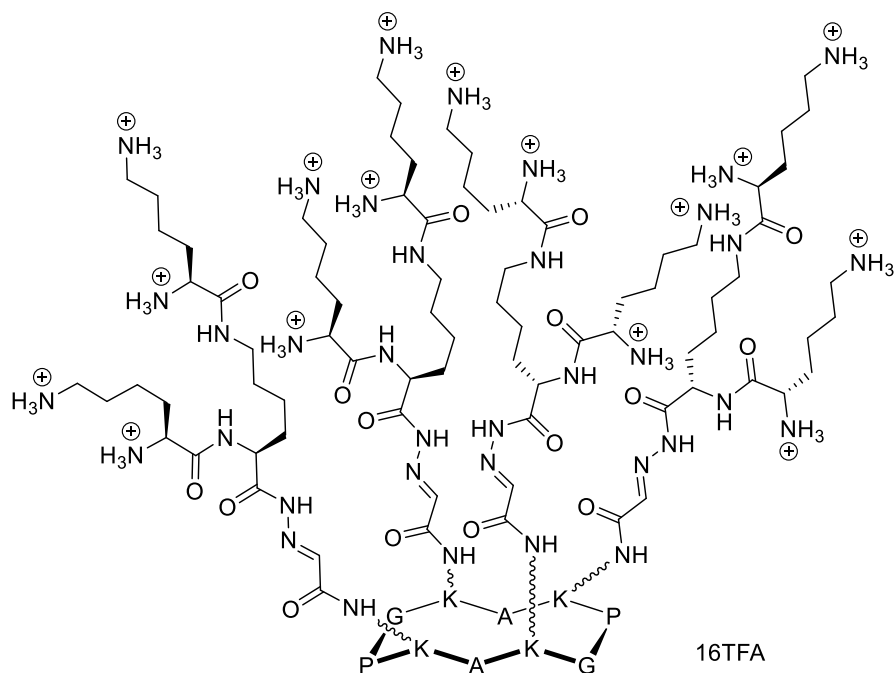


cRAFT(Gly)₄. MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₆₀H₉₈N₂₆O₁₈+Na]⁺ 1493.76, found 1493.72.

cRAFT(Arg)₃. HPLC t_R: 5.79 min (Method C); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₁₂₄H₂₃₁N₇₀O₂₆+H]⁺ 3116,82 found 3116.86.

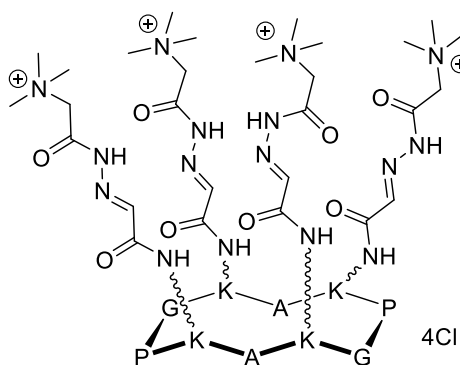
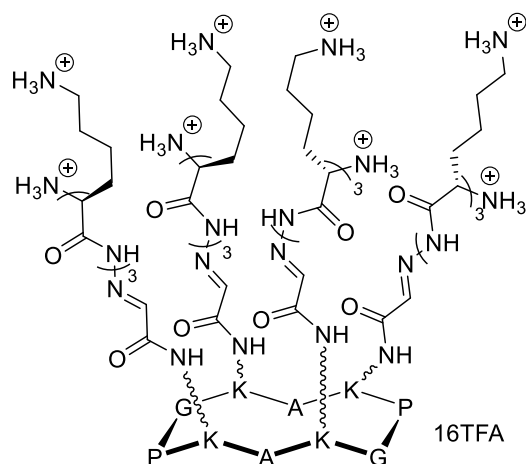


cRAFT(D-Arg)₄. MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₇₆H₁₃₄N₃₈O₁₈+H]⁺ 1868.07, found 1868.05.

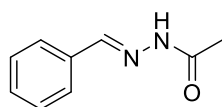


cRAFT(G₁-Lys)₄. HPLC t_R : 4.66 min (Method C); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₁₂₄H₂₃₁N₄₆O₂₆+Na]⁺ 2803.82, found 2802.79.

cRAFT(Lys₃)₄. HPLC t_R : 2.94 min (Method C); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₁₂₄H₂₃₁N₄₆O₂₆+Na]⁺ 2803.82, found 2802.76.

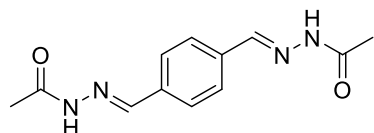
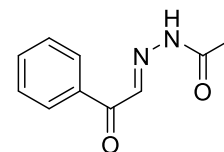


cRAFT(Gir)₄. HPLC t_R : 6.83 min (Method C); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₇₂H₁₂₇N₂₆O₁₈+4Cl+Na]⁺ 1805.98, found 1805.86.



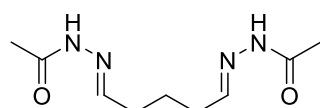
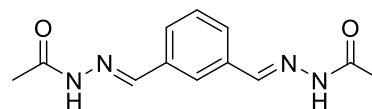
N-benzylideneacetohydrazide A1.Ac. HPLC t_R : 6.26 min (Method C); HR-ESI-MS: calcd for $[C_9H_{10}N_2O+Na]^+$ 185.0871, found 185.0870.

N-(2-oxo-2-phenylethylidene)acetohydrazide A2.Ac. HPLC t_R : 7.40 min (Method C); HR-ESI-MS: calcd for $[C_{10}H_{10}N_2O_2+Na]^+$ 213.0821, found 213.0819.



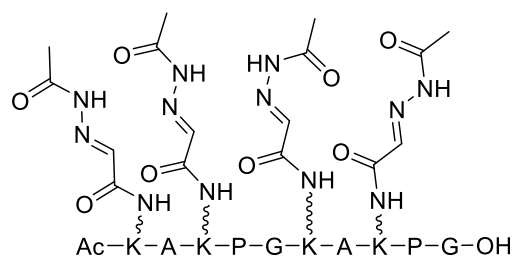
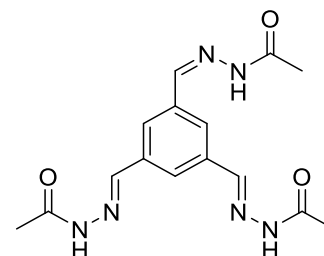
N,N''-(1,4-phenylenebis(methanylylidene))di(aceto-hydrazide) A3.Ac. HPLC t_R : 6.78 min (Method C); HR-ESI-MS: calcd for $[C_{12}H_{14}N_4O_2+Na]^+$ 269.1195, found 269.1197.

N,N''-(1,3-phenylenebis(methanylylidene))di(aceto-hydrazide) A4.Ac. HPLC t_R : 6.92 min (Method C); HR-ESI-MS: calcd for $[C_{12}H_{14}N_4O_2+Na]^+$ 269.1195, found 269.1197.



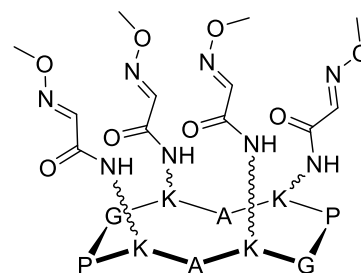
N,N''-(pentane-1,5-diylidene)di(acetohydrazide) A5.Ac. HR-ESI-MS: calcd for $[C_9H_{16}N_4O_2+Na]^+$ 235.1171, found 235.1169.

N,N'',N''''-(benzene-1,3,5-triyltris(methanylylidene))tri(aceto-hydrazide) A6.Ac. HPLC t_R : 7.92 min (Method C); HR-ESI-MS: calcd for $[C_{15}H_{18}N_6O_3+Na]^+$ 353.1519, found 353.1516.



IRAFT(Ac)₄. HPLC t_R : 7.99 min (Method C); MALDI-ToF (HCCA): calcd for $[C_{62}H_{98}N_{22}O_{20}+Na]^+$ 1493.73, found 1493.70.

cRAFT(Ox)₄. The procedure was inspired from the literature.^[7] An aqueous solution of methoxyamine (1.6 μ L, 8 mM) were added to a solution of **cRAFT(ALD)₄** (1 μ L, 1 mM) at 100 mM in H₂O mQ in an aqueous solution with 0.1% of TFA at pH 3.0 and the mixture was stirred overnight at room temperature. The



resulting cluster was analyzed by HPLC t_R : 3.20 min (Method A); MALDI-ToF (HCCA): calcd for $[C_{56}H_{90}N_{18}O_{18}+Na]^+$ 1325.67, found 1325.59.

III. Iminosugar clusters for the inhibition of glycosidases

A. Peptide scaffolds

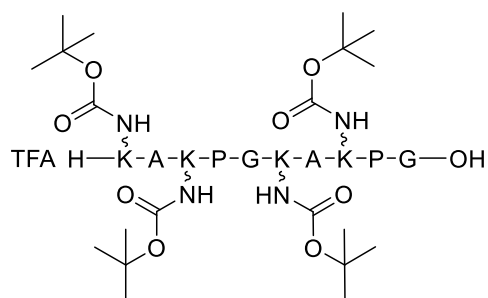
1. Aldehyde scaffolds

cRAFT(ALD)₄ and **IRAF(TALD)₄** were synthesized according to the procedures and characterization described in the section Multivalent clusters for DNA recognition.

2. Maleimide scaffolds

These scaffolds were prepared according to the same procedure described for **cRAFT(ALD)₄** and **IRAF(TALD)₄**. However, the platforms were then functionalized with a maleimide group.

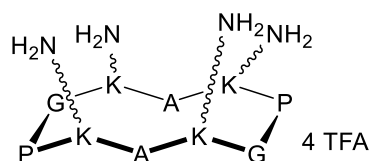
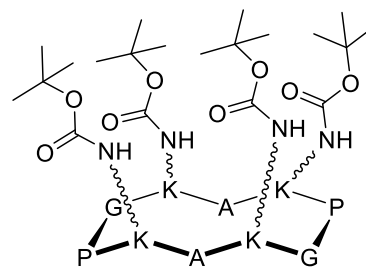
IRAF(TLys(Boc))₄ 10. The 2-CTC resin was manually loaded with Fmoc-Gly-OH according to the general procedure yielding a loading of 0.31 mmol/g of resin. **10** was synthesized according



to the general procedure for linear and cyclic peptide synthesis on 0.25 mmol. The linear peptide was purified by semi-preparative HPLC 1 in H_2O /acetonitrile 0.1% TFA gradient (0 → 40% → 60% → 100% acetonitrile 0.1% TFA (5 min/20 min/10 min)) to obtain **10** as a white solid (215.4 mg, 38%). LC-MS

2 t_R : 3.34 min (Method H); MALDI-ToF (HCCA): calcd for $[C_{64}H_{112}N_{14}O_{19}+K]^+$ 1403.82, found 1403.79.

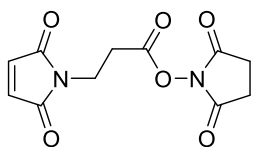
cRAFT(Lys(Boc))₄ 11. **10** was cyclized according to the general procedure for cyclisation of linear peptides. **11** was engaged without any further purification in the deprotection step. LC-MS 2 t_R : 4.01 min (Method H); HR-ESI-MS: calcd for $[C_{64}H_{110}N_{14}O_{18}+Na]^+$ 1385.81, found 1385.85.



cRAFT(Lys)₄ 11 (0.144 mmol) was deprotected according to the general procedure for cleavage under harsh conditions. The crude product was then purified by semi-preparative HPLC 1 in H_2O /acetonitrile 0.1% TFA gradient (0 → 20% → 50% acetonitrile 0.1% TFA (20 min/40 min)) to obtain **cRAFT(Lys)₄** as a white solid (102.2 mg,

50%). LC-MS 2 t_R : 0.56 min (Method H); MALDI-ToF (HCCA): calcd for $[C_{44}H_{78}N_{14}O_{10}+Na]^+$ 985.60, found 985.59.

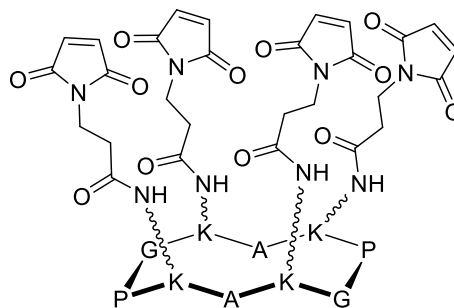
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)propanoate **12**.^[8] β -Alanine (1 g, 11.2 mmol) was added to a solution of maleic anhydride (1.1 g, 11.2 mmol) in DMF (20 ml)



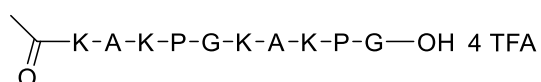
and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. *N*-hydroxysuccinimide (1.61 g, 14.0 mmol) was added to the mixture followed by EDC-HCl (4.29 g, 22.4 mmol). The resulting mixture was stirred overnight and concentrated *in vacuo*. The crude was solubilized

in CH_2Cl_2 and washed with water (2x). The aqueous phase was extracted two times with CH_2Cl_2 . The organic phases were mixed and washed with saturated aqueous $NaHCO_3$ solution and saturated aqueous $NaCl$ solution. The organic phase was dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The crude was purified by flash chromatography (SiO_2 , CH_2Cl_2 /acetone 9/1) which gave **12** as a white solid (2.10 g, 71 mmol). 1H NMR (d^6 -DMSO; 400 MHz) δ 7.04 (s, 2H, 2(C=CH)), 3.74 (t, $^3J=8.0$, 2H, CO- CH_2 - CH_2), 3.04 (t, 2H, CH_2 -N), 2.79 (s, 4H, CO- CH_2 - CH_2 -CO); ^{13}C NMR (d^6 -DMSO; 100 MHz) δ 170.6, 170.0, 166.8, 134.7, 32.7, 29.0, 25.4.

cRAFT_{Ala}(Mal)₄, **12** (229.5 mg, 7.76 mmol) was added to a solution of **cRAFT_{Ala}(Lys)₄** (102 mg, 71.9 μ mol) in a phosphate buffer 100mM pH 7.2/acetonitrile solution (6/4) (13.6 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the product was purified by semi-preparative HPLC 1 in H_2O /acetonitrile 0.1% TFA gradient (0 \rightarrow 15% \rightarrow 45% \rightarrow 100% acetonitrile 0.1% TFA (3 min/30 min/10 min)) and freeze dried. **cRAFT_{Ala}(Mal)₄** was obtained as a white solid (96 mg, 85 %). LC-MS 2 t_R : 3.30 min (Method J); MALDI-ToF (HCCA): calcd for $[C_{72}H_{98}N_{18}O_{22}+Na]^+$ 1589.71, found 1589.70.



IRAFT(Lys)₄. The 2-CTC resin was manually loaded with Fmoc-Gly-OH according to the general procedure yielding a loading of 0.31 mmol/g of resin. **IRAFT(Lys)₄** was synthesized

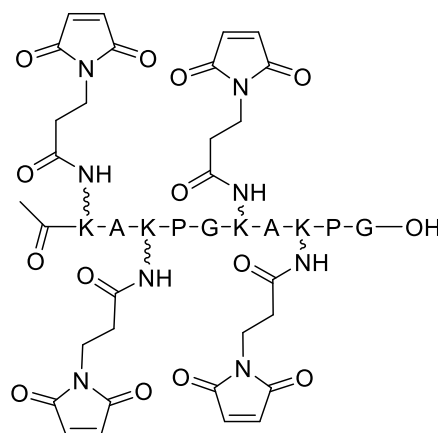


according to the general procedure for linear and cyclic peptide synthesis on 0.25 mmol. After the

ligation of the last dipeptide **2**, and Fmoc deprotection, *N*-ter was acetylated with 10 mL of a solution of acetic anhydride/ CH_2Cl_2 (50/50) for 20 min. The acetylation was repeated another time for 20 min. Then, resin was cleaved according to the general procedure under harsh conditions described above. The crude product was then purified by semi-preparative HPLC 1 in H_2O /acetonitrile 0.1%TFA gradient (0 \rightarrow 20% \rightarrow 50% acetonitrile 0.1% TFA (20 min/20 min))

to obtain **IRAF(TLys)₄** as a white solid (443 mg, 80%). HPLC t_R : 2.17 min (Method D); MALDI-ToF (HCCA): calcd for $[C_{46}H_{82}N_{14}O_{12}+H]^+$ 1023.62, found 1023.62.

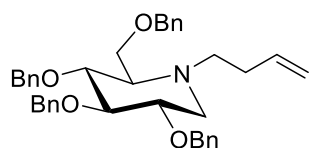
IRAF(Mal)₄. **12** (948.7 mg, 3.56 mmol) was added to a solution of **IRAF(TLys)₄** (440 mg, 0.30 mmol) in a phosphate buffer 100mM pH 7.2/acetonitrile solution (6/4) (56.3 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the product was purified by semi-preparative HPLC 2 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (0 → 10% → 40% → 100% acetonitrile 0.1% TFA (3 min/30 min/10 min)) and freeze dried. **cRAFT(Mal)₄** was obtained as a white solid (374 mg, 77 %). LC-MS 2 t_R : 2.36 min (Method J); MALDI-ToF (HCCA): calcd for $[C_{74}H_{102}N_{18}O_{24}+Na]^+$ 1649.73, found 1649.72.



B. Modified iminosugars

The iminosugar synthesis were carried out by Renaud ZELLI and Pr. Alberto MARRA (Glycochemistry & Molecular Recognition, IBMM, UMR 5247).

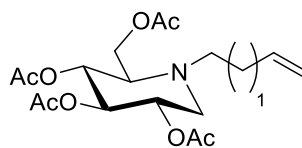
(2R,3R,4R,5S)-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-1-(but-3-en-1-yl)piperidine 13. To a mixture of 2,3,4,6-tetra-benzyl-1-deoxy-nojirimycin^[9] (200 mg, 0.38 mmol) and 3-buten-1-ol



tosylate (104 mg, 0.46 mmol) was added *sym*-collidine (55 mg, 0.46 mmol). The resulting suspension was stirred at 120°C for 3h. The crude was purified by flash chromatography (SiO₂, toluene/Et₂O 12/1 containing 0.5% of triethylamine) to give **13** as a colorless oil (175

mg, 79 %). ¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz) δ 7.40-7.35 (m, 2H, H_{ar}), 7.32-7.22 (m, 6H, CH_{ar}), 7.20-7.04 (m, 12H, CH_{ar}), 5.74 (dddd, 1H, J=6.8, 6.8, 10.2, 16.9 Hz, CH=CH₂), 5.07 (d, 2H, J=11.5, CH₂-C_{ar}), 4.89 (d, 2H, J=11.5, CH₂-C_{ar}) 5.04 (d, 2H, J=12.5, CH₂-C_{ar}), 4.57 (d, 2H, J=12.5, CH₂-C_{ar}), 5.03 (dddd, 1H, J=2.0, 2.0, 3.2, 16.9, CH=CHH), 5.00 (dddd, 1H, J = 0.9, 0.9, 1.6, 10.2 Hz, CH=CHH), 4.55 (d, 2H, J=12.0, CH₂-C_{ar}), 4.51 (d, 2H, J=12.0, CH₂-C_{ar}) 4.27 (d, 2H, J=12.5, CH₂-C_{ar}), 4.24 (d, 2H, J=12.5, CH₂-C_{ar}), 3.70 (dd, 1H, J_{5,6a}= 3.0, J_{6a,6b}= 10.5, H-6a), 3.69 (dd, 1H, J_{3,4}=8.7, J_{4,5}= 9.4, H-4), 3.68 (ddd, 1H, J_{1eq,2}=4.8, J_{2,3}=8.7, J_{1ax,2}= 11.2, H-2), 3.61 (dd, 1H, H-3), 3.58 (dd, 1H, J_{5,6b}=1.5, H-6b), 3.04 (dd, 1H, J_{1eq,1ax}= 11.2, H-1eq), 2.88-2.79 (m, 1H, N-CHH), 2.70-2.61 (m, 1H, N-CHH), 2.43 (ddd, 1H, H-5), 2.22 (dd, 1H, H-1ax), 2.17-2.09 (m, 2H, CH₂-CH=CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 140.0, 139.8, 139.5, 138.8, 137.2, 128.6-127.5 (20 x C_{ar}H), 115.6, 87.8, 79.5, 79.3, 75.4, 75.2, 73.3, 72.6, 67.9, 64.9, 54.8, 52.4, 30.0; $[\alpha]_D^{20}$: -5.3 (c=1.1, CDCl₃); HR-ESI-MS: calcd for $[C_{38}H_{43}NO_4+H]^+$ 578.3270, found 578.3265.

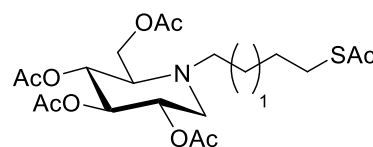
(2R,3R,4R,5S)-2-(acetoxymethyl)-1-(but-3-en-1-yl)piperidine-3,4,5-triyl triacetate **14**. To a



stirred, cooled (-60 °C) solution of **13** (410 mg, 0.71 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (13 mL) was slowly added to a 1 M solution of BCl₃ in CH₂Cl₂ (7.1 mL, 7.10 mmol). The solution was allowed to warm to -10 °C over 1 h, then MeOH (1 mL) was slowly added and the solution was allowed to warm to 0 °C over 30 min. Triethylamine (1 mL) was added dropwise and the solution was concentrated. A suspension of the residue in pyridine (2 mL) and acetic anhydride (4 mL) was stirred at room temperature for 24 h, and concentrated and then diluted in EtOAc (100 mL) and H₂O (100 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 100 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The crude was purified by flash chromatography (SiO₂, EtOAc/cyclohexane 1/2 containing 1% of triethylamine) to give **18** as an amorphous solid (208 mg, 76%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.73 (dddd, J=6.8, 6.8, 10.2, 17.1, 1H, CH=CH₂), 5.07 (dddd, 1H, J=1.3, 1.3, 3.0, 10.2, CH=CHH), 5.05-4.99 (m, 3H, CH=CHH, H-3, H-4), 4.98-4.91 (m, 1H, H-2), 4.16 (d, 2H, J=2.8, H-6_a, H-6_b), 3.20 (dd, 1H, J_{1eq,1ax}=11.5, J_{1eq,2}=5.1 Hz, H-1_{eq}), 2.82 (ddd, 1H, J=6.5-9.5-13.9, N-CHH), 2.74 (dd, 1H, J_{2,3}=J_{3,4}=10.4, H-3), 2.74-2.65 (m, 2H, N-CHH, H-5), 2.38 (dd, 1H, J_{1ax,2}=10.2, H-1_{ax}), 2.26-2.11 (m, 2H, NCH₂-CH₂), 2.07- 2.00 (4s, 12H, 4Ac); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 170.9, 170.4, 170.0, 169.7 (4C), 135.5, 116.5, 74.6, 69.4, 69.3, 61.1, 59.6, 52.9, 29.2, 20.9, 20.8, 20.7, 20.6 (4C); [α]_D²⁰: +11.9 (c = 1.1, CDCl₃); HR-ESI-MS: calcd for [C₁₈H₂₇NO₈+H]⁺ 386.1815, found 386.1815.

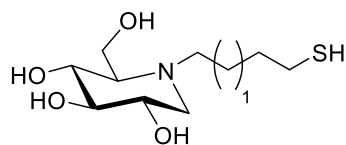
(2R,3R,4R,5S)-2-(acetoxymethyl)-1-(4-(acetylthio)butyl)piperidine-3,4,5-triyl triacetate **15**. To

a stirred solution of **14** (130 mg, 0.338 mmol) and DPAP (26 mg, 0.10 mmol) in MeOH (300 μL) was added thioacetic acid (78 mg, 1.02 mmol). The solution was irradiated at room



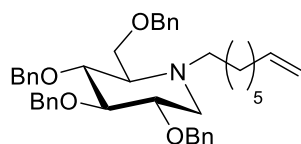
temperature for 45 min and then concentrated. The crude was purified by flash chromatography (SiO₂, EtOAc/cyclohexane 1/1.5 containing 0.5% of triethylamine) to give **15** (101 mg, 64%) as a syrup. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.03-4.94 (m, 2H, H-3, H-4), 4.93-4.85 (m, 1H, H-2), 4.09 (d, 2H, J_{5,6}=2.6, H-6_a, H-6_b), 3.12 (dd, 1H, J_{1eq,2}=5.1, J_{1eq,1ax}=11.5, H-1_{eq}), 2.81 (t, 2H, J=6.7, CH₂-S), 2.69 (m, 1H, CH₂-N), 2.57 (ddd, 1H, J_{4,5}= 8.9, H-5), 2.49 (m, 1H, CH₂-N), 2.26 (s, 3H, SAc), 2.23 (dd, 1H, J_{1ax,2}=10.5, H-1_{ax}), 2.03-1.93 (m, 12H, 4 OAc), 1.56-1.32 (m, 4H, N-CH₂-CH₂, S-CH₂,CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 195.9, 170.9, 170.4, 170.1, 169.8 (4 C), 74.7, 69.4, 69.3, 61.6, 59.5, 52.8, 51.0, 30.7, 28.8, 27.2, 24.1, 21.11-20.6 (4 OAc); [α]_D²⁰: +5.8 (c = 1.2, CDCl₃); HR-ESI-MS: calcd for [C₂₀H₃₁NO₉S+H]⁺ 462.1798, found 462.1800.

(2R,3R,4R,5S)-2-(hydroxymethyl)-1-(4-mercaptobutyl)piperidine-3,4,5-triol **16**. A solution of **15** (101 mg, 0.216 mmol) in a 2M solution of NH₃ in MeOH (3.0 mL) was kept at room



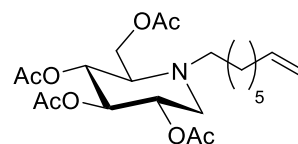
temperature under argon atmosphere for 14h and then concentrated *in vacuo*. To avoid disulfide reaction, **16** was engaged directly in next step without any further purification and analysis. ¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ 3.86 (dd, 1H, J_{5,6a} = 2.2, J_{6a,6b} = 12.8 Hz, H-6_a) 3.79 (dd, 1H, J_{5,6b} = 2.6 Hz, H-6_b) 3.50 (ddd, 1H, J_{1eq,2} = 4.6, J_{2,3} = 9.5, J_{1ax,2} = 11.1 Hz, H-2) 3.33 (dd, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9.5 Hz, H-4) 3.21 (dd, 1H, H-3) 2.98 (dd, 1H, J_{1eq,1ax} = 11.1 Hz, H-1_{eq}) 2.77-2.49 (m, 4H, N-CH₂, S-CH₂) 2.28 (dd, 1H, H-1_{ax}) 2.22 (ddd, 1H, H-5) 1.68-1.47 (m, 4H, 4 CH₂)

(2R,3R,4R,5S)-3,4,5-tris(benzyloxy)-2-((benzyloxy)methyl)-1-(oct-7-en-1-yl)piperidine **17**. To a mixture of tetra-benzyl-1-deoxy-nojirimycin^[9] (200 mg, 0.38 mmol) and alkyl bromide (130



mg, 0.46 mmol) was added *sym*-collidine (55 mg, 0.46 mmol). The resulting suspension was stirred at 120°C for 3h. The crude was purified by flash chromatography (SiO₂, toluene/Et₂O 6/1 containing 0.5% of triethylamine) to give **17** as a colorless oil (221 mg, 80 %). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.42-7.37 (m, 2H, CH_{ar}), 7.33-7.24 (m, 6H, CH_{ar}), 7.21-7.04 (m, 12H, CH_{ar}), 5.81 (dddd, 1H, J=6.5, 6.5, 10.1, 16.9, CH=CH₂), 5.09 (d, 2H, J=11.4, CH₂-C_{ar}), 4.91 (2d, 2H, J=11.4, CH₂-C_{ar}), 5.07 (d, 2H, J=11.3, CH₂-C_{ar}), 4.60 (d, 2H, J= 11.3, CH₂-C_{ar}), 5.06 (dddd, 1H, J=1.8, 1.8, 5.3, 10.9, CH=CHH), 5.02 (dddd, 1H, J=0.8, 0.8, 2.9, 10.1, CH=CHH), 4.59 (d, 2H, J=11.7, CH₂-C_{ar}), 4.54 (d, 2H, J=11.7, CH₂-C_{ar}), 4.31 (d, 2H, J=12.5, CH₂-C_{ar}), 4.27 (d, 2H, J=12.5, CH₂-C_{ar}), 3.75 (dd, 1H, J_{3,4}=8.6, J_{4,5}=9.5, H-4), 3.74 (ddd, 1H, J_{1eq,2}=4.8, J_{2,3}=8.6, J_{1ax,2}=11.2, H-2), 3.72 (dd, 1H, J_{5,6a}=2.8, J_{6a,6b}=10.5, H-6_a), 3.65 (dd, 1H, H-3), 3.62 (dd, 1H, J_{5,6b}= 1.8, H-6_b), 3.12 (dd, 1H, J_{1eq,1ax}=11.2, H-1_{eq}), 2.83-2.73 (m, 1H, N-CHH), 2.56-2.47 (m, 1H, N-CHH), 2.44 (ddd, 1H, H-5), 2.23 (dd, 1H, H-1_{ax}), 2.04-1.96 (m, 2H, CH₂-CH=CH₂), 1.45-1.09 (m, 8H, 4(CH₂)); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 140.0, 139.8, 139.6, 139.2, 139.0, 128.6-127.5 (20 C_{ar}H), 114.6, 87.9, 79.6, 79.4, 75.4, 75.2, 73.3, 72.7, 68.0, 65.4, 55.0, 53.0, 34.2, 29.5, 29.4, 27.7, 25.5; [α]_D²⁰: -4.2 (c=1.1, CDCl₃); HR-ESI-MS: calcd for [C₄₂H₅₁NO₄+H]⁺ 634.3896, found 634.3896.

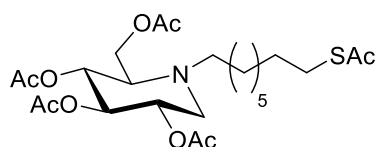
(2R,3R,4R,5S)-2-(acetoxymethyl)-1-(oct-7-en-1-yl)piperidine-3,4,5-triyl triacetate **18**. To a stirred, cooled (-60 °C) solution of **17** (180 mg,



0.28 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (5 mL) was slowly added a 1 M solution of BCl₃ in CH₂Cl₂ (2.8 mL, 2.8 mmol). The solution was allowed to warm to -10 °C over 1 h, then MeOH (0.8 mL) was slowly added and the solution was allowed to warm to 0 °C over 30 min. Et₃N (0.8 mL) was added dropwise and the solution was concentrated. A suspension of the residue in pyridine (1 mL) and acetic anhydride (2 mL) was stirred at room temperature

for 24 h, and concentrated and then diluted in EtOAc (50 mL) and H₂O (50 mL). The layers were separated and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2 × 50 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 1:2 EtOAc-cyclohexane + 1% triethylamine to give **18** (90 mg, 75%) as an amorphous solid. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.73 (dddd, 1H, J = 6.7, 6.7, 10.5, 17.1, CH=CH₂) 5.01 (dd, 1H, J_{3,4} = J_{4,5} = 9.3, H-4) 4.97 (dd, 1H, J_{2,3} = 9.3, H-3) 4.93 (dddd, 1H, J = 1.6, 1.6, 3.5, 17.1, CH=CHH) 4.88 (ddd, 1H, J_{1eq,2} = 5.1, J_{2,3} = 9.3, J_{1ax,2} = 10.2, H-2) 4.70 (dddd, 1H, J = 1.2, 1.2, 2.2, 10.5, CH=CHH) 4.09 (d, 2H, J_{5,6} = 2.7, H-6_a, H-6_b) 3.12 (dd, 1H, J_{1eq,1ax} = 11.5, H-1_{eq}) 2.66 (m, 1H, N-CH₂) 2.57 (dd, 1H, H-5) 2.49 (m, 1H, N-CH₂) 2.26 (dd, 1H, H-1_{ax}) 1.97-1.93 (m, 12H, 4 Ac), 1.45-1.11 (m, 12H, C_{alk}); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 170.9, 170.3, 169.9, 169.7 (4 × C_q), 138.9 (CH=CH₂) 114.3 (CH=CH₂) 74.6 (C-4) 69.4 (C-3) 69.3 (C-2) 61.4 (C-5) 59.4 (C-6) 52.9 (C-1) 51.7 (N-CH₂) 33.6, 28.9, 28.7, 26.9, 24.5, (5 × C_{alk}) 20.8-20.6 (4 × Ac); [α]_D²⁰ = +7.8 (c = 1.3, CHCl₃); HRMS (ESI/Q-TOF) m/z calcd. for C₂₂H₃₆NO₈ [M+H]⁺ 442.2441, found 442.2441

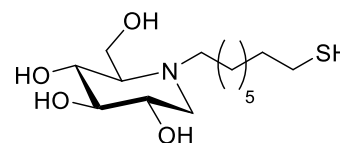
(2R,3R,4R,5S)-2-(acetoxymethyl)-1-(8-(acetylthio)octyl)piperidine-3,4,5-triyl triacetate **19**. To a stirred solution of **18** (90 mg, 0.20 mmol) and DPAP (15 mg, 0.06 mmol) in CH₂Cl₂ (200 μL)



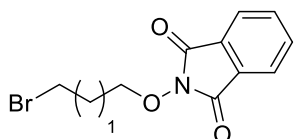
was added thioacetic acid (78 mg, 0.6 mmol). The solution was irradiated at room temperature for 45 min and then concentrated. The crude was purified by flash chromatography (SiO₂, EtOAc/cyclohexane 1/2 containing 0.5% of

triethylamine) to give **19** as a syrup (70 mg, 70%). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.08 (dd, 1H, J_{2,3}=J_{3,4}=9.1, H-3), 5.03 (dd, 1H, J_{4,5}=8.9, H-4), 4.96 (ddd, 1H, J_{1eq,2}=4.9, J_{1ax,2}=11.5, H-2), 4.15 (d, 2H, J=1.3, H-6_a, H-6_b), 3.19 (dd, 1H, J_{1eq,1ax}=11.5, H-1_{eq}), 2.85 (t, 2H, J=7.3, S-CH₂), 2.77-2.67 (m, 1H, N-CHH), 2.64 (ddd, 1H, H-5), 2.61-2.50 (m, 1H, N-CHH), 2.32 (dd, 1H, H-1_{ax}), 2.31 (s, 3H, SAc), 2.07 (s, 3H, OAc), 2.02 (2s, 6H, 2 × OAc), 2.00 (s, 3H, OAc), 1.60-1.50 (m, 2H, CH₂), 1.48-1.15 (m, 12H, 6 × CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 196.1, 171.0, 170.5, 170.1, 169.9 (4C), 74.9, 69.7, 69.6, 61.7, 59.7, 53.1, 51.9, 30.8, 29.6, 29.4, 29.2, 29.1, 28.8, 27.3 (6C), 24.8, 21.0, 20.9, 20.8, 20.8 (4 OAc); [α]_D²⁰: +8.1 (c = 0.9, CDCl₃); HR-ESI-MS: calcd for [C₂₄H₃₉NO₉S+H]⁺ 518.2424, found 518.2424.

(2R,3R,4R,5S)-2-(hydroxymethyl)-1-(8-mercaptooctyl)piperidine-3,4,5-triol **20**. A solution of 2M NH₃ (3.0 mL) was added to **19** (70 mg, 0.14 mmol) under argon. The resulting mixture was stirred overnight and then concentrated *in vacuo*. To avoid disulfide reaction, **20** was engaged directly in next step without any further purification and analysis.



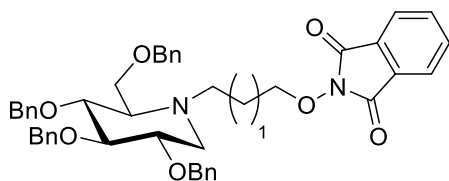
2-(3-bromopropoxy)isoindoline-1,3-dione^[10] **21**. To a 0 °C mixture of 1,3-dibromopropane (2.9 g, 14.4 mmol), triethylamine (607 mg, 6 mmol) and DMF (18 mL) was added dropwise to a



solution of *N*-hydroxyphthalimide (500 mg, 3 mmol) and DMF (18 mL). The crude was purified by flash chromatography (SiO₂, EtOAc/cyclohexane 1/1) to give **21** as a white solid (710 mg, 83 %).

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.85 (m, 2H, CH_{ar}), 7.76 (m, 2H, CH_{ar}), 4.37 (t, 2H, J=5.8, CH₂-O), 3.71 (t, 2H, J=6.5, CH₂-Br), 2.31 (m, 2H, CH₂-CH₂-O); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 163.6, 134.6, 128.8, 123.6, 76.1, 31.5, 29.3; HR-ESI-MS: calcd for [C₁₁H₁₀NO₃Br+H]⁺ 283.9922, found 283.9926.

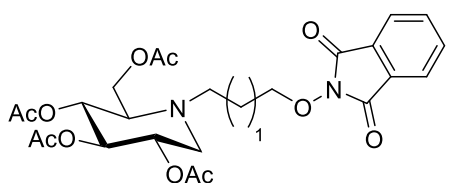
2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-*N*-(3-phthalimidoxy-propyl)-D-glucitol **22**. A mixture of tetra-benzyl-1-deoxy-nojirimycin (200 mg, 0.38 mmol), bromide **21** (130 mg, 0.46



mmol), and *sym*-collidine (55 mg, 0.46 mmol) was stirred at 120 °C for 3 h, then cooled to room temperature and directly eluted from a column of silica gel with 6:1 toluene-Et₂O (containing 0.5% of triethylamine) to give **21** (221

mg, 80%) as a colorless oil. ¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz) δ 7.40-7.34 (m, 4H, CH_{ar}), 7.32-7.25 (m, 6H, CH_{ar}), 7.22-7.01 (m, 12H, CH_{ar}), 6.83-6.77 (m, 2H, CH_{ar}), 5.09 (d, 2H, J=10.7, CH₂-C_{ar}), 4.88 (d, 2H, J=10.7, CH₂-C_{ar}), 5.04 (d, 2H, J=10.6, CH₂-C_{ar}), 4.61 (s, 2H, CH₂-C_{ar}), 4.57 (d, 2H, J=10.6, CH₂-C_{ar}), 4.33 (d, 2H, J= 10.6, CH₂-C_{ar}), 4.17 (t, 2H, J=5.9, O-CH₂), 3.75 (dd, 1H, J_{5,6a}=3.2, J_{6a,6b}=10.0, H-6_a), 3.71 (ddd, 1H, J_{1eq,2}=4.6, J_{2,3}=8.6, J_{1ax,2}=10.1, H-2), 3.70 (dd, 1H, J_{3,4}= J_{4,5}=8.9, H-4), 3.66 (dd, 1H, J_{5,6b}=1.9, H-6_b), 3.61 (dd, 1H, H-3), 3.17 (dd, 1H, J_{1eq,1ax}=10.1, H_{1eq}), 3.10-3.01 (m, 1H, N-CHH), 2.68-2.60 (m, 1H, N-CHH), 2.39 (ddd, 1H, H-5), 2.16 (dd, 1H, H-1_{ax}), 1.82-1.72 (m, 2H, CH₂-CH₂-N); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 163.2 (2C), 140.1, 139.8, 139.7, 138.9, 133.8 (2 C_{ar}), 129.5 (2C), 128.7-127.3 (24 C_{ar}), 123.0 (2C_{ar}), 87.8, 79.5, 79.2, 77.1, 75.4, 75.2, 73.3, 72.6, 68.0, 65.6, 55.1, 49.1, 25.5; [α]_D²⁰: +2.7 (c=0.9, CDCl₃); HR-ESI-MS: calcd for [C₄₅H₄₆N₂O₇+H]⁺ 727.3383, found 727.3383.

2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-*N*-(3-phthalimidoxypropyl)-D-glucitol (**23(phta)**)



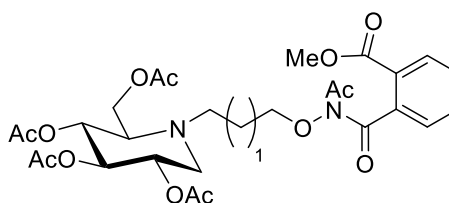
23 (phta)

and *N*-{3- [*N*-acetyl-*N*-(2-methoxycarbonyl-benzoyl)]-aminoxypropyl}-2,3,4,6-tetra-*O*-

acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol

(**23(open)**). To a stirred, cooled (-60 °C)

solution of **22** (148 mg, 0.20 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (4 mL) was slowly added a 1M solution of BCl₃ in CH₂Cl₂ (2.1 mL, 2.1 mmol). The solution was allowed to warm to

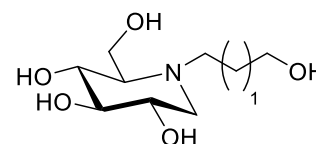


23 (open)

-10 °C over 1 h, then MeOH (0.8 mL) was added dropwise and the solution was allowed to warm to 0 °C over 30 min. Et₃N (0.8 mL) was added dropwise and the solution was concentrated. A suspension of the residue in pyridine (1 mL) and acetic anhydride (2 mL) was stirred at room temperature for 24 h, then concentrated, diluted in H₂O (50 mL), and extracted with AcOEt (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 1:1 AcOEt-cyclohexane (containing 1% of Et₃N) to give a ca. 2.1:1 mixture of **23(phta)** and **23(open)** (97 mg, 85%) as a white foam that was used for the next step without further purification. **23(phta)**. ¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz) δ 7.32-7.25 (m, 2H, H-Ar) 6.84-6.76 (m, 2H, H-Ar) 5.34 (dd, 1H, J_{2,3} = J_{3,4} = 8.9 Hz, H-3) 5.29 (dd, 1H, J_{4,5} = 8.9 Hz, H-4) 5.19 (ddd, 1H, J_{1eq,2} = 4.9, J_{1ax,2} = 10.2 Hz, H-2) 4.31 (dd, 1H, J_{5,6a} = 3.6, J_{6a,6b} = 12.9 Hz, H-6a) 4.19 (dd, 1H, J_{5,6b} = 2.0 Hz, H-6b) 4.02-3.92 (m, 2H, O-CH₂) 3.06 (dd, 1H, J_{1eq,1ax} = 11.5 Hz, H-1eq) 2.87-2.78 (m, 1H, N-CHH) 2.58-2.48 (m, 1H, N-CHH) 2.29 (ddd, 1H, H-5) 2.02 (dd, 1H, H-1ax) 1.83, 1.78, 1.74, 1.68 (4s, 12H, 4Ac) 1.57-1.46 (m, 2H, N-CH₂-CH₂). MS (ESI): m/z calcd for C₂₅H₃₁N₂O₁₁ [M+H]⁺ 535.19, found 535.20; m/z calcd for C₂₅H₃₀N₂NaO₁₁ [M+Na]⁺ 557.17, found 557.20. **23(open)** ¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz) δ 7.90-7.85 (m, 1H, H-Ar) 7.13-7.08 (m, 2H, H-Ar) 7.06-7.00 (m, 1H, H-Ar) 5.25-5.19 (m, 2H, H-3, H-4) 5.08 (ddd, 1H, J_{1eq,2} = 5.3, J_{1ax,2} = J_{2,3} = 10.2 Hz, H-2) 4.15 (dd, 1H, J_{5,6a} = 3.7, J_{6a,6b} = 12.9 Hz, H-6a) 4.08-3.91 (m, 1H, H-6b) 3.74-3.65 (bs, 2H, CH₂-O) 3.43 (s, 3H, OMe) 2.83 (dd, 1H, J_{1eq,1ax} = 10.2 Hz, H-1eq) 2.88-2.78 (m, 1H, N-CHH) 2.59-2.48 (m, 1H, N-CHH) 2.45 (s, 3H, NAc) 2.20-2.12 (m, 1H, H-5) 1.88 (dd, 1H, H-1ax) 1.81, 1.75, 1.72, 1.66 (4s, 12H, 4Ac) 1.57-1.46 (m, 2H, N-CH₂-CH₂). MS (ESI): m/z calcd for C₂₈H₃₇N₂O₁₃ [M+H]⁺ 609.23, found 609.25; m/z calcd for C₂₈H₃₆N₂NaO₁₃ [M+Na]⁺ 631.21, found 631.25.

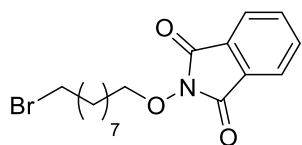
N-(3-Aminoxy-propyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol **IS_s**. A

solution of **23(phta)** and **23(open)** (2.1:1 mixture, 92 mg, 0.16 mmol) in a 2M solution of NH₃ in methanol (3.4 mL) was kept at



room temperature under argon atmosphere for 14 h and then concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 7:3 CH₂Cl₂-EtOH and then EtOH to give **IS_s** (35 mg, 93%) as an amorphous solid. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.90 (dd, 1H, J_{6a,5}=0.9, J_{6a,6b}=13.3, H-6a), 3.83 (dd, 1H, J_{5,6b}=2.2, H-6b), 3.73 (t, 2H, J=6.0, CH₂-O) 3.55 (ddd, 1H, J_{1ax,2}=11.4, J_{1eq,2}=4.8, J_{2,3}=9.2, H-2), 3.38 (dd, 1H, J_{3,4}=J_{4,5}=9.2, H-4), 3.26 (dd, 1H, H-3), 3.03 (dd, 1H, J_{1eq,1ax}=11.4, H-1eq), 2.89-2.78 (m, 1H, N-CHH), 2.76-2.66 (m, 1H, N-CHH), 2.33 (dd, 1H, H-1ax), 2.29 (ddd, 1H, H-5), 1.86-1.72 (m, 2H, O-CH₂-CH₂); ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz) δ 78.2, 74.1, 69.9, 68.7, 65.0, 57.3, 55.1, 48.7, 22.1; [α]_D²⁰: -10.5 (c=1.1, H₂O); HR-ESI-MS: calcd for [C₉H₂₀N₂O₅+H]⁺ 237.1450, found 237.1452.

1-Bromo-9-phthalimidoxy-nonane **24**.^[10a] To a stirred, cooled (0 °C) solution of 1,9-dibromononane (2.00 g, 6.99 mmol) and Et₃N (620 μL, 4.44 mmol) in DMF (9.5 mL) was added

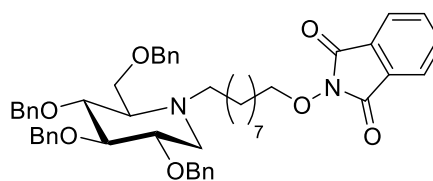


dropwise a solution of *N*-hydroxyphthalimide (241 mg, 1.48 mmol) in DMF (9.5 mL). The solution was stirred at room temperature for 12 h

and then concentrated. The residue was eluted from a column of

silica gel with 2:1 CH₂Cl₂-cyclohexane to give **23** (409 mg, 75%) as a white solid. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.83 (m, 2H, CH_{ar}), 7.74 (m, 2H, CH_{ar}), 4.19 (t, 2H, J=6.7, CH₂-O), 3.40 (t, 2H, J=6.9, CH₂-Br), 1.92-1.73 (m, 4H, 2(CH₂)), 1.55-1.19 (m, 10H, 5(CH₂)); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 163.7, 134.4, 128.9, 123.5, 78.6, 34.0, 32.8, 29.2, 29.1, 28.6, 28.1 (2C), 25.5; HR-ESI-MS: calcd for [C₁₇H₂₂NO₃Br+H]⁺ 368.0861, found 368.0862.

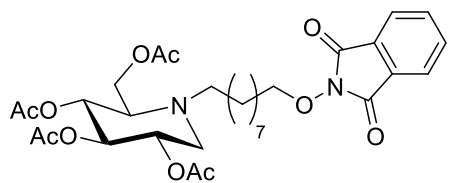
2,3,4,6-Tetra-O-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-N-(3-phthalimidoxy-nonyl)-D-glucitol **25**. A mixture of tetra-benzyl-1-deoxy-nojirimycin (200 mg, 0.38 mmol), bromide **24** (168 mg, 0.46 mmol), and *sym*-collidine (55 mg, 0.46



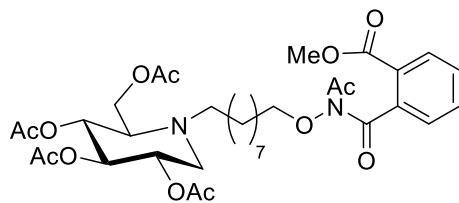
mmol) was stirred at 120 °C for 3 h, then cooled to room temperature and directly eluted from a column of silica gel with 6:1 toluene-Et₂O (containing 0.5% of triethylamine) to give **25** (250

mg, 82%) as a colorless oil. ¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz) δ 7.42-7.37 (m, 2H, CH_{ar}), 7.35-7.26 (m, 8H, CH_{ar}), 7.21-7.06 (m, 12H, CH_{ar}), 6.82-6.76 (m, 2H, CH_{ar}), 5.09 (d, 2H, J=11.1, CH₂-C_{ar}), 5.07 (d, 2H, J=11.3, CH₂-C_{ar}), 4.91 (d, 2H, J=11.1, CH₂-C_{ar}), 4.62 (d, 2H, J=11.3, CH₂-C_{ar}), 4.60 (d, 2H, J=11.1, CH₂-C_{ar}), 4.55 (d, 2H, J=11.1, CH₂-C_{ar}), 4.32 (s, 2H, CH₂-C_{ar}), 4.05 (t, 2H, J=6.5, O-CH₂), 3.77 (ddd, 1H, J_{1eq,2}=4.8, J_{2,3}=8.9, J_{1ax,2}=11.0, H-2), 3.76 (dd, 1H, J_{3,4}=8.9, J_{4,5}=9.0, H-4), 3.74 (dd, 1H, J_{5,6a}=3.2, J_{6a,6b}=10.2, H-6a), 3.66 (dd, 1H, H-3), 3.65 (dd, 1H, J_{5,6b}=2.0, H-6b), 3.16 (dd, 1H, J_{1eq,1ax}=11.0, H-1_{eq}), 2.88-2.78 (m, 1H, N-CHH), 2.60-2.51 (m, 1H, N-CHH), 2.47 (ddd, 1H, H-5), 2.25 (dd, 1H, H-1_{ax}), 1.98-1.59 (m, 2H, CH₂), 1.49-1.35 (m, 4H, 2(CH₂)), 1.32-1.15 (m, 8H, 4(CH₂)); ¹³C NMR (C₆D₆, 100 MHz) δ 163.4 (2C), 140.0, 139.8, 139.6, 138.9, 133.8 (2C), 129.6 (2C), 128.8-127.3 (20C), 123.0 (2C), 87.9, 79.6, 79.4, 78.5, 75.4, 75.2, 73.3, 72.7, 68.0, 65.4, 55.0, 53.0, 30.0, 29.9, 29.6, 28.6, 27.8, 26.1, 25.6; [α]_D²⁰: -1.5 (c=1.2, CHCl₃); HR-ESI-MS: calcd for [C₅₁H₅₈N₂O₇+H]⁺ 811.4322, found 811.4324.

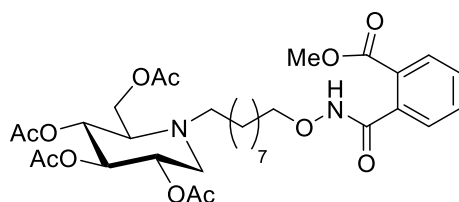
2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-N-(3-phthalimidoxynonyl)-D-glucitol (**26(phta)**), N-{3-[Nacetyl-N-(2-methoxycarbonyl-benzoyl)]-aminoxynonyl}-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**26(open)**) and 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-N-{3-[N-(2-methoxycarbonyl-benzoyl)]-aminoxynonyl}-D-glucitol (**26(NH)**). To a stirred, cooled (-



26 (phta)



26 (open)

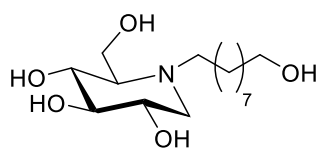


26 (NH)

60 °C) solution of **25** (140 mg, 0.17 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (3.3 mL) was slowly added a 1M solution of BCl₃ in CH₂Cl₂ (1.7 mL, 1.7 mmol). The solution as allowed to warm to - 10 °C over 1 h, then MeOH (0.8 mL) was added dropwise and the solution was allowed to warm to 0 °C over 30 min. Et₃N (0.8 mL) was added dropwise and the solution was concentrated. A suspension of the residue in pyridine (1 mL) and acetic anhydride (2 mL) was stirred at room temperature for 24 h, then concentrated, diluted in H₂O (50 mL), and extracted with

AcOEt (3 x 50 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄) and concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with 2:1 cyclohexane-AcOEt (containing 1% of Et₃N) to give a ca. 3.7:2.0:1.0 mixture of **26(phta)**, **26(open)**, and **26(NH)** (93 mg, 85%) as a white foam that was used for the next step without further purification. ¹H NMR (C₆D₆, 400 MHz) δ 7.88-7.43 (m, 0.29H, H Ar [**open**]) 7.81-7.77 (m, 0.14H, H-Ar [**NH**]) 7.63-7.29 (m, 1.14H, H-Ar [**phta**]) 7.08-7.77 (m, 0.29H, H-Ar [**open**]) 7.01-6.94 (m, 0.58H, H-Ar [**open**]) 6.92-6.86 (m, 0.14H, H-Ar [**NH**]) 6.84-6.77 (m, 1.14H, H-Ar [**phta**]) 5.42-5.35 (m, 1H, H-3) 5.35-.5.29 (m, 1H, H-4) 5.27-5.18 (m, 1H, H-2) 4.26-4.09 (m, 2.28H, H-6a, H-6b, CH₂-O [**NH**]) 4.06 (t, 1.14H, J = 6.5 Hz, CH₂-O [**phta**]) 3.88-3.78 (bs, 0.58H, CH₂-O [**open**]) 3.58 (s, 0.42H, OMe [**NH**]) 3.38 (s, 0.87H, OMe [**open**]) 3.16-3.08 (m, 1H, H-1eq) 2.59-2.42 (m, 1H, N-CHH) 2.46 (s, 0.87H, NAc [**open**]) 2.40-2.26 (m, 2H, N-CHH, H-5) 2.10-1.99 (m, 1H, H-1ax) 1.80-1.72 (4s, 9H, 3Ac) 1.66 (s, 3H, Ac) 1.68-1.58 (m, 1H, CHH-CH₂-O) 1.48-0.95 (m, 13H, 6 CH₂, CHH-CH₂-O). **26(phta)**. MS (ESI): m/z calcd for C₃₁H₄₃N₂O₁₁ [M+H]⁺ 619.29, found 619.25; m/z calcd for C₃₁H₄₂N₂NaO₁₁ [M+Na]⁺ 641.27, found 641.25. **26(open)**. MS (ESI): m/z calcd for C₃₄H₄₉N₂O₁₃ [M+H]⁺ 693.32, found 693.30; m/z calcd for C₃₄H₄₈N₂NaO₁₃ [M+Na]⁺ 715.30, found 715.30. **26(NH)**. MS (ESI): m/z calcd for C₃₂H₄₇N₂O₁₂ [M+H]⁺ 651.31, found 651.35.

N-(3-Aminooxy-nonyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol **IS_i**. A solution of **26(phta)**, **26(open)** and **26(NH)** 3.7:2.0:1.0 mixture, 50 mg, 0.078 mmol) in a 2M solution of NH₃ in methanol (1.5



mL) was kept at room temperature under argon atmosphere for 14 h and then concentrated. The residue was eluted from a column of silica gel with CH₂Cl₂-EtOH (4:1 then 1:1) to give **IS_i** (22 mg, 88%) as an amorphous solid.

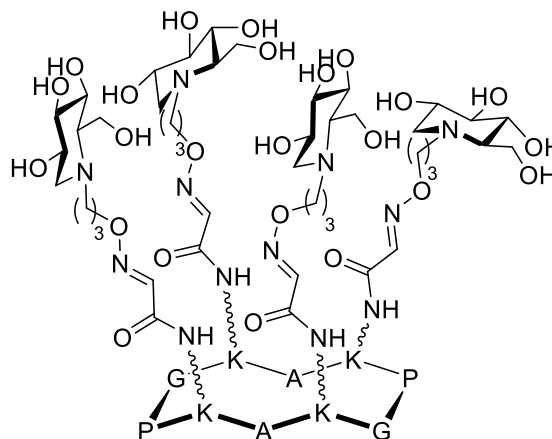
¹H NMR (D₂O, 400 MHz) δ 3.87 (dd, 1H, J_{6a,5}=2.1, J_{6a,6b}=12.0, H-6a), 3.81 (dd, 1H, J_{5,6b}=1.7, H-6b), 3.68 (t, 2H, J=6.5, CH₂-O), 3.53 (ddd, 1H, J_{1ax,2}=11.4, J_{1eq,2}=4.7, J_{2,3}=8.9, H-2), 3.37 (dd, 1H, J_{3,4}=J_{4,5}=9.2, H-4), 3.24 (dd, 1H, H-3), 3.04 (dd, 1H, J_{1eq,1ax}=11.4, H-1eq), 2.82-2.71 (m, 1H, N-CHH), 2.70-2.59 (m, 1H, N-CHH), 2.36 (dd, 1H, H-1ax), 2.32 (ddd, 1H, H-5), 1.58-1.50 (m, 2H, O-CH₂-CH₂), 1.50-1.40 (m, 2H, N-CH₂-CH₂), 1.34-1.18 (m, 10H, 5(CH₂)); ¹³C NMR (D₂O, 100 MHz) δ 78.1, 76.4, 69.8, 68.6, 65.1, 57.2, 55.0, 52.2, 28.5, 28.4 (2C), 27.4, 26.6, 25.1, 22.7; [α]_D²⁰: -10.8 (c=0.5, MeOH); HR-ESI-MS: calcd for [C₁₅H₃₂N₂O₅+H]⁺ 321.2389, found 321.2390.

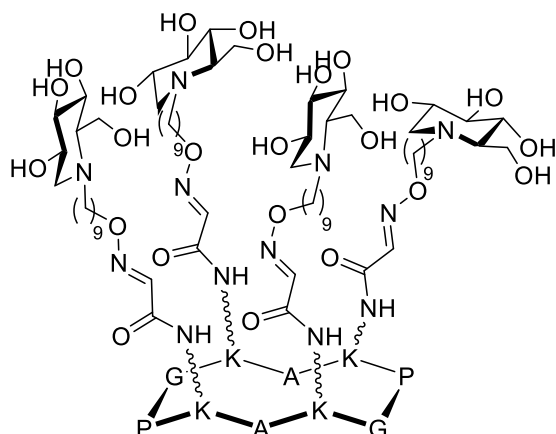
C. Clusters

The iminosugar clusters were prepared according to the general procedure described below.

50 μL of a 100 mM solution (5.0 μmol) of **RAFT(ALD)₄** in H₂O were diluted in 4.550 mL of H₂O+0.1% TFA. 400 μL of a 100 mM solution (40.0 μmol) of iminosugar **IS** in H₂O were then added and the reaction mixture was stirred for 2 days at room temperature.

cRAFT(IS_s)₄. **cRAFT(IS_s)₄** was prepared according to the general procedure described above using **cRAFT(ALD)₄** and **IS_s**. The crude was purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (5 →20% →100% acetonitrile, 0.1% TFA (60 min/10 min)) to obtain **cRAFT(IS_s)₄** as a white solid (5.9 mg, 47%). LC-MS 2 t_R: 1.47 min (Method J); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₈₈H₁₅₀N₂₂O₃₄+Na]⁺ 2082.07, found 2082.04.

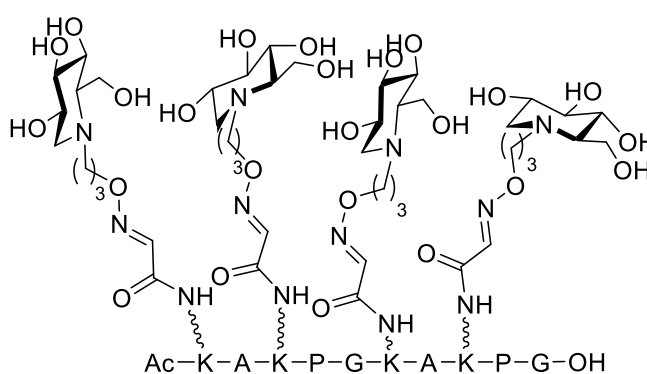




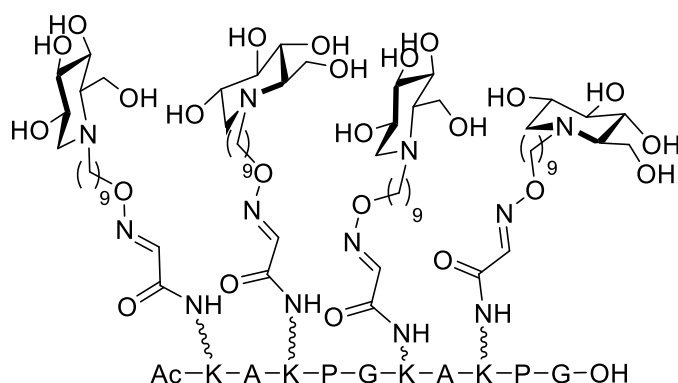
2396.44, found 2396.49.

IRAF(T_S)₄. IRAF(T_S)₄ was prepared according to the general procedure described above using IRAF(ALD)₄ and IS_S. The crude was purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (5 →20% →100% acetonitrile, 0.1% TFA (60 min/10 min)) to obtain the IRAF(T_S)₄ as a white solid (4.1 mg, 40%).

LC-MS 2 t_R: 1.49 min (Method J); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₉₀H₁₅₄N₂₂O₃₆+Na]⁺ 2142.09, found 2142.05.



IRAF(T_S)₄. IRAF(T_S)₄ was prepared according to the general procedure described above using IRAF(ALD)₄ and IS_I. The crude was purified by semi-preparative HPLC 1 in

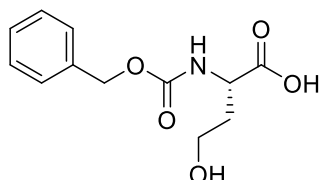


H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (5 →50% →100% acetonitrile, 0.1% TFA (45 min/10 min)) to obtain IRAF(T_S)₄ as a white solid (7.1 mg, 70%). LC-MS 2 t_R: 2.37 min (Method J); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₁₁₄H₂₀₂N₂₂O₃₆+H]⁺ 2478.47, found 2478.44.

IV. Functionalized α -PNAs

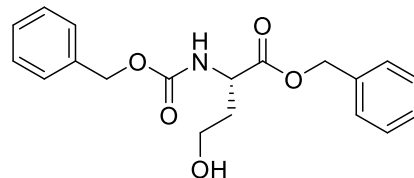
A. Modified amino acids

((Benzyloxy)carbonyl)-L-homoserine **27**. The synthesis of this compound was adapted from previously described report and the characterizations were conformed to the literature.^[11]



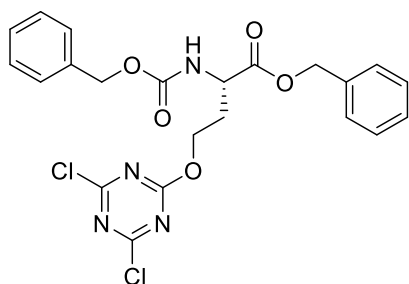
Benzyl chloroformate (6.6 mL, 46.2 mmol) was added to a suspension of *L*-homoserine (5 g, 42.0 mmol) in aqueous solution of NaHCO₃ (16.8 g in 260 mL of H₂O). The mixture was stirred for 20 hours at room temperature. The product was washed with Et₂O (3x). Then, the aqueous phase was cooled in an ice bath and acidified to pH 2.0 by adding 3N HCl. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3x) and the organic phase dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo* (caution: the bath of the rotavapor was kept at 20°C and not heated to avoid the formation of the corresponding lactone). **27** was obtained as a white solid (9.87 g, 93%) and engaged in the next step without any further purification. ¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz) δ 12.53 (br s, 1H, COOH), 7.54 (d, ³J = 8.0; 1H, N-H), 7.39 (m, 5H, C_{ar}H), 5.02 (s, 2H, C_{ar}-CH₂), 4.59 (br s, CH₂-OH), 4.11 (m, 1H, CH-CH₂), 3.48 (m, 2H, CH₂-OH), 1.89 (m, 1H, CH-CH-H), 1.73 (m, 1H, CH-CH-H); ¹³C NMR (CDCl₃; 100 MHz) δ 174.2, 156.1, 136.95, 128.3, 127.7, 127.7, 65.3, 57.1, 50.8, 33.7; HPLC t_R: 2.39 min (Method H).

Benzyl((benzyloxy)carbonyl)-L-homoserinate **28**. The synthesis of this compound was adapted from previously described report and the characterizations were conformed to the literature.^[11] Benzyl bromide (2.6 mL, 22.3 mmol) was



added to a solution of **27** (5.37 g, 21.2 mmol) and DIEA (3.7 mL, 21.2 mmol) in dry DMF (34.8 mL). The solution was stirred for 8 h at room temperature and 0.1 eq of DIEA was added. After 12h stirring, EtOAc was added to the crude mixture and washed with H₂O (1x), a saturated solution of NaHCO₃ (2x) and brine (1x). The organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (SiO₂, Cyclohexane/EtOAc 8/2 \rightarrow 5/5) which gave Benzyl((benzyloxy)carbonyl)-L-homoserinate **28** as a white solid (6.95 g, 96%). ¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.35 (m, 10 H; C_{ar}-H), 5.71 (d, ³J=8.0; 1H, N-H), 5.15 (m; 2H, CH₂-OCONH), 5.12 (m; 2H, CH₂-OCOCH), 4.59 (m, 1H; C-H), 3.68 (m, 2H; CH₂-OH), 2.42 (br s, 1H; O-H), 2.18 (m, 1H; CH-CH-H), 1.72 (m, 1H; CH-CH-H); ¹³C NMR (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.7, 156.2, 136.9, 136.0, 128.5, 128.4, 128.1, 127.9, 127.8, 127.8, 128.2, 65.9, 65.5, 56.9, 51.1, 33.7; [α]_D¹⁸: -0.3 (c=1.0, CHCl₃); HPLC t_R: 3.74 min (Method H).

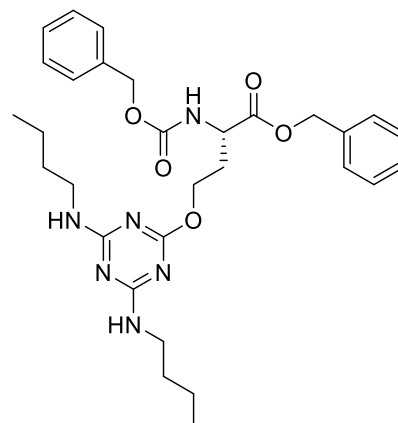
Benzyl *N*-((benzyloxy)carbonyl)-*O*-(4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)-*L*-homoserinate **29**. DIEA (1.52 mL, 8.74 mmol) was added at 0°C to a solution of cyanuric chloride (1.29 g, 6.99 mmol)



in dry THF (6 mL). Then, a solution of Benzyl((benzyloxy)carbonyl)-*L*-homoserinate **28** (2 g, 5.82 mmol) in dry THF (6 mL) was added dropwise. The mixture was stirred for 13 hours in an ice bath. The ice bath was then removed and the reaction mixture was further stirred for 12 hours. The mixture was filtered on sintered glass filter and

washed with EtOAc before being dried under vacuum. The crude material was purified by flash chromatography (SiO₂, Petroleum ether/EtOAc 9/1 → 7/3) which gave Benzyl *N*-((benzyloxy)carbonyl)-*O*-(4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)-*L*-homoserinate **29** as a yellow solid (2.21 g, 79%). ¹H NMR (CDCl₃; 400 MHz) δ 7.38 (m, 10H, C_{ar}H), 5.54 (d, ³J=8.0, 1H, N-H), 5.19 (m, 2H, CH-CONH), 5.16 (s, 2H, CH-OCOCH), 4.63 (m, 1H, CH-CH₂), 4.56 (m, 2H, CH₂-OH), 2.45 (m, 1H, CH-CH-H), 2.27 (m, 1H, CH-CH-H); ¹³C NMR (CDCl₃; 100 MHz) δ 172.6, 171.4, 170.8, 155.9, 136.1, 135.0, 128.8, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 67.9, 67.4, 66.3, 51.3, 31.5; HR-ESI-MS: calcd for [C₂₂H₁₉N₄O₅Cl₂+H]⁺ 491.0889, found 491.0893; HPLC t_R: 4.87 min (Method H).

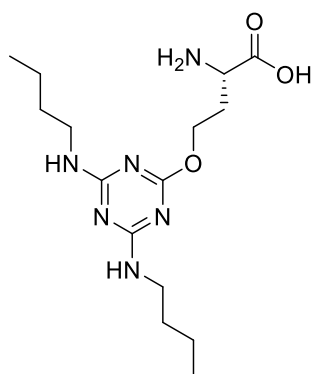
Benzyl *N*-((benzyloxy)carbonyl)-*O*-(4,6-bis(butylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-*L*-homoserinate **30**. A mixture of *n*-butylamine (2.9 mL, 29.3 mmol) and DIEA (10.2 mL, 98.6 mmol) in dry THF (40 mL) was added to a solution of Benzyl *N*-((benzyloxy)carbonyl)-*O*-(4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)-*L*-homoserinate **29** (3.6 g, 7.33 mmol) in dry THF (320 mL). The mixture was stirred under reflux for 20 h at room temperature.



The mixture was filtered on a sintered glass filter and washed with EtOAc. The filtrate was then dried under vacuum and the crude material was purified by flash chromatography (SiO₂, Petroleum ether/EtOAc 5/5) which gave Benzyl *N*-((benzyloxy)carbonyl)-*O*-(4,6-bis(butylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-*L*-homoserinate **30** as a yellow oil (3.93 g, 95%). ¹H NMR (d₆-DMSO; 400 MHz) δ 7.89 (t, ³J=7.2, 1H, CH-N-H), 7.34 (m, 10H, C_{ar}H), 7.18 (t, ³J=5.6, 1.2H, C_{ar}-NH-CH₂), 7.05 (t, ³J=5.6, 0.5H, C_{ar}-NH-CH₂), 6.97 (t, ³J=5.6, 0.3H, C_{ar}-NH-CH₂), 5.13 (m, 2H, CH-CONH), 5.03 (m, 2H, CH-OCOCH), 4.22 (m, 3H, CH-CH₂, CH₂-O), 3.18 (m, 4H, HN-CH₂), 2.14 (m, 1H, CH-CH-H), 1.96 (m, 1H, CH-CH-H), 1.43 (m, 4H, HN-CH₂-CH₂), 1.26 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₃), 0.85 (m, 6H, CH₂-CH₃); ¹³C NMR (d₆-DMSO; 100 MHz) δ 172.1, 169.8, 166.7, 156.2, 136.8, 135.9, 128.5, 128.4, 128.1, 127.9, 127.8, 66.2, 65.6, 61.9, 51.2, 31.3, 31.2, 30.1, 19.7, 19.6, 13.8, 13.7; [α]_D¹⁸: -3.0 (c=1.0, CHCl₃);

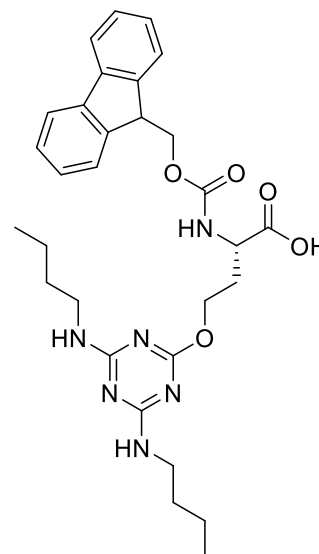
HR-ESI-MS: calcd for $[C_{30}H_{39}N_6O_5+H]^+$ 565.3138, found 565.3135; HPLC t_R : 4.59 min (Method H).

O-(4,6-bis(butylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-L-homoserine **31**. 10% Pd/C (approximately 20 mg) was added to a solution of Benzyl *N*-((benzoxy)carbonyl)-O-(4,6-bis(butylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-L-homoserinate **30** (1.20 g, 2.1 mmol) in dry MeOH under H_2 .




The mixture was stirred at room temperature for 20h and was then filtered on a pad of celite and washed with MeOH (6x350 mL). The eluted fractions were concentrated *in vacuo* and gave O-(4,6-bis(butylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-L-homoserinate **31** as a white solid (686.7 mg, 96%). 1H NMR (d_6 -DMSO/MeOD 1/1, 400MHz) δ 4.30 (m, 2H, CH_2 -O), 3.45 (br s, 1H, NH_2), 3.21 (m, 4H, NH - CH_2), 2.22 (m, 1H, CH - CH -H), 1.99 (m, 1H, CH - CH -H), 1.42 (m, 4H, HN - CH_2 - CH_2), 1.26 (m, 4H, CH_2 - CH_2 - CH_3), 0.85 (t, $^3J=8.0$, 6H, CH_2 - CH_3); ^{13}C NMR (d_6 -DMSO/MeOD 1/1, 100 MHz) δ 170.2, 51.0, 38.8, 30.4, 29.3, 18.7, 12.3; HR-ESI-MS: calcd for $[C_{15}H_{27}N_6O_3+H]^+$ 341.2301, found 341.2303; HPLC t_R : 2.85 min (Method H).

N-(((9*H*-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-O-(4,6-bis(butylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-L-homoserine **32**. A solution of *N*-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide (537.4 mg, 2.08 mmol) in 1,4-dioxane (1.6 mL) was added dropwise at $0^\circ C$ to a suspension of O-(4,6-bis(butylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-L-homoserinate **31** in 10% aqueous Na_2CO_3 (3.8 mL) and 1,4-dioxane (2.6 mL). After 14h stirring at room temperature, EtOAc was added to the crude mixture and the organic layer was washed with an aqueous solution of 5% hydrochloric acid. The aqueous phase was extracted with EtOAc (3x). The combined organic phase was washed with brine and dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (SiO_2 , CH_2Cl_2 /EtOAc 5/5 \rightarrow EtOAc \rightarrow EtOAc/MeOH 95/5) which gave *N*-Fmoc-O-(4,6-bis(butylamino)-1,3,5-triazin-2-yl)-L-homoserinate **32** as a white solid (828.1 mg, 74%). 1H NMR (d_6 -DMSO; 400 MHz) δ 7.90 (d, $^3J=8.0$, 2H, $C_{ar}H$), 7.72 (d, $^3J=8.0$, 2H, $C_{ar}H$), 7.43 (m, 2H, C_{ar} - $C_{ar}H$ - $C_{ar}H$ - $C_{ar}H$), 7.34 (m, 2H, CH - C_{ar} - $C_{ar}H$ - $C_{ar}H$), 7.13 (t, $^3J=5.6$, 1.0H, C_{ar} - NH - CH_2), 7.00 (t, $^3J=5.6$, 0.5H, C_{ar} - NH - CH_2), 6.93 (t, $^3J=5.6$, 0.3H, C_{ar} - NH - CH_2), 4.29 (m, 5H, C_{ar} - CH - C_{ar} , CH_2 -OCON, CH_2 -O), 4.11 (m, 1H, CH - CH_2), 3.20 (m, 4H, NH - CH_2), 2.16 (m, 1H, CH - CH -H), 1.93 (m, 1H, CH - CH -H), 1.46 (m, 4H, HN - CH_2 - CH_2), 1.31 (m, 4H, CH_2 - CH_2 - CH_3), 0.89 (m, 6H, CH_2 - CH_3); ^{13}C NMR (d_6 -DMSO; 100 MHz) δ 173.9, 172.8, 156.2, 143.8, 140.7, 127.7, 127.1, 125.3, 120.1, 120.1, 65.7, 62.2, 51.0,

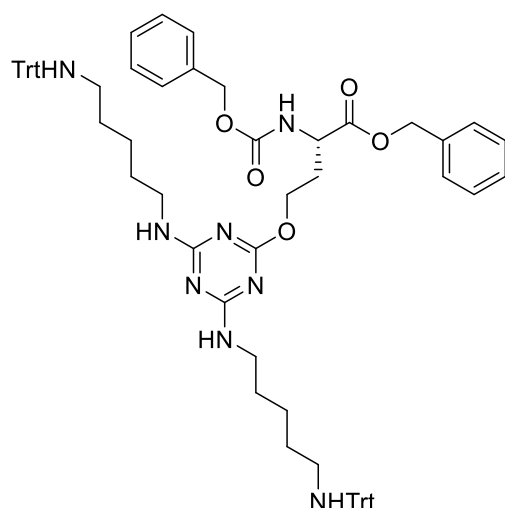


173.9, 172.8, 156.2, 143.8, 140.7, 127.7, 127.1, 125.3, 120.1, 120.1, 65.7, 62.2, 51.0,

46.7, 31.3, 31.2, 30.2, 25.3, 19.6, 13.8, 13.7; $[\alpha]_D^{18}$: -5.0 (c=1.0, MeOH); HR-ESI-MS: calcd for $[C_{30}H_{37}N_6O_5+H]^+$ 563.2982, found 563.2982; HPLC t_R : 4.36 min (Method H).

N-tritylpentane-1,5-diamine **33**. The procedure for the preparation of this compound was adapted from the literature.^[12] To a solution of 1,5-diaminopentane (20.44 g, 5 eq) in CH_2Cl_2 TrtHN--NH₂ (50 mL) is added dropwise, at 0°C, a solution of trityl chloride (11.15 g, 1 eq) in CH_2Cl_2 (100 mL). The mixture is then stirred 24 h at room temperature. Then the mixture is washed with a solution of Na₂CO₃ 5% and brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated under vacuum. The crude mixture was purified by flash chromatography on silica gel (CH_2Cl_2 /MeOH/NH₄OH 80/19/1) to afford **33** in 70% yield (9.65 g). The characterizations were conformed to the data reported in the reference.

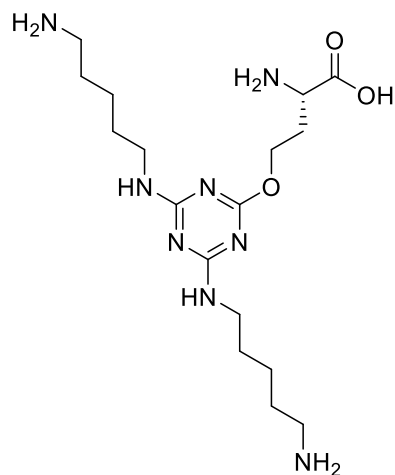
Benzyl N-((benzyloxy)carbonyl)-O-(4,6-bis((5-(tritylamino)pentyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl)-L-homoserinate **34**. To a solution of **29** (2.1 g, 1 eq.) in THF (180 mL) was slowly added a solution



of *N*-tritylpentane-1,5-diamine **34** (5.88 g, 4 eq) and DIEA (5.96 mL, 8 eq) in dry THF (20 mL). The mixture was stirred overnight under reflux, and then concentrated to dryness. The crude mixture was purified by flash chromatography on silica gel (Petroleum Ether/EtOAc 1/1) to afford **34** in 87% yield (4.12 g). ¹H NMR (400 MHz, d⁶-DMSO) δ 7.51-7.01 (m, 40H), 5.17-4.88 (m, 4H), 4.34-4.09 (m, 3H), 3.21-3.01 (m, 4H), 2.38-2.27 (m, 1H), 2.22-2.03 (m, 1H), 2.03-1.79 (m, 4H), 1.53-1.32 (m, 8H), 1.32-1.10 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, d₆-DMSO) δ

171.97, 166.62, 156.13, 146.21, 136.74, 135.77, 128.31, 127.97, 127.81, 127.70, 127.58, 125.92, 70.32, 66.10, 65.56, 61.79, 51.17, 43.32, 43.23, 30.09, 29.79, 29.09, 24.31; ESI-MS: calcd for $[C_{70}H_{74}N_8O_5+H]^+$ 1107.59, found 1107.45; HPLC t_R : 4.53 min (Method H).

O-(4,6-bis((5-(tritylamino)pentyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl)-L-homoserine **35**. To a solution of **34** (2 g, 1.80 mmol) in MeOH/EtOAc 3/1 (57 mL) was carefully added, under argon, activated

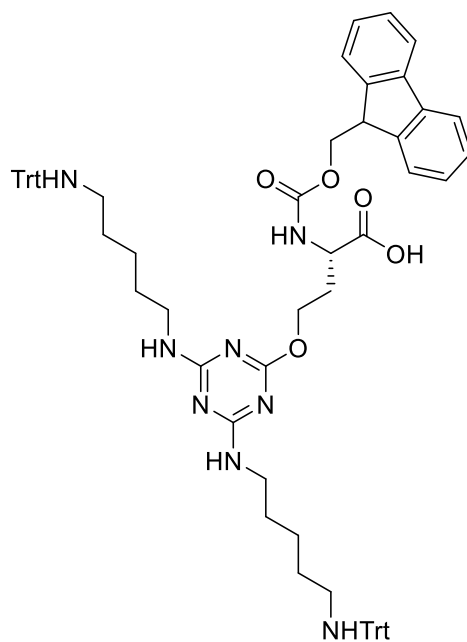


palladium on charcoal (10% of Pd). After 3 vacuum-H₂ cycles, the mixture was left stirring overnight under a H₂ atmosphere. The mixture is then filtered on a celite pad and evaporated to afford the titled compound. The pad of celite was thoroughly washed with MeOH/EtOAc 1/1 in order to recover **35** in 97% yield (1.55 g). No further purification is needed. ¹H NMR (400 MHz, d⁶-DMSO) δ 7.56-6.91 (m, 30H), 4.42-4.14 (m, 3H), 3.22-3.03 (m, 4H), 2.45-2.24 (m, 1H), 2.22-2.03 (m, 1H), 1.97-1.80 (m, 4H), 1.53-1.31 (m, 8H), 1.31-1.17 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 166.55, 146.22, 143.73, 128.98, 128.31,

127.59, 126.21, 125.92, 70.32, 43.33, 29.85, 29.12, 24.36; HR-ESI-MS: calcd for [C₅₅H₆₂N₈O₃+H]⁺ 883.5023, found 883.5023; HPLC t_R: 3.56 min (Method H).

N-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-O-(4,6-bis((5-

(tritylamino)pentyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl)-L-homoserine **36**. To a solution of **35** (1.06 g, 1 eq.) in 1,4-dioxane (5 mL) is added a solution of 10% aqueous Na₂CO₃ (4.0 mL). The mixture is cooled down to 0°C, and Fmoc-OSu (427.1 mg, 1.05 eq) in 1,4-dioxane (2.8 mL) is added dropwise. The mixture is then stirred for 20 hours at room temperature. The mixture is then diluted with EtOAc, acidified by addition of HCl 0.1 N (to pH~3). The aqueous phase was then extracted 3 times with EtOAc. The organic phases are washed two times with distilled water and one time with brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated. The residue is then purified by

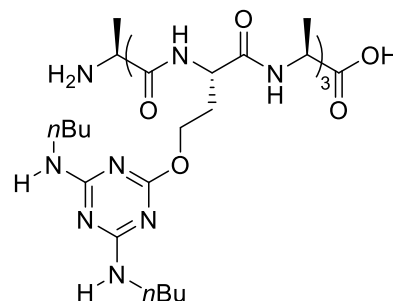


silica gel chromatography (EtOAc/MeOH, 0% to 15% MeOH) to afford the pure **36** in 72% yield (960 mg). ¹H NMR (d⁶-DMSO, 400 MHz) δ 7.91-7.82 (m, 2H), 7.68 (d, J=7.2, 2H), 7.44-7.09 (m, 38H), 4.33-4.08 (m, 5H), 3.98-3.87 (m, 1H), 3.21-3.05 (m, 4H), 2.43-2.28 (m, 1H), 2.21-2.04 (m, 1H), 1.95-1.80 (m, 4H), 1.51-1.30 (m, 8H), 1.29-1.20 (m, 4H); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 155.8, 146.1, 144.0, 141.3, 130.1, 128.7, 127.8, 127.6, 127.0, 126.3, 125.3, 119.9, 77.3, 71.0, 66.7, 47.3, 43.6, 40.9, 30.5, 29.7, 29.5, 29.3, 24.7; HR-ESI-MS: calcd for [C₇₀H₇₂N₈O₅+H]⁺ 1105.5704, found 1105.5695; HPLC t_R: 4.35 min (Method H).

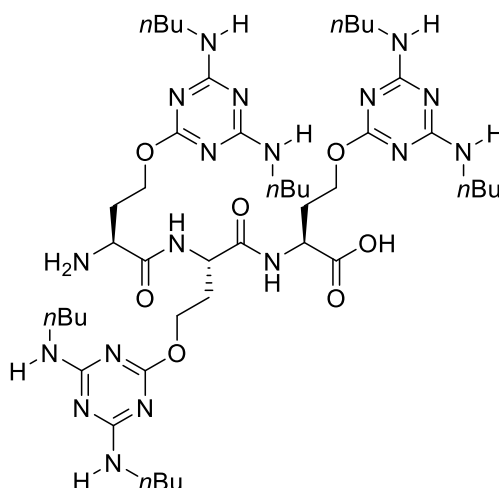
B. α -PNAs

The synthesis were performed by Dr. Arnaud Gilles (Glycochemistry & Molecular Recognition, IBMM, UMR 5247).

Ala-Triaz. The peptide was synthesized according to the general procedure for the peptide coupling described above and was purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient ((20% →100% acetonitrile, 0.1% TFA (40 min)) Flow: 20 mL/min) to obtain **Ala-Triaz** as a white solid (3 mg, 10%). HPLC t_R : 3.89 min (Method H); ESI-MS: calcd for [C₅₇H₁₀₀N₂₂O₁₁+H]⁺ 1269.79, found 1269.50; MALDI-ToF (HCCA) : calc for [C₅₇H₁₀₀N₂₂O₁₁+H]⁺ 1269.80, found 1269.93; calcd for [C₅₇H₁₀₀N₂₂O₁₁+Na]⁺ 1291.78, found 1291.90.



Triaz-Triaz. The peptide was synthesized according to the general procedure for the peptide coupling procedure described above and was purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient ((50% →100% acetonitrile, 0.1% TFA (35 min)) Flow: 20 mL/min) to obtain **Triaz-Triaz** as a white solid (15 mg, 28%). HPLC (Method A): t_R = 5.78 min; ESI-MS: [C₁₀₅H₁₈₄N₄₂O₁₅+2H]²⁺ calcd 1137.74, found 1138.05; MALDI-ToF (HCCA) : calcd for [C₁₀₅H₁₈₄N₄₂O₁₅+H]⁺ 2274.50, found 2274.38; calcd for [C₁₀₅H₁₈₄N₄₂O₁₅+Na]⁺ 2296.48, found 2296.35.



V. Peptide-based cages

A. Peptide scaffolds

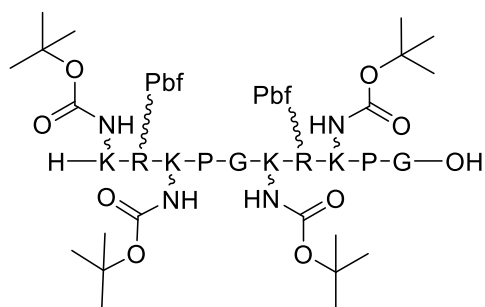
1. Serine and Aldehyde scaffolds

cRAFT(Ser)₄ and **cRAFT(ALD)₄** synthesis and characterizations were described in the Multivalent clusters for DNA recognition section.

2. Maleimide scaffolds

The synthesis and characterizations of the maleimide scaffold **cRAFT_{Ala}(Mal)₄** and **cRAFT_{Ala}(Lys)₄** were described in the section Iminosugar clusters for the inhibition of glycosidases.

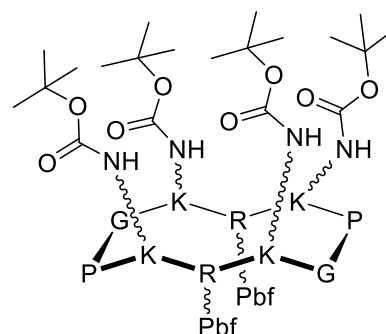
IRAF_TArg(Lys(Boc))₄ 37. The 2-CTC resin was manually loaded with Fmoc-Gly-OH according to the general procedure yielding a loading of 0.31 mmol/g of resin. **36** was synthesized



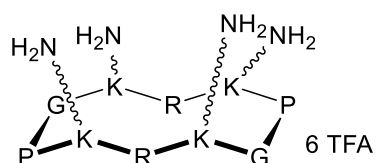
according to the general procedure for linear and cyclic peptide synthesis on 0.25 mmol. The linear peptide was purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (0 → 40% → 60% → 80% acetonitrile 0.1% TFA (5 min/25 min/35 min)) to obtain **37** as a white solid (270.0 mg, 50%). LC-MS 2 *t_R*: 4.57 min (Method H); HR-ESI-MS: calcd for

[C₉₆H₁₅₈N₂₀O₂₅S₂+2H]²⁺ 1028.75, found 1028.55.

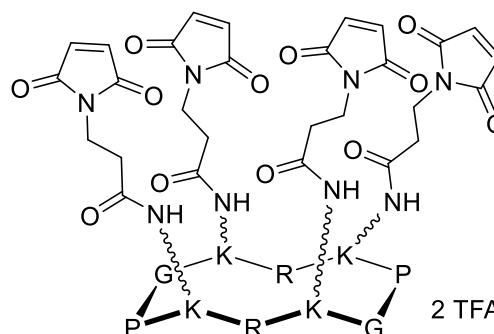
cRAFT_{Arg}(Lys(Boc))₄ 38. **37** was cyclized according to the general procedure for cyclisation of linear peptides. **38** was obtained as a white solid (244.6 mg, 92%). LC-MS 2 *t_R*: 5.34 min (Method H); HR-ESI-MS: calcd for [C₉₆H₁₅₆N₂₀O₂₄S₂+2H]²⁺ 1019.55, found 1019.80.



cRAFT_{Arg}(Lys)₄ 38 (244.6 mg, 0.12 mmol) was deprotected according the general procedure of deprotection of the peptides. **cRAFT_{Arg}(Lys)₄** was obtained as a white solid (190.0 mg, Quantitative yield). HPLC 1 *t_R*: 3.10 min (Method A), *t_R*: 23.7 min (Method B).



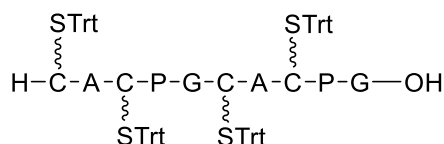
cRAFT_{Arg}(Mal)₄ 12 (383 mg, 1.44 mmol) was added to a solution of **cRAFT_{Arg}(Lys)₄** (190 mg, 0.12 mmol) in a phosphate buffer 100mM pH 7.2/DMF solution (55/45) (24 mL). The mixture was stirred overnight at room temperature and the product was purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (0 → 25% → 100% acetonitrile 0.1% TFA (30 min/40 min)) and freeze dried. **cRAFT_{Arg}(Mal)₄** was obtained as a white powder (188.7



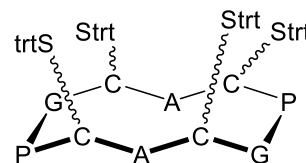
mg, 80 %). LC-MS 2 t_R : 2.09 min (Method J); MALDI-ToF (HCCA): calcd for $[C_{78}H_{112}N_{24}O_{22}+H]^+$ 1737.84, found 1737.82.

3. Cysteine scaffold

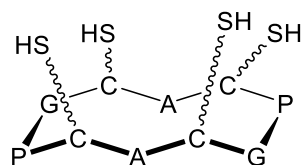
lRAFT(Cys(Trt))₄ 39. The 2-CTC resin was manually loaded with Fmoc-Gly-OH according to the general procedure yielding a loading of 0.31 mmol/g of resin. **39** was synthesized according to the general procedure for linear and cyclic peptide synthesis on 0.25 mmol. The linear peptide was purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (50 → 50% → 70% → 100% acetonitrile 0.1% TFA (5 min/10 min/30 min)) to obtain **39** as a white solid (72.0 mg, 40%). HPLC t_R : 6.59 min (Method D).



cRAFT(Cys(Trt))₄ 40. **39** was cyclized according to the general procedure for cyclisation of linear peptides. **40** was engaged without any further purification in the deprotection step. HPLC t_R : 7.38 min (Method D).



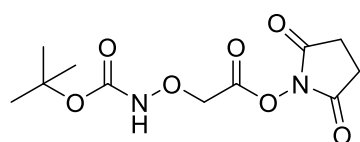
cRAFT(Cys)₄ 40 (20.0 mg, 0.01 mmol) was deprotected according to general procedure for cleavage under harsh conditions. **cRAFT(Cys)₄** was then purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient (0 → 40% → 65% → 100% acetonitrile 0.1% TFA (10 min/25 min/15 min)). **cRAFT(Cys)₄** was obtained as a white solid (8.0 mg, 93%). HPLC t_R : 2.34 min (Method J); MALDI-ToF (HCCA): calcd for $[C_{32}H_{50}N_{10}O_{10}S_4+Na]^+$ 885.26, found 885.20.



B. Bifunctional spacers

1. Hydrazone-oxime spacers

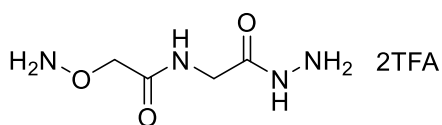
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 2-(((tert-butoxycarbonyl)amino)oxy)acetate **41**.^[13] *N*-hydroxysuccinimide (734.4 mg, 6.38 mmol) was added to a solution of *N*-Boc-aminoxyacetic acid (1 g, 5.23 mmol) in DMF (20.2 mL). Then, a solution of EDC-HCl (1.22 g, 6.38 mmol) in DMF (58 mL) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was then concentrated *in vacuo* and the residue was solubilized



in EtOAc and washed with water, saturated aqueous NH₄Cl solution and saturated aqueous NaCl solution. The organic phase was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to give **41** as a white solid (1.35 g, 90%). LC-MS 1: t_R = 3.30 min (Method D); ¹H NMR (400 MHz,

CDCl_3) δ 7.74 (s, 1H, NH), 4.77 (s, 2H, O-CH₂), 2.87 (s, 4H, 2(CO-CH₂)), 1.48 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.8, 165.2, 156.3, 82.8, 71.0, 28.3, 25.7.

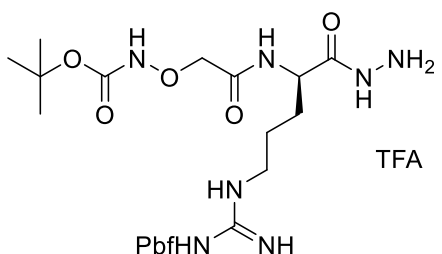
2-(aminooxy)-N-(2-hydrazinyl-2-oxoethyl)acetamide **42**. After 2-CTC resin functionalization based on the general procedure for the preparation of the Fmoc-hydrazine resin. Then, the



Fmoc-Gly-OH was coupled to the resin according to the general procedure for the hydrazide peptide coupling. The functionalized resin was then suspended in a solution of

DIEA (125.4 μL , 0.72 mmol) in CH_2Cl_2 (1.7 mL) and a solution of **41** (103.8 mg, 0.36 mmol) in CH_2Cl_2 (1.7 mL) was added. After overnight stirring at room temperature, the resin was filtered and TNBS test was performed to give a complete functionalization of the amine group. The resin was filtered and washed with DMSO (3x), CH_2Cl_2 (2x), isopropanol (1x), CH_2Cl_2 (2x) and Et_2O (3x) before drying *in vacuo*. The resin was suspended in a solution of deprotection according to the general procedure for cleavage under harsh conditions. The crude product was dissolved in H_2O and freeze dried to give **42** as a white solid (34.6 mg, 49%). ¹H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.71 (s, 2H, O-CH₂), 4.12 (s, 2H, CH₂-NH); ¹³C NMR (100 MHz, MeOD) δ 169.9, 169.3, 163.2 (q, ²J(C,F)=35, 1C, F₃C-C=O), 117.8 (q, ³J(C,F)=290, 1C, F₃C-), 71.9, 40.4; HR-ESI-MS: calcd for [C₄H₁₀N₄O₃+H]⁺ 163.0831, found 163.0881.

tert-butyl (R)-(2-((1-hydrazinyl-1-oxo-5-(3-((2,2,4,6,7-pentamethyl-2,3-dihydrobenzofuran-5-yl)sulfonyl)guanidino)pentan-2-yl)amino)-2-oxoethoxy)carbamate **43**. After 2-CTC resin

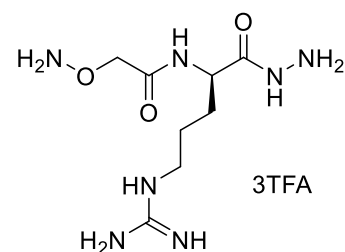


functionalization based on the general procedure for the preparation of the Fmoc-hydrazine resin. Then, the Fmoc-Gly-OH was coupled to the resin according to the general procedure for the hydrazide peptide coupling. The functionalized resin was then suspended in a solution of

DIEA (111 μL , 0.64 mmol) in CH_2Cl_2 (1.5 mL) and a solution of **41** (92.2 mg, 0.32 mmol) in CH_2Cl_2 (1.5 mL) was added. After overnight stirring at room temperature, the resin was filtered and TNBS test was performed to give a complete functionalization of the amine group of the arginine. The resin was filtered and washed with DMSO (3x), CH_2Cl_2 (2x), isopropanol (1x), CH_2Cl_2 (2x) and Et_2O (3x) before drying *in vacuo*. The resin was cleaved under mild conditions according to the general procedure described above. The protected amino acid was purified by semi-preparative HPLC 1 in H_2O /acetonitrile 0.1%TFA gradient (5% \rightarrow 50% \rightarrow 100% acetonitrile 0.1% TFA (45 min/10 min)) to give, after freeze drying, **43** as a white solid (20.3 mg, 17%). LC-MS 2 t_R : 3.35 min (Method J); ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 4.51 (m, 1H, NH-CH), 4.30 (m, 2H, NH-O-CH₂), 3.26-3.12 (m, 1H, CH₂-NH), 3.00 (s, 2H, C_{ar}-CH₂-C(CH₃)₂), 2.58 (s, 3H, C_{ar}-CH₃), 2.52 (s, 3H, C_{ar}-CH₃), 2.08 (s, 3H,

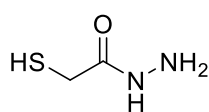
$C_{ar}-CH_3$), 1.89-1.86 (m, 1H, CH-CH-H), 1.80-1.77 (m, 1H, CH-CH-H), 1.61-1.60 (m, 2H, CH_2-CH_2-NH), 1.46 (s, 15H, $C(CH_3)_3$, $2(C(CH_3)_2)$); ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD) δ 171.9, 160.0, 139.5, 133.6, 126.1, 118.5, 87.7, 83.3, 76.4, 44.0, 29.9, 28.7, 28.5, 19.6, 18.4, 12.5; HR-ESI-MS: calcd for $[C_{26}H_{43}N_7O_8S+H]^+$ 614.2972, found 614.2975.

(R)-2-(aminooxy)-N-(5-guanidino-1-hydrazinyl-1-oxopentan-2-yl)acetamide **44**. **43** (16.2 mg, 22.3 μ mol) was suspended in a solution of deprotection according to the general procedure for cleavage under harsh conditions. **44** was obtained as a white solid (21 mg, Quantitative yield). 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.65 (s, 2H, O- CH_2), 4.45-4.41 (m, 1H, CH- CH_2), 3.19 (t, $^3J=6.8$, 2H, CH_2-NH), 1.93-1.75 (m, 2H, CH- CH_2-CH_2), 1.70-1.1.57 (m, 2H, CH- CH_2-CH_2); $[\alpha]_D^{20}$: -1.61 (H_2O , $c=1,0$); HR-ESI-MS: calcd for $[C_8H_{19}N_7O_3+H]^+$ 262.1628, found 262.1626.

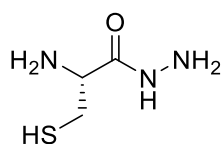


2. Thiol-hydrazide spacers

2-mercaptoacetohydrazide **45**. The procedure was inspired from the literature.^[14] Hydrazine monohydrate (229.6 μ L, 4.71 mmol) was added to a solution of methyl thioglycolate (421.2 μ L, 4.71 mmol) in EtOH (9.4 mL) and the mixture was stirred at room temperature for one day. The mixture was then concentrated *in vacuo* to afford **45** as a yellow solid (498.8 mg, 100%). 1H NMR (400 MHz, d^6 -DMSO) δ 9.15 (s, 1H, SH), 4.17 (br s, 2H, CO-NH- NH_2), 3.40 (br s, 2H, CO-NH- NH_2), 3.03 (s, 2H, CH_2-SH); ^{13}C NMR (100 MHz, d^6 -DMSO) δ 169.1, 25.3.



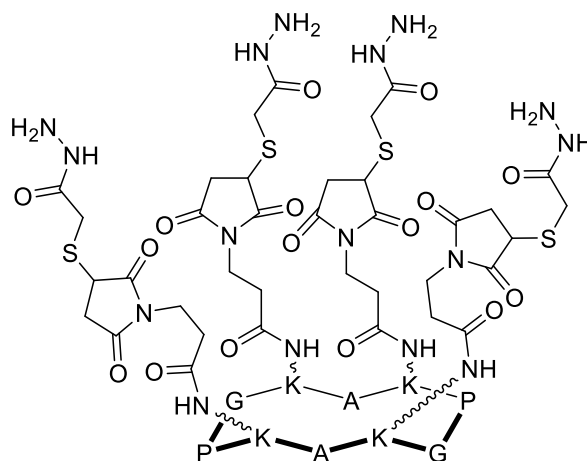
(R)-2-amino-3-mercaptopropanehydrazide **46**. The procedure was inspired from the literature.^[14] Hydrazine monohydrate (142.0 μ L, 2.91 mmol) was added to a solution of L-cysteine methyl ester hydrochloride (500 mg, 2.91 mmol) in EtOH (5.8 mL). Then, triethylamine (812 μ L, 5.83 mmol) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was then concentrated *in vacuo* to afford **46** as a yellow solid (540.0 mg, 79%). 1H NMR (400 MHz, d^6 -DMSO) δ 9.52 (br s, 1H, SH), 3.60 (t, $^3J=6.0$, 1H, CH- CH_2), 2.78 (d, $^3J=6.0$, 2H, CH- CH_2).



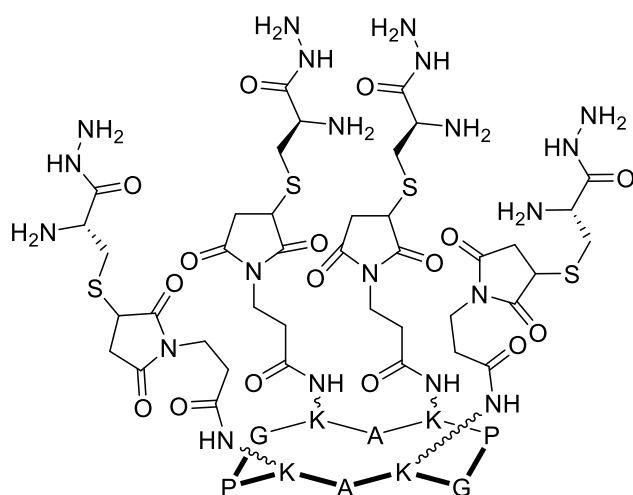
C. Cages

cRAFT(Mal-45)₄. 45 (3.5 mg, 33.2 μmol) was added to a solution of **cRAFT(Mal)₄** (472.5 μL of a solution at 13.5 mM in DMF/DMSO 66/33, 6.38 μmol) in a 100 mM phosphate buffer at pH 7.2 (1.28 mL) and the mixture was stirred for two days at room temperature. Then, the mixture was directly purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1%

TFA gradient ((0% → 15% → 30% → 100% acetonitrile, 0.1% TFA (10 min/50 min/10 min)) Flow: 20 mL/min) to obtain **cRAFT(Mal-45)₄** as a white solid (6.8 mg, 43%). HPLC 1 t_R: 2.46 min (Method D); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₉₀H₁₂₂N₂₆O₂₆S₄+K]⁺ 2029.79, found 2029.81.



cRAFT(Mal-46)₄. 46 (3.5 mg, 12.9 μmol) was added to a solution of **cRAFT(Mal)₄** (99.5 μL of a solution at 25 mM in DMF, 2.49 μmol) in a 100 mM phosphate buffer at pH 7.2 (398 μL) and



2129.90, found 2129.84.

the mixture was stirred for one day at room temperature. Then, the mixture was directly purified by semi-preparative HPLC 1 in H₂O/acetonitrile 0.1% TFA gradient ((0% → 10% → 20% → 100% acetonitrile, 0.1% TFA (10 min/40 min/10 min)) Flow: 20 mL/min) to obtain **cRAFT(Mal-46)₄** as a white solid (3.8 mg, 50%). HPLC 1 t_R: 16.17 min (Method C); MALDI-ToF (HCCA): calcd for [C₈₄H₁₃₄N₃₀O₂₆S₄+Na]⁺

VI. References

- [1] Solid-phase reaction monitoring—Chemical derivatization and off-bead analysis, C. Kay, O. E. Lorthioir, N. J. Parr, M. Congreve, S. C. McKeown, J. J. Scicinski, S. V. Ley, *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, *71*, 110-118.
- [2] Hepatocyte Targeting and Intracellular Copper Chelation by a Thiol-Containing Glycocyclopeptide, A. M. Pujol, M. Cuillel, O. Renaudet, C. Lebrun, P. Charbonnier, D. Cassio, C. Gateau, P. Dumy, E. Mintz, P. Delangle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 286-296.
- [3] Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2923-2925.
- [4] NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities, H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 7512-7515.
- [5] a) Preparation and application of O-amino-serine, Ams, a new building block in chemoselective ligation chemistry, J. C. Spetzler, T. Hoeg-Jensen, *J. Pept. Sci.*, **1999**, *5*, 582-592; b) 1-Ethoxyethylidene, a New Group for the Stepwise SPPS of Aminoxyacetic Acid Containing Peptides, S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturny, P. Dumy, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 983-991.
- [6] Chemoselectively Template-Assembled Glycoconjugates as Mimics for Multivalent Presentation of Carbohydrates, O. Renaudet, P. Dumy, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 243-246.
- [7] Tetravalent glycocyclopeptide with nanomolar affinity to wheat germ agglutinin, M. Fiore, N. Berthet, A. Marra, E. Gillon, P. Dumy, A. Dondoni, A. Imberty, O. Renaudet, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 7113-7122.
- [8] Maleimide Conjugates of Saxitoxin as Covalent Inhibitors of Voltage-Gated Sodium Channels, W. H. Parsons, J. Du Bois, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 10582-10585.
- [9] Large-Scale Synthesis of the Glucosylceramide Synthase Inhibitor N-[5-(Adamantan-1-yl-methoxy)-pentyl]-1-deoxynojirimycin, T. Wennekes, B. Lang, M. Leeman, G. A. v. d. Marel, E. Smits, M. Weber, J. v. Wiltenburg, M. Wolberg, J. M. F. G. Aerts, H. S. Overkleeft, *Org. Process Res. Dev.*, **2008**, *12*, 414-423.
- [10] a) S-[ω -(Aminoöxy)alkyl]isothiuronium Salts, ω, ω' -Bis(aminoöxy)alkanes and Related Compounds, L. Bauer, K. S. Suresh, *J. Org. Chem.*, **1963**, *28*, 1604-1608; b) ¹⁵N-D-labeled ionic probes for mass spectrometry, F. Ito, S. Ando, M. Iuchi, T. Ukari, M. Takasaki, K. Yamaguchi, *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 8009-8013.
- [11] Synthesis of L-canaline and γ -functional 2-aminobutyric acid derivatives, A. J. Ozinskas, G. A. Rosenthal, *J. Org. Chem.*, **1986**, *51*, 5047-5050.
- [12] a) Triphenylbutanamines: Kinesin Spindle Protein Inhibitors with in Vivo Antitumor Activity, F. Wang, J. A. D. Good, O. Rath, H. Y. K. Kaan, O. B. Sutcliffe, S. P. Mackay, F. Kozielski, *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, 1511-1525; b) Synthetic studies toward the development of novel minoxidil analogs and conjugates with polyamines, G. E. Magoulas, S. E. Bariamis, C. M. Athanassopoulos, D. Papaioannou, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 1989-1993.
- [13] Synthesis of photoaffinity probes of tautomycin, M. Kurono, A. Shimomura, M. Isobe, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 1773-1780.
- [14] a) Biodynamers: Self-Organization-Driven Formation of Doubly Dynamic Proteoids, A. K. H. Hirsch, E. Buhler, J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 4177-4183; b) Synthesis and pharmacological evaluation of thieno[2,3-b]pyridine derivatives as novel c-Src inhibitors, I. Pevet, C. Brulé, A. Tizot, A. Gohier, F. Cruzalegui, J. A. Boutin, S. Goldstein, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 2517-2528.

Conclusion

Ce travail d'ingénierie et d'auto-assemblage de systèmes biomoléculaires multivalents a permis de générer de nouvelles constructions destinées à la reconnaissance d'acides nucléiques, la vectorisation de siARN et à l'inhibition enzymatique.

- Des plate-formes fonctionnalisées, basées sur des châssis α -PNA, ont été préparées pour la reconnaissance d'oligonucléotides (Figure 1A).
- La génération de clusters d'iminosucres, par ligations sans métaux sur des plate-formes peptidiques, a abouti à la découverte de puissants inhibiteurs d' α -mannosidases (Figure 1B).
- Des clusters dynamiques ont été générés avec succès par une approche d'auto-assemblage *in situ* basée sur des ligations réversibles de type click, pour la complexation d'oligonucléotides. Le relargage des oligonucléotides en présence d'un stimulus chimique a même été observé. Par le biais d'un criblage de l'architecture et de la nature des ligands, des vecteurs de transfection ont été identifiés (Figure 1C).
- Enfin, ces ligations click, réversibles ou non, ont été engagées dans la construction de cages peptidiques avec la création de deux nouveaux systèmes (Figure 1D).

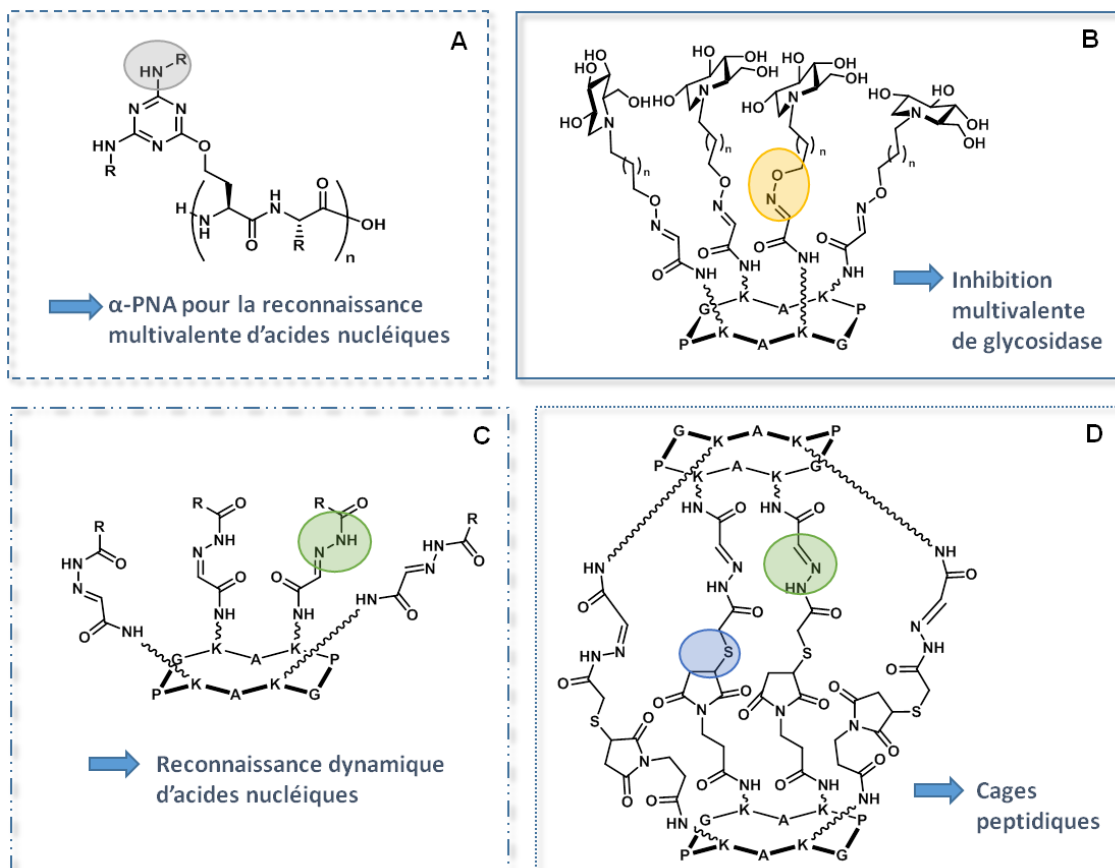


Figure 1. Résumé des travaux

Publications scientifiques.

Dynamic Expression of DNA Complexation with Self-assembled Biomolecular Clusters
Bartolami, Eline; Bessin, Yannick; Gervais, Virginie; Dumy, Pascal; Ulrich, Sébastien, *Angewandte Chemie International Edition*, **2015**, 54, 10183-10187.

Multivalent DNA recognition by self-assembled clusters: deciphering structural effects by fragments screening and evaluation as siRNA vectors

Bartolami, Eline; Bessin, Yannick; Bettache, Nadir; Gary-Bobo, Magali; Garcia, Marcel; Dumy, Pascal; Ulrich, Sebastien, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2015**, 13, 9427-9438.

Synthesis of α -PNA containing a functionalized triazine as nucleobase analogue

Bartolami, Eline;[‡] Gilles, Arnaud; [‡] Dumy, Pascal; Ulrich, Sébastien, *Tetrahedron Letters*, **2015**, 56, 2319-2323.

Emerging trends in enzyme inhibition by multivalent nanoconstructs

Kanfar, Nasreddine; Bartolami, Eline; Zelli, Renaud; Marra, Alberto; Winum, Jean-Yves; Ulrich, Sebastien; Dumy, Pascal, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2015**, 13, 9894-9906.

A metal-free synthetic approach to peptide-based iminosugar clusters as novel multivalent glycosidase inhibitors

Zelli, Renaud; [‡] Bartolami, Eline; [‡] Longevial, Jean-Francois; Bessin, Yannick; Dumy, Pascal; Marra, Alberto; Ulrich, Sébastien, **2015**, *Manuscrit soumis*.

‡: contribution identique co-premiers auteurs

Communications Orales.

Novembre 2014 : Journées Très Grand Sud Ouest, SCF, *Toulouse, France*

Novembre 2014 : Journées Ecole Doctorale ED459, *Montpellier, France*

Octobre 2014 : Self Assembly of Biomolecules, Balard Chemistry Conferences, *La Grande Motte, France*

Septembre 2014 : Ecole d'été Challenges in supramolecular chemistry, *Strasbourg, France*

Septembre 2014 et Juillet 2013 : Ecole d'été du LabEx CheMISyst, *France*

Décembre 2012 : Journée LabEx CheMISyst, *France*

Communications par posters.

Juin 2015 : Challenges in Chemical Biology, RSC, *Zurich, Switzerland*

Octobre 2014 : Self Assembly of Biomolecules, Balard Chemistry Conferences, *La Grande Motte, France*

Septembre 2014 : Ecole d'été Challenges in supramolecular chemistry, *Strasbourg, France*

Octobre 2012 : Journées Méditerranéennes Jeunes Chercheurs, SCF, *Montpellier, France*

Abréviations

A : L-Alanine

AA : Acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFM : Microscopie à Force Atomique

ARN : Acide ribonucléique

Bn : Benzyle

BnBr : Bromure de benzyle

Boc: *tert*-butoxycarbonyl

BOP : (Benzotriazol-1-yloxy)tris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphatebp : base pair (paire de base)

BuNA : Butyl Nucleic Acid

Cbz : Carboxybenzyl

Cbz-Cl : Chloroformate de benzyle

CDCl₃ : Chloroforme deutéré

CD₃OD : Methanol deutéré

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène

DCC : Dicyclohexyl carbodiimide

DCU : Dicyclohexylurée

DIEA : Diisopropyléthylamine

DHAP : 2,5-Dihydroxyacetophenone

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

d6-DMSO : Diméthylsulfoxyde deutéré

DPAP : 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone

EDC-HCl : N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

eq : équivalent

Et₂O : Diethyl ether

EtBr : Bromure d'éthidium

Fmoc : 9-fluorenylmethoxycarbonyl

G : Glycine

Gly : Glycine

GNA : Glycerol Nucleic Acid

HATU : 1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate

HBTU : *N,N,N',N'*-Tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate

HCCA : α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid

i-PrOH : Isopropanol

ICGM : Institut Charles Gerhart Montpellier

ITC : Isothermal Titration Calorimetry (Calorimétrie de Titration Isotherme)

K : *L*-Lysine

K_a : Constante d'association

kb : kilobase

MALDI-ToF :

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MeOH : Méthanol

MET : Microscopie Electronique à Transmission

*n*Bu : *n*-Butyl

NMP : *N*-méthyl-2-pyrrolidone

P : *L*-Proline

Pbf : 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

PDI : Indice de polydispersité

PNA : Peptide d'Acides Nucléiques

PyBOP : (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

R : *L*-Arginine

Résine 2CTC : Résine de chlorure de 2-chlorotrityl

TBDMS-Cl : *tert*-butyldiméthylsilane

TEAA : Triethylammonium acetate

TEM : Transmission Electronic Microscopy (Microscope Electronique à Transmission)

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

TIS : Triisopropylsilane

T_m : Température de demi-dénaturation

Abréviations

TNBS : Acide trinitrobenzènesulfonique

Trt : Trityl

V : Volt

Z : Cbz

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance au Pr. Pascal Dumy. Je le remercie de m'avoir accueilli au sein de son groupe pendant ces trois années de doctorat et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet. Toute ma gratitude revient également à Sébastien Ulrich qui m'a conseillé et aidé durant ces trois années pour aboutir à ces résultats. Merci pour les nombreux échanges qui m'ont beaucoup apportés. Chacun d'entre eux a su me guider tout en me laissant une part importante d'indépendance pour me permettre d'appréhender le monde de la recherche.

Je remercie le LabEX CheMISyst d'avoir financé ces travaux.

Je remercie également les membres du jury, les Drs Anne-Marie Caminade, Didier Boturyn et Sylvain Ladame d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit.

Je tiens à remercier les personnes qui ont accepté de relire ce manuscrit : Dr. Sébastien Ulrich, Julien Bergès, Dr. Yannick Bessin, Prof. Alberto Marra et ma maman. Merci pour vos commentaires et les questions que vous m'avez formulés ainsi que pour les discussions qui en ont découlé.

Un grand merci aux différents collaborateurs avec qui j'ai pu travailler de près ou d'un peu plus loin pour aboutir à ce projet. Mes premiers remerciements s'adressent au Dr. Yannick Bessin avec qui j'ai travaillé dans la bonne humeur durant ces trois années sur la synthèse des RAFT et qui a réalisé les études de complexation des systèmes sur gel d'agarose par électrophorèse. Je remercie également Renaud Zelli et le Prof. Alberto Marra pour notre collaboration sur le projet des clusters d'iminosucres. Merci au Dr. Arnaud Gilles pour la synthèse des α -PNA malgré parfois de petits désaccords. Je remercie également le Dr. Virginie Gervais de l'IPBS de Toulouse pour notre collaboration et son travail d'ITC qui a permis la publication de l'Angewandte. Merci aux Dr. Nadir Bettache et Dr. Magali Gary-Bobo de l'IBMM pour cette agréable collaboration qui nous a permis d'identifier des vecteurs de transfection. Merci pour votre accueil chaleureux à chacune de mes visites à la faculté de Pharmacie. Je tiens également à remercier sincèrement le Dr. Sonia Cantel pour les analyses MALDI-ToF et pour sa bonne humeur et son soutien permanent. Merci au Dr. Joseph Chamieh pour l'ensemble des travaux réalisés sur Taylor.

Je tiens à remercier le Dr. Gilles Valette et Guillaume Cazals du Laboratoire de Mesures Physiques qui ont réalisés l'ensemble des analyses MALDI-ToF et HR-ESI-MS permettant la caractérisation des produits générés au cours de ces trois années.

Remerciements

Je remercie également les membres du laboratoire sans qui cette thèse aurait été bien différente: Alberto, Sébastien, Yannick, Karine, Jean-Yves, Magalie, Renaud, Nanda, Simona, Nasser, Camille. Merci aux anciens avec qui nos chemins se sont croisés, Delphine, merci pour ton aide durant mes deux premières années de thèse et bonne chance pour la suite, Karime, Joanna, Laurène, Irene, Francesca... Merci également aux stagiaires dont leur travail a été d'une grande aide durant ces trois années: Jeff, Sarah, Charlotte, Benoit, Julien, Théo.

Je remercie tout particulièrement Sonia Cantel, Béatrice Roy ainsi que Valérie Rolland pour m'avoir permis de réaliser des enseignements de travaux pratiques et de travaux dirigés au cours des années 2013 à 2015. Ce fût une expérience très enrichissante et magique.

Toute cette histoire n'aurait pas vu le jour en l'absence de trois personnes qui ont été très présentes pour moi depuis la licence à Grenoble. Merci à Olivier Hamelin d'avoir été là au cours de mes années à l'UJF et merci pour ta patience à m'expliquer la chimie orga. Un grand merci à Olivier Renaudet qui a cru en moi et m'a offert l'opportunité de partir à l'ENSCR et vivre une belle expérience chez les bretons. En espérant que nos chemins se recroiseront prochainement. Comment ne pas remercier Philippe Breton. Mon stage chez Servier a confirmé mon envie de travailler dans la recherche. Merci de m'avoir soutenue dès ce premier jour de stage du mois de mars 2012 et d'être encore là aujourd'hui pour partager les bons moments et me soutenir lorsque je doute. Je te remercie de m'avoir ouvert les portes du laboratoire de Pascal pour réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui sont venues le 25 Novembre pour assister à ma soutenance, mes parents, Fity, mamie, Fabrice, Laurence, Sylvain, Arlette, Germain, Greg, Magali, Nadir, Béa, Annabelle, Mélanie, Sammy, Damien, Vincent, Julien, Nico, Rémi, Gégé et toute l'équipe GMR.

Merci Julien d'avoir eu la patience de me faire répéter la veille encore de la soutenance et merci pour tes conseils.

Un merci tout particulier à Vincent Blanchard et Julien Bergès pour ces soirées qui me permettaient de décompresser, à la kfet ou ailleurs. Merci de m'avoir fait découvrir et apprécier Montpellier malgré l'absence de mes sommets...

Je tiens à remercier mes parents d'avoir toujours été là pour moi, dans les bons moments comme dans les moments plus difficiles. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir encouragé à me surpasser.

Merci à Greg pour qui je le sais ces trois années ont été pleines de sacrifices. Merci d'avoir été si patient et présent au cours de cette thèse.

La Nature est une source d'inspiration inépuisable. Elle a su développer des méthodes complexes pour permettre l'évolution et aboutir aux systèmes vivants actuels par des processus d'auto-assemblage des constituants de la matière.

La question qui se pose alors porte sur les moyens utilisés par la Nature pour favoriser cet auto-assemblage et atteindre cette complexité. Comment ces constituants sont-ils capables de se reconnaître entre eux, de s'agréger ou encore de communiquer au sein du milieu aqueux?

L'une des approches que le monde du vivant utilise pour permettre une reconnaissance efficace et fiable, repose sur des interactions par le biais de multiples points d'accroche. Pour répondre à cette question, l'Homme tente aujourd'hui de reproduire de manière synthétique cette approche multivalente, mise en œuvre par la Nature pour permettre de mieux comprendre ces phénomènes de reconnaissance.

Ce projet de thèse repose sur le développement de nouvelles méthodologies par le biais de l'ingénierie et de l'auto-assemblage pour la génération de systèmes biomoléculaires multivalents appliqués à la reconnaissance d'oligonucléotides, la vectorisation de siARN et l'inhibition enzymatique.

Existe-t-il un réel effet de l'architecture et de la valence de ces systèmes sur la l'interaction avec la cible biologique? Et si oui, peut-on moduler cette reconnaissance? Peut-on contrôler et guider l'assemblage des éléments vers la génération sélective de certains systèmes dynamiques?

