



HAL
open science

Ligation de Staudinger traceless pour la post-fonctionnalisation d'ARN

Camelia Kitoun

► **To cite this version:**

Camelia Kitoun. Ligation de Staudinger traceless pour la post-fonctionnalisation d'ARN. Chimie organique. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP5009 . tel-03884396

HAL Id: tel-03884396

<https://theses.hal.science/tel-03884396v1>

Submitted on 5 Dec 2022

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

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

Université de Paris

École doctorale n°563 : Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques

(Équipe « Chimie des ARN, Nucléosides, Peptides et Hétérocycles » – CNRS UMR8601)

Ligation de Staudinger traceless pour la post-fonctionnalisation d'ARN

Par Camélia KITOUN

Thèse de Doctorat de Chimie Organique

Dirigée par le Pr Mélanie Ethève-Quelquejeu

Co-encadrée par le Dr Laura Iannazzo

Présentée et soutenue publiquement le 26 Mars 2021

Devant un jury composé de :

Dr Françoise Debart, Directrice de Recherche, Université de Montpellier	Rapporteur
Dr Alejandro Perez-Luna, Directeur de Recherche, Sorbonne Université	Rapporteur
Pr Thomas Lecourt, Professeur des Universités, Université de Rouen	Examineur
Pr Mélanie Ethève-Quelquejeu, Professeur des Universités, Université de Paris	Directrice de thèse
Dr Laura Iannazzo, Chargé de Recherche, Université de Paris	Membre invité

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie et Biologie Pharmacologiques et Toxicologiques (CNRS-UMR 8601) de la Faculté des Sciences Fondamentales et Biomédicales de l'Université de Paris dirigé par le Dr Laurent Micouin. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie l'école doctorale MTCl pour le financement de ces trois années de thèse.

Je tiens également à remercier les Drs Françoise Debart et Alejandro Perez-Luna d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je remercie le Pr Thomas Lecourt d'avoir accepté d'examiner ce travail et de participer à mon jury de thèse.

Mes remerciements vont aussi à nos collaborateurs. Dans le cadre de nos travaux sur l'étude d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane bactérien, je remercie les Drs Michel Arthur et Matthieu Fonvielle ainsi que Lauriane Rietmeyer du Centre de Recherche des Cordeliers. Je remercie également le Dr Pauline Poinot de l'Université de Poitiers et son équipe pour les analyses LC-MS qu'ils ont réalisé au cours de ma thèse.

Cette thèse a été effectuée sous la direction du Pr Mélanie Ethève-Quelquejeu et je la remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet. Merci pour ta compréhension et ton soutien.

Je tiens également à exprimer ma sincère gratitude au Dr Laura Iannazzo, un immense MERCI pour tout ! Sans toi la réalisation de cette thèse n'aurait été possible. C'est à toi qu'est revenue la tâche de m'encadrer durant ces trois années, ce que tu as fait à la perfection. Merci pour ta disponibilité, ton soutien, tes conseils et ton aide chaque jour de ces trois années de thèse, et plus particulièrement durant cette longue et difficile période qu'est la rédaction. Au-delà du côté professionnel, merci d'avoir été à l'écoute de mes plaintes, de mes moments d'énervement et d'avoir toujours une solution à tout. Je suis consciente et reconnaissante de la chance de t'avoir eu à mes côtés durant cette expérience particulière qui est la thèse. Tu resteras à jamais pour moi un exemple et une grande source d'inspiration de par ton parcours et ton implication (et ta rapidité à rédiger !).

Mes plus vifs remerciements vont à l'ensemble de l'équipe du Pr Mélanie Ethève-Quelquejeu. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr Emmanuelle Braud et aux étudiants de l'équipe :

Flavie, cela fait maintenant plus de trois ans que nous partageons le même bureau, tu as également participé au bon déroulement de cette thèse. Merci pour ta gentillesse, les pauses goûters, tous les petits gâteaux partagés et les pauses commérages. Merci d'avoir partagé les moments de joie mais également les moments de doutes que peut contenir une thèse, et d'avoir pris le temps de relire mon manuscrit. Je veux que tu saches que je serai présente durant tes derniers mois et même après, et que tu pourras compter sur moi-même si je quitte le laboratoire.

Dylan, je sais que mes petites remarques vont te manquer. Je suis sûre que tu auras bientôt ton triazole iodé, je resterai à l'affût de la super publi qui en découlera !

Dr Saidjalolov, merci d'avoir assuré la préparation de toutes les solutions du labo pour nous deux durant ces trois années de thèse, ton calme olympien et ta zen attitude face à toutes les situations me surprendront toujours. Je te souhaite le meilleur pour tes futures aventures.

Merci à Colette, Manon, Bo, Yusif, Du, Louna et Delphine.

Un grand merci à tout l'UMR 8601 pour ces trois années.

Enfin je remercie ma famille, mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes études, merci pour tous vos sacrifices et tout l'amour que vous m'apportez. Merci d'avoir toujours pris le temps de me conseiller, de m'écouter et de toujours trouver les bons mots dans les moments difficiles. Merci à mes sœurs Adelia et Cynthia, ma vie serait bien triste sans vos petites photos quotidiennes. Mes remerciements seraient incomplets sans un petit mot à Nassim, mon mari, qui a su me comprendre, me soutenir, faciliter mon quotidien et prendre soin de moi quand je n'avais pas le temps de le faire. Et non, je n'aime pas ma thèse et Laura plus que toi.

Table des matières

Liste des abréviations.....	p1
Chapitre I: Introduction.....	p5
A) Les ARN	p6
1) Définition.....	p6
2) Stratégies de synthèse des ARN	p8
i) Voie biochimique	p8
a) Transcription <i>in vitro</i> par des ARN polymérases.....	p8
b) Ligation enzymatique	p9
ii) Voie chimique : Synthèse d'ARN sur support solide.....	p9
B) Différentes approches pour la fonctionnalisation d'ARN.....	p11
1) L'approche pré-synthétique	p11
2) L'approche post-synthétique.....	p12
C) Des réactions de bioconjugaison appliquées à la modification d'ARN.....	p13
1) Réactions métallo-catalysées	p13
i) Cycloadditions azoture-alcyne catalysées par le cuivre (I).....	p14
ii) Couplage de Suzuki-Miyaura	p17
iii) Couplage de Stille	p18
2) Cycloadditions contraintes	p20
i) Les cycloadditions azoture-alcynes contraintes	p20
ii) Les cycloadditions à demande électronique inverse	p22
3) Réactions dissociatives.....	p25
4) Fonctionnalisation par des dérivés diazo	p28
5) Réactions photocatalysées	p29
6) Ligations chimiques	p30
i) Le couplage peptidique.....	p30
ii) La ligation chimique native.....	p31

ii) La ligation de Staudinger	p32
D) Objectif de la thèse	p34

Chapitre II: Ligation de Staudinger traceless pour la bioconjugaison de l'extrémité 3' terminale d'es ARN p37

A) Ligation de Staudinger traceless	p38
1) Généralités	p38
2) Application pour la fonctionnalisation de biomolécules.....	p39
3) Objectif	p43
B) Synthèse des précurseurs	p44
1) Synthèse de la 2'-azido-adénosine	p45
2) Synthèse du dinucléotide modèle	p47
3) Synthèse des phosphines.....	p48
C) Application de la LSt pour la fonctionnalisation d'un dinucléotide modèle	p50
1) Mise au point des conditions de LSt	p50
2) Mise en évidence de l'oxazaphospholane.....	p53
3) Mécanisme postulé de la LSt pour la fonctionnalisation de dinucléotide	p55
D) Exemplification.....	p58
E) Application de la LSt à la fonctionnalisation d'un ARN	p60
1) Synthèse du réactif de monophosphorylation	p60
2) Synthèse du dinucléotide pdCpA-N ₃	p61
3) Synthèse de l'ARN 2'-N ₃	p61
4) Application de la LSt à la post-fonctionnalisation d'ARN	p62
F) Conclusion	p63

Chapitre III: Ligation de Staudinger traceless pour la synthèse d'analogues d'aminoacyl-ARNt p65

A) Introduction.....	p66
1) Généralités	p66
2) Le peptidoglycane.....	p67

3) Les transférases Fem	p69
i) Schéma général.....	p69
ii) Transférases Fem chez <i>Weissella viridescens</i>	p69
iii) Transférases Fem chez <i>Staphylococcus aureus</i>	p72
4) Objectif	p74
B) Synthèse d'analogues 2'-amido-ARNt selon une approche pré-synthétique	p76
1) Synthèse des 2'-amido dinucléotides.....	p76
2) Accès aux analogues 2'-amido-ARNt par ligation enzymatique	p79
3) Évaluation biologique du Gly-ARNt 40	p80
C) Synthèse d'analogues d'ARNt stables selon une approche post-synthétique	p82
1) Généralités sur les phosphines acides aminés ou peptides	p82
2) Synthèse des phosphines acides aminés	p86
3) Synthèse des phosphines peptides.....	p88
4) Ligation de Staudinger traceless	p89
i) Évaluation de la réactivité des phosphines acides aminés comportant une fonction libre	p89
ii) Évaluation de la réactivité des phosphines acides aminés protégés	p91
iii) Etape de déprotection du groupement Boc après LSt	p95
D) Conclusion	p96

Chapitre VI: Étude de la réactivité de l'adénosine dans des réactions de Staudinger traceless et application à la synthèse d'analogues de bisubstrats pour l'étude de méthyltransférases d'ARN..... p98

A) Introduction.....	p99
B) Étude de la réactivité de la position 6 de l'adénosine par LSt.....	p99
1) Synthèse de la C6-azido adénosine	p99
2) Ligation de Staudinger traceless.....	p104
3) Conclusion.....	p108
C) Étude de la réactivité de la position 5' de l'adénosine par LSt.....	p109
1) Synthèse de la 5'-azido adénosine	p109

2) Fonctionnalisation de la position 5' de l'adénosine par LSt	p109
D) Synthèse d'analogues de bisubstrats pour l'étude de méthyltransférases d'ARN .	p110
1) Contexte biologique	p110
i) Les méthyltransférases d'ARN.....	p110
ii) Analogues de type bisubstrats	p111
ii) Bisubstrats synthétisés au laboratoire	p111
2) Application de la LSt à la synthèse de conjugué SAM-adénosine	p114
E) Conclusion	p117

Conclusion générale et perspectives	p119
--	-------------

Partie expérimentale	p126
-----------------------------------	-------------

Liste des abréviations

A			
A	Adénine	AMP	Adénosine monophosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique	Ala	Alanine
Ac	Acetyl	ATP	Adénosine triphosphate
ARN	Acide ribonucléique	ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert	ADHP	2-amino-4,6-dihydroxy-pyrimidine
B			
Boc	Butyloxycarbonyl	Bz	Benzoyle
BOP	Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-(diméthylamino)-phosphonium hexafluorophosphate	^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
BSA	Serum Albumine Bovine		
C			
C	Cytosine	Cbz	Benzyloxycarbonyle
CuAAC	Copper-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition	CI ₅₀	Concentration minimale inhibitrice à 50%
D			
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Da	Dalton
DIC	Diisopropylcarbodiimide	DTT	1,4-Dithiothreitol
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide	DMP	Periodinane de Dess-Martin
DCU	Dicyclohexylurea	DCM	Dichloromethane
DMF	Diméthylformamide	DABCO	Diazabicyclooctane
DMTr	Diméthoxytrityl	DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamine
DMAP	4-diméthylaminopyridine		
E			
Eq	Équivalent	ESI	ElectronSpray Ionisation
Et	Éthyle	EtOAc	Éthyle Acétate
EtOH	Éthanol	<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDCI	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide	EDTA	Acide tétraacétique éthylènediamine
F			
FemX _{wv}	Transférases Fem chez <i>Weissella viridescens</i>	Fmoc	Fluorenylméthoxyloxycarbonyl
G			
G	Guanine	GINac	<i>N</i> -acetylglucosamine

Gly	Glycine		
H			
HOBt	Hydroxybenzotriazole	HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	HRMS	High-Resolution Mass Spectroscopy
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)		
I			
<i>i</i> Pr	Isopropyle	IEDDA	Inverse-Electron Demand Diels-Alder
L			
LSt	Ligation de Staundinger traceless	LC/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital		
M			
M	Molar	MurNac	N-acétylmuramique
MeCN	Acétonitrile	min	Minutes
MS	Mass Spectroscopy	MW	Molecular Weight
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid		
N			
Nu	Nucléophile	NCL	Native Chemical Ligation
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
P			
Pyr	Pyridine	Phe	Phénylalanine
pKa	Constante d'acidité	Ph	Phényle
pKb	Constante de dissociabilité	PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
R			
RMN	Résonance magnétique nucléaire	RMTase	Méthyle transférases d'ARN
S			
Sat.	Saturated	SAM	S-Adénosyl-L-Méthionine
SPAAC	Strained-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition	SAH	S-Adénosyl-L-Homocystéine

SPS	Synthèse sur support solide	SN _{Ar}	Substitution nucleophile aromatique
siRNA	Small interfering RNA		
T			
T	Thymine	TBS	tertButyltriméthylsilyle
TCA	Acide trichloroacétique	Trt	Trityle
THF	Tétrahydrofurane	TCO	Trans-cyclooctene
Tol	Toluène	TMS	Triméthylsilyle
Tf	Triflate	TFA	Acide trifluoroacétique
THPTA	tris-hydroxypropyltriazolylmethylamine	TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
U			
U	Uracile	UDP	Uridine diphosphate
UV	Ultraviolet		
V			
Val	Valine		

CHAPITRE I

Introduction

A) Les acides ribonucléiques

1) Structure chimique des ARN

Les acides ribonucléiques (ARN) sont des macromolécules formées par une succession d'unités nucléotidiques. Chaque nucléotide est composé d'un sucre (ribose) relié par une liaison *N*-glycosidique à une base hétérocyclique de type purine (A, G) ou pyrimidine (T, U) (Figure 1 A et B). Ils sont reliés entre eux par des liaisons phosphodiester entre les positions 5' et 3' du ribose.

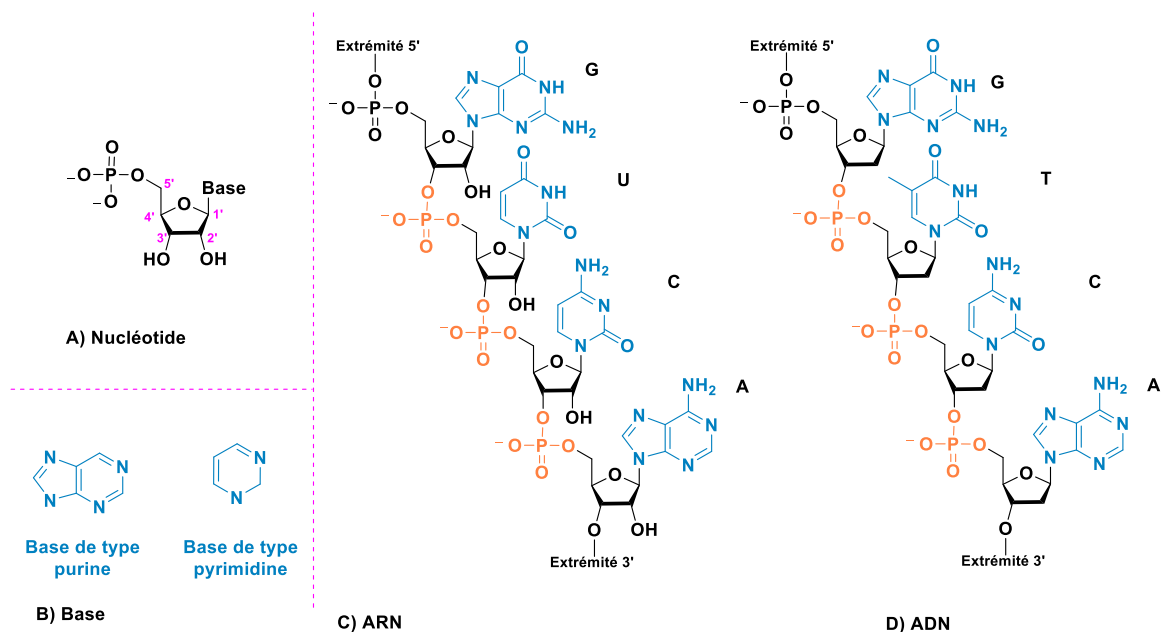


Figure 1 : A) Structure d'un nucléotide, B) Structure des bases nucléiques, C) Structure chimique de l'ARN, D) Structure chimique de l'ADN

Chimiquement très proches des ADN (acide désoxyribonucléique), les ARN se différencient en deux points (Figure 1 C et D) : 1) la structure de l'ARN comporte une nucléobase de type uracile alors que chez l'ADN il s'agit d'une thymine, 2) l'ARN est constitué de riboses contrairement à l'ADN qui est constitué de 2'-désoxyriboses. Du fait de la présence d'un groupement hydroxyle en position 2' du ribose, les ARN sont plus instables chimiquement. En milieu basique, l'attaque intramoléculaire de l'oxygène en position 2' sur l'atome de phosphore du lien phosphodiester peut entraîner son hydrolyse.

Les ARN se présentent généralement sous la forme d'un simple brin linéaire (structure primaire). Des appariements internes *via* des liaisons hydrogènes conduisent à des structures secondaires. On parle alors de structure en tige-boucle lorsque les interactions se forment aux extrémités de l'ARN et «d'épingles à cheveux» si elles ont lieu en interne. L'enchevêtrement

de ces structures simples conduit à des structures tridimensionnelles complexes composées d'une alternance de régions appariées et de simple brin (Figure 2).

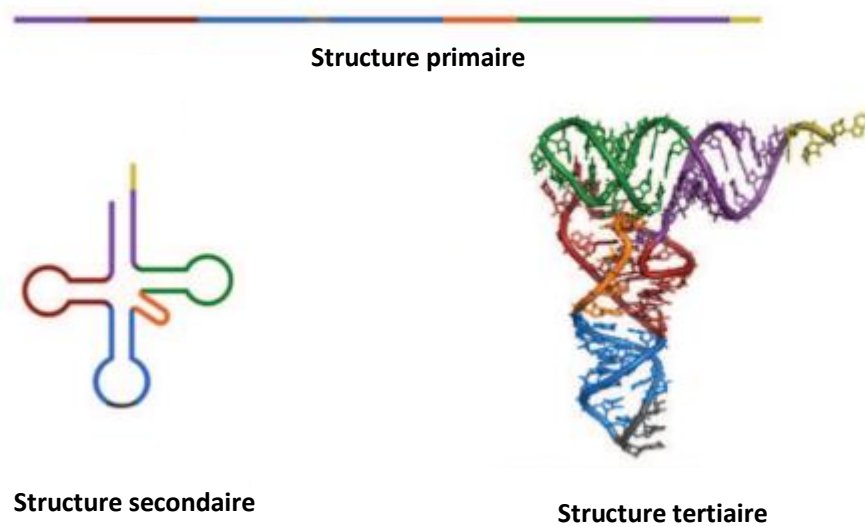


Figure 2 : Structures de l'ARNt <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/genetique-am-97/>

Les ARN interviennent dans différents processus biologiques au sein de la cellule. Chez les eucaryotes, leur principale fonction est la synthèse de protéines.¹ Au cours de ce processus, un brin d'ADN matrice est transcrit en ARN messagers (ARNm) par les enzymes ARN polymérase. Puis l'étape de traduction est assurée au niveau du ribosome en présence d'ARN de transfert (ARNt) chargé à son extrémité avec les acides aminés correspondants. Le ribosome, constitué d'ARN (ARNr) et de protéines, catalyse alors l'ajout de l'acide aminé correspondant au polypeptide en croissance, par formation d'un lien peptidique.² Au-delà de leur implication dans la synthèse protéique, les ARN sont également considérés comme des catalyseurs biologiques,³ et participent à la régulation de phénomènes épigénétiques.⁴ Chez les procaryotes, les ARNt interviennent dans la biosynthèse du peptidoglycane bactérien en tant que donneur d'acides aminés. Chez les virus tels que la Dengue, Ebola ou le SARS-CoV-2, l'ARN constitue le matériel génétique et code pour de nombreuses protéines qui permettent au virus de se protéger et de se reproduire (par réplication d'ARN).⁵ Enfin, des ARN appelés

¹ Meister, G. *ChemBioChem*, **2011**, 12, 2699-2700.

² Rodnina, M. V., Wintermeyer, W. *Curr Opin Struct Biol.* **2003**, 13,334-340.

³ Lilley, D. M. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **2011**, 366, 2910-2917.

⁴ Holoch, D., Moazed, D. *Nat. Rev. Genet.* **2015**, 16, 71-84.

⁵ Shannon, A., Selisko, B., Le, N., Huchting, J., Touret, F., Piorkowski, G., Fattorini, V., Ferron, F., Decroly, E., Meier, C., Coutard, B., Peersen, O., Canard, B. *Nat Commun.* **2020**, 11, 4682-4691.

ARN non codant (ncARN) ont plus récemment été découverts et il a été démontré qu'ils avaient un rôle primordial dans la régulation de nombreux processus biologiques.⁶

Afin d'étudier ces ARN et leur rôle dans différents mécanismes biologiques, mais aussi pour les utiliser en thérapie (ARN anti-sens par exemple), il est essentiel de pouvoir synthétiser et parfois modifier chimiquement ces biomolécules. La synthèse d'ARN repose sur 2 stratégies : 1) une voie biochimique faisant intervenir des enzymes tels que des ARN polymérases ou des ligases et 2) une voie chimique par synthèse sur support solide basée sur la chimie des phosphoramidites.

2) Stratégies de synthèse des ARN

i) Voie biochimique

a) Transcription *in vitro* par des ARN polymérases

Les ARN polymérases sont des protéines qui catalysent la transcription d'un ARN à partir d'un brin d'ADN complémentaire au brin à synthétiser (ADN matrice). La synthèse *in vitro* d'ARN repose sur l'utilisation d'un système bactériophage composé d'une polymérase et de sa séquence promotrice spécifique. La stratégie consiste à intégrer le brin d'ADN matrice en aval de la séquence promotrice.⁷ Après s'être fixé à cette dernière, la polymérase parcourt le brin matrice dans le sens 3'-5' en présence de ribonucléosides triphosphates et synthétise le brin d'ARN complémentaire dont la taille peut varier de 30 à 10⁴ nucléotides (Schéma 1).⁸

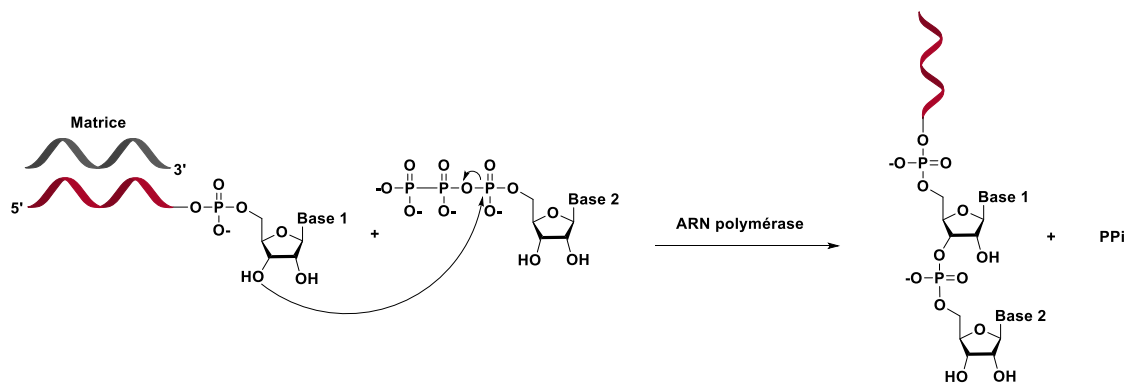


Schéma 1 : Synthèse d'ARN par l'ARN polymérase.

⁶ a) Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., Sementchenko, V., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Ganesh, M., Ghosh, S., Bell, I., Gerhard, D., Gingeras, T. R. *Science*, **2005**, 308, 1149-1154; b) The ENCODE Project Consortium, *Nature*, **2007**, 447, 799-816.

⁷ Krieg, P. A., Melton, D. A. *Methods In Enzymology*. **1987**, 155, 397-415.

⁸ Beckert, B., Masquida, B. *Methods in Molecular Biology*. **2010**, 703, 29-41.

b) Ligation enzymatique

Une seconde méthode biochimique repose sur l'utilisation de ligase. La T4RNA ligase par exemple catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre un oligonucléotide donneur phosphorylé en position 5' et un oligonucléotide accepteur possédant une extrémité 3'-OH (Schéma 2).⁹ Cette méthodologie convient particulièrement à l'hémisynthèse d'ARN dans laquelle de courts oligonucléotides phosphorylés en position 5' (minimum 2-nt) sont liés à des séquences d'ARN de tailles variables. Plusieurs ARN portant des modifications en position 2' ou 3' du ribose terminale ont été synthétisés par cette méthode au laboratoire.¹⁰

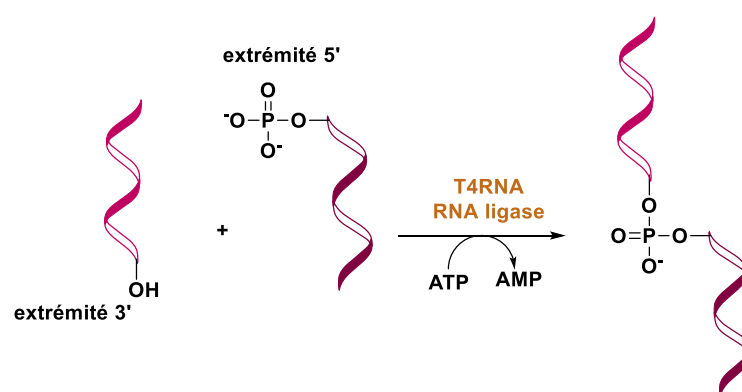


Schéma 2 : Synthèse d'ARN par LA T4RNA ligase

ii) Voie chimique : Synthèse d'ARN sur support solide (SPS)

La synthèse d'oligonucléotides sur support solide repose sur une méthode de couplage utilisant la chimie des phosphoramidites. Développée par Beaucage et Caruthers en 1981,¹¹ elle a d'abord été appliquée à la synthèse en solution de courts fragments d'oligonucléotides par formation d'une liaison 3'-5' phosphodiester entre un nucléoside 3'-phosphoramidite et un deuxième nucléoside 5' OH. Une optimisation des conditions initiales a permis d'adapter cette stratégie à la synthèse automatique sur support solide (SPS). Chaque cycle de synthèse comprend plusieurs étapes et permet l'ajout séquentiel de nucléoside de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' terminale avec d'excellents rendements (Schéma 3).¹² Les positions 5'-OH et 2'-OH des nucléosides mise en jeu lors de cette stratégie doivent être protégés, ainsi que les amines exocycliques des base nucléiques, A, G et C.

- 1- Une première étape consiste en la déprotection de l'hydroxyle en position 5' du premier nucléoside lié au support solide en présence d'une solution de TCA.

⁹ Englund, T., Uhlenbeck, O. *Nature*. **275**, 560-561.

¹⁰ Santarem, M., Fonvielle, M., Sakkas, N., Laisné, G., Chemama, M., Herbeuval, J., Braud, E., Arthur, M., Ethève-Quelquejeu, M. *Bioorg Med Chem*. **2014**, *24*, 3231-3233.

¹¹ Beaucage, S. L., Caruthers, M. H. *Tetrahedron*. **1981**, *22*, 1859-1862.

¹² Caruthers, M. H. *Acc Chem Res*. **1991**, *24*, 278-284.

- 2- Puis le nucléoside, comportant une fonction phosphoramidite est ajouté, après avoir été préalablement activé en présence d'un activateur (du tétrazole par exemple). L'attaque du groupement 5'-OH du premier nucléoside lié au support solide sur le nucléoside activé conduit à la formation d'un intermédiaire « phosphite triester ». Après cette étape de couplage, une étape de capping est nécessaire afin d'éviter que les nucléoside 5'-OH n'ayant pas réagi n'interviennent dans un couplage ultérieur. Pour cela, la position 5'-OH est acétylé en présence d'une solution d'anhydride acétique et de *N*-methylimidazole.
- 3- Une étape d'oxydation en présence d'une solution composée d'un mélange I_2/H_2O /pyridine permet la formation de la liaison phosphotriester.
- 4- La détritylation du groupement hydroxyle à l'extrémité 5'-terminale qui peut alors réagir avec le nucléoside phosphoramidite suivant.
- 5- Une dernière étape de décrochage du support et de déprotection permet d'accéder à l'oligonucléotide final.

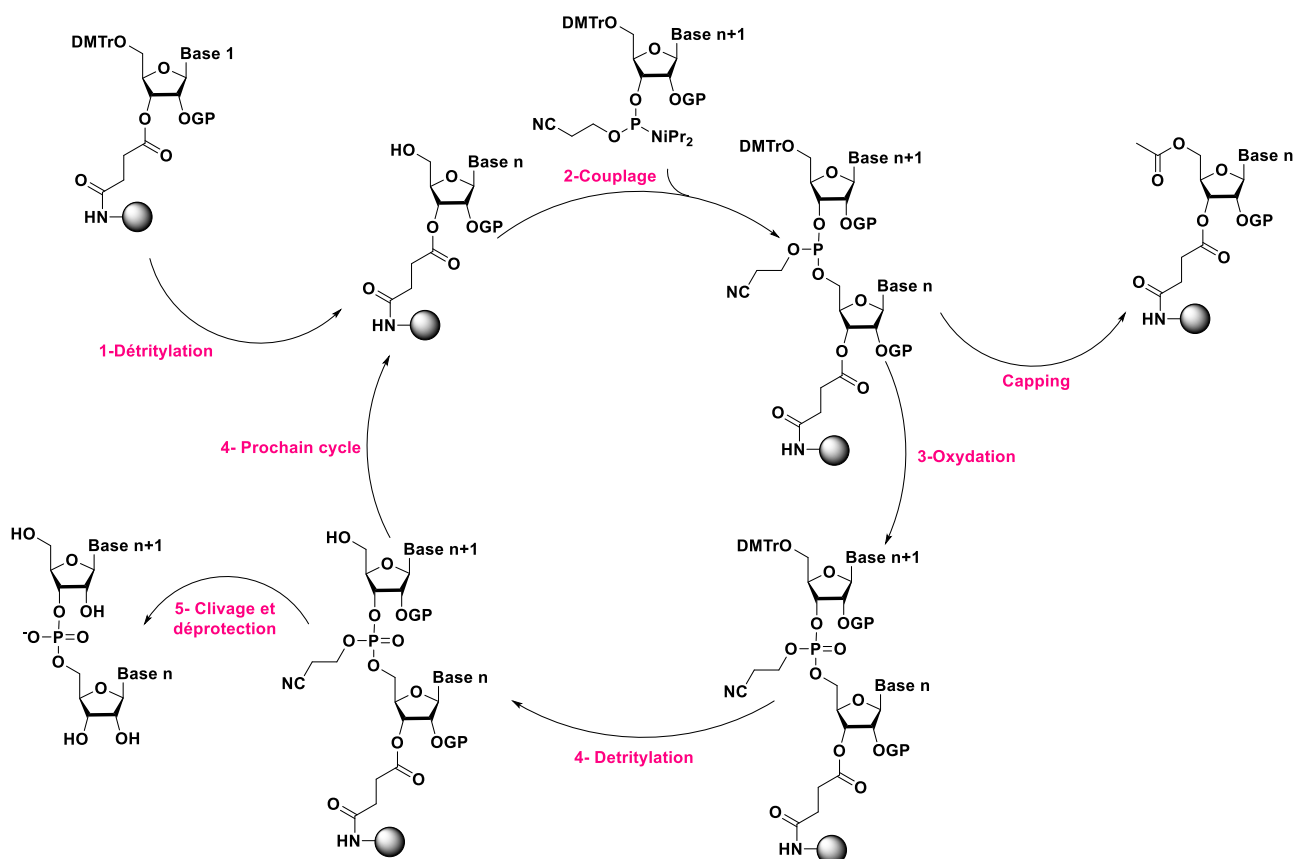


Schéma 3 : Synthèse d'ARN sur support solide

B) Différentes approches pour la fonctionnalisation d'ARN

Du fait du développement croissant de la biologie des ARN et de leurs récents intérêts thérapeutiques, avec notamment la découverte des ribozymes¹³ et des ARN interférents,¹⁴ des méthodes de modification chimique d'ARN ont été développées ces dernières années.^{15,16} L'introduction d'un groupement sur un ARN peut être réalisé selon deux approches dites pré- et post-synthétiques (Schéma 4).

1) L'approche pré-synthétique

Lors de cette approche, un groupement d'intérêt est introduit avant l'étape d'oligomérisation; cette étape pouvant s'effectuer par synthèse sur support solide ou par méthodes enzymatiques *via* des polymérases ou des ligases. Cette stratégie de pré-fonctionnalisation nécessite l'emploi d'une grande quantité de monomère fonctionnalisé et conduit souvent à une modification des conditions standards de couplage utilisées pour la synthèse sur support solide.¹⁷ De plus, l'incorporation de groupements encombrants s'accompagne souvent d'une diminution de l'efficacité des réactions de couplage. Concernant les méthodes d'oligomérisation enzymatiques, la spécificité des enzymes peut être affectée par la présence d'une sonde. Dans le cas des polymérases, les monomères comportant la sonde doivent être triphosphorylés ce qui peut s'avérer compliqué à synthétiser. Dans le cas des ligases, il est nécessaire de passer par la synthèse de dinucléotides.

¹³ Yu, M., Ojwang, J., Yamada, O., Hampel, A., Rapaport, J., Looney, D., Wong-Staal, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, *90*, 6340-6344.

¹⁴ a) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, G. C. *Nature.* **1998**, *391*, 806-811; b) Tuschl, T. *ChemBioChem.* **2001**, *2*, 239-245.

¹⁵ Edwards, T. E., Sigurdsson, S. T. *Modified RNAs as Tools in RNA Biochemistry, in Handbook of RNA Biochemistry: Second, Completely Revised and Enlarged Edition.* **2014**, 112-129, (eds R. K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön and E. Westhof).

¹⁶ Arthur, M. and Etheve-Quellejeu, M. (2015) Covalent Organic Functionalization of Nucleic Acids, in Chemistry of Organo-Hybrids: Synthesis and Characterization of Functional Nano-Objects (eds B. Charleux, C. Copéret and E. Lacôte), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

¹⁷ Malakhov, A. D., Malakhova, E. V., Kuznitsova, S. V., Grechichnikova, I. V., Prokhorenko, I. A., Skorobogatyi, M. V., Korshun, V. A., Berlin, Y. A. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2000**, *26*, 34-44.

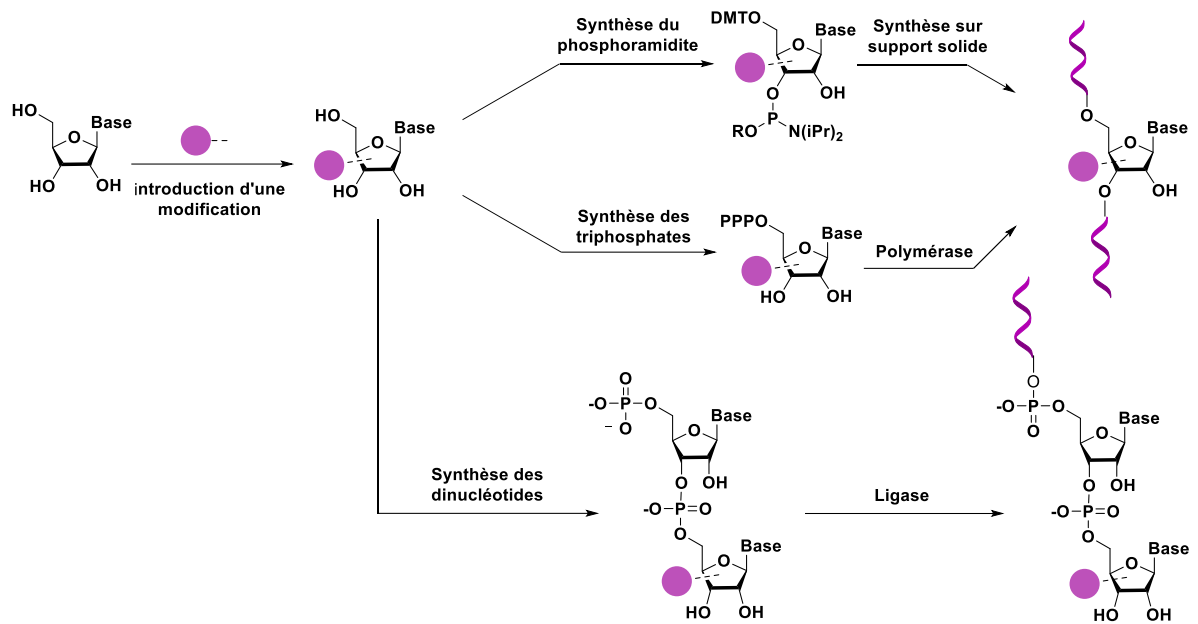


Schéma 4 : Fonctionnalisation d'ARN selon une approche pré-synthétique

2) L'approche post-synthétique

L'approche post-synthétique permet d'introduire un groupement d'intérêt après formation de l'ARN. Dans ce cas, une fonction chimique est introduite préalablement sur un monomère nucléosidique. Il s'agit souvent d'un simple hétéroatome, d'une amine primaire, d'un thiol, ou d'un groupement azoture. Une fois l'oligomère formé (par SPS, par action de polymérase ou par ligation enzymatique), la sonde est introduite sur l'ARN par une méthode de fonctionnalisation efficace et compatible avec la nature et la structure de l'acide nucléique via la réactivité spécifique de cette nouvelle fonction chimique. La méthodologie de synthèse choisie doit être chimiosélective vis-à-vis des fonctions présentes de façon naturelle sur l'ARN et compatible avec un milieu aqueux et une gamme de pH relativement restreinte (Schéma 5).

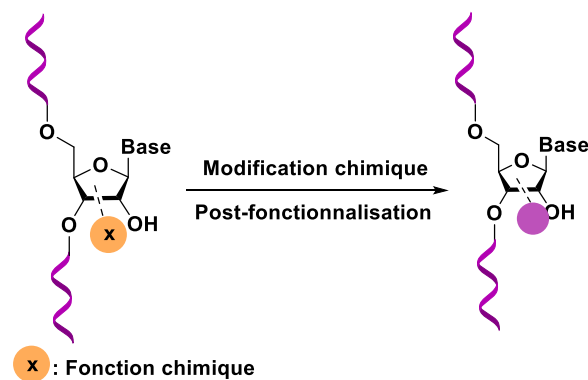


Schéma 5 : Fonctionnalisation d'ARN selon une approche post-synthétique

Dans le cadre de ces travaux de thèse nous nous intéressons au développement de nouvelles méthodes de post-fonctionnalisation d'ARN. Bien que beaucoup de travaux se réfèrent à la post-fonctionnalisation d'ADN, peu d'exemples ont été appliqués à l'ARN.

C) Les réactions de bioconjugaison appliquées à la modification d'ARN

Comme nous l'avons vu précédemment, le nombre croissant d'ARN non codants nouvellement découverts et l'implication de ces ARN dans le domaine de l'épigénétique, augmentent la nécessité d'explorer et de comprendre leurs rôles spécifiques dans les cellules. Ces dernières années, des approches chimiques avancées ont émergé pour aborder les questions liées à la biologie des ARN. Ces avancées comprennent de nouveaux outils de synthèse et de marquage d'ARN en phase solide.¹⁸ De nombreuses fonctionnalisations d'ARN ont tout d'abord été basées sur des méthodes impliquant la formation de lien covalent *via* des fonctions amines, thiols ou acide carboxyliques¹⁹ dont je ne parlerai pas dans cette partie bibliographique. Je me focaliserai sur des méthodes mettant en jeu des réactions de bioconjugaison, pour la plupart, bioorthogonales, permettant de modifier spécifiquement différents sites d'un ARN.²⁰ Nous verrons dans un premier temps les réactions métallo-catalysées et les réactions de cycloadditions contraintes. J'aborderai aussi les réactions dissociatives, la fonctionnalisation par des dérivés diazo, les réactions photocatalysées et je finirai par un paragraphe spécifique présentant les méthodes de modifications des ARN, par l'introduction de liens amides.

1) Réactions métallo-catalysées

Les réactions métallo-catalysées ont trouvé une application évidente pour la modification des biomolécules du fait des conditions douces dans lesquels elles peuvent être effectuées. Pour leur application dans la modification d'ARN, il a notamment fallu mettre au point des catalyseurs solubles en milieu aqueux (pour les réactions de types Suzuki-Miyaura ou de Stille), ou trouver des additifs pour éviter la dégradation des ARN par les métaux (dans le cas par exemple de la cycloaddition de Huisgen-Sharpless). Comme nous l'avons dit précédemment, pour chacune de ces réactions, l'introduction d'un groupement chimique orthogonal est nécessaire. Une fonction azido, pour effectuer les réactions de cycloaddition de Huisgen-Sharpless ou une base nucléique halogénée pour les réactions de couplage

¹⁸ Caruthers, M. H. *Biochem Soc Trans.* **2011**, *39*, 572-580.

¹⁹ Arthur, M. and Etheve-Quellejeu, M. (2015) Covalent Organic Functionalization of Nucleic Acids, in *Chemistry of Organo-Hybrids: Synthesis and Characterization of Functional Nano-Objects* (eds B. Charleux, C. Copéret and E. Lacôte), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.

²⁰ Klöcker, N., Weissenboeck, F. P., Rentmeister, A. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 8749-8773.

catalysée au Pd. Ces modifications peuvent se situer sur ribose, sur la base nucléique ou sur la liaison phosphodiester, mais également en position 3' terminale, 5'-terminale ou en position interne de l'oligonucléotide. Ces réactions permettent d'introduire des liens spécifiques entre l'oligonucléotide et la sonde, *via* différentes fonctions (triazole, liaison Carbone-Carbone...). Je décrirai ici, de façon non-exhaustive des exemples de ces réactions utilisées pour modifier spécifiquement les ARN.

i) Cycloadditions azoture-alcyne catalysées par le cuivre(I)

En 2002, les groupes de Sharpless²¹ et Meldal²² ont mis au point des conditions permettant la formation de triazoles 1-4 à partir d'azoture et d'alcyne en présence de Cu(I), on parlera alors de CuAAC (Schéma 6), et classifiée comme étant une réaction de type « Chimie click ».

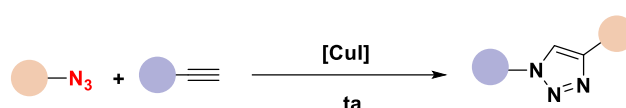


Schéma 6 : Réaction de cycloaddition de Huisgen-Sharples- Meldal,

Faisant intervenir deux fonctions orthogonales de petite taille qui peuvent être incorporées au sein de biomolécules sans altérer leur structure et leur fonction, la CuAAC a été appliquée à la bioconjugaison de nombreuses biomolécules.

Dès les années 2000, la CuAAC a été appliquée avec succès à la fonctionnalisation d'ADN.²³ La présence de cuivre comme catalyseur, était d'abord un problème car il provoque la dégradation de l'oligonucléotide. Ce problème a été résolu en utilisant un ligand stabilisant le Cu(I)²⁴ tel que la tris (benzyltriazolylméthyl) amine (TBTA) ou la tris [(1-hydroxypropyl-1H-1,2,3-triazol-4-yle) méthyl] amine (THPTA). Les premiers exemples de fonctionnalisation d'oligonucléotide par la CuAAC impliquaient des alcyne-oligonucléotides²⁵ car les fonctions alcynes sont compatibles avec les réactions impliquées dans la SPS, contrairement à l'azoture. En ce qui concerne l'utilisation de cette réaction sur des ARN, en 2011, l'équipe de Das, a montré qu'en présence de co-solvant tel que l'acétonitrile, il était possible d'accéder

²¹ Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

²² Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.

²³ a) El-Sagheer, A. F., Brown, T. *Chem Soc. Rev.* 2010, *39*, 1388-1405. b) Gramlich, P. M. E., Wirges, C. T., Manetto, A., Carell, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 8350-8358.

²⁴ a) Chan, T. R., Hilgraf, R., Sharpless, K. B., Fokin, V. V. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2853-2855. b) Besanceney-Webler, C., Jiang, H., Zheng, T. Q., Feng, L., del Amo, D. S., Wang, W., Klivansky, L. M., Marlow, F. L., Y. Liu, Y., Wu, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8051-8056.

²⁵ a) Jao, C. Y., Salic, A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **2008**, *105*, 15779-15784. b) Jayaprakash, K. N., Peng, C. G., Butler, D., Varghese, J. P., Maier, M. A., Rajeev, K. G., Manoharan, M. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5410-5413. c) Motorin, Y., Burhenne, J., Teimer, R., Koynov, K., Willnow, S., Weinhold, E., Helm, M. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1943-1952. d) Yamada, T., Peng, C. G., Matsuda, S., Addepalli, H., Jayaprakash, K. N., Alam, M. R., Mills, K., Maier, M. A., Charisse, K., Sekine, M., Manoharan, M., and Rajeev, K. G. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1198-1211.

aux produits de cycloaddition avec de bons rendements.²⁶ Cette méthodologie a été appliquée en 2012 par le groupe de Micura pour la fonctionnalisation d'un siRNA de 27 nucléotides. Il a ainsi introduit un motif fluorophore (F545) en position interne, à partir d'un azido-oligonucléotide, en présence de CuSO_4 et d'ascorbate de sodium dans un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ (Schéma 7).²⁷

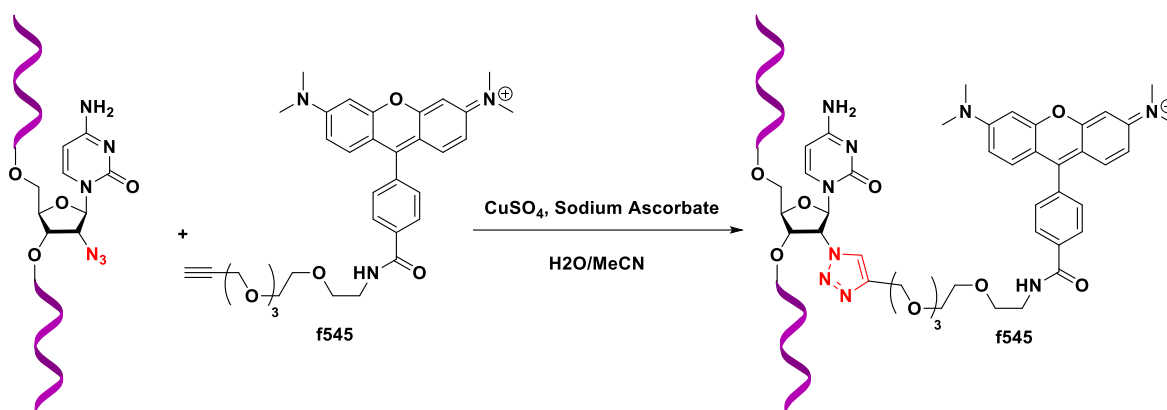


Schéma 7 : Fonctionnalisation de siRNA par la réaction de CuAAC

Dans cet exemple, il montre la possibilité d'introduction de la fonction azido dans le fragment d'ARN en position interne en combinant la chimie des phosphoramidites et du chlorophényl phosphate. En effet, la fonction azoture, n'étant pas compatible avec la fonction phosphoramidite, en présence de laquelle elle peut être réduite en amine. La synthèse *via* la SPS doit être adaptée, une partie du brin d'ARN a tout d'abord été obtenue classiquement par la SPS, la synthèse est ensuite interrompue à l'étape de détritylation et un couplage manuel à un nucléoside 2'-azido 3'-O-chlorophényl phosphate en présence de mésitylénesulfonyl 3-nitro-1,2,4 triazole (MSNT) est effectué. Après une étape de « *capping* » l'élongation du brin est poursuivie par SPS (Schéma 8).

²⁶ Paredes, E., Das, S. R. *ChemBioChem*. **2011**, *12*, 125-131.

²⁷ Fauster, K., Hartl, M., Santner, T., Aigner, M., Kreutz, C., Bister, K., Ennifar, E., Micura, R. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 581-589.

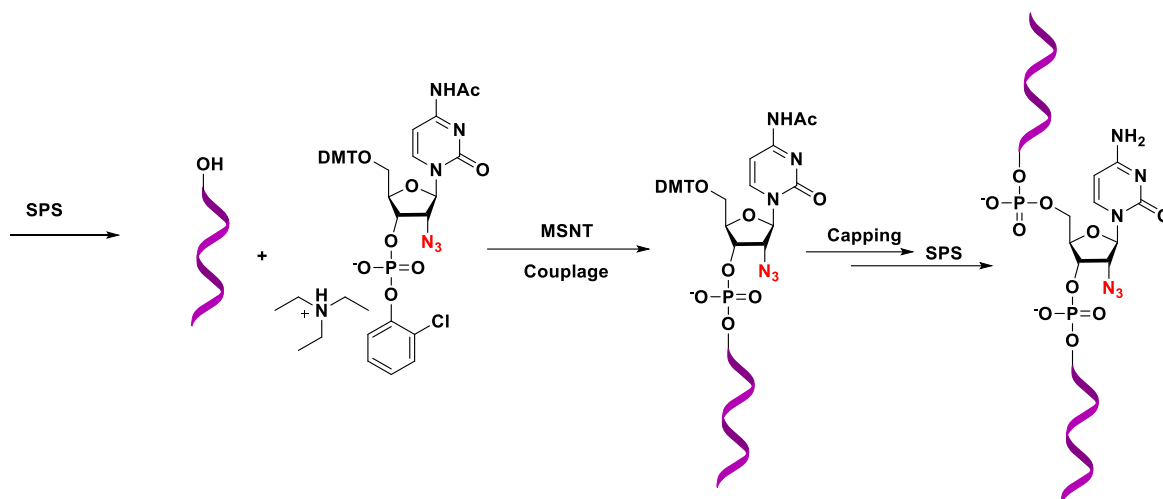


Schéma 8 : Synthèse de siRNA portant un azoture en position interne

Cet exemple montre que la modification 2'-azido d'un nucléotide en position interne permet le marquage d'un ARN de façon efficace et versatile.

Un autre exemple décrit en 2012, a été reporté par notre équipe, où la CuAAC est appliquée à la synthèse d'un conjugué peptidyl-ARN pour l'étude structurale d'enzymes de type transférases.²⁸ Pour cela, un ARN-2'-N₃ de 24-nucléotides a été mis en présence d'un précurseur peptidique comportant un motif alcyne. La cycloaddition est alors réalisée dans l'eau en présence de CuSO₄ et d'ascorbate de sodium. L'ajout du ligand THPTA permet ici d'assurer la stabilité du cuivre (I) et d'éviter la dégradation de l'ARN au cours de la réaction (Schéma 9). L'azoture a été introduit *via* la synthèse d'un 2'-azido dinucléotide phosphorylé en position 5' qui a lui-même été engagé dans une ligation enzymatique catalysée par la T4RNA ligase avec une micro hélice d'ARN de 22-nt.

²⁸ Fonvielle, M., Mellal, D., Patin, D., Lecerf, M., Blanot, D., Bouhss, A., Santarem, M., Mengin-Lecreux, D., Sollogoub, M., Arthur, M., Ethève-Quellejeu, M. *Chem. Eur. J.* **2012**, *4*, 1357-1363.

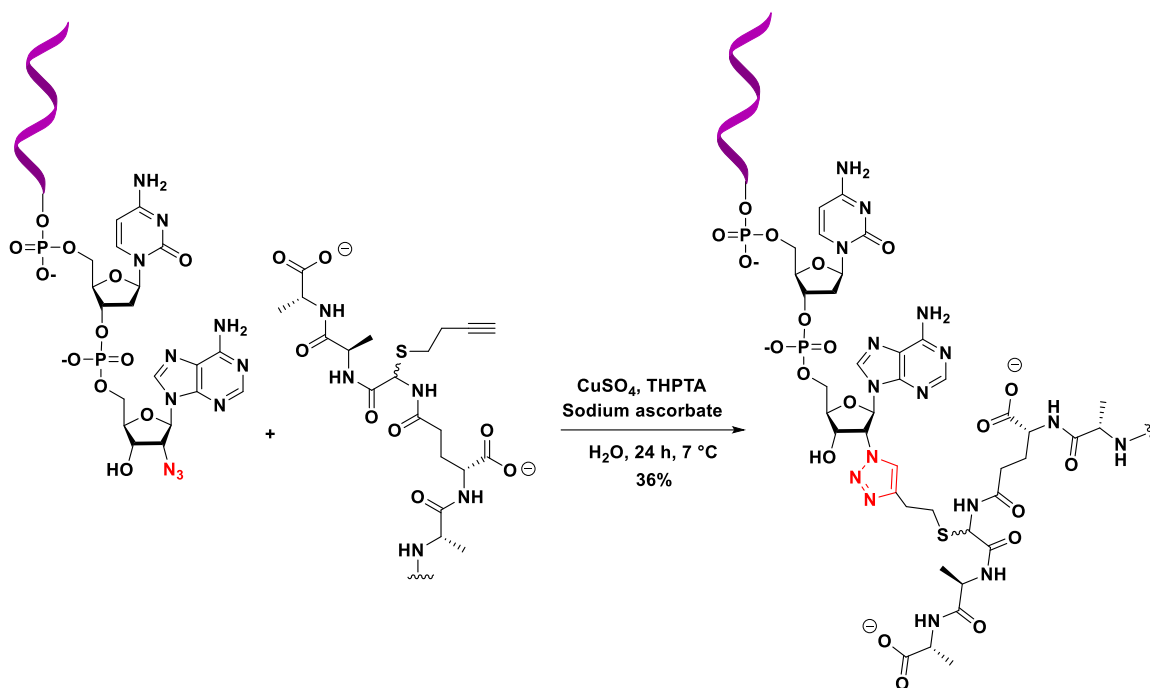


Schéma 9 : Application de la CuAAC pour la synthèse d'un conjugué peptidyl-ARN

Depuis, de nombreux exemples ont montré l'utilité de cette réaction de CuAAC pour modifier des ARN, elle est efficace et biocompatible et a permis aussi d'effectuer des modifications chimiques d'ARN dans un environnement cellulaire²⁹ On peut mentionner aussi, le fait que des marquages chimiques post-transcriptionnels sont développés actuellement pour introduire les groupements alcyne ou azido et permettre la fonctionnalisation de très longs ARN par la CuAAC.³⁰

ii) Couplage de Suzuki-Miyaura

Le couplage de Suzuki-Miyaura est une réaction pallado-catalysée permettant la création d'une liaison carbone-carbone à partir d'un dérivé halogéné et d'un acide boronique (Schéma 10).

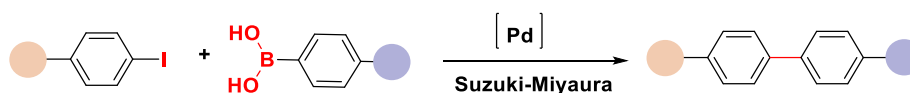


Schéma 10 : Couplage de Suzuki-Miyaura

²⁹ Ganz, D., Harijan, D., Wagenknecht, H.-A., *RSC Chem. Biol.* **2020**, 1, 86-97.

³⁰ a) George, T. J., Srivatsan, S. *Methods.* **2017**, 102, 28-38. b) Anhäuser, A., Rentmeister, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, 48, 69-76.

Initialement décrit en 2009 par le groupe de Davis pour la fonctionnalisation d'ADN,³¹ le couplage de Suzuki-Miyaura a été récemment utilisé par le groupe de Srivastan pour la modification post-transcriptionnelle d'ARN.³² Le développement d'un système catalytique basé sur l'utilisation du ligand (DM)ADHP a permis de réaliser le couplage dans des conditions douces (37 °C, pH = 8.5) (Schéma 11). Dans ces conditions, différents motifs d'intérêts (biotine, fluorophore, dérivés hétérocycliques) ont été couplés à un ARN 10-nt avec des rendements compris entre 28% et 80%. Les ARN iodés substrats de la réaction ont été obtenus par incorporation de la 5'-iodo-uridine triphosphate *via* des polymérisations enzymatiques.

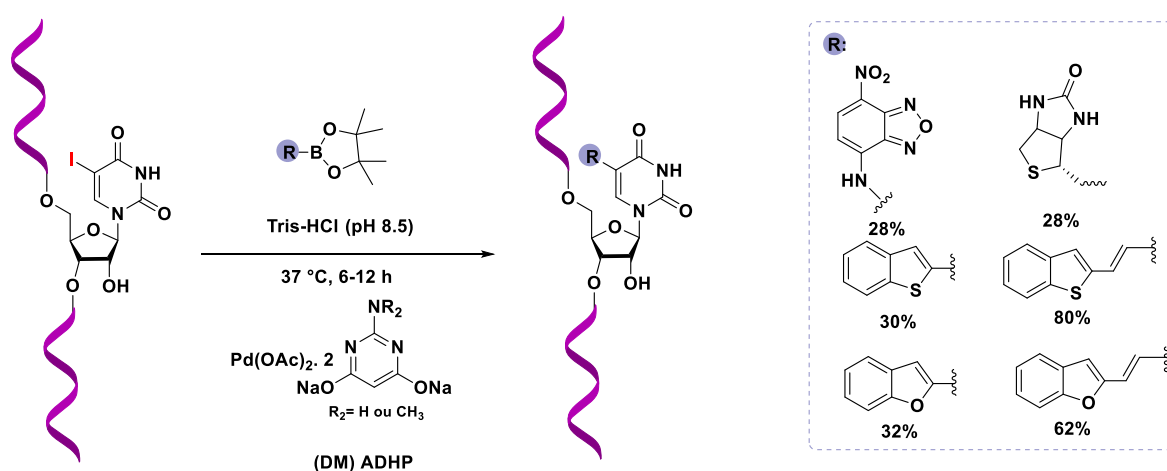


Schéma 11 : Couplage de Suzuki-Miyaura appliqué à la fonctionnalisation d'ARN

Cette méthode de marquage direct constitue un outil puissant pour la fonctionnalisation et l'étude des ARN, permettant la création de liaison carbone-carbone stable à partir de 5'-iodo-uridine facilement accessible.

iii) Couplage de Stille

Le couplage de Stille permet la formation de liaisons carbone-carbone par catalyse au palladium en présence de dérivés stannylés et de composés halogénés³³ (Schéma 12).

³¹ a) Chalker, J. M., Wood, C. S. C., Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346-1634. b) Lercher, L., McGouran, J. F., Kessler, B. M., Schofield, C. J., Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 10553-10558.

³² Walunj, M. B., Tanpure, A. A., Srivastan, S. G. *Nucleic Acids Research.* **2018**, *11*, e65.

³³ Stille, J. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, *25*, 508-524. b) Diederich, F., Stang, P. *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*; Wiley-VCH: Weinheim, **1998**. c) Farina, V. *The Stille reaction*; J. Wiley: New York, **1998**.



Schéma 12 : Couplage de Stille

Le groupe de Engels l'a appliqué à la post fonctionnalisation d'ARN sur support solide.³⁴ Le couplage de Stille a été réalisé sur des ARN iodés de tailles variables (5 à 12-nt) obtenus par SPS à partir de 2-iodo adénosine et de 5-iodo uridine. Avant l'étape de déprotection et de décrochage du support solide, ces derniers ont été mis en présence de différents dérivés stannylés et d'un système catalytique basé sur l'emploi de catalyseur tris (dibenzylidèneacétone) dipalladium (0) ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$) et d'une phosphine $\text{P}(\text{furyl})_3$ dans le DMF à 60 °C (Schéma 13).

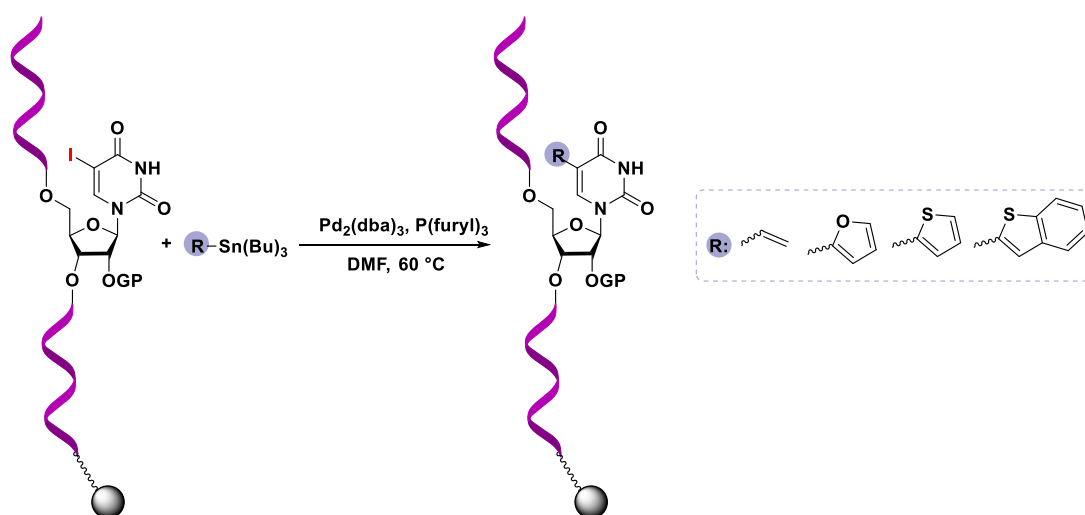


Schéma 13 : Couplage de Stille appliqué à la fonctionnalisation d'ARN

Nous avons vu à travers ces exemples que l'utilisation de métaux était compatible avec la nature des ARN. Cependant, dans certains cas (*in cellulo* ou *in vivo* par exemple), la présence de cuivre par exemple peut être problématique. L'utilisation de cycloaddition contrainte peut alors être une alternative intéressante.

³⁴ Wicke, L., Engels, J. W. *Bioconjugate Chem.* **2012**, 23, 627-642.

2) Cycloadditions contraintes

i) Les cycloadditions azoture/alcyne contraintes (SPAAC)

La cycloaddition contrainte de type SPAAC repose sur une réaction entre un azoture et un alcyne contraint dont la réactivité est accrue par la tension générée par le cycle (angle 158°, nature des substituants) et permet ainsi de s'affranchir de l'utilisation de cuivre (Schéma 14).

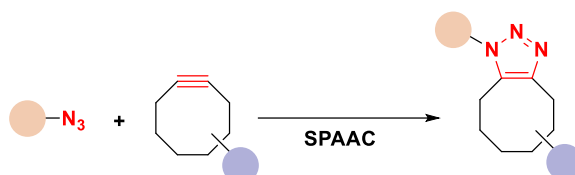


Schéma 14 : SPAAC

Son utilisation en bioconjugaison a été initiée par le groupe de Bertozzi,³⁵ pour le marquage sélectif de surfaces cellulaires.³⁶ En 2014, le groupe de Seitz a décrit la synthèse de conjugués peptide-oligonucléotide anti-sens par cette réaction de SPAAC, en créant un lien covalent entre le peptide portant l'alcyne contraint et un siRNA (14-nt) fonctionnalisé par un azoture.³⁷ Les rendements sont compris entre 68 et 84% selon la nature du peptide et du siRNA impliqués dans la réaction (Schéma 15).

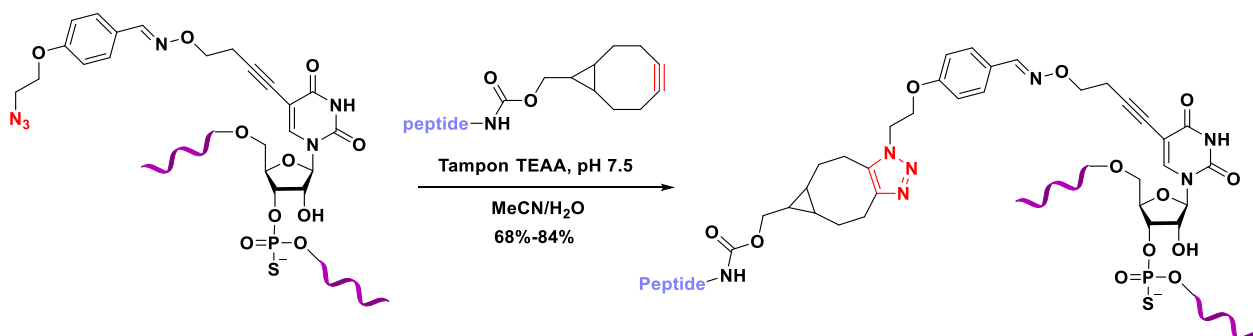


Schéma 15 : Synthèse de conjugués ARN-peptides par SPAAC

³⁵ Agard, N. J., Prescher, J. A. Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046-15047.

³⁶ Jewett, J. C., Sletten, E. M., Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3688-3690.

³⁷ a) Abendroth, F., Seitz, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10504-10509. b) Di Pisa, M., Seitz, O. *ChemMedChem.* **2017**, 12, 872-882.

Le groupe de Wang s'est intéressé en 2015 au marquage spécifique d'ARNt par la réaction de SPAAC.³⁸ Leur méthodologie repose sur l'intervention d'une synthétase afin d'introduire des analogues modifiés d'agmatine portant une fonction azoture sur une cytidine (en position C34) de l'ARN. Ces azido-ARNt de 76-nt ont ensuite été incubés en présence d'un fluorophore (BCN-FITC) dans un tampon Tris (pH 7.4), à 37 °C pendant 30 min. Le produit de cycloaddition a pu être mis en évidence par analyse de gels de fluorescence (Schéma 16).

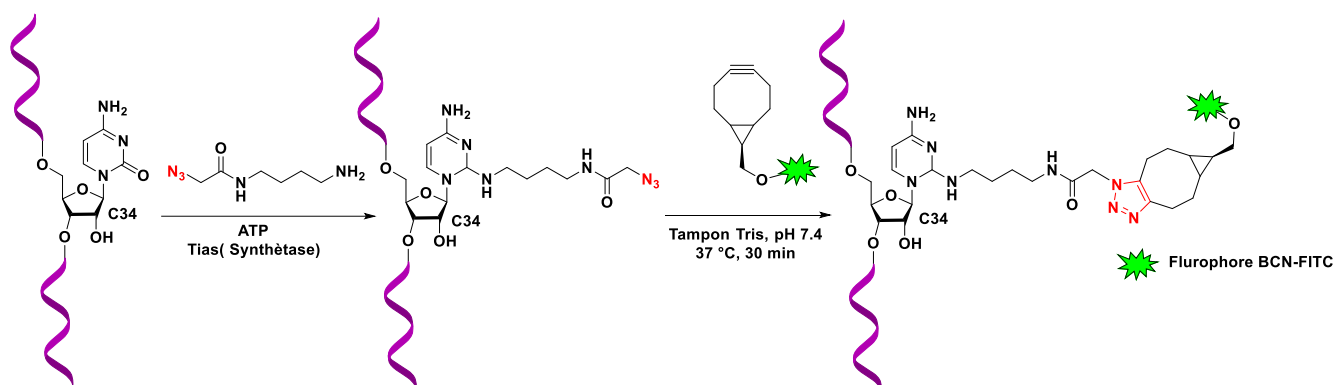


Schéma 16 : Accès à des ARN fluorescents par SPAAC

Le développement de cyclooctynes plus stables et présentant une meilleure solubilité en milieu physiologique a permis l'utilisation de la SPAAC *in vivo*.

En 2016, le groupe de Srivatsan a réalisé le marquage d'ARN cellulaire après une mise au point des conditions de la cycloaddition *in vitro*.³⁹ Pour cela, les azido-ARN ont été obtenus par polymérisation enzymatique en présence d'azido-uridine triphosphate puis mis en présence de cyclooctynes substituées par des groupements biotinylé ou fluorescent à 37 °C pendant 1 h. Les ARN modifiés ont été obtenus avec des rendements compris entre 56% et 83% en fonction de la position de l'azoture sur la séquence d'ARN (Schéma 17). Cette méthodologie a été ensuite appliquée au marquage de l'ARN cellulaire. L'incubation des cellules en présence d'azido-uridine triphosphate suivit d'un traitement avec un cyclooctyne substitué par un fluorophore a permis la visualisation de cellules fluorescentes. À travers cette étude, le groupe de Srivatsan a prouvé le potentiel de la réaction de SPAAC en bioconjugaison mais également en tant qu'outils d'imagerie et de marquage *in vivo*.

³⁸ Li, F., Dong, J., Hu, X., Li, W. G. J., Shen, J., Tian, H., Wang, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1-7.

³⁹ Sawant, A. A., Tanpure, A. A., Mukherjee, P. P., Athavale, S., Kelkar, A., Galande, S., Srivatsan, S. G. *Nucleic Acids Research.* **2016**, *44*, e16.

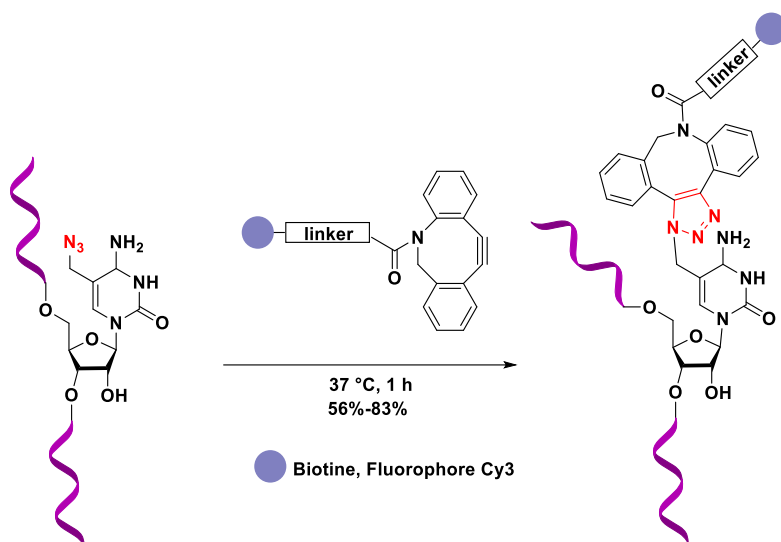


Schéma 17 : Marquage d'ARN par la réaction de SPAAC

ii) Les cycloadditions à demande électronique inverse entre des tétrazines et des alcènes tendus (IEDDA)

En 1959, le groupe de Lindsey a décrit pour la première fois une réaction de Diels-Alders à demande électronique inverse (IEDDA), en réalisant une cycloaddition [4+2] entre une tétrazine (jouant le rôle du diène pauvre en électrons) et un diénophile (riche en électrons).⁴⁰ Contrairement à une cycloaddition de Diels-Alder classique, la IEDDA fait intervenir la HOMO du diénophile qui réagit avec la LUMO du diène.⁴¹ Afin de contrôler la vitesse de la réaction, il est possible de fonctionnaliser la tétrazine par ajout de groupements électroattracteurs ce qui a pour conséquence d'abaisser la LUMO et ainsi de réduire l'écart énergétique avec l'orbitale HOMO du diénophile. Différents diénophiles ont été étudiés en IEDDA, ainsi les alcènes contraints de type trans-cyclooctène (TCO), norboréne ou encore les alcynes contraints tels que les cyclooctynes se révèlent être des partenaires de choix. Considérée comme la réaction de bioconjugaison la plus rapide avec une constante de vitesse de l'ordre de $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ elle a connu un véritable succès pour la fonctionnalisation de biomolécules (Schéma 18).

⁴⁰ Carboni, R. A., Lindsey R.V. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4342-4346.

⁴¹ Oliveira, B. L., Guo, Z., Bernardes, G. J. L. *Chem. Soc. Rev.* 2017, *46*, 4895-4950.

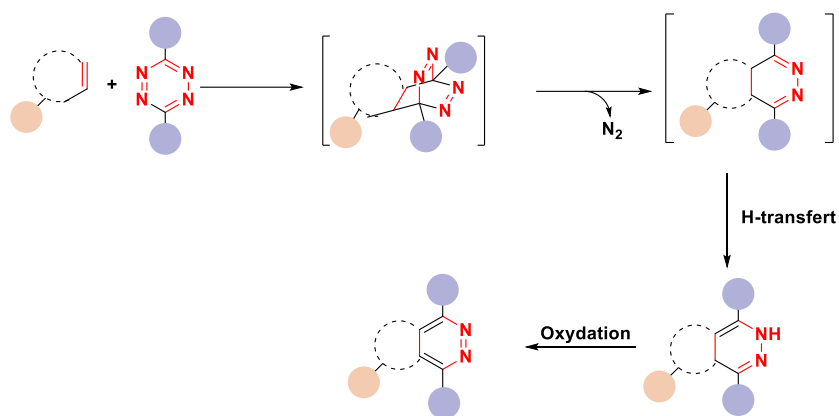


Schéma 18 : Mécanisme de la réaction de Diels-Alder à demande électronique inverse

En 2014, Royzen et son équipe se sont intéressés au marquage d'ARN par cette méthode d'IEDDA.⁴² Ces derniers ont décrit une approche générale pour le marquage de brins d'ARN en utilisant des précurseurs bio-orthogonaux : une cytidine sur laquelle un groupement TCO a été introduit en position 5 *via* un linker et une tétrazine fonctionnalisée par une fluorescéine. La cycloaddition entre ces ARN-TCO (33-nt) et une tétrazine liée à une fluorescéine a été réalisée dans un tampon ammonium acétate à 37 °C à l'abri de la lumière pendant 30 min (Schéma 19). L'analyse de la réaction par spectrométrie de masse a révélé la formation du produit de cycloaddition avec un taux de conversion de 60%. Ce taux de conversion peut s'expliquer par une isomérisation du TCO en *cis*-cyclooctène au cours de la purification par gel SDS-PAGE car ce dernier est chauffé à 90 °C en présence d'urée. L'accès à un ARN substitué par un motif TCO a été réalisé par incorporation d'une cytidine modifiée au sein de la séquence par polymérisation enzymatique. Dans ce cas, l'introduction du groupement TCO en position 5 d'une cytidine triphosphate ne perturbe pas la reconnaissance du nucléotide par l'ARN polymérase qui incorpore efficacement l'analogue à un brin d'ARN transcrit.

⁴² Asare-Okai, P. N., Agustin, E., Fabris, D., Royzen, M. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 7844-7847.

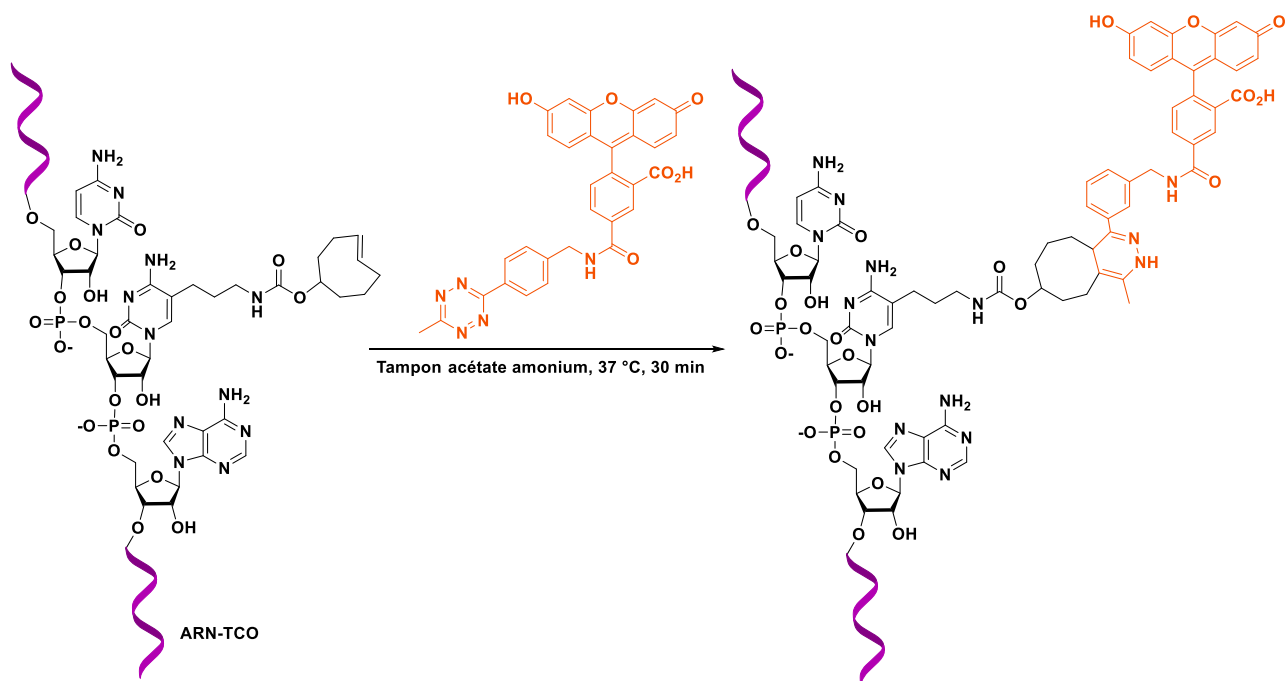


Schéma 19 : Marquage d'ARN par une fluorescéine via une réaction de IEDDA

L'emploi de cyclooctyne comme partenaire de cycloaddition a aussi été utilisé par le groupe de Jäschke pour accéder à des conjugués peptidyl-ARN.⁴³ Divers nucléosides diénophiles ont été incorporé par la T7 polymérase en position 5'-terminal de l'ARN (19-nt). Ces derniers ont par la suite réagi avec des peptides modifiés sur lesquels une tétrazine a été incorporée (Schéma 20). La réaction de cycloaddition a été réalisée dans un milieu aqueux dans des conditions stœchiométriques et les peptides-ARN purifiés par LC-MS ont été obtenu avec des taux de conversion quantitatifs.

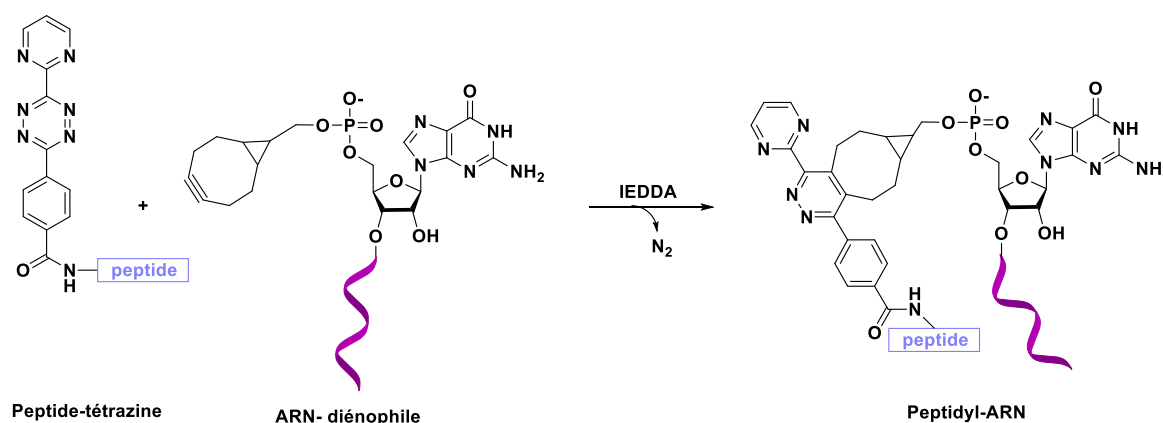


Schéma 20 : Synthèse de conjugués Peptide-ARN obtenus par réaction IEDDA

⁴³ Ameta, S., Becker, J., Jäschke, A. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 4701-4707.

En 2015, l'équipe de Kath-Schorr a décrit une voie d'accès à des ARN fonctionnalisés par une sonde (fluorophore ou biotine) par réaction entre un ARN (30-nt) substitué par un motif norbornène et une tétrazine.⁴⁴ L'incorporation du motif norbornène en position interne de l'ARN a été réalisé par polymérisation. En effet ce motif s'est révélé instable dans les conditions de synthèse par SPS (Schéma 21). Les ARN substitués par un ou plusieurs groupements norbornènes ont ensuite été incubés en présence de tétrazine pendant 1h à température ambiante dans l'eau permettant d'accéder aux produits de cycloaddition avec des rendements compris entre 50% et 84% en fonction de l'ARN et du groupement porté par la tétrazine.

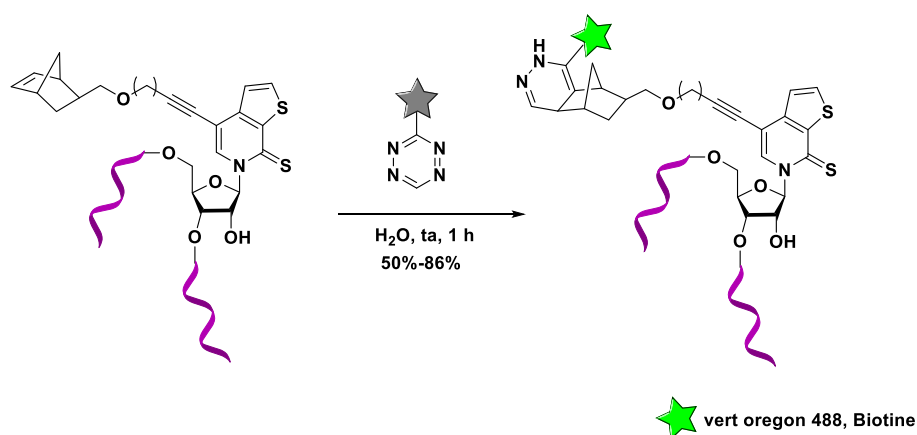


Schéma 21 : Réactivité d'un ARN norbornène en présence d'une sonde tétrazine

Ces exemples récents montrent l'efficacité de cette chimie des tétrazines pour la fonctionnalisation des ARN. Cependant, le lien qui est créé entre l'oligonucléotide et la sonde est volumineux et peut dans certains cas gêner l'hybridation ou l'interaction des ARN avec leur partenaire protéique dans certains processus biologiques. On peut noter aussi la difficulté de synthèse des motifs tétrazines, extrêmement réactif et des cyclooctènes qui peuvent parfois s'isomériser.

3) Réactions dissociatives

Le concept de réaction dissociative fait référence à une transformation chimique qui se produit au même moment qu'une liaison se rompt, entraînant ainsi la libération d'une molécule «démascarée» (Schéma 22). Cette transformation peut être induite par l'action d'un stimuli chimique, environnemental (pH, milieu oxydant ou réducteur), enzymatiques ou photochimiques.⁴⁵

⁴⁴ Domnick, C., Eggert, F., Kath-Schorr, S. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 8253-8256.

⁴⁵ Debart, F., Dupouy, C., Vasseur, J. J. *Beilstein J Org Chem.* **2018**, 14, 436-469.



Schéma 22 : Exemple d'une réaction dissociative. En orange : représentation schématique d'une biomolécule.

Une étude menée par le groupe de Kool en 2009 a conduit au développement d'une nouvelle stratégie pour la détection d'ARN (*in vitro* et *in vivo*) basée sur la réduction de Staudinger utilisant ce concept de réaction dissociative.⁴⁶ Pour cela, un ARN polyfonctionnel a été substitué en deux points : 1) une sonde fluorescente jouant le rôle de quencheur, reliée *via* un lien azido-éther à l'ARN 2) un fluorophore dont la fluorescence est initialement « quenchée ». Cet ARN est mis en présence d'un brin d'ADN complémentaire sur lequel a été greffée une triphénylphosphine. L'appariement des deux brins ARN/ADN entraîne une la réduction de l'azido par la phosphine qui conduit à la formation d'un hémiaminal qui va aussitôt conduire au relargage d'un aldéhyde portant le fluorophore quencheur. Cela va alors restaurer la fluorescence du second fluorophore et ainsi permettre la détection de l'ARN (Schéma 23).

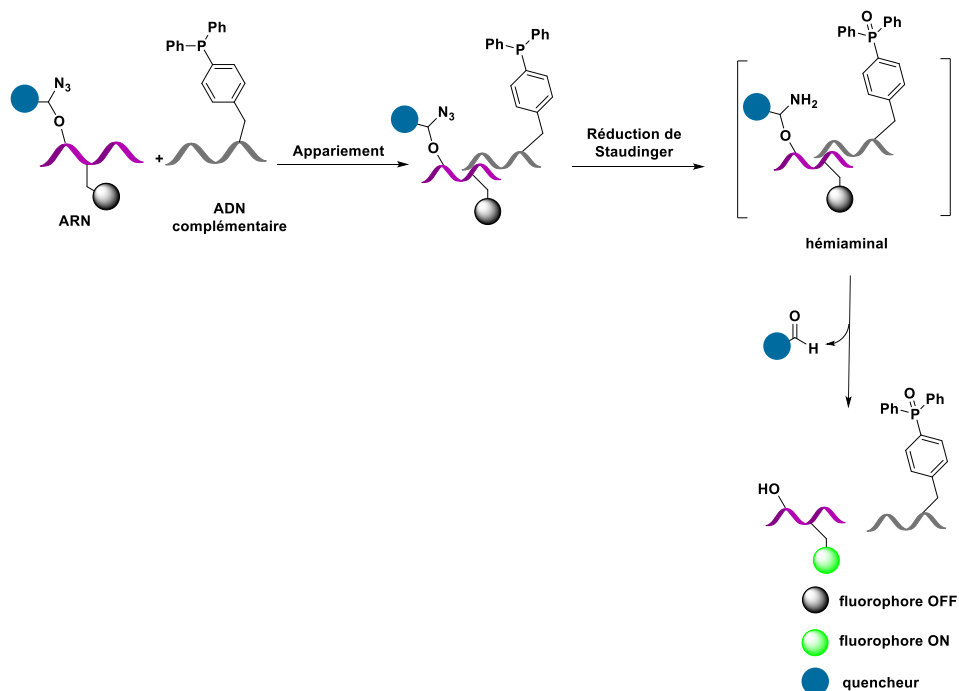


Schéma 23 : Sonde basée sur une réaction de Staudinger dissociative

⁴⁶ Franzini, R. M., Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16021-16023.

L'utilisation de réactions dissociatives a récemment été étudiée par le groupe de Royzen pour la mise au point d'une méthode de purification d'ARN synthétisé sur SPS.⁴⁷ Pour cela, une uridine phosphoramidite substituée en position 5' par un groupement TCO, via un lien carbamate clivable, a été synthétisée et incorporée au cours du dernier cycle de synthèse par SPS. Le brin d'ARN synthétisé peut alors être isolé en réagissant avec une tétrazine greffé sur l'agarose. La réaction de dissociation est réalisée instantanément dans l'eau par contre 5 h d'incubation à température ambiante ont été nécessaire pour libérer l'ARN (21-nt) (Schéma 24).

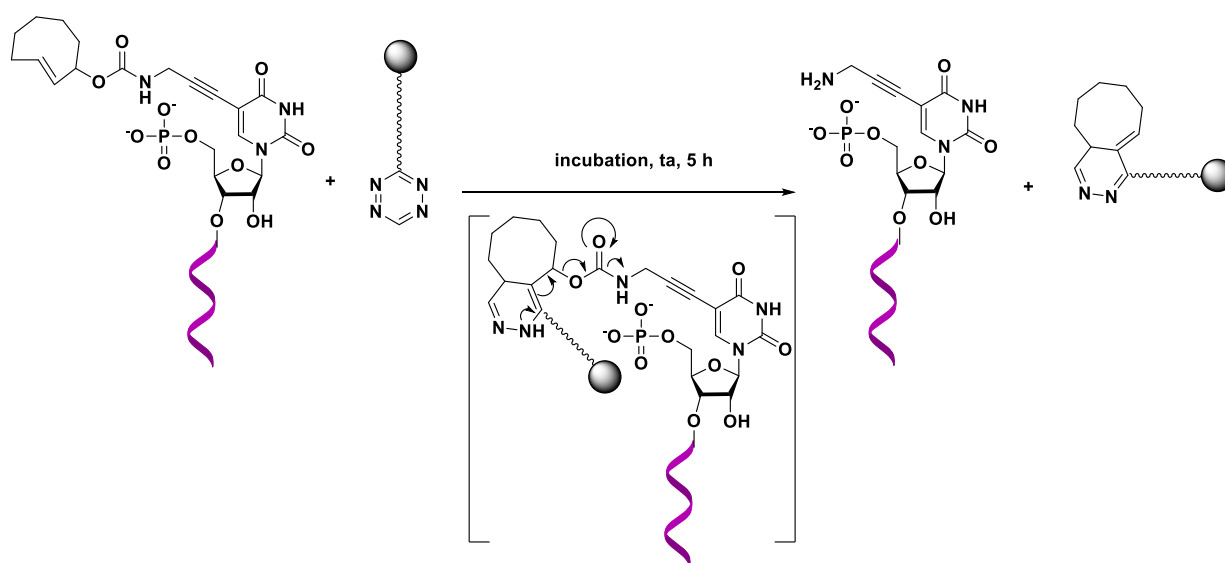


Schéma 24 : Réaction dissociative induite par IEDDA permettant le relargage de l'ARN

En 2017, ce même groupe a décrit un exemple d'activation chimique basé sur une réaction de IEDDA entre un TCO et une tétrazine pour l'activation de siRNA.⁴⁸ Au cours de ce travail, les auteurs ont décrit la synthèse d'un siRNA (22-nt) inactif greffé sur une nanoparticule. La formation de la liaison covalente de type carbamate entre l'extrémité 5' du siRNA et un motif cyclooctène constitue un lien permettant de libérer un siRNA actif sous l'action d'une réaction de cycloaddition en présence de tétrazine (Schéma 25).

⁴⁷ Augustin, A., Asare Okai, P. N., Khan, I., Miller, M. R., Wang, R., Sheng, J., Royzen, M. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 1405-1408.

⁴⁸ Khan, I., Seebald, L. M., Robertson, N. M., Yigit, M. V., Royzen, M. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 5705-5712.

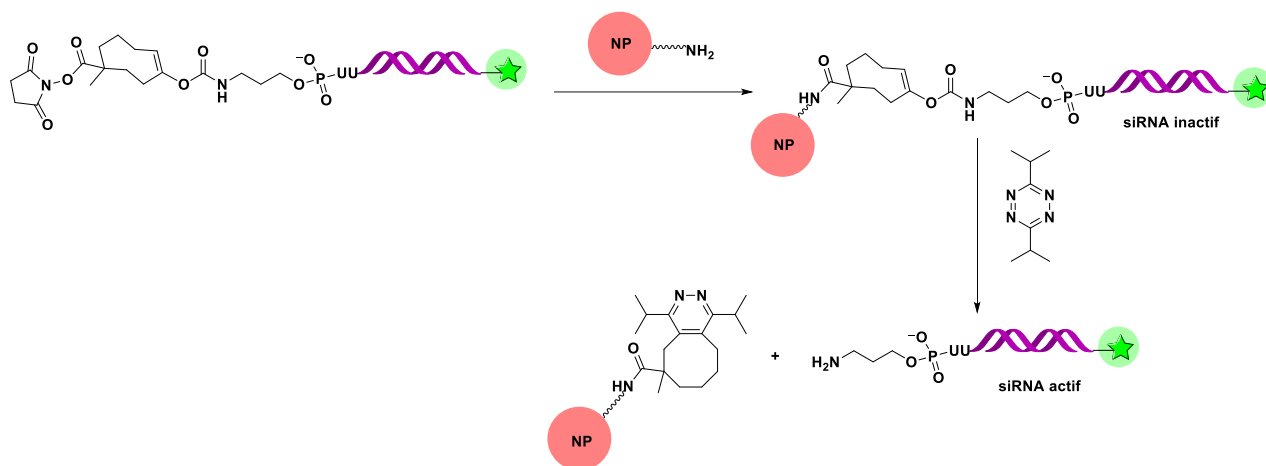


Schéma 25 : Accès à des siARN actif par IEDDA

Les réactions dissociatives sont de bons outils permettant le contrôle temporaire de l'activité des ARN. Cette approche permet de s'affranchir des limites de l'utilisation des oligonucléotides en tant que molécules active tels que les problèmes d'instabilité dans les milieux intra et extracellulaire ou la perméabilité cellulaire et tissulaire.

4) Fonctionnalisation par des dérivés diazo

Afin de post-fonctionnaliser l'extrémité 5' des ARN à des fins analytiques et thérapeutiques, l'équipe de Zécri s'est intéressée à la réactivité des composés diazo.⁴⁹ En conditions physiologiques l'acidité des protons portés par le phosphate à l'extrémité 5' de l'ARN permet l'activation du dérivé diazo sous la forme diazonium. Cette espèce électrophile réagit ensuite avec le phosphate nucléophile pour conduire à la formation d'un lien phosphodiester à l'extrémité 5' de l'ARN (21-nt). La réaction a été réalisée dans un tampon MES à pH 7 avec 10% de solvant organique nécessaire à la solubilisation du dérivé diazo. Dans ces conditions, l'extrémité 5' terminale de l'ARN a été modifiée par une biotine avec un taux de conversion de 95% (Schéma 26).

⁴⁹ Gampe, C. M., Hollis-Symynkywicz, M., Zécri, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 55, 10283-10286.

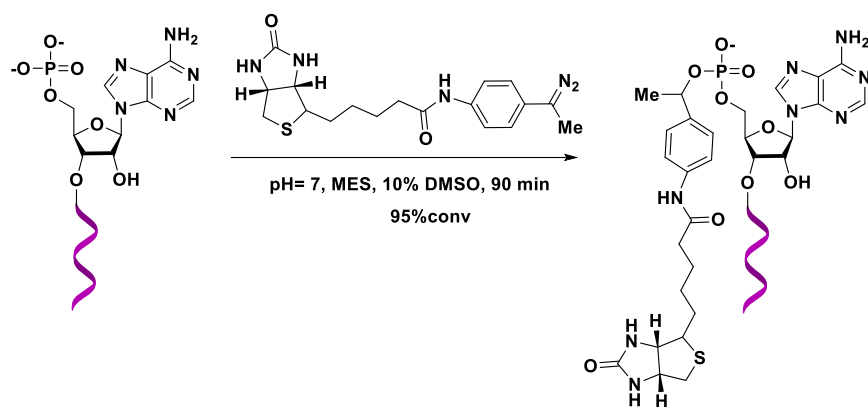


Schéma 26 : Fonctionnalisation d'ARN par des composés diazo

5) Réactions photocatalysées

Depuis quelques années, un intérêt croissant est porté aux réactions photocatalysées pour la fonctionnalisation d'acides nucléiques.⁵⁰ Ces réactions apparaissent aujourd'hui comme des outils intéressants car elles s'effectuent dans des conditions douces compatibles avec la nature de ces biomolécules. L'emploi de photocatalyseur à base d'iridium,⁵¹ de nickel⁵² ou encore de ruthénium à récemment permis la modification d'ADN par création de liaison C-C.

Fin 2020, les groupes de Gaunt et Balasubramanian ont décrit le premier exemple de réaction redox photocatalysée pour la détection de N6-méthyladenosine (m⁶A) d'ARN en ciblant la liaison C(sp³)-H du groupement méthyle.⁵³ Bien qu'essentiellement basée sur la détection de la méthylation en position N6 des désoxyadénosines de l'ADN (N⁶mdA), leurs travaux recensent un exemple appliqué à une courte séquence d'ARN (13-nt).

⁵⁰ Koo, B., Yoo, H., Choi, H. J., Kim, M., Kim, C., Kim, K. T. *Molecules* **2021**, *26*, 556-580.

⁵¹ a) Poplata, S., Troster, A., Zou, Y.Q., Bach, T. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 9748–9815; b) Lei, T., Zhou, C., Wei, X.Z., Yang, B., Chen, B.; Tung, C.H.; Wu, L.Z. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 879–884; c) Kolmel, D.K., Loach, R.P., Knauber, T., Flanagan, M.E. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2159–2165; d) Kolmel, D.K., Meng, J., Tsai, M.H., Que, J., Loach, R.P., Knauber, T., Wan, J., Flanagan, M.E. *ACS Comb. Sci.* **2019**, *21*, 588–597; e) Kolmel, D.K., Ratnayake, A.S., Flanagan, M.E., Tsai, M.H., Duan, C., Song, C. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 2908–2913.

⁵² a) Zuo, Z., Ahneman, D.T., Chu, L., Terrett, J.A., Doyle, A.G., MacMillan, D.W. *Science* **2014**, *345*, 437-440; b) Ruff, Y., Martinez, R., Pelle, X., Nimsgern, P., Fille, P.; Ratnikov, M., Berst, F. *ACS Comb. Sci.* **2020**, *22*, 120-128; c) Phelan, J.P., Lang, S.B., Sim, J., Berritt, S., Peat, A.J.; Billings, K., Fan, L., Molander, G.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 3723-3732; d) Badir, S.O., Sim, J., Billings, K., Csakai, A., Zhang, X., Dong, W., Molander, G.A. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 1046-1051.

⁵³ Nappi, M., Hofer, A., Balasubramanian, S., Gaunt, M, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 21484-21492.

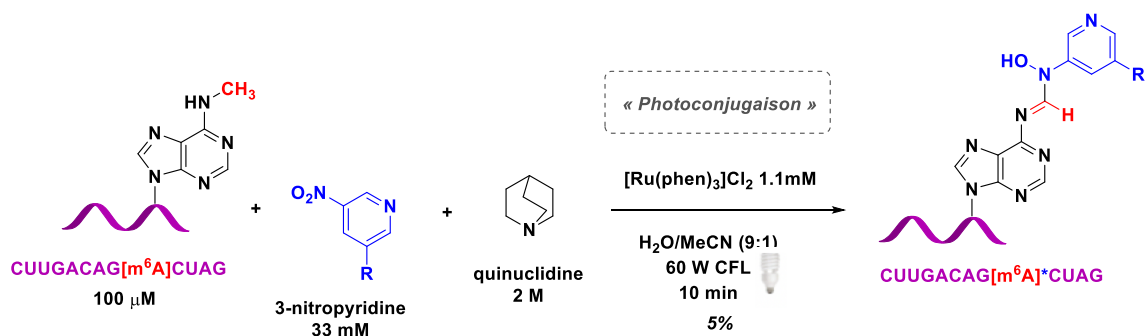


Schéma 27 : Réaction de « photoconjugaison » pour la fonctionnalisation d'ARN

Leur méthodologie repose sur la combinaison de deux systèmes réactionnels composés d'un oxydant (la nitropyridine), d'un réducteur (la quinuclidine), d'un photocatalyseur à base de ruthénium ($[\text{Ru}(\text{phen})_3]\text{Cl}_2$) et d'une source lumineuse (lampe CFL 60 W). Tout d'abord, la réduction de la nitropyridine en présence du complexe photoactivé $^*\text{[Ru(II)(Phen)}_3]$ et du réducteur permet de générer un radical anion nitrosopyridine et le radical cation dérivant de la quinuclidine. D'autre part l'abstraction d'un proton au niveau du groupement méthyle de la m⁶A permet de générer une espèce radicalaire. Cette dernière peut alors réagir rapidement avec la nitrosopyridine et conduire à un conjugué hydroxyformamide stable avec un rendement de 5% (Schéma 27). Cette réaction est impressionnante en terme de chimiosélectivité et pourra certainement permettre un meilleur séquençage de ces modifications m⁶A qui ont une importance majeure dans la chimie des ARN (voir chapitre IV). Cet exemple montre une fois encore l'intérêt d'appliquer des méthodologies originales et récentes à la modification de ces biomolécules.

6) Ligations chimiques

i) Le couplage peptidique

En 2010, le groupe de Micura a décrit la synthèse d'analogues d'amino-acyl ARNt non hydrolysables *via* la formation d'un lien amide stable par post-fonctionnalisation (Schéma 28).⁵⁴ Pour cela, un ARN-3'-azido a été synthétisé par SPS à partir d'une 3'-azido-adénosine fixée sur support solide. L'ARN obtenu a ensuite été soumis à des conditions réductrices en présence de TCEP dans un tampon Tris.HCl à pH 8 afin d'accéder à un analogue ARN-3'-NH₂ avec un rendement de 98%. Une étape de couplage peptidique a ensuite été réalisée en présence d'une méthionine formamide activée par un groupement para-nitrophénol

⁵⁴ Steger, J., Graber, D., Moroder, H., Geiermann, A.-S., Aigner, M., Micura, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 7470-7472.

(fMetOPfp). Ce couplage a permis de conduire à la formation d'un analogue stable d'ARNt présentant un lien amide avec un rendement de 94%.

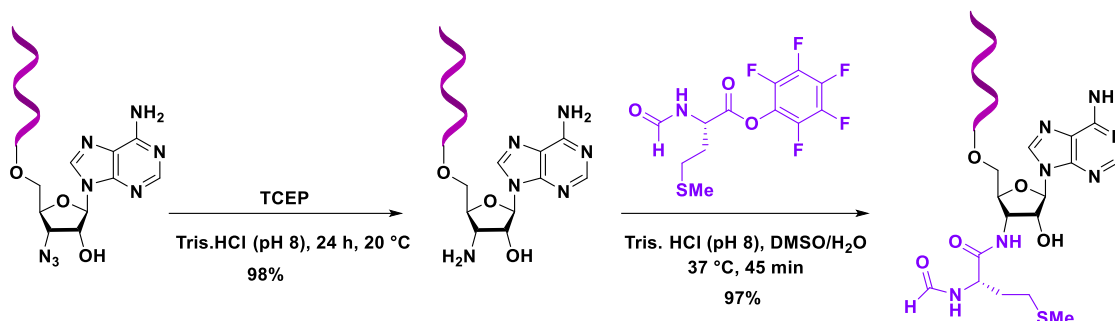


Schéma 28 : Fonctionnalisation d'ARN par couplage peptidique

Cette réaction de réduction d'azido en amine *via* le TCEP a été utilisée par notre équipe et a permis aussi de mettre en place une méthode de post-fonctionnalisation originale d'ARN faisant intervenir un lien squaramide.⁵⁵

ii) La ligation chimique native

Développée par Kent en 1994 dans le but de synthétiser de longs peptides,⁵⁶ la ligation native (NCL) met en jeu un thioester porté à l'extrémité C-terminale d'un premier peptide et une cystéine à l'extrémité N-terminale d'un second peptide.⁵⁷ Une première étape de thioesterification réversible conduit à la formation d'un intermédiaire thioester pouvant se réarranger de façon irréversible pour former la liaison amide (Schéma 29).

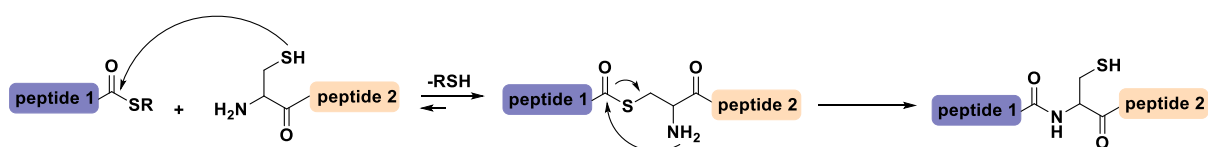


Schéma 29 : Ligation Chimique Native (NCL)

Cette réaction chimio- et régio-selective peut donc être utilisée pour la ligation de peptides totalement déprotégés mais également dans des réactions de bioconjugaison pour la

⁵⁵ Fonvielle, M., Sakkas, N., Iannazzo, L., Le Fournis, C., Patin, D., Mengin-Lecreux, D., El-Sagheer, A., Braud, E., Cardon, S., Brown, T., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13553-13557

⁵⁶ Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., Kent, S. B. *Science*. **1994**, *266*, 776-779.

⁵⁷ Wieland, T., Bokelmann, E., Bauer, L., Lang, H. U., Lau, H., *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1953**, *583*, 129-149.

modification de biomolécules. Un exemple de synthèse de conjugués 3'-peptidyl ARN par NCL a été rapporté en 2011 par le groupe de Micura.⁵⁸ Pour cela, une cystéine a été préalablement introduite par couplage peptidique sur un ARN 3'-NH₂. La ligation a ensuite été réalisée dans un tampon phosphate à pH=7.5 en présence de TCEP afin de libérer la cystéine *in situ* et 2% de thiophénol. L'ajout de DTT au milieu réactionnel est nécessaire afin d'éviter l'homodimérisation des ARN. Dans ces conditions, les produits de ligation ont été obtenus avec des rendements compris entre 24% et 72% selon la séquence de l'ARN et la nature du peptide (Schéma 30).

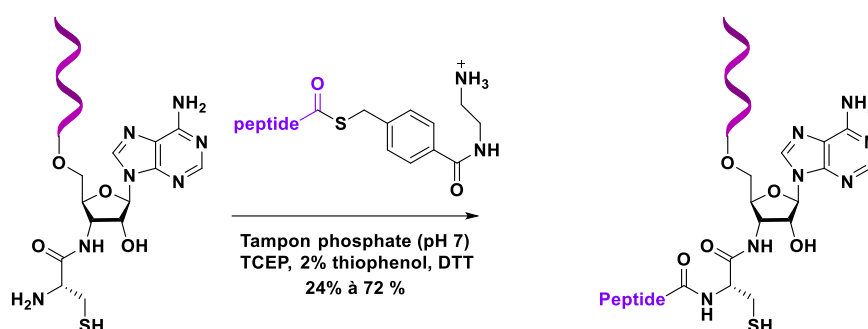


Schéma 30 : Post-fonctionnalisation d'ARN par ligation chimique native

iii) La ligation de Staudinger

La ligation de Staudinger a été développée en 2000 par l'équipe de Bertozzi.⁵⁹ Cette réaction s'inspire de la réduction d'un azoture en amine primaire en présence de triphénylphosphine (réduction de Staudinger) rapportée par Staudinger et Meyer.⁶⁰ La ligation de Staudinger est basée sur la réactivité de l'intermédiaire iminophosphorane formé au cours de la première étape de la réaction en présence de phosphine. La présence d'un groupement ester en *ortho* du phosphore sur l'un des groupements phényles permet de piéger l'imino-phosphorane et conduit à la formation d'un lien amide (Schéma 31).⁶¹

⁵⁸ Geiermann, A.-S., Polacek, N., Micura, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 19068-19071.

⁵⁹ a) Saxon, E., Bertozzi, C. R. *Science*. **2000**, 287, 2007-2010.

⁶⁰ Staudinger, H., Meyer, J. *Helv. Chim. Acta.* **1919**, 2, 635-646.

⁶¹ Lin, F. L., Hoyt, H. M., van Halbeek, H., Bergman, R. G., Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 2686-2695.

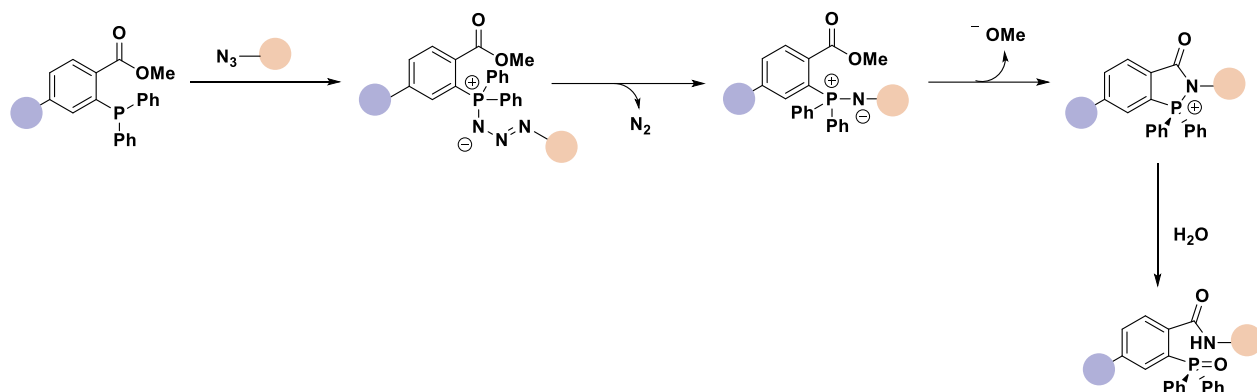


Schéma 31 : Ligature de Staudinger

Cette réaction hautement chimiosélective a très vite été exploitée pour la bioconjugaison de biomolécules.⁶² Afin de réaliser une modification site-spécifique sur un siRNA pour l'insertion d'un quencheur de fluorescence, le groupe de Micura a décrit en 2011 l'utilisation de cette réaction de bioconjugaison.⁶³ La réaction a été réalisée dans un mélange DMF/H₂O (3:1) à 60 °C pendant 21h en présence d'une phosphine substituée par un quencheur de fluorescence. L'analyse de la réaction par spectrométrie de masse a révélé la formation du produit de ligation avec un rendement de 85%, mais s'accompagne également de la présence du produit de réduction avec un rendement de 15% (Schéma 32).

⁶² Schilling, C. I., Jung, N., Biskup, M., Schepers, U., Bräse, S. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4840-4871.

⁶³ Aigner, M., Hartl, M., Fauster, K., Steger, J., Bister, K., Micura, R. *ChemBiochem.* **2011**, *12*, 47-51.

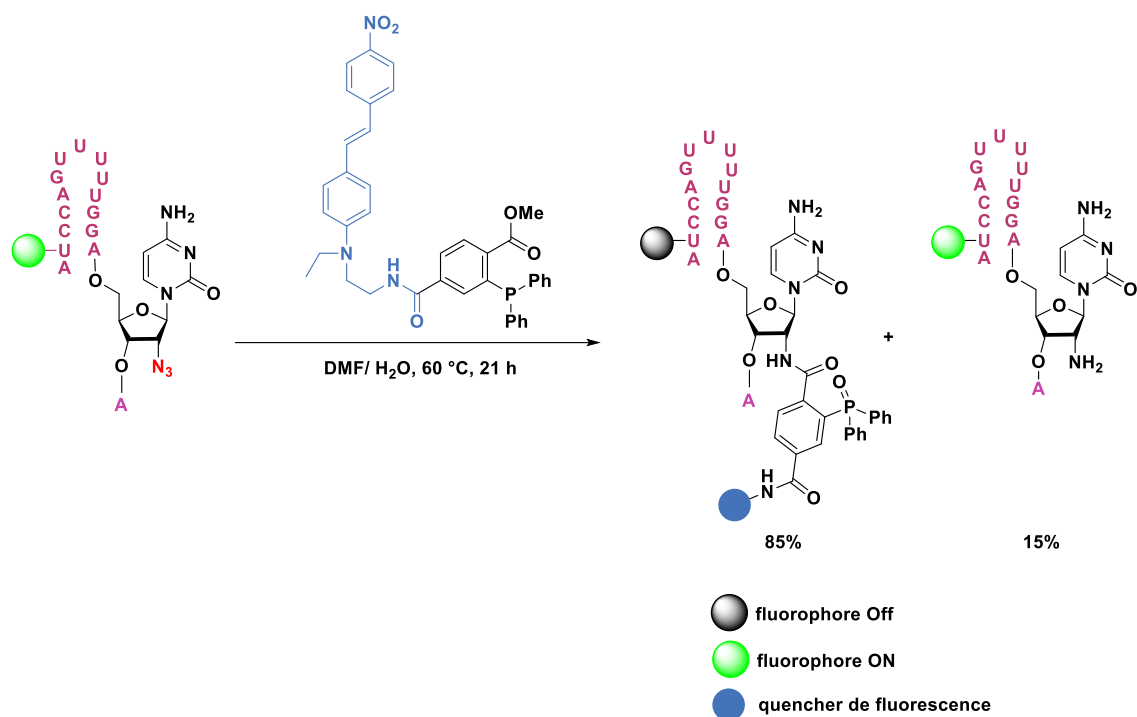


Schéma 32 : Fonctionnalisation de l'ARN par ligature de Staudinger

D'autres variantes de la ligature de Staudinger ont été développées par Bertozzi⁶⁴ et Raines⁶⁵ dans une version dite « traceless » permettant de s'affranchir de l'oxyde de phosphine sur le produit de la ligature. Cette réaction, appelée Ligature de Staudinger traceless (LSt) n'avait encore jamais été appliquée à la post-fonctionnalisation d'ARN et elle fera l'objet de mon travail de thèse.

Dans le cadre de cette partie bibliographique, on peut également citer les travaux de Strazewski sur le développement de conditions de Staudinger-Vilarassa pour la synthèse d'analogues de puromycine.⁶⁶ Cette réaction repose sur la formation *in situ* de l'amine par réduction de Staudinger en présence de $P(\text{Bu})_3$. Cette dernière peut alors réagir, selon un couplage peptidique, avec l'acide aminé activé en présence de DIC et d'HOBt et conduire au produit de ligature avec un rendement de 94% (Schéma 33).

⁶⁴ Saxon, E., Armstrong, J. I., Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1939-1941.

⁶⁵ Nilsson, B. L., Kiessling, L., Raines, R. T. *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141-2143.

⁶⁶ Charfeddine, A., Dayoub, W., Chapuis, H., Strazewski, P. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 5566-5584.

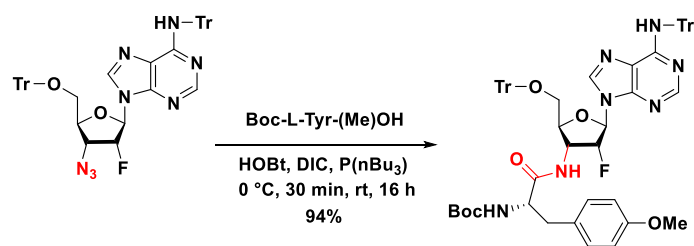
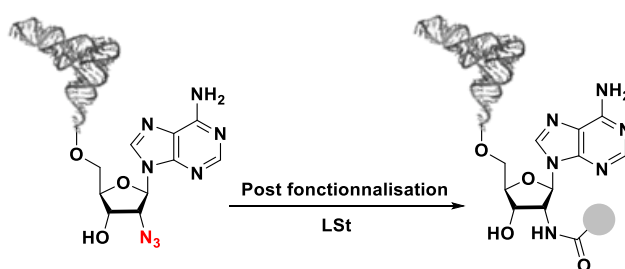


Schéma 33 : Exemple de réaction de Staudinger-Vilarassa appliquée à la fonctionnalisation de la position 3' d'un nucléoside

D- Objectif de la thèse

Dans le cadre de ces travaux de thèse nous nous intéresserons au développement d'une nouvelle méthode de post-fonctionnalisation d'ARN basée sur la ligation de Staudinger traceless (LSt).



Une première partie de mes travaux de thèse (Chapitre II) sera consacrée à la mise au point de cette ligation afin de fonctionnaliser la position 3' terminale d'ARN *via* l'introduction de différents tags par un lien amide. L'optimisation des conditions réactionnelles sera tout d'abord réalisée sur un dinucléotide modèle (Schéma 34).

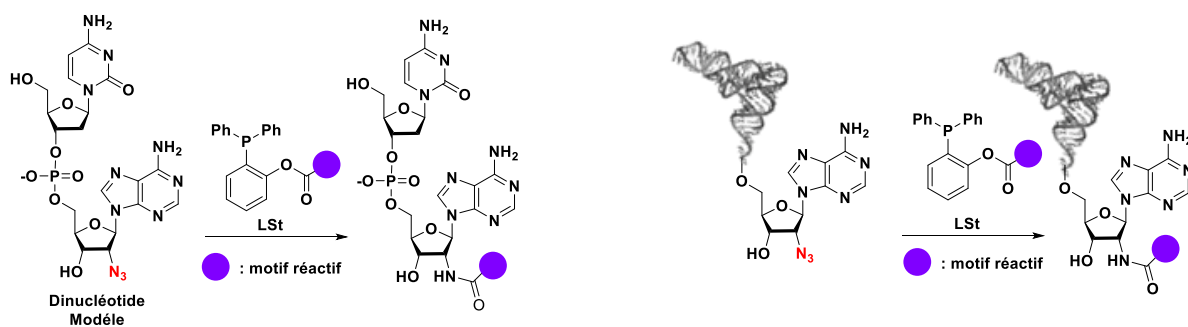


Schéma 34 : Objectif du chapitre II

La deuxième partie (Chapitre III) de ce manuscrit portera sur la fonctionnalisation par des acides aminés *via* un lien amide de la position 3' terminale de l'ARN afin d'accéder à des analogues stables d'ARNt. Ces derniers seront utilisés pour l'étude d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane : les transférases de la famille Fem. Dans cette partie deux stratégies seront proposées (Schéma 35).

- 1) Une première approche pré-synthétique sera basée sur la fonctionnalisation d'un nucléoside par couplage peptidique suivi de la synthèse de dinucléotide avant de réaliser la ligation enzymatique.
- 2) Une approche post-synthétique utilisera les conditions de LSt développée au chapitre II.

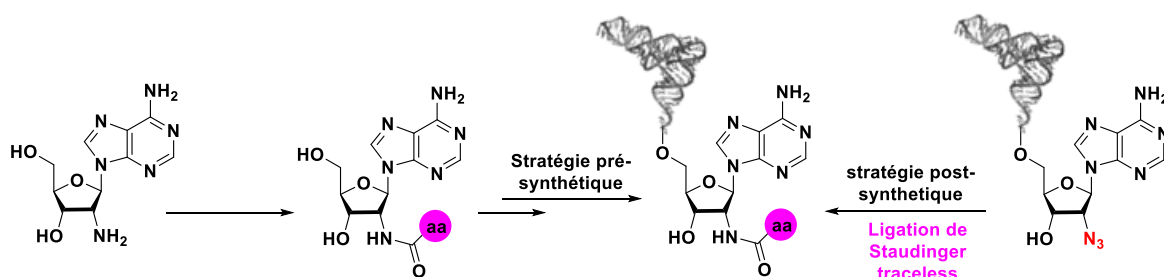


Schéma 35 : Objectif du chapitre III

Une dernière partie de ce manuscrit (Chapitre IV), concernera l'étude de la réactivité des différentes positions de l'adénosine (en particulier les positions C6 et 5'-OH) vis à vis de cette réaction de LSt. Nous utiliserons cette méthodologie pour accéder à des conjugués SAM-adénosine pour l'étude de méthyltransférases d'ARN (Schéma 36).

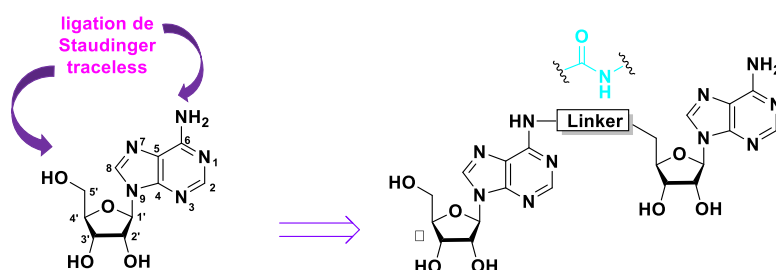


Schéma 36 : Objectif du chapitre IV

CHAPITRE II

Ligation de Staudinger traceless pour la bioconjugaison de l'extrémité 3' terminale des ARN

A) Ligation de Staudinger traceless

1) Généralités

Développée dans les années 2000, la ligation de Staudinger traceless (LSt) permet de créer un lien amide à partir d'un azoture et d'une phosphine spécifiquement fonctionnalisée (Schéma 37).

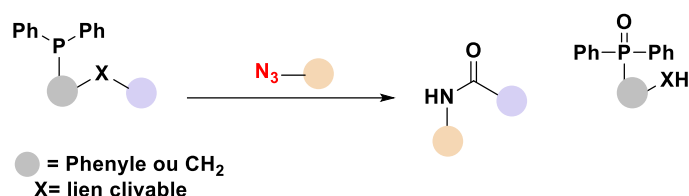


Schéma 37 : Ligation de Staudinger traceless

Ceci est possible grâce aux travaux des groupes de Bertozzi⁶⁵ et Raines⁶⁶ qui ont mis au point simultanément et de façon indépendante une nouvelle génération de phosphines (Figure 3). Ces dernières favorisent le transfert intramoléculaire d'acyle qui conduit à la formation du lien amide et au relargage de la partie oxyde de phosphine.

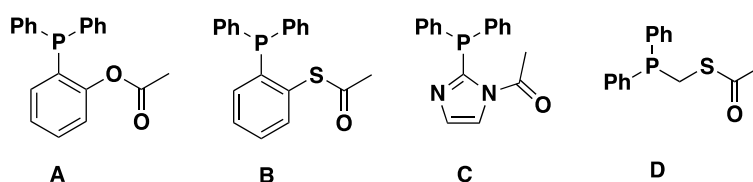


Figure 3 : Exemples de phosphines « nouvelle génération »

Les phosphines mises en jeu contiennent deux éléments essentiels. Tout d'abord un lien clivable de type ester ou thioester qui relie l'acyle à transférer à l'aryle phosphine (Figure 3). La présence de deux phényles permet d'éviter l'oxydation de la phosphine et assure la stabilité de l'aza-ylide (également connu sous le terme : iminophosphorane), intermédiaire clé de la réaction. Par analogie avec la ligation de Staudinger, la première étape de la réaction consiste en la formation de l'iminophosphorane **II** par réaction entre l'azoture et la phosphine. L'attaque nucléophile du doublet non liant de l'azote sur le carbonyle de la phosphine conduit à l'amidophosphonium **IV** en passant par un intermédiaire cyclique à 6 chaînons **III**. Une dernière étape d'hydrolyse en présence d'eau est nécessaire afin d'obtenir l'amide **V** et de libérer l'oxyde de phosphine **VI** (Schéma 38).^{65,66} Il est à noter que l'instabilité de l'iminophosphorane

⁶⁵ Saxon, E., Armstrong, J. I., Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1939-1941.

⁶⁶ Nilsson, B. L., Kiessling, L., Raines, R. T. *Org. Lett.* **2000**, 2, 2141-2143.

I peut conduire à une réaction secondaire d'hydrolyse compétitive qui favorise la formation d'une amine VI.

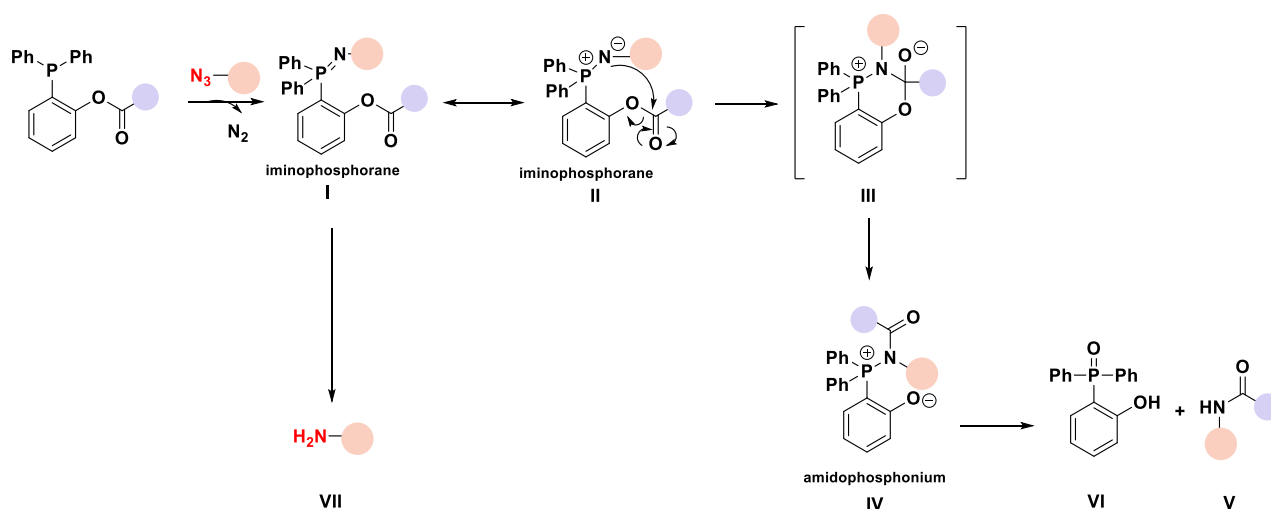


Schéma 38 : Mécanisme réactionnel de la ligand de Staudinger traceless

2) Applications pour la fonctionnalisation de biomolécules

Parmi les différentes méthodes de bionconjugaison permettant la fonctionnalisation de biomolécules par création de lien amide, la ligation chimique native (NCL) a été très largement étudiée.⁶⁷ Bien que très efficace, cette réaction nécessite la présence d'une cystéine à la jonction des deux partenaires, elle a particulièrement été développée pour la ligation de deux peptides. Dans le but de se défaire de cette limitation, le groupe de Raines s'est inspiré de dérivés de type thiophénol, connus pour effectuer la trans estérification de thioester au cours de la NCL, afin de développer des thiophosphines. Lorsque ces phosphines sont liées à un premier peptide en position C-terminale *via* un lien thioester, ce peptide peut alors réagir avec l'extrémité N-terminal d'un second peptide portant un azoture. La réaction conduit ainsi à la création d'un lien inter-peptidique naturel (Schéma 39).⁶⁶

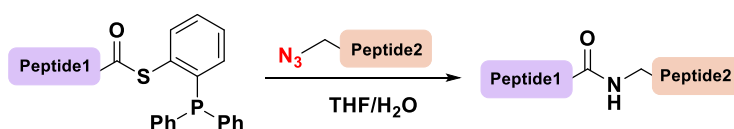


Schéma 19 : Application de la ligation de Staudinger traceless à la synthèse peptidique

⁶⁷ a) Dawson, P. E., Muir, T. W., Clarklewis, I., Kent, S. B. H. *Science* **1994**, 266, 776-779. b) Shin, Y., Winans, K. A., Backes, B. J., Kent, S. B. H., Ellman, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11684-11689. c) Johnson, E. C. B., Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 128, 6640-6646.

Bien que les premières thiophosphines développées assurent la ligation entre deux peptides non cystéiniques, les rendements sont relativement faibles. Par exemple, le couplage entre la N-acétylglycine et l'azoture de benzoylglycine s'effectue avec un rendement maximal de 35% (Schéma 40).⁶⁸

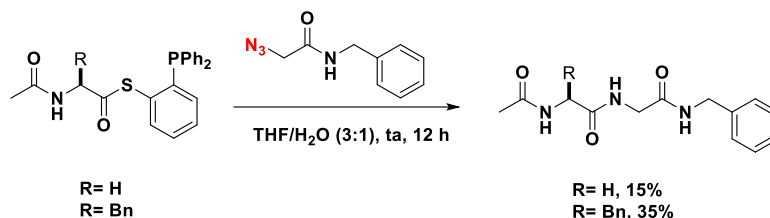


Schéma 20 : Lst avec des peptides non cystéiniques appliquée à la synthèse peptidique

Afin d'optimiser la réaction, le groupement phényle reliant le thioester à la diphenyle phosphine a été remplacé par un méthylène (Figure 3, phosphine D). Cette modification permet de réduire la distance entre l'azote nucléophile et le site électrophile favorisant ainsi le transfert d'acyle.⁶⁸ Cette nouvelle génération de phosphines très efficace permet de réaliser la ligation entre deux peptides avec des rendements pouvant atteindre 90% lorsque l'acide aminé lié à l'azoture est une glycine (Schéma 41). La ligation de Staudinger traceless semble être un outil intéressant pour créer des liaisons inter-peptidiques sans aucune limitation liée à la séquence (la présence d'une cystéine n'est plus nécessaire contrairement à la NCL).

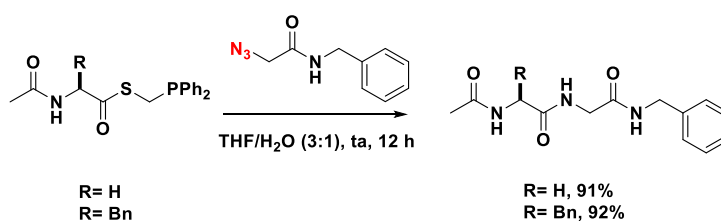


Schéma 41 : Ligation d'acides aminés en présence de phosphinéméthanethiol

En 2007, le groupe de Raines s'est intéressé au couplage entre peptide et protéine. Pour cela, des phosphines hydro-solubles ont été développées en introduisant sur chacun des phényles des motifs diméthylammonium. Ce type de phosphine favorise le transfert d'acyle tout en limitant la réduction de l'azoture (Schéma 42).⁶⁹

⁶⁸ Nilsson, B. L., Kiessling, L., Raines, R. T. *Org. Lett.* **2001**, 3, 9-12.

⁶⁹ Soellner, M. B., Tam, A., Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 11421-11430.

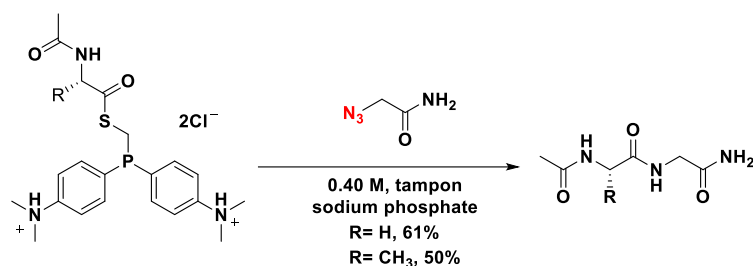


Schéma 42 : LSt avec des phosphines hydrosolubles

La ligation de Staudinger traceless a également été appliquée à la synthèse de glycosyl-amide par le groupe de Bernardi.⁷⁰ Ces derniers ont décrit une version stéréoconservative permettant d'accéder à des mimes non hydrolysables de monosaccharides : les α -Glycosyles. La conservation de la stéréochimie du carbone anomérique est rendue possible par l'encombrement stérique dû au groupement protecteur des hydroxyles du sucre. En effet, à partir du tétra-*O*-benzyl- α -glycosyle azide, l'amide- α est obtenu majoritairement tandis que la LSt à partir du tétra-*O*-acétyle- α -Glycosyle azide conduit exclusivement à l'amide- β (Schéma 43).

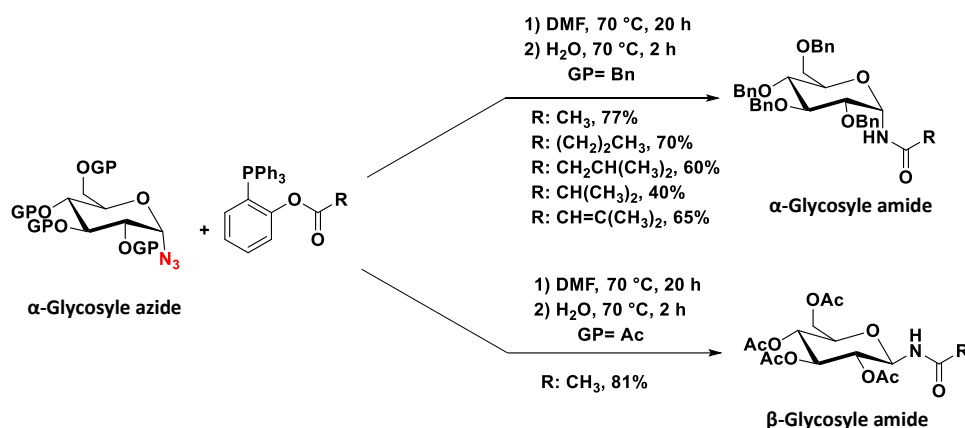


Schéma 43 : Synthèse stéréosélective de glycosylamides

Cette méthodologie a par la suite été étendue à la conjugaison de polysaccharides et des conjugués oligosaccharides-protéines ont été synthétisés par l'équipe de Mulard dans le but de développer de potentiels nouveaux vaccins.⁷¹ Dans ce cas, la phosphine portant la protéine vectrice (*TT* ou *BSA*) est protégée par un borane afin d'éviter l'oxydation de l'atome de phosphore. L'ajout de DABCO lors de la LSt est ensuite nécessaire afin de libérer la phosphine réactive (Schéma 44).

⁷⁰ Bianchi, A., Bernardi, A. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 12, 4565-4577.

⁷¹ Grandjean, C., Boutonnier, A., Guerreiro, C., Fourniers, J. M., Mulard, L. A. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7123-7132.

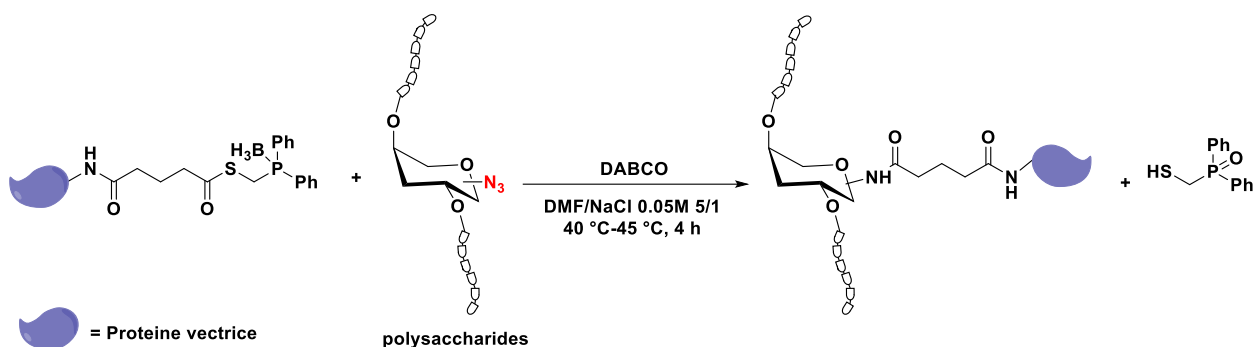


Schéma 44 : Application de la LSt à la synthèse de conjugués polysaccharides-protéines

En 2017, la synthèse d'un analogue de l'antigène humain CD52 est obtenue par ligation entre la séquence peptidique complète de l'antigène CD52 lié au partenaire phosphinothiol et un tri-mannose sur lequel un azoture a été introduit.⁷² Le conjugué glycan-peptide a ainsi été obtenu avec un rendement de 66% (Schéma 45).

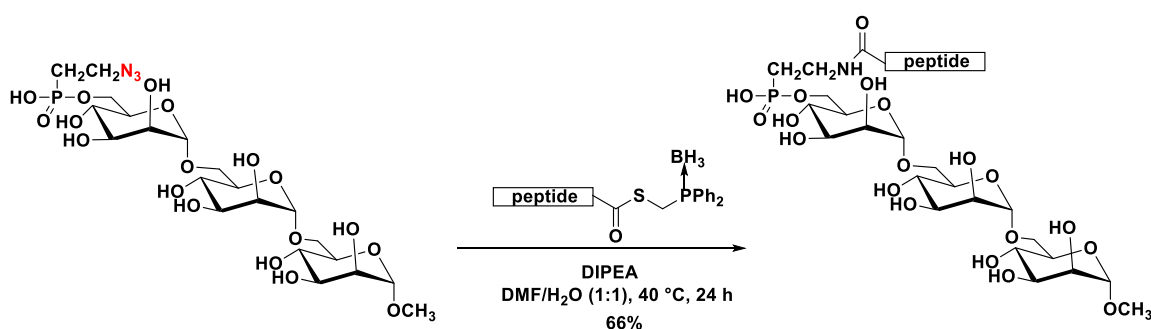


Schéma 45 : Synthèse d'analogues d'antigène humain CD52 par LSt

En 2011, le groupe de Davis a étudié la chimiosélectivité de cette ligation dans le cadre de la synthèse de N-reverse glycoprotéines.⁷³ Les α -N-glycoprotéines interviennent dans de nombreux processus de reconnaissance biologique et sont très sensibles aux enzymes du milieu cellulaire. L'inversion de cette liaison α -N-glucidique pourrait conférer à ces biomolécules plus de stabilité sans modification majeure de leur structure. Dans ce contexte, l'équipe de Davis a rapporté une application de la LSt entre différentes azido-protéines et une glyco-phosphine afin d'accéder aux β -N-Reverse-glycoprotéines. Malgré une conversion totale de l'azoture, la formation de la fonction amide β n'est observée qu'avec des taux de conversion modérés allant de 45% à 50%, en compétition avec l'amine correspondante (Schéma 46).

⁷² Zhu, S., Guo, Z. *Org. Lett.* **2017**, 19, 3063-3066.

⁷³ Bernardes, G. J. L., Linderoth, L., Doores, K. J., Boutureira, O., Davis, B. G. *ChemBioChem.* **2011**, 12, 1383-1386.

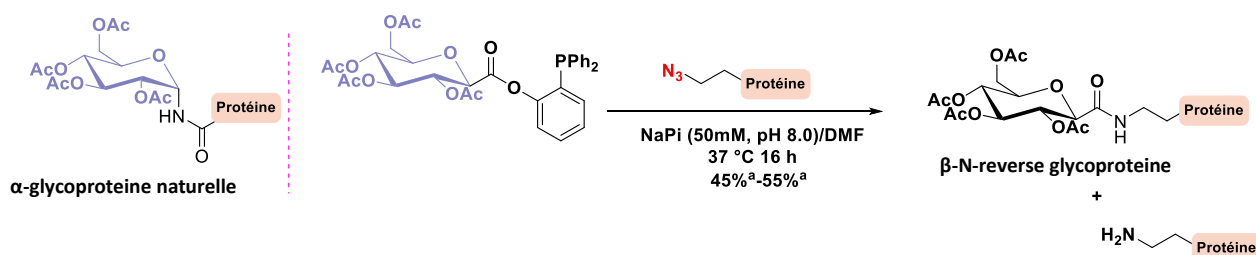


Schéma 46 : Application de la LSt à la synthèse de N-reverse protéine. ^a : taux de conversion déterminé par LCMS

Bien que les exemples cités précédemment témoignent de l'efficacité de la ligation de Staudinger traceless pour la conception et la synthèse de conjugués à partir de différentes biomolécules, aucun exemple de fonctionnalisation d'acide nucléique n'a été décrit. On peut toutefois noter la fonctionnalisation de la 5'-azido-2'-désoxyadénosine par le groupe de Bertozzi en 2000.⁶⁵ Ce nucléoside protégé sur la base nucléique a été mis en présence de différentes phosphines afin de comparer leur efficacité pour la création de lien amide. L'utilisation de la diphenylphosphinéméthyle ester a permis l'introduction d'un groupement acétyle en position 5' avec un rendement de 95% (Schéma 47).

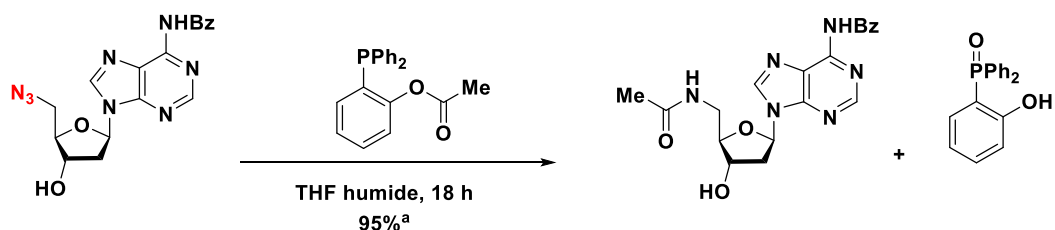


Schéma 47 : Fonctionnalisation de la 5'-azido-2'-désoxyadénosine par LSt. ^a : rendement déterminé par HPLC.

3) Objectif

La ligation de Staudinger traceless a été appliquée avec succès à la conjugaison de nombreuses biomolécules et semble compatible avec la chimie des nucléosides. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à cette réaction afin de l'appliquer à la post-fonctionnalisation d'ARN (Schéma 48A). Pour cela, un ARN modifié en position 2' de l'adénosine 3'-terminale par introduction d'une fonction azoture sera mis en présence de phosphines. La synthèse des ARN-2'-N₃ pourra être réalisée par ligation enzymatique catalysée par la T4 RNA ligase d'un dinucléotide pdCpA-2'-N₃ et d'une micro-hélice d'ARN de

22 nucléotides.⁷⁴ Les conditions de la réaction seront d'abord mises au point sur un dinucléotide modèle dCpA-2'N₃ avant d'être appliquées à l'ARN (Schéma 48B). Ce chapitre comportera trois parties : tout d'abord nous présenterons la synthèse du dinucléotide dCpA-2'N₃ ainsi que des phosphines comportant différents motifs d'intérêts. Puis nous exposerons la mise au point des conditions de ligation de Staudinger traceless pour qu'elles soient applicables aux acides nucléiques. Enfin, la dernière partie concernera l'application de ces conditions à la post fonctionnalisation de l'ARN.

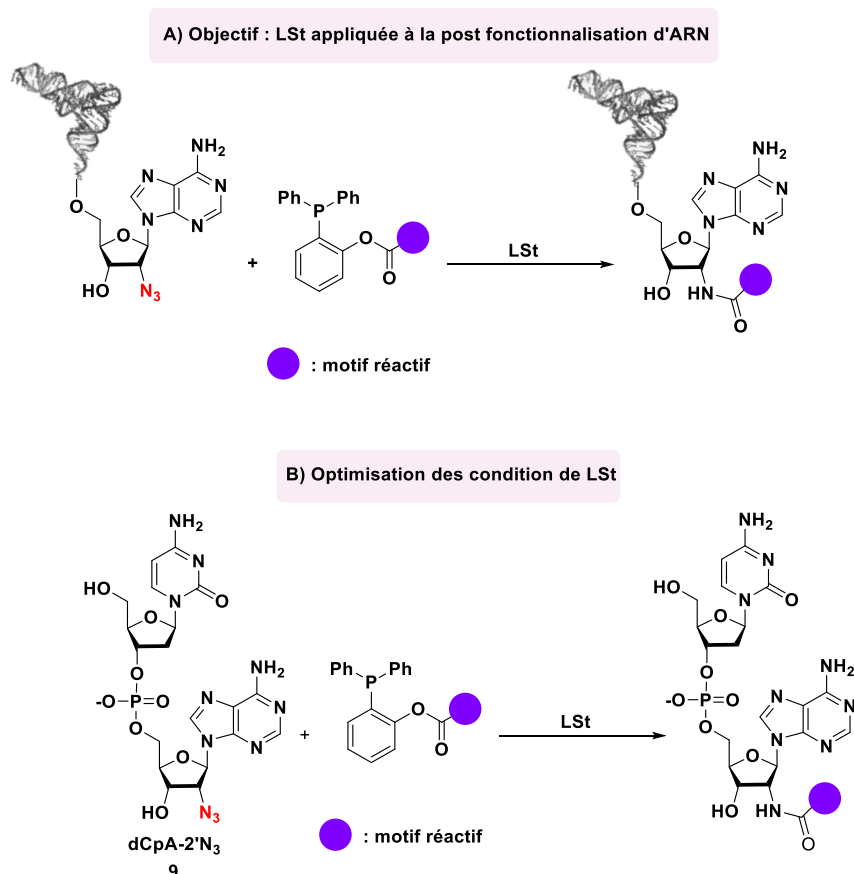


Schéma 48 : A) Objectif, B) Mise au point des conditions sur un système modèle

B) Synthèse des précurseurs

Le dinucléotide modèle dCpA-2'-N₃ **9** pourrait être obtenu par couplage entre la désoxycytidine phosphoramidite commerciale et la 2'-azidoadénosine **7**. La stéréochimie de la position 2' pourra être maîtrisée grâce à une méthodologie d'oxydation/réduction suivit d'une étape de

⁷⁴ Chemama, M., Fonvielle, M., Villet, R., Arthur, M., Valery, J. M., Etheve-Quellejeu, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 129, 12642-12643.

substitution nucléophile sur l'adénosine sélectivement protégée, elle-même issue de l'adénosine commerciale (Schéma 49).

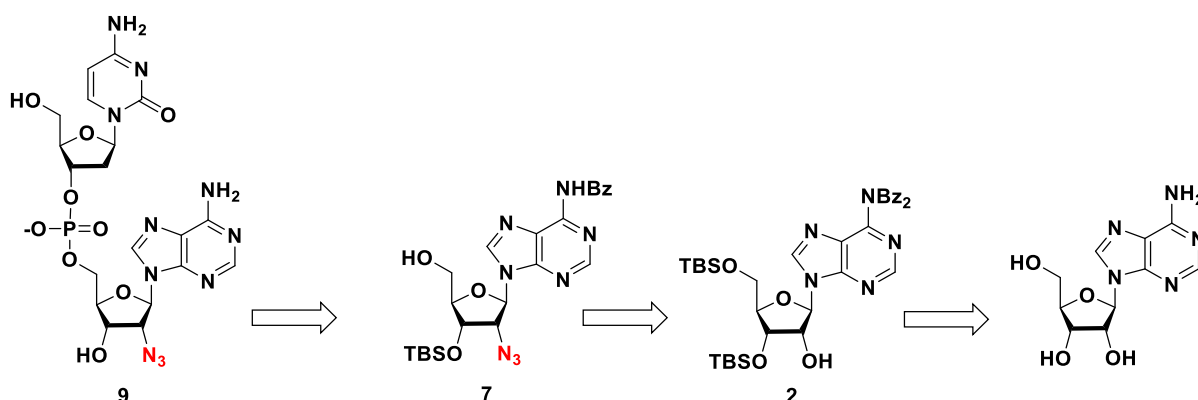


Schéma 49 : Schéma rétrosynthétique permettant d'accéder au dinucléotide modèle 9

La stratégie d'accès au dinucléotide modèle dCpA-2'*N*₃ est basée sur l'utilisation de la chimie des phosphoramidites. Nous avons choisi ce dinucléotide car il correspond à la séquence 3' terminale du bras accepteur des ARNt. La désoxycytidine phosphoramidite est commerciale, en revanche il nous faut synthétiser la 2'-azido-adénosine 7.

1) Synthèse de la 2'-azido-adénosine

Afin de préparer le 2' azido-nucléoside 7, nous nous sommes appuyés sur une voie de synthèse précédemment mise au point au laboratoire.⁷⁵

Une première étape de protection sélective des fonctions hydroxyle en positions 3' et 5' de l'adénosine est nécessaire. Pour cela, l'adénosine commerciale est mise en présence du chlorure de *tert*-butyldiméthylsilyle, de nitrate d'argent et de DABCO dans le THF pendant 4 h.⁷⁶ Ces conditions décrites par le groupe de Ogilvie permettent d'obtenir majoritairement le composé 1 avec un rendement de 53% (Schéma 50).

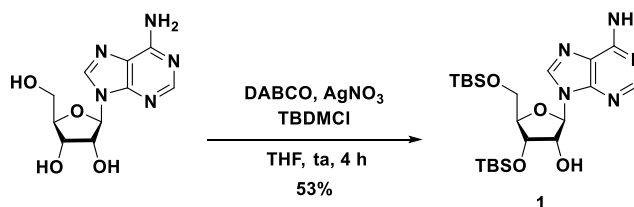


Schéma 50 : Silylation des positions 3' et 5' de l'adénosine

⁷⁵ Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, A., Etheve-Quelquejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5115-5119.

⁷⁶ Hakimelahi, G.H., Proba, Z.A., Ogilvie, K.K. *Tet. Lett.* **1981**, *22*, 5243-5246.

Cette sélectivité est rendue possible grâce à l'utilisation du DABCO, cette base encombrée déprotone plus efficacement l'oxonium en position 3' généré au cours de la première étape élémentaire, favorisant ainsi la silylation de cette position. Bien que la position 2' soit moins accessible en raison de la gêne stérique engendrée par l'adénine, nous observons tout de même la formation du régioisomère silylé en position 2' et 5' ce qui explique le rendement modéré obtenu au cours de la réaction.

Avant de protéger l'amine exocyclique, l'adénosine di-silylé **1** est tout d'abord mise en présence de chlorure de triméthylsilyle dans la pyridine pendant 1h30 afin de protéger provisoirement la position 2'. L'amine libre réagit ensuite avec le chlorure de benzoyle. Enfin un traitement aqueux permet d'obtenir le composé **2** avec un très bon rendement de 80% (Schéma 51).

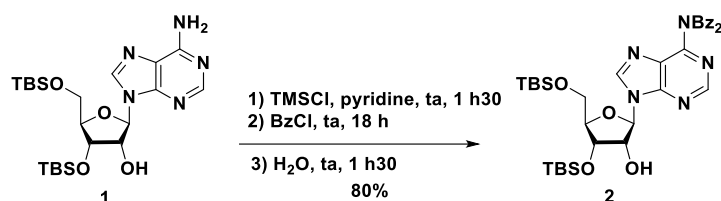


Schéma 51 : Benzoylation de l'amine exocyclique

L'introduction de l'azoture en position 2' est réalisée en présence d'azoture de sodium selon un mécanisme SN_2 entraînant une inversion de configuration. Afin de conserver la stéréochimie de cette position, l'orientation de l'hydroxyle libre en 2' a été inversée par une méthodologie d'oxydation/réduction à partir du composé **2**. L'oxydation est réalisée en présence de périodinate de Dess-Martin (DMP) dans le dichlorométhane et permet d'obtenir le composé **3** avec un rendement de 71%. La cétone est ensuite réduite par le $NaBH_4$. Dans ce cas, l'attaque de l'hydruire sur la face la moins encombrée permet d'inverser l'orientation de l'alcool et d'obtenir le composé **4** avec un rendement de 50% (Schéma 52). Nous constatons également la formation d'un produit secondaire qui résulte de la mono-débenzoylation de l'amine.

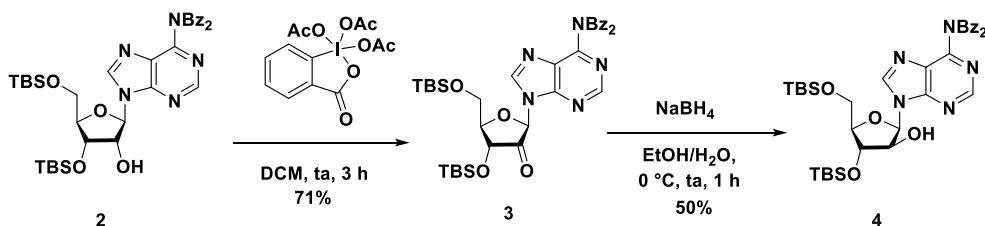


Schéma 52 : Inversement de la stéréochimie de la position 2'

La fonctionnalisation de la position 2' de l'adénosine est réalisée en deux étapes. Dans un premier temps, l'activation de l'hydroxyle en 2' par le chlorure de trifluorométhanesulfonyle (TfCl) permet d'obtenir le dérivé **5**. Ce dernier est ensuite mis en présence d'azoture de sodium, ce qui conduit à la formation du composé **6** avec un rendement de 50 % sur deux étapes. Cette réaction s'accompagne là aussi d'une mono-débenzoylation de l'amine exocyclique (Schéma 53).

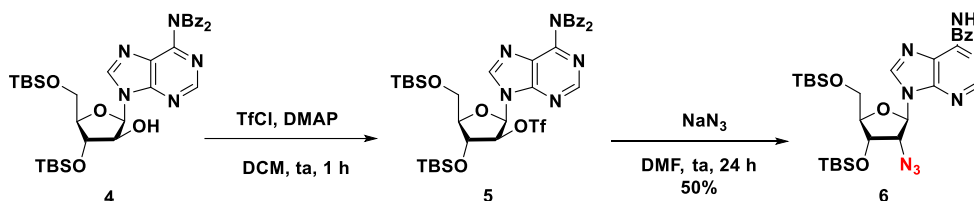


Schéma 53 : Synthèse du composé **6**

Afin d'introduire en position terminale du dinucléotide un monomère 2'-azido adénosine, une déprotection de la position 5' est nécessaire. A cet effet, le nucléoside **6** a donc été traité par une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique (1:1) pendant une heure à température ambiante. Cette déprotection sélective du groupement TBS en position 5' conduit à la formation du composé **7** avec un excellent rendement de 91% (Schéma 54).

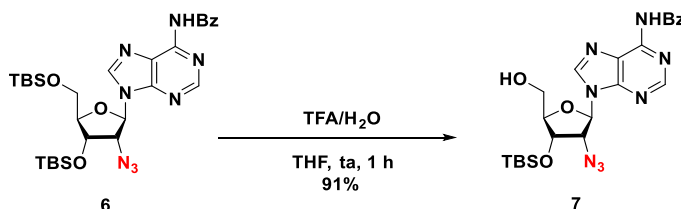


Schéma 54 : Désilylation sélective en 5'

2) Synthèse du dinucléotide modèle

La synthèse du dinucléotide modèle dCpA-2'-N₃ **9**, a été réalisée par couplage au phosphoramidites. Cette méthodologie maîtrisée au sein du laboratoire a facilité l'accès à de nombreux dinucléotides à partir de phosphoramidites commerciaux.⁷⁷ La première étape de la synthèse consiste à coupler l'extrémité 5'-OH du composé **7** à une desoxycytidine phosphoramidite commerciale en présence de tétrazole. Puis, l'ajout d'une solution de diiode permet d'oxyder le phosphite triester obtenu en phosphate triester plus stable. Enfin, le

⁷⁷ Chemama, M., Fonvielle, M., Villet, R., Arthur, M., Valery, J. M., Etheve-Quelquejeu, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 129, 12642-12643.

traitement par une solution d'acide trichloracétique permet de se débarrasser du groupement diméthoxytrityle porté par la cytidine en position 5'. Le dinucléotide protégé **8** est alors obtenu avec un rendement de 83% (Schéma 55).

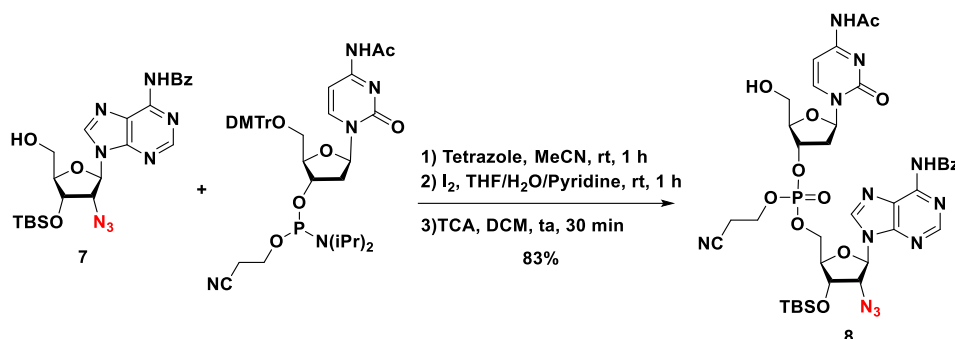


Schéma 55 : Synthèse du dinucléotide dCpA-2'-N₃ protégé **8**

Deux étapes de déprotection sont ensuite nécessaires afin d'accéder au dinucléotide modèle **9**. Un premier traitement à la méthylamine permet la déprotection des groupements acétyle, benzoyle et cyanoéthyle. Il est suivi d'une étape de déprotection du groupement TBS en présence de fluorure de césium. Le dinucléotide **9** complètement déprotégé est alors obtenu avec un rendement de 20% sur deux étapes, après purification sur HPLC (Schéma 56).

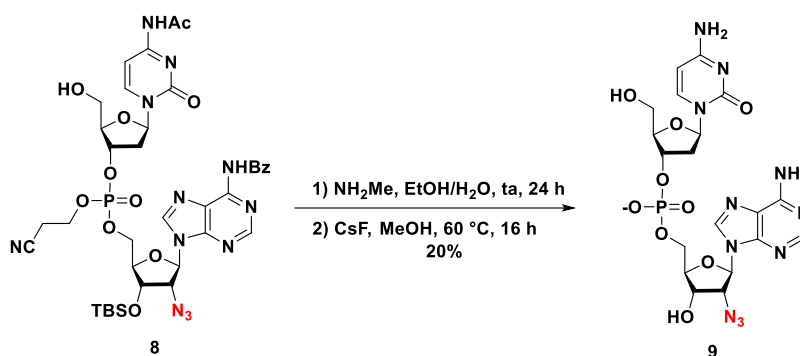


Schéma 56 : Synthèse du dinucléotide modèle **9**

Afin d'étudier la LSt, nous avons synthétisé un dinucléotide modèle, nous allons à présent nous intéresser à la synthèse des phosphines qui seront engagées dans cette réaction.

3) Synthèse des phosphines

Concernant le choix des phosphines, nous nous sommes tournés vers les esters phénoliques. Ces composés sont facilement accessibles par couplage entre le diphenylphosphanyle phénol commercial et un acide carboxylique en présence de DCC et de DMAP (Schéma 57).

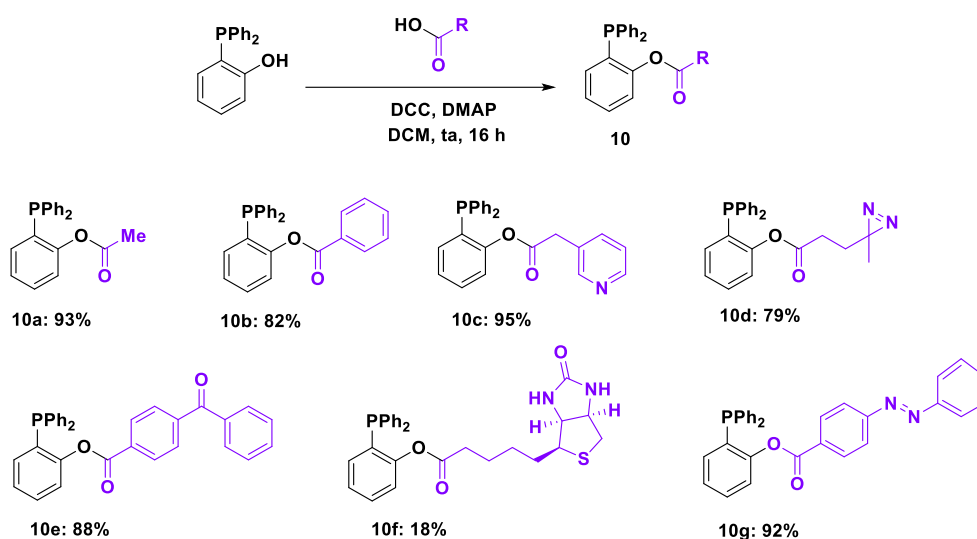


Schéma 57 : Synthèse des phosphines

Dans ces conditions, 7 phosphines ont été obtenues avec des rendements compris entre 18% et 95% (Schéma 57). Les phosphines **10a**, **10b** et **10c**, substituées par des groupements méthyle, phényle et pyridine ont été préparées avec des rendements de 93% ; 82% et 95% respectivement. Nous avons ensuite introduit des groupements réactifs communément utilisés pour la fonctionnalisation de biomolécules. Les phosphines portant des motifs photo-activables tels qu'une benzophénone ou une diazirine ont été obtenues avec des rendements de 88% et 79%. Le diazobenzène qui possède des propriétés « photoswitch » a été couplé à la phosphine avec un rendement de 92%. Enfin, la phosphine **10f** fonctionnalisée par une biotine a été obtenue avec un rendement de 18%.

Nous avons ensuite porté notre attention sur la préparation de la phosphine **10j** présentant un groupement sydnone. En effet, ce motif mésoionique⁷⁸ apparaît aujourd'hui comme un partenaire de choix pour la bioconjugaison de biomolécules, notamment lors de réactions de « click & release » en présence de cyclooctynes.⁷⁹ Pour cela, nous avons choisi d'introduire la sydnone sur la phosphine par l'intermédiaire d'un lien β -alanine. La phosphine **10h** a alors été synthétisée dans les conditions précédemment décrites avec un rendement de 84%. Le groupement Boc a ensuite été déprotégé par une solution d'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane afin d'obtenir le composé **10i** avec un rendement de 75%. Afin d'introduire le motif sydnone, nous nous sommes inspiré des travaux de l'équipe de F. Taran qui étudie leur réactivité en milieu biologique et vient récemment de mettre au point la synthèse

⁷⁸ de la Conception, J. G., Martinez, R. F., Cintas, P., Cintas, P., Jimenez, J. **2018**, DOI: <http://dx.medra.org/10.17374/targets.2018.21.228>.

⁷⁹ Decuypere, E., Plougastel, L., Audisio, D., Taran, F. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 11515-11527.

d'iminosydnones activées sous forme de carbonyle imidazolium **11**.⁸⁰ Ces composés hautement électrophiles permettent de créer un lien carbamate suite à l'attaque d'une amine primaire. Afin d'obtenir la phosphine sydnone **10j**, le composé **11** a alors été préparé selon la procédure décrite par ce même groupe. Enfin, la phosphine β -alanine **10i** a été mise en présence de la sydnone activée **11** et de DIPEA, pour conduire à la formation du composé **10j** avec un rendement de 54% (Schéma 58).

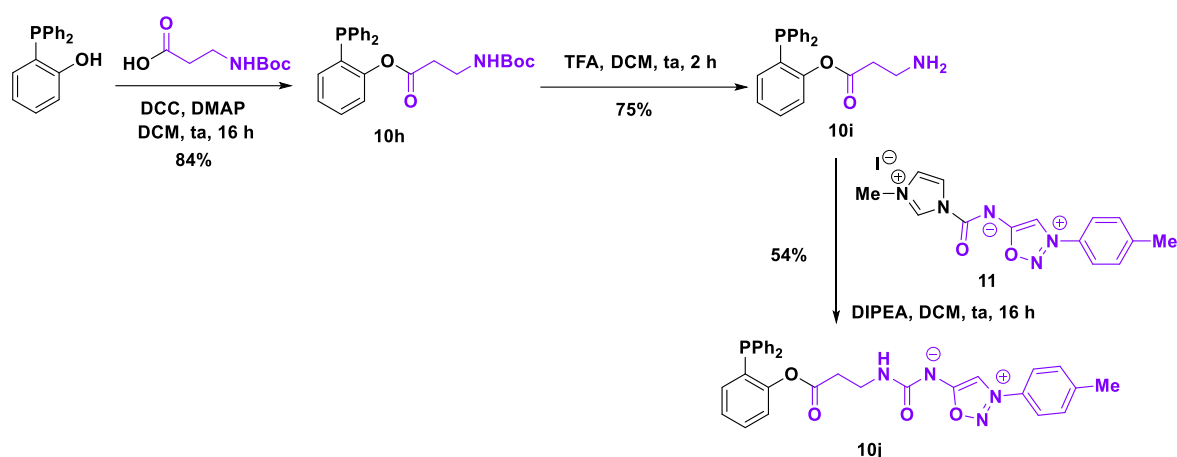


Schéma 58 : Synthèse de la phosphine-sydnone **10j**

Nous venons de décrire la synthèse des partenaires nécessaires pour la LSt, le dCpA-2'N₃ et les différentes phosphines portant des groupements d'intérêts. Avant de pouvoir appliquer cette méthodologie à la fonctionnalisation d'un ARN, nous allons mettre au point les conditions de la réaction sur un système modèle. Ce dernier sera constitué du dinucléotide modèle dCpA-2'-N₃ et de la phosphine méthyle ester.

C) Application de la LSt pour la fonctionnalisation d'un dinucléotide modèle

1) Mise au point des conditions de LSt

Tout d'abord nous avons vérifié la faisabilité de la LSt sur un dinucléotide. En nous basant sur les conditions décrites par Bertozzi,⁸¹ le dinucléotide **9** a été mis en présence d'un excès de phosphine **10a** dans un mélange DMF/H₂O à température ambiante pendant 16h. Après analyse et quantification par LCMS, nous observons la formation de l'amide **12** avec un rendement de 7% (Tableau 1, Entrée 1). La formation d'un sous-produit cyclique de type oxazaphospholane **12'** a également été observée avec un rendement de 78%. La formation

⁸⁰ Riomet, M., Porte, K., Madegard, L., Thuéry, P., Audisio, D., Taran, F. *Org. Lett.* **2020**, 6, 2403-2408.

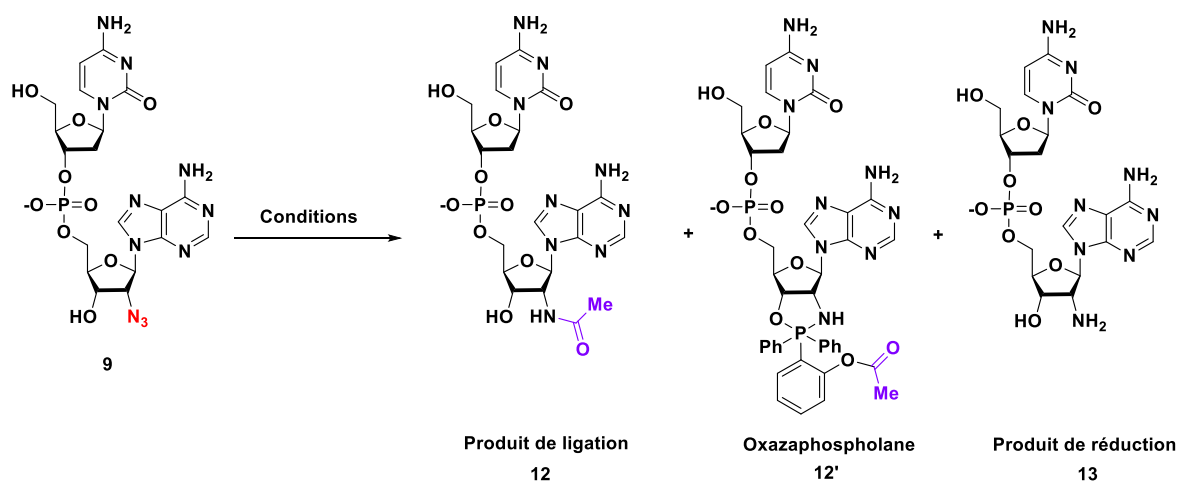
⁸¹ Saxon, E., Armstrong, J. I., Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* **2000**, 2, 1939-1941.

de ce dernier est due à l'attaque de l'oxygène sur le phosphore. Cette étape est favorisée par le positionnement en *1,2-cis* du 3'-OH et de l'azoture en position 2' de l'adénosine terminale.⁸² Bien que la création du lien amide par LSt soit compatible avec la nature d'un dinucléotide (groupement phosphate, fonction amine et alcool libres), le rendement obtenu reste relativement faible dans ces conditions. Nous nous sommes alors intéressés à deux paramètres pouvant favoriser la formation du produit de ligation à savoir la température et la nature de la phosphine. L'augmentation de la température à 40 °C nous a permis d'obtenir le produit de ligation **12** avec un rendement de 10% et l'oxazaphospholane **12'** a été observé avec un rendement de 90% (Tableau 1, Entrée 2). Nous avons également réalisé la réaction sous irradiation micro-onde à 70 °C pendant 10 min, dans ce cas le composé cyclique est formé majoritairement avec un rendement de 89% (Tableau 1, Entrée 3). En nous inspirant des conditions mises au point par le groupe de Bernardi dans le cadre de la synthèse de glycosylamide,⁸³ le mélange réactionnel a été chauffé à 70 °C pendant 4 h, suivit d'un traitement aqueux pendant 2 h à 70 °C. Cette étape supplémentaire entraînerait l'hydrolyse de l'adduit cyclique et favoriserait le transfert d'acyle. Ces conditions nous ont alors permis d'obtenir le produit de ligation **12** avec un rendement de 22%. Les deux sous-produits de la réaction ont également été mis en évidence avec des rendements de 50% pour l'amine **13** et de 28% pour l'oxazaphospholane **12'** (Tableau 1, Entrée 4). Enfin, nous avons évalué l'influence de la nature de la phosphine au cours de la ligation. Pour cela, nous nous sommes tournés vers la phosphine méthyle thioester décrite par Raines. Cette phosphine commerciale **10k** est disponible sous sa forme protégée par un groupement borane afin d'éviter son oxydation. La ligation a été réalisée en présence de DABCO qui permet de déprotéger la phosphine, à 40 °C pendant 16 h afin d'obtenir le produit de ligation **12** avec un rendement de 23% et le produit de réduction **13** avec un rendement de 77% (Tableau 1, Entrée 5).⁸⁴ Dans ce cas, nous n'avons pas observé de formation de l'oxazaphospholane mais le phénomène de réduction reste largement majoritaire.

⁸² Nisic, F., Speciale, G., Bernardi, A. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6895-6909.

⁸³ a) Bianchi, A., Bernardi, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 12, 4565-4577. b) Nisic, F., Andreini, M., Bernardi, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5744-5751.

⁸⁴ Grandjean, C., Boutonnier, A., Guerreiro, C., Fourniers, J. M., Mulard, L. A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7123-7132.



Entrée	Phosphine	Conditions	12	12'	13
1	 10a	DMF/H ₂ O 9/1 ta, 16 h ^b	7% ^a	78% ^a	-
2	 10a	DMF/H ₂ O 9/1 40 °C, 16 h	10% ^a	90% ^a	-
3	 10a	DMF/H ₂ O 9/1 MW, 70 °C, 10 min	11% ^a	89% ^a	-
4	 10a	1) DMF/H ₂ O 9/1, 70 °C, 4 h, 2) H ₂ O, 70 °C, 2 h	22% ^a	28% ^a	50% ^a
5	 10k	DABCO, DMF/H ₂ O 9/1, 40 °C, 16 h	23% ^a	-	77% ^a

Tableau 1 : Mise au point des conditions de la ligation de Staudinger traceless. ^a : rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 254nm, ^b : Dans ces conditions on récupère 15% de produit de départ 9.

La phosphine de Raines permet d'obtenir l'amide avec un rendement de 23%, mais le taux de réduction reste très important. De plus, ce type de phosphine est très sensible à l'oxydation et la fonctionnalisation des thiophosphines par différents groupements nécessite une synthèse relativement longue. Afin d'étendre cette réaction aux autres phosphines précédemment

synthétisées, nous avons choisi d'utiliser les conditions décrites [Tableau 1, Entrée 4](#), à savoir : chauffer le milieu réactionnel à 70 °C pendant 4 h, dans un mélange DMF/H₂O en présence de phosphine phényle ester suivi d'un ajout d'H₂O. Ces conditions nous permettent d'accéder au produit de ligation désiré avec des rendements sensiblement proches de ceux obtenus avec les thiophosphines tout en utilisant des phosphines facilement accessibles.

La série de résultats que nous avons présenté nous a permis de mettre au point des conditions réactionnelles permettant de réaliser la LSt sur un dinucléotide. Nous avons également mis en évidence la présence d'un sous-produit cyclique de type oxazaphospholane dont nous allons à présent étudier la formation au cours de la réaction.

2) Mise en évidence de l'oxazaphospholane

Si le produit de la réduction de l'azoture en amine est bien connu pour être en compétition avec la formation de l'amide au cours de la LSt, très peu d'exemples dans la littérature abordent la formation d'un sous-produit cyclique de type oxazaphospholane. A notre connaissance seul le groupe de Bernardi a décrit la formation d'oxazaphospholane lors de l'application de la LSt à la fonctionnalisation de β -glycofuranosyl azides ([Schéma 59](#)). La stéréosélectivité de cette réaction à partir de β -N₃-galactofuranosyl est contrôlée par le groupement hydroxyle porté par le carbone en position 2 ce qui conduit à la formation de l'amide du même côté que ce dernier (anomère α favorisé). En effet cette épimerisation particulière pourrait s'expliquer par l'ouverture du furanose suite à la formation de l'iminophosphorane, permettant à ce dernier de se positionner en position 1,2 *cis* de l'hydroxyle adjacent. L'étape de fermeture du cycle serait biaisée par le caractère oxophile du phosphore. L'attaque de l'oxygène sur le phosphore et de la phosphinimine conduirait à la formation de l'oxazaphospholane suivi du transfert d'acyle. Enfin l'hydrolyse du composé cyclique dans l'eau conduirait uniquement à l'amide 1,2-*cis* ([Schéma 59](#)).⁸⁵

⁸⁵ Nisic, F., Speciale, G., Bernardi, A. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6895-6909.

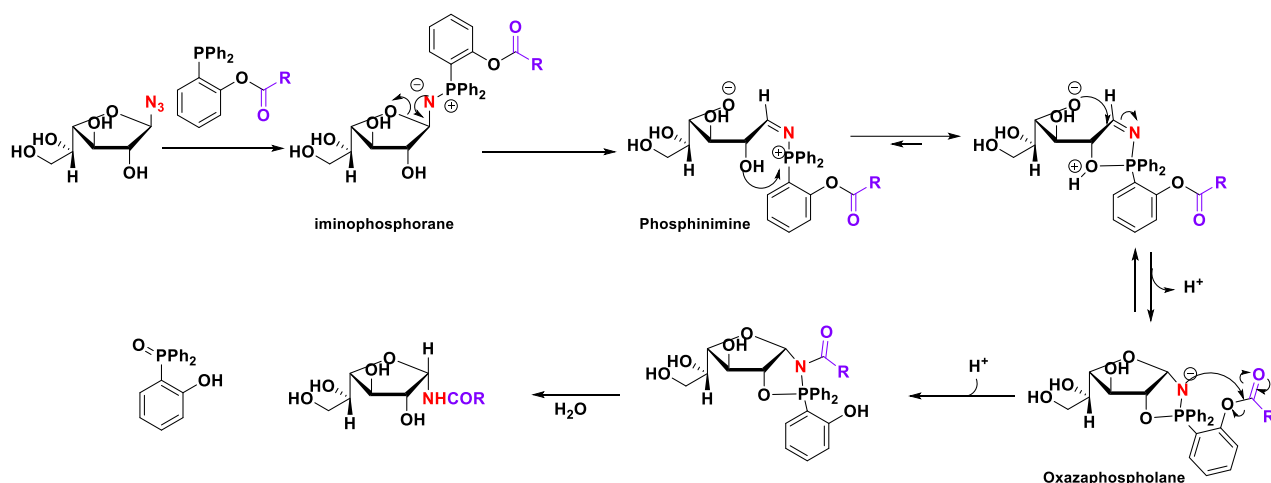


Schéma 59 : Proposition de mécanisme pour la formation du 1,2 cis amide à partir de glucofuranosyl azide déprotégé⁸⁵

Dans le cas de notre dinucléotide modèle **9**, le positionnement de l'azoture en *cis* du OH en 3' conduit inévitablement à la formation de l'adduit cyclique au cours de la LSt. Afin de mettre en évidence la formation de l'oxazaphospholane, nous avons réalisé un suivi de la réaction par RMN ³¹P dans le but d'observer la formation de la liaison oxygène-phosphore. Pour cela, la réaction a été effectuée dans un tube RMN dans un mélange 9/1 DMF/ D₂O à 70 °C en présence de la phosphine **10a**. L'acquisition du spectre RMN au bout de 55 min révèle l'apparition d'un nouveau signal à **+32.6 ppm**, ne correspondant pas à la phosphine de départ (-15.8 ppm) ni à la phosphine oxydée présentant des pics caractéristiques entre 20 ppm et 30 ppm (Figure 4).

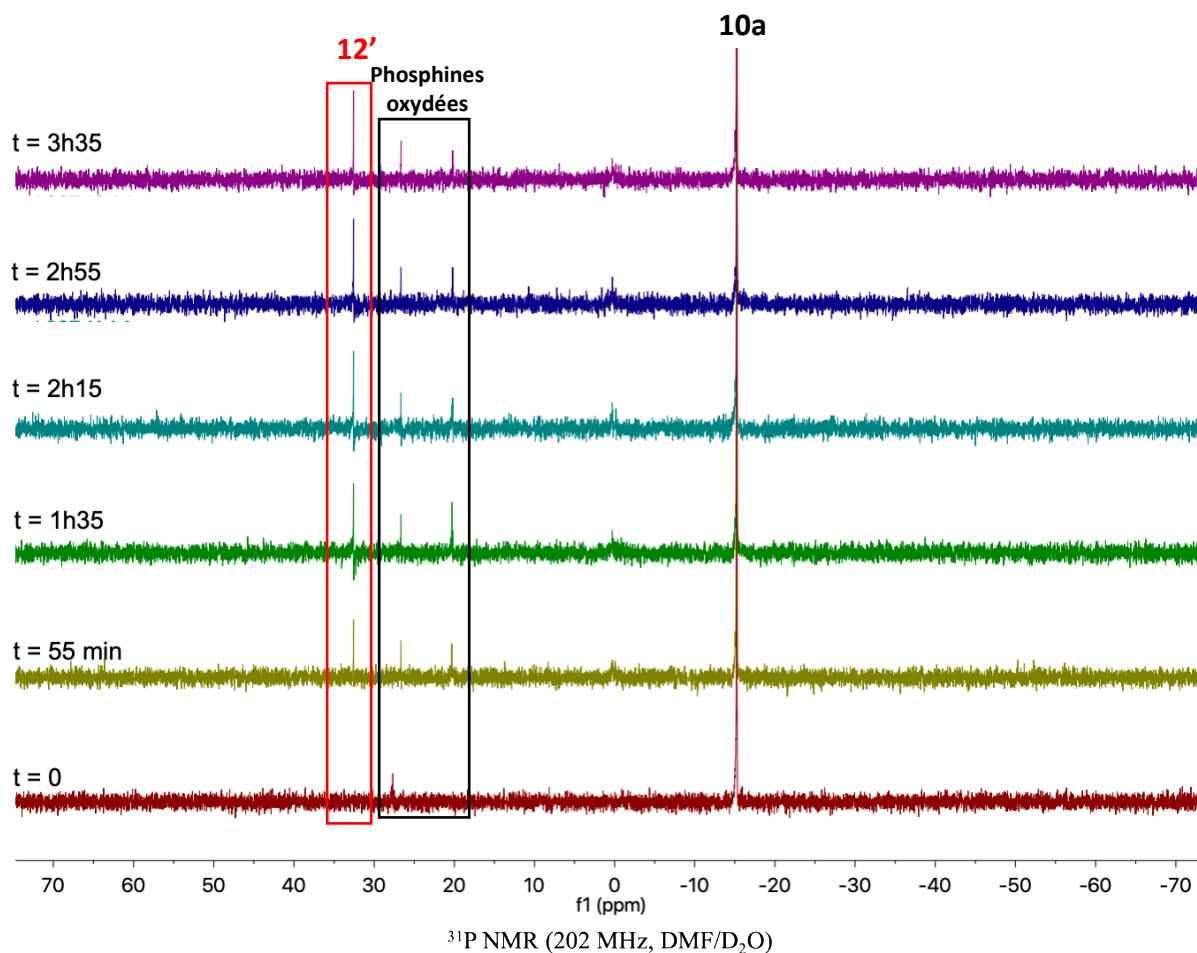


Figure 4 : Mise en évidence de l'oxazaphospholane **12'** par RMN ^{31}P

Nous avons constaté au cours de notre étude que ce composé cyclique n'est observé que lorsque la réaction est réalisée avec la phosphine ester et non pas avec la thiophosphine **10k**. Nous en déduisons que l'effet inductif attracteur exercé par le phényle présent sur ce type de phosphine (**10a** à **10h**) pourrait augmenter l'électrophilie du phosphore favorisant ainsi la cyclisation.

3) Mécanisme postulé de la LSt pour la fonctionnalisation de dinucléotide

D'après toutes les données que nous avons en main, nous pouvons proposer un mécanisme réactionnel conduisant à la formation des trois composés que nous observons (Schéma 60).

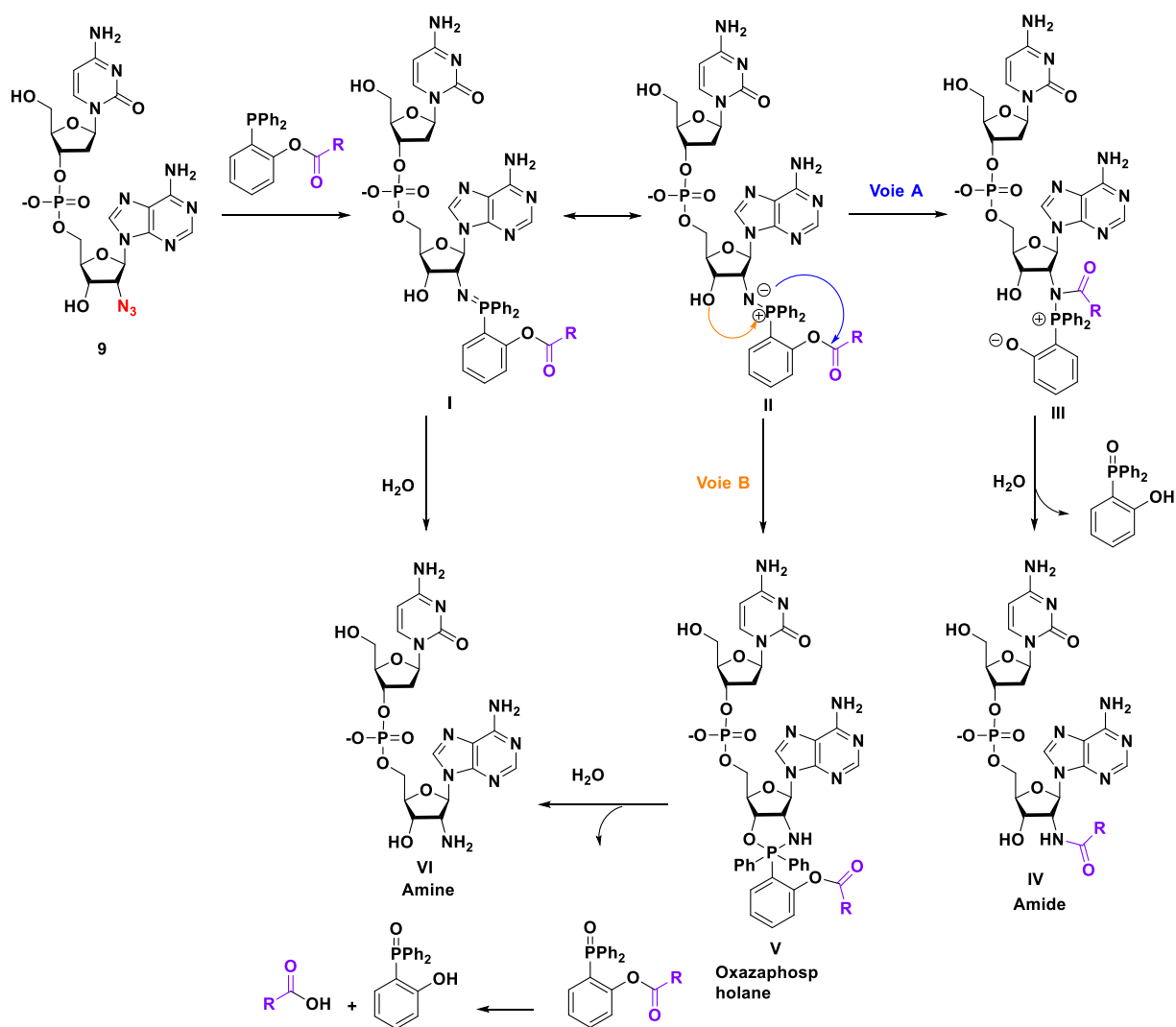


Schéma 60 : Mécanisme réactionnel proposé pour la LSt en présence de phosphinephénylester

Après la formation de l'intermédiaire iminophosphorane **I**, une étape de réduction de Staudinger pourrait directement mener à la formation du 2'-NH₂-dinucléotide **VI**. Cette réaction serait en compétition avec le transfert d'acyle de la phosphine vers l'azote de l'iminophosphorane (voie A). Cette étape serait favorisée par un intermédiaire réactionnel à 6 chaînons et conduirait au composé **III**; ce dernier permettant d'accéder, après hydrolyse en présence d'eau, à l'amide **IV**. L'iminophosphorane et l'hydroxyle en position 3' étant en configuration *cis*, cela favoriserait l'étape de cyclisation intramoléculaire et donnerait lieu à la formation de l'oxazaphospholane **V** (voie B). Cette réactivité ayant déjà été rapportée par Bernardi sur des azido-glycofuranosyles.⁸⁶ Le caractère basique de l'iminophosphorane⁸⁷

⁸⁶ Nisic, F., Speciale, G., Bernardi, A. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6895-6906.

⁸⁷ Nunez, M. G., Farley, A. G., Dixon D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16348-16351.

pourrait également promouvoir la déprotonation de l'alcool en position 3' et favoriserait l'attaque sur le phosphore. L'hydrolyse de l'oxazaphospholane **V** conduirait finalement, après hydrolyse, à la formation de l'amine **VI** ainsi qu'à l'oxydation de la phosphine.

Lorsque la LSt est réalisée en présence de la thiophosphine **10k**, la formation de l'oxazaphospholane n'est pas observée, ce qui nous laisse penser que le mécanisme est différent dans ce cas (Schéma 61).

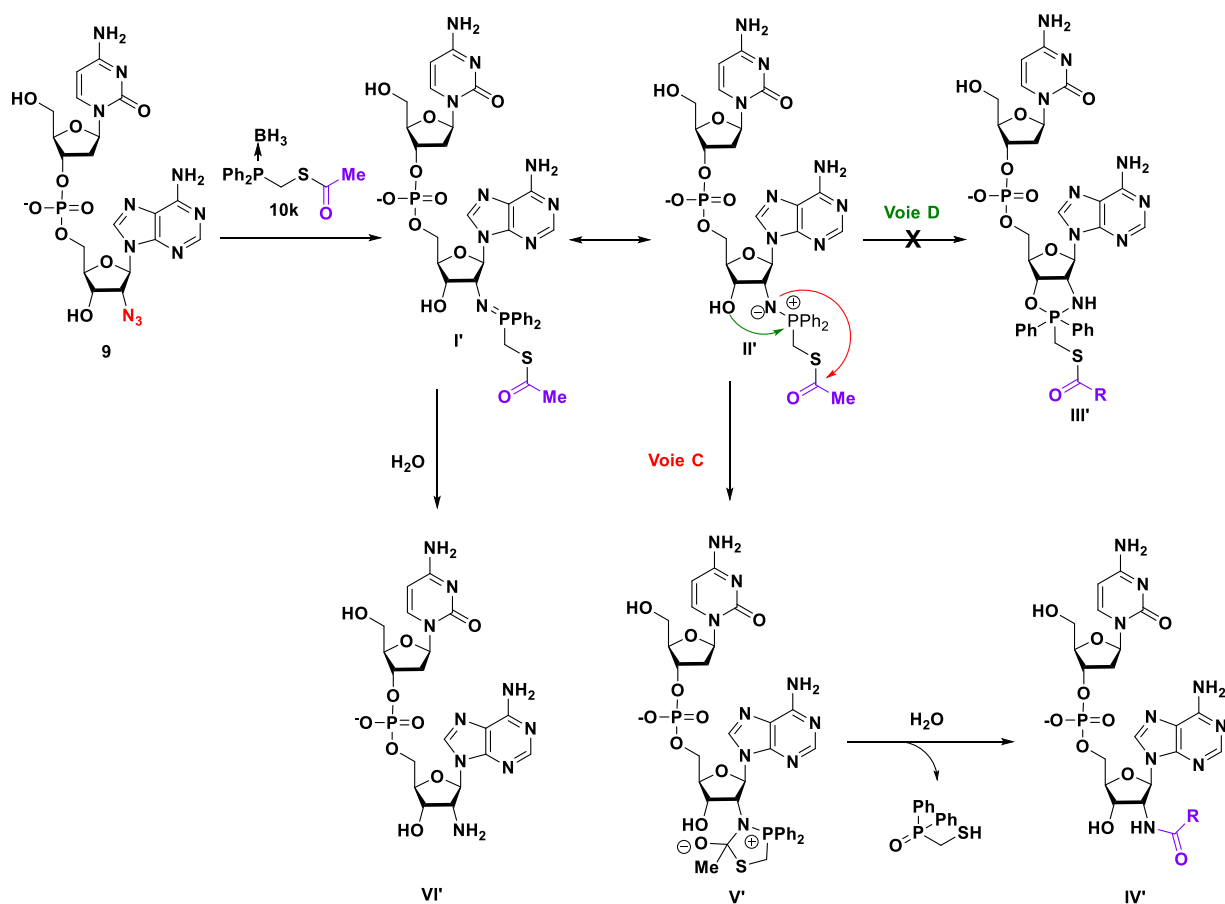


Schéma 61 : Mécanisme réactionnel proposé pour la LSt en présence de la thiophosphine **10k**

En présence de la thiophosphine **10k**, le dinucleotide **9** conduirait à l'imino-phosphorane **I'** qui pourrait être hydrolysé en présence d'eau afin de conduire à l'amine **VI'**. Le transfert d'acyle serait favorisé dans ce cas par la formation d'un intermédiaire réactionnel à 5 chaînons **II'**, et conduirait à la formation de l'intermédiaire **V'**. L'hydrolyse de ce dernier en présence d' H_2O conduirait à l'amide **IV'** (voie C). L'oxazaphospholane **III'** n'étant pas observé (voie D), nous supposons que le groupement méthylène porté par le phosphore le rend moins électrophile (comparativement à la présence d'un phényle pour la phosphine **10a**), ce qui empêcherait l'attaque en position 3'.

Les résultats de cette étude nous ont permis une meilleure compréhension de LSt pour la fonctionnalisation de la position 2' de l'adénosine terminale du dinucléotide dCpA-2'-N₃. Nous allons à présent exposer les résultats obtenus dans le cadre de l'exemplification de cette méthodologie.

D) Exemplification

Les conditions mises au point ont été étendues aux différentes phosphines précédemment synthétisées (Schémas 57 et 58). Lorsque les phosphines contenant un motif phényle ou pyridine ont été utilisées pour la bionconjugaison du dinucléotide **9**, les composés **14** et **15** ont été obtenus avec des rendements de 77% et de 27% respectivement. Les dinucléotides photoactivables **16** et **17** ont été obtenus avec des rendements de 12% et 76% à partir des phosphines **10d** et **10e**. Il est également possible d'introduire une biotine en position 2' terminal du dinucléotide **9** par réaction en présence de la phosphine **10f**. Le produit de ligation correspondant est alors obtenu avec un rendement de 59%. La ligation à partir de la phosphine **10g** a permis d'accéder au composé **19** contenant un motif «photoswitch» de type diazobenzène avec un rendement de 47%. Enfin, un conjugué dinucléotide-sydnone **20** a pu être obtenu par LSt avec un rendement de 86% (Schéma 62). Il semblerait que l'encombrement stérique ainsi que les effets électroniques (plus particulièrement l'effet mésomère attracteur des substituants portés par les phosphines) favoriseraient le transfert d'acyle. Afin de confirmer cette tendance il serait judicieux d'élargir la gamme de groupements d'intérêt à introduire.

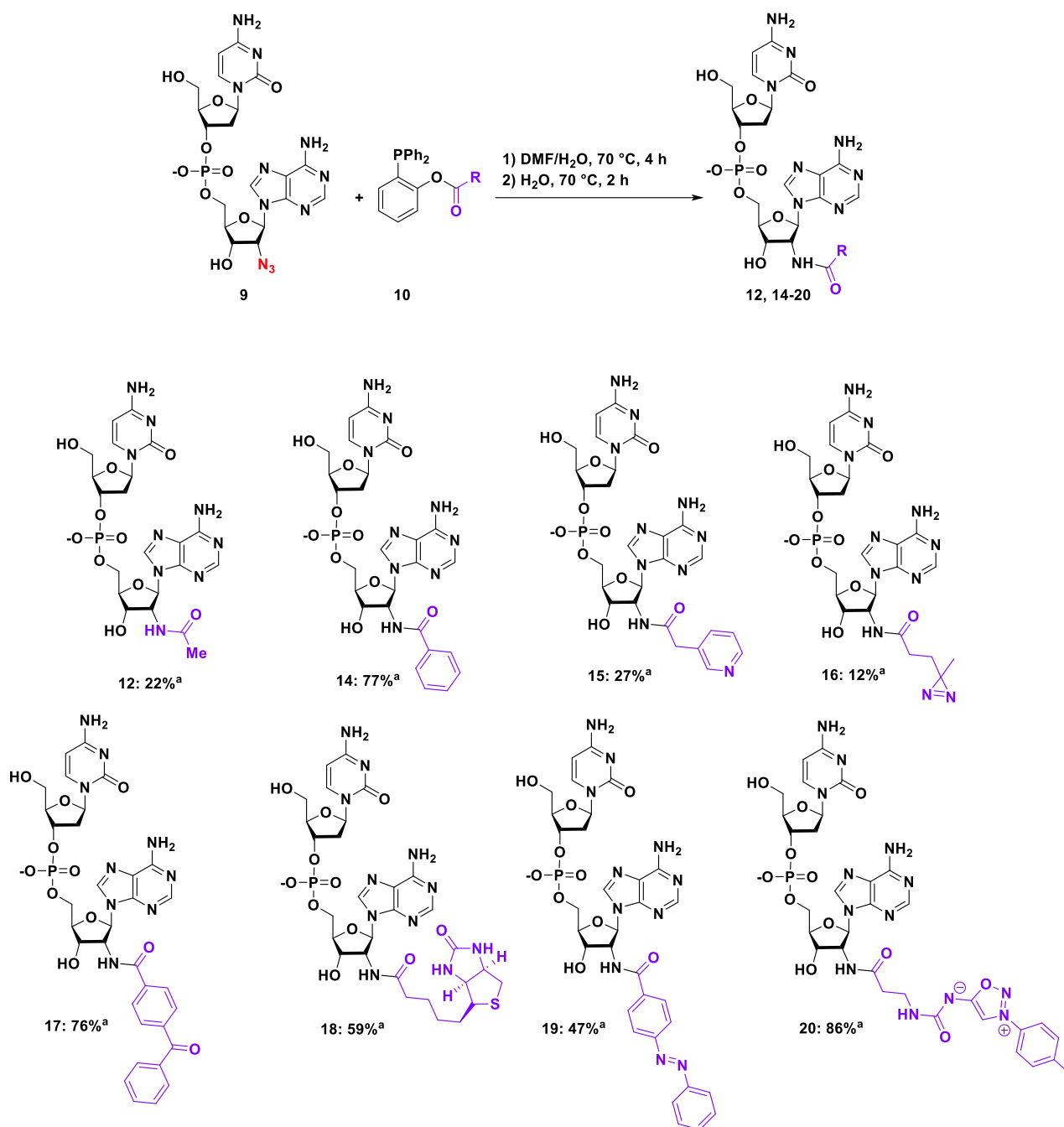


Schéma 62 : Fonctionnalisation de dinucléotides par ligation de Staudinger traceless. ^a : rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 254 nm

L'exemplification que nous venons de présenter permet de valider la méthodologie de LSt pour la fonctionnalisation de la position 2' de l'adénosine terminale d'un dinucléotide dCpA-2'-N₃. En effet, nous avons obtenu 8 dinucléotides fonctionnalisés par différents groupements d'intérêt. Nous avons ensuite étendu ces conditions à la modification d'un ARN-2'-N₃. Dans un premier temps nous décrivons la synthèse de l'ARN-N₃ puis nous appliquerons la LSt sur ce dernier en présence de la phosphine benzophénone.

E) Application de la LSt à la fonctionnalisation d'un ARN

La stratégie de synthèse de l'azido-ARN **23**, repose sur une ligation enzymatique catalysée par la T4 RNA ligase entre une micro-hélice d'ARN et le dinucléotide **22**. Ce dernier résulterait d'un couplage aux phosphoramidites entre la désoxycytidine commerciale et la 2'-azido- adénosine **7** suivi d'une étape de phosphorylation (Schéma 63).

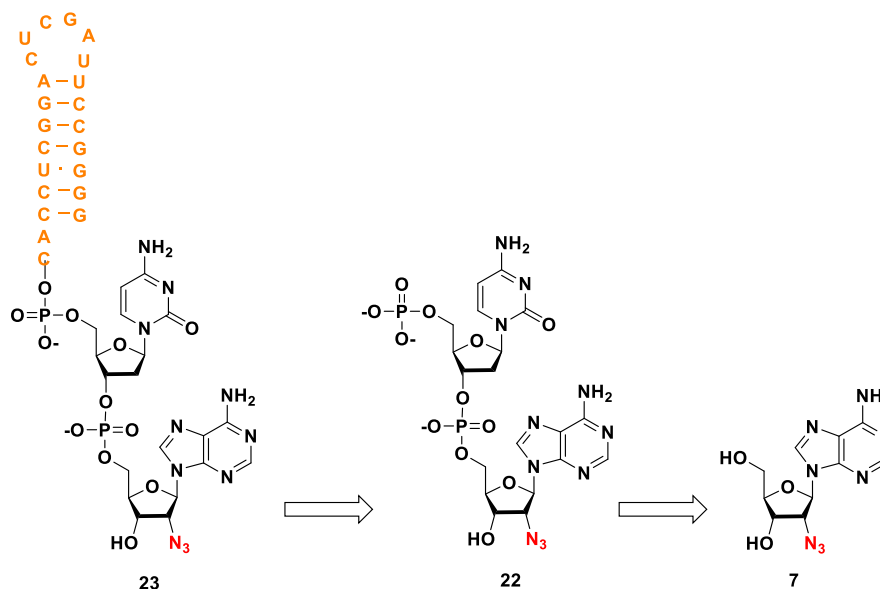


Schéma 63 : Schéma rétrosynthétique conduisant à l'ARN-2'-N₃ **23**

1) Synthèse du réactif de monophosphorylation

Afin de réaliser la phosphorylation de la position 5' de la cytidine, il est nécessaire de préparer le bis(2-cyanoéthyle) diisopropylphosphoramidite.⁸⁸ L'ajout à 0 °C du 3-hydroxypropionitrile à une solution de cyanoéthyle-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite dans le THF conduit au composé **21** avec un rendement de 18 % (Schéma 64).

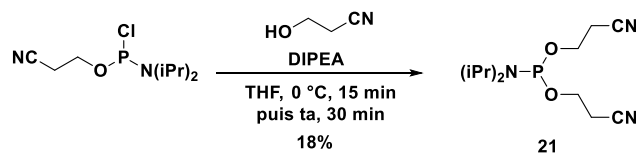


Schéma 64 : Synthèse du réactif de monophosphorylation **21**

2) Synthèse du dinucléotide pdCpA-N₃

⁸⁸ Marchan, V., Rodriguez-Tanty, C., Estrada, M., Pedrosa, E., Grandas, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 13, 2495-2500.

Le couplage nucléotidique par la méthode des phosphoramidites conduisant au dinucléotide **8** à partir du nucléoside **7** a été présenté précédemment. La phosphorylation de la position 5' a été réalisée en présence du bis(2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite **21** et de tétrazole dans le MeCN pendant 3 h à température ambiante. Puis le triphosphite ester résultant est oxydé en phosphate triester par une solution de diiode. Enfin un traitement à la méthylamine suivi d'une déprotection au fluorure de césium permet d'obtenir le dinucléotide **22** totalement déprotégé avec un rendement de 7% sur 4 étapes, après purification HPLC (Schéma 65).

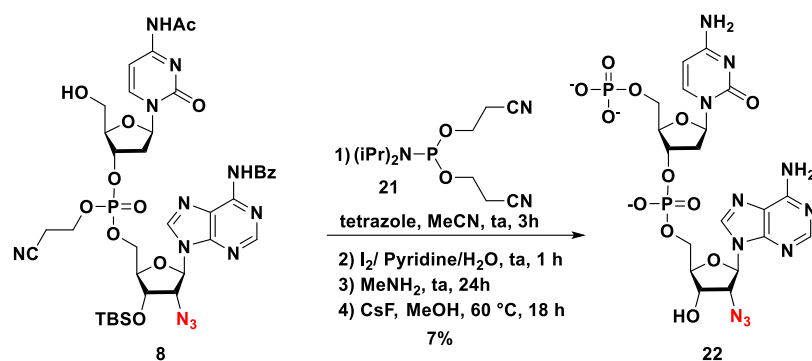


Schéma 65 : Synthèse du dinucléotide **22** phosphorylé en position 5'

3) Synthèse de l'ARN-2'-N₃

La ligation enzymatique du dinucléotide **22** à l'extrémité 3' d'une micro-hélice d'ARN a été réalisée par le Dr Matthieu Fonvielle dans des conditions précédemment décrites au laboratoire.⁸⁹ Afin d'accéder à un ARN de 24-nt nous avons choisi une micro-hélice de 22-nt. Cette microhélice d'ARN est mise en présence du pdCpA-2'-N₃ **22**, dans un tampon HEPES contenant de la T4-RNA ligase ainsi que de l'ATP et du MgCl. La réaction est réalisée à 37 °C pendant 2 h. Le produit de ligation a été purifié par chromatographie échangeuse d'ions et les différentes fractions ont été identifiées par gel SDS-PAGE ce qui a permis d'isoler l'ARN-2'-N₃ **23** (Schéma 66).

⁸⁹ a) Heckler, T., Chang, L. H., Zama, Y., Naka, T., Chorghade, M. S., Hecht, S. M. *Biochemistry* **1984**, 23, 1468-147; b) Robertson, S. A., Noren, C. J., Anthony-Cahill, S. J., Grith, M. C, Schultz, P. G. *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 9649-9660; c) Mellal, D., Fonvielle, M., Santarem, M., Chemama, M., Schneider, Y., Iannazzo, L., Braud, E., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 6161-6169.

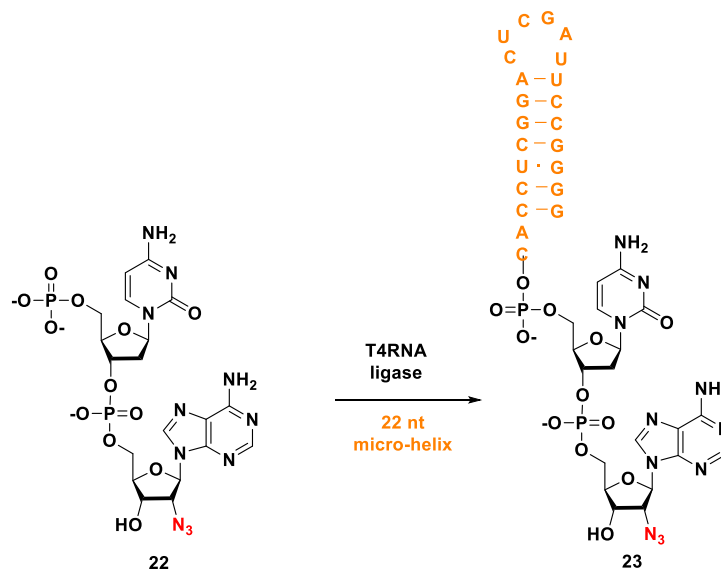


Schéma 66 : Synthèse de l'ARN-2'-N₃ **23**

4) Application de la LSt à la post-fonctionnalisation d'ARN

Afin d'accéder à un ARN fonctionnalisé, l'ARN 24-nt **23** a été soumis à des conditions de LSt. Cet ARN est mis en présence de 100 équivalents de phosphine **10e** dans un mélange 5/5 DMF/H₂O à 70 °C pendant 4 h, suivi d'un traitement aqueux pendant 2 h à la même température. La formation du produit de ligation avec un rendement de 7% a été confirmée par spectrométrie de masse MALDI-TOF ; un pic [M] = 7838 Da correspondant au produit **24** a été observé (Schéma 67). Au cours de la réaction le produit de réduction **25** ([M] = 7625 Da) et l'oxazaphospholane **24'** ([M] = 8111 Da) ont également été mis en évidence.

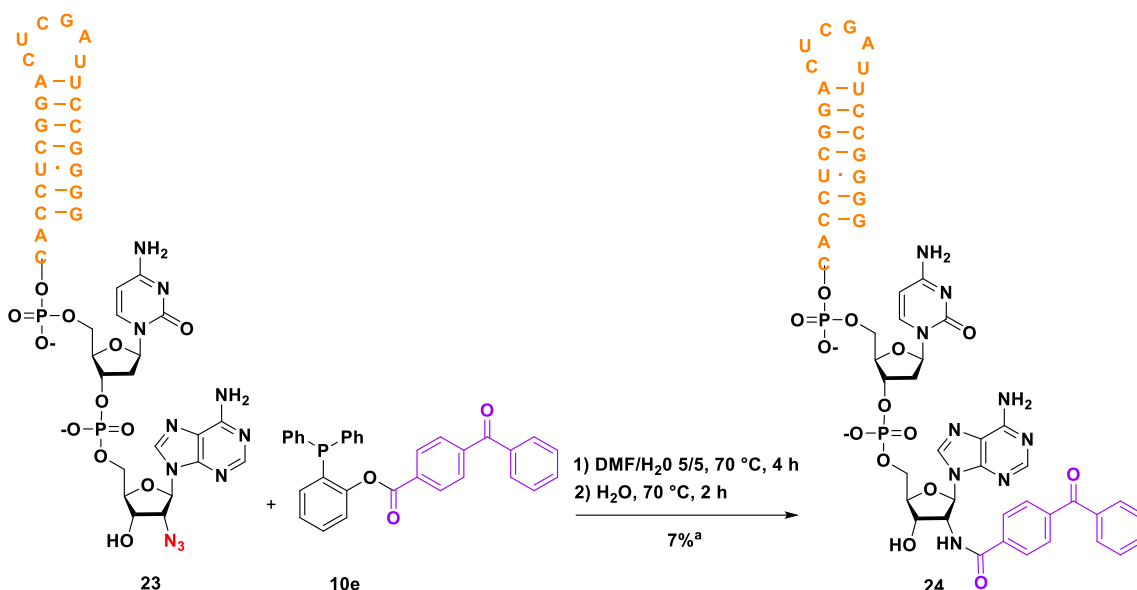


Schéma 67 : LSt sur un ARN 24-nt. ^a : rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 260 nm

F) Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit le premier exemple de bioconjugaison d'un ARN par LSt.⁹⁰ Ce travail a conduit à la synthèse d'un dinucléotide modifié sur lequel un azoture a été introduit en position 2', ainsi que la préparation de 8 phosphines portant des groupements d'intérêts. La mise au point des conditions de la réaction nous a permis d'accéder à 8 dinucléotides amide et de mettre en évidence un adduit de type oxazaphospholane cyclique. Enfin cette stratégie a été appliquée à la fonctionnalisation d'un ARN-2'-N₃, obtenu par ligation enzymatique à partir d'un dinucléotide pdCpA-2'N₃. Cet ARN modifié pourra être utilisé pour l'étude d'enzymes ARN-dépendantes tel que les transférases de la famille Fem. En effet, l'ARN obtenu pourrait être irradié à 365 nm, afin de générer un carbène réactif capable de former une liaison covalente avec l'enzyme.

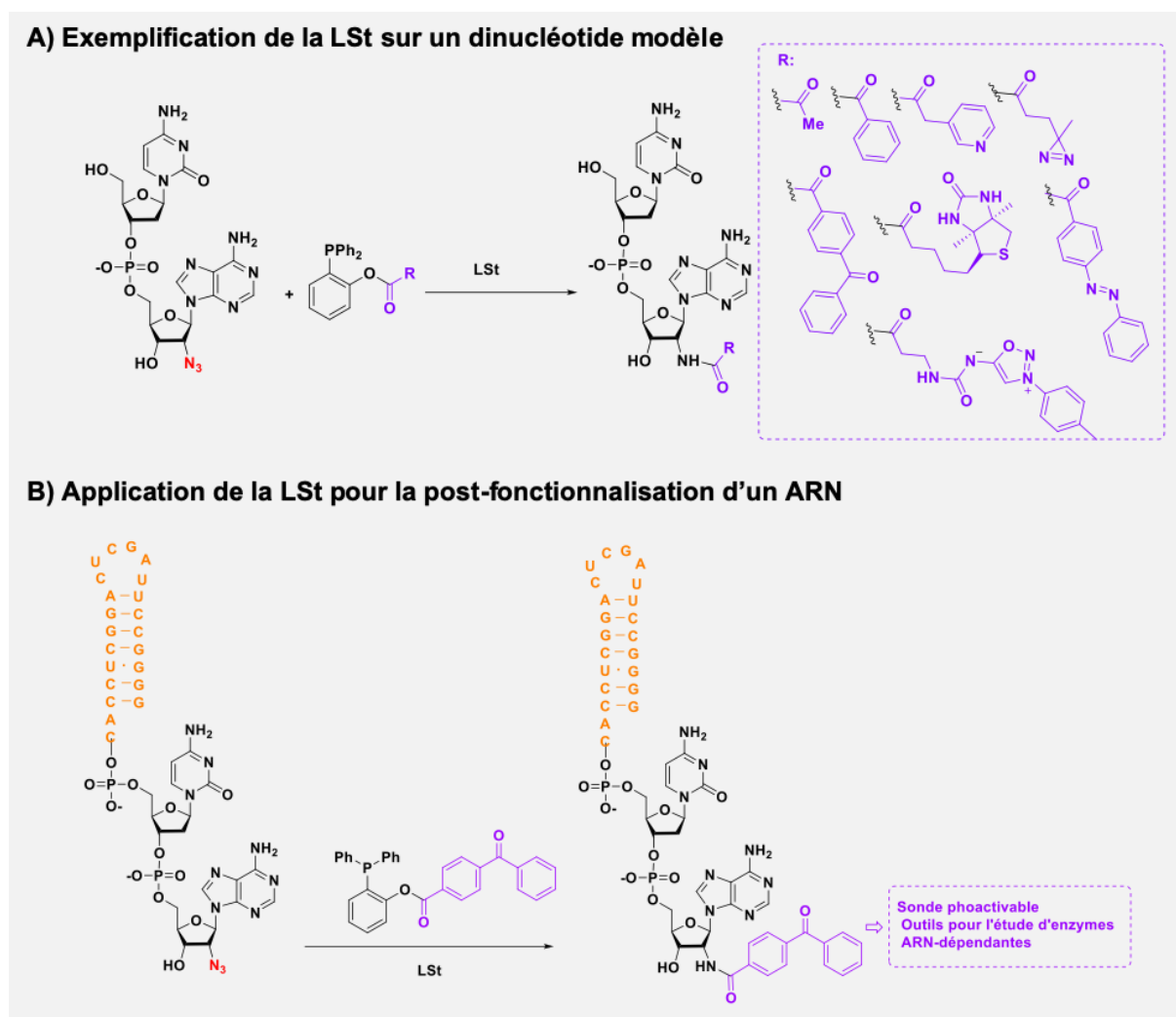


Schéma 68 : Bilan du chapitre II

⁹⁰ a) Kitoun, C., Fonvielle, M., Djago, F., Sakkas, N., Lefresne, M., Blancart Remaury, Q., Poinot, P., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M., Iannazzo, L. *Org. Lett.* **2020**, 22, 8034-8038 ; b) Kitoun, C., Fonvielle, M., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M., Iannazzo, L. *Current Protocols*, **2021**, e42, DOI: 10.1002/cpz1.42.

Chapitre III

Ligation de Staudinger traceless pour la synthèse d'analogues d'aminoacyl-ARNt

A) Introduction

1) Généralités

Les antibiotiques sont des substances chimiques naturelles ou synthétiques, capables d'inhiber la croissance des bactéries. Leur découverte revient à Sir A. Fleming, qui en 1928 a mis en évidence le pouvoir antibiotique d'une substance issue d'une souche de *Penicillium notatum*, la Pénicilline. En 1942 elle est commercialisée pour la première fois sous forme de médicament, initiant ainsi « l'ère de l'antibiothérapie ». Au cours des années suivantes, l'arsenal thérapeutique a été enrichi avec de nouvelles substances actives qui ont été isolées chez d'autres organismes. De nombreux dérivés semi-synthétiques et des antibiotiques de synthèse ont également été développés. Ces substances agissent sur différentes cibles au sein des cellules bactériennes (Figure 5) :

- 1) L'ADN topoisomérase : la famille des quinolones bloque la réplication de l'ADN en se complexant à l'ADN topoisomérase.⁹¹
- 2) Le ribosome : les antibiotiques agissent sur le processus de synthèse protéique en ciblant les sous-unités du ribosome, la sous unité 30S de ce dernier est inhibée par la streptomycine.⁹²
- 3) Le peptidoglycane : les β -lactamines sont une classe majeure d'antibiotiques agissant sur la paroi bactérienne en inhibant les enzymes responsables de sa biosynthèse.⁹³

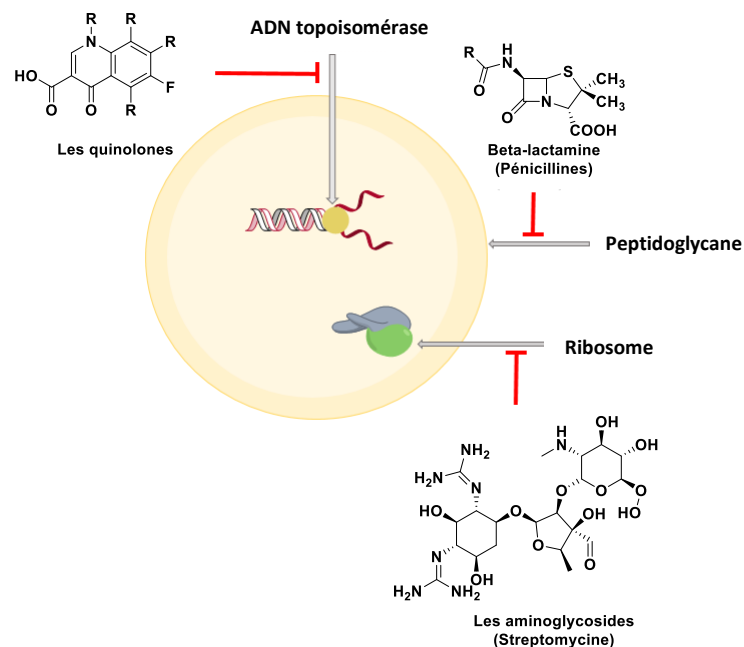


Figure 5 : Principales cibles cellulaires des antibiotiques

⁹¹ Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J., Zhao, X. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 385-392.

⁹² Galimand, M., Courvalin, P., Lambert, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, 56, 3960-3962.

⁹³ Lewis, K. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2013**, 12, 371-387.

Les antibiotiques sont considérés comme une des plus grandes découvertes du XX^{ème} siècle, leur usage thérapeutique à grande échelle ayant conduit à baisser de façon significative le taux de mortalité dû aux maladies infectieuses. Mais leur utilisation massive a engendré l'émergence de phénomènes de résistance.⁹⁴ Dès la fin des années 1950, des études ont été menées sur la résistance de *Staphylococcus aureus* à la pénicilline et un nouveau médicament capable de contrer cette inactivation a été mis au point. C'est ainsi que la Méricilline est commercialisée 10 ans plus tard.⁹⁵

Après la Pénicilline, de hauts niveaux de résistance à la Vancomycine ont été observés chez certaines bactéries.⁹⁶ Dans les années 1990, *Staphylococcus aureus* a montré une baisse de sensibilité à cet antibiotique. Quelques années plus tard en 2003, deux souches pathogènes de ce dernier se sont révélées complètement résistantes à la Méricilline.⁹⁷

Ce phénomène de résistance est une problématique de santé publique majeure. On estime au sein de l'UE que 25000 morts par an sont causés par une infection bactérienne. Face à l'urgence de la situation, il devient important de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques afin de développer de nouvelles classes d'antibiotiques actifs.

Bien que le peptidoglycane soit une cible conventionnelle sur laquelle agissent les antibiotiques déjà existants, certaines enzymes de sa biosynthèse restent inexploitées et très peu connues. C'est le cas des transférases de la famille Fem. Avant de les présenter plus en détail, nous allons présenter quelques généralités concernant le peptidoglycane bactérien.

2) Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est un constituant essentiel et spécifique de la paroi bactérienne. Il est constitué de chaînes glycanes reliées entre elles par des ponts interpeptidiques. La partie osidique, polymérisée par des glycosyltransférases, est une succession d'unités *N*-acetylglucosamine (GlcNac) reliée par des liaisons β 1-4 à des acide *N*-acétylmuramique (MurNac). Chaque unité MurNac est attachée à un pentapeptide, ce dernier est substitué par une chaîne latérale variable en fonction des espèces. Ces chaînes latérales constituent le pont

⁹⁴ Davies, J., Davies, D. *Microbiology and Molecular Review*. **2010**, 74, 417-433.

⁹⁵ Tomoo, S., Keizo, Y. *Japon Medical Association Journal*. **2009**, 52, 103-108.

⁹⁶ Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J., Courvalin, P. *N. Engl. J. Med.* **1988**, 319, 157-161.

⁹⁷ a) Chang, F.Y., Peacock, J. E., Jr., Musher, D. M., Triplett, P., MacDonald, B. B., Mylotte, J. M., O'Donnell, A., Wagner, M. M., Yu, V.L. *Medicine*. **2003**, 82, 333-339; b) Weigel, L. M., Clewell, D. B., Gill, S. R., Clark, N. C., McDougal, L. K., Flannagan, S. E., Kolonay, J. F., Shetty, J., Killigore, G. E., Tenover, F. C. *Science*, **2003**. 302, 1569-1571.

inter-peptidique dont la formation est catalysée par des transférases de la famille Fem (Schéma 69).⁹⁸

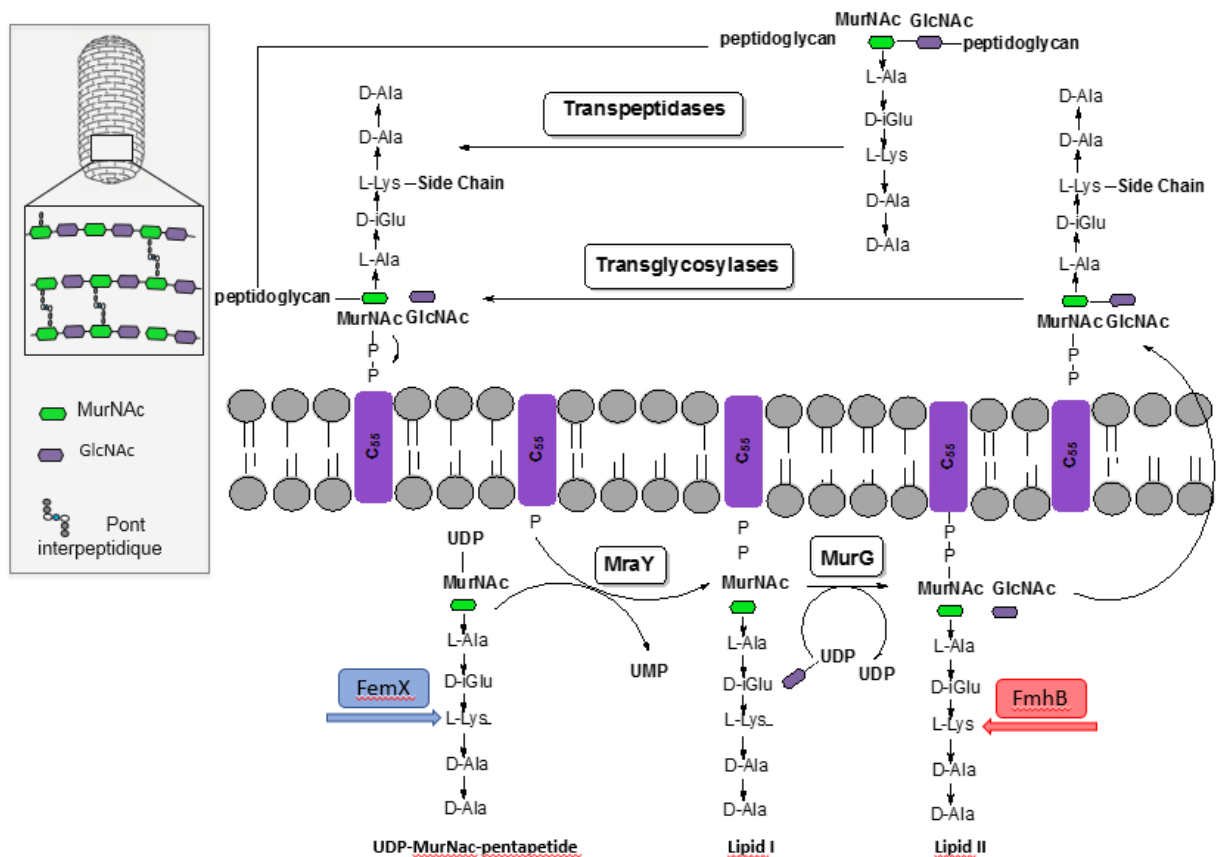


Schéma 69 : Biosynthèse du peptidoglycane

A la fois rigide et élastique, ce bio-polymère protège la bactérie des variations osmotiques.⁹⁹ Il est également associé aux processus de croissance et de division cellulaire. L'absence ou l'endommagement du peptidoglycane fragilise l'intégrité cellulaire de la bactérie et conduit à la mort de cette dernière.¹⁰⁰

Les transférases Fem interviennent chez toutes les bactéries, cependant elles peuvent agir à différents stades de la biosynthèse et transfèrent différents acides aminés pour la construction de différents ponts inter-peptidiques. Par exemple chez *Weissella viridescens* une alanine est ajoutée sur l'UDP-MurNac tandis que chez *Staphylococcus aureus* les transférases Fem agissent au niveau du Lipid II en y ajoutant une glycine (Schéma 69).

⁹⁸ Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 32, 149-167.

⁹⁹ Barnickel, N., Labischinski, H., Bradaczek, H., Giesbresht, P. *Eur. J. Biochem.* **1979**, 95, 157-65.

¹⁰⁰ a) Holtje, J. V. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, 62, 181-203; b) Nanninga, N. *Mol. Biol. Rev.* **1998**, 62, 110-29.

3) Les transférases Fem

i) Schéma général

Les transférases Fem interviennent dans la première étape essentielle de formation du pont interpeptidique.¹⁰¹ Plus précisément elles catalysent le transfert d'un acide aminé porté par un aminoacyl-ARNt sur un précurseur du peptidoglycane (Schéma 70).

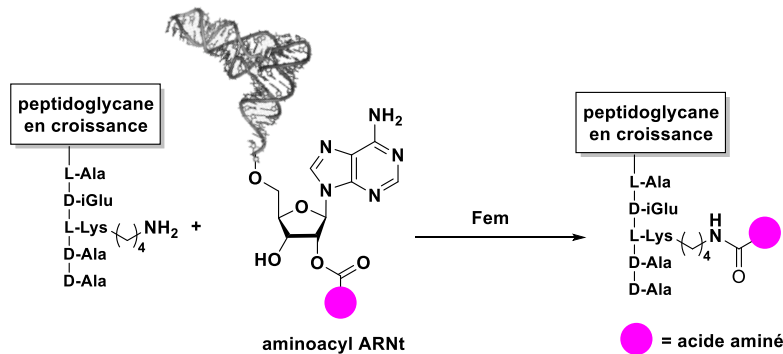


Schéma 70 : Réaction catalysée par les transférases Fem

Les ARNt impliqués dans cette étape sont substitués à leur extrémité 3' terminale par un acide aminé. Les ARNt intervenant au niveau du ribosome lors de la synthèse protéique portent l'acide aminé en position 3' du ribose et le transfert se fait à partir de cette position 3'. Les transférases Fem utilisent elles aussi un ARNt 3'-acylé mais il a été montré que le transfert s'effectue à partir de la position 2' (grâce à une isomérisation 3' vers 2' dans le site actif de l'enzyme).¹⁰² Les transférases Fem jouent un rôle crucial dans la biosynthèse du peptidoglycane. En effet l'incorporation d'un acide aminé erroné peut bloquer la réaction de transpeptidation en agissant comme terminateur de chaîne. Ceci en fait des cibles attractives pour la mise au point d'antibiotiques actifs sur les bactéries multirésistantes.

ii) Transférase Fem chez *Weissella viridescens* (FemX_{Wv})

Chez *Weissella viridescens* (bactérie non pathogène), le transfert d'acyle est assuré par FemX_{Wv} qui va catalyser le transfert d'une alanine portée par un Ala-ARNt^{ala} sur l'UDP-MurNac-pentapeptide, avant que ce dernier ne soit ancré à la membrane. FemX_{Wv} apparaît donc comme une enzyme modèle de choix grâce à son substrat hydrosoluble (Schéma 71).¹⁰³

¹⁰¹ a) Hegde, S. S., Shader, T. E. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 6988-7003; b) Rohrer, S., Berger-Bachi, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 837-846.

¹⁰² Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, A., Etheve-Quelquejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 5115-5119.

¹⁰³ Mainardi, J. L., Villet, R., Bugg, T. D., Mayer, C., Arthur, M. *FEMS Microbiol Rev.* **2008**, 386-408; b) Hedge, S. S., Shrader, T.E. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 6998-7003.

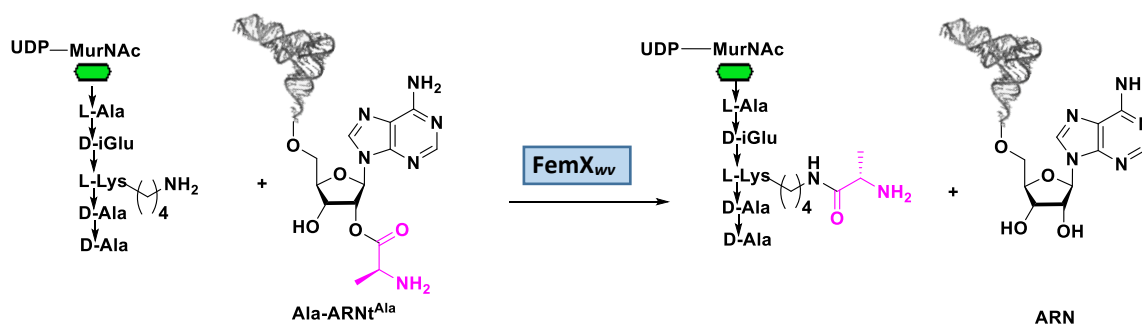


Schéma 71 : Mode d'action de FemX_{Wv}

Afin d'étudier plus précisément le mode d'action de FemX_{Wv}, notre équipe s'est intéressée à la modification du substrat ARNt en proposant une voie d'accès à des analogues stables où le lien ester facilement hydrolysable a été remplacé par un lien amide (Schéma 72).¹⁰⁴ La synthèse d'analogue 2'-amido-ARNt a donc été entreprise. Elle repose sur une étape de réduction de l'azido en position 2'. L'amine obtenue est ensuite couplée à un résidu Ala-NHBoc. Le précurseur 2'-amide ainsi obtenu a ensuite été engagé dans un couplage en présence d'une désoxycytidine phosphoramidite. La synthèse du dinucléotide pdCpA-Ala phosphorylé en position 5' a ensuite été réalisée puis ce dernier a été lié à une micro-hélice d'ARN par une méthode biochimique en présence de la T4RNA ligase. L'évaluation biologique de cet ARN a montré que ce dernier pouvait inhiber FemX_{Wx} mais ne permettait pas le transfert d'acyle.

¹⁰⁴ Mellal, D., Fonvielle, M., Santarem, M., Chemama, M., Schneider, Y., Iannazzo, L., Braud, E., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6161-6169.

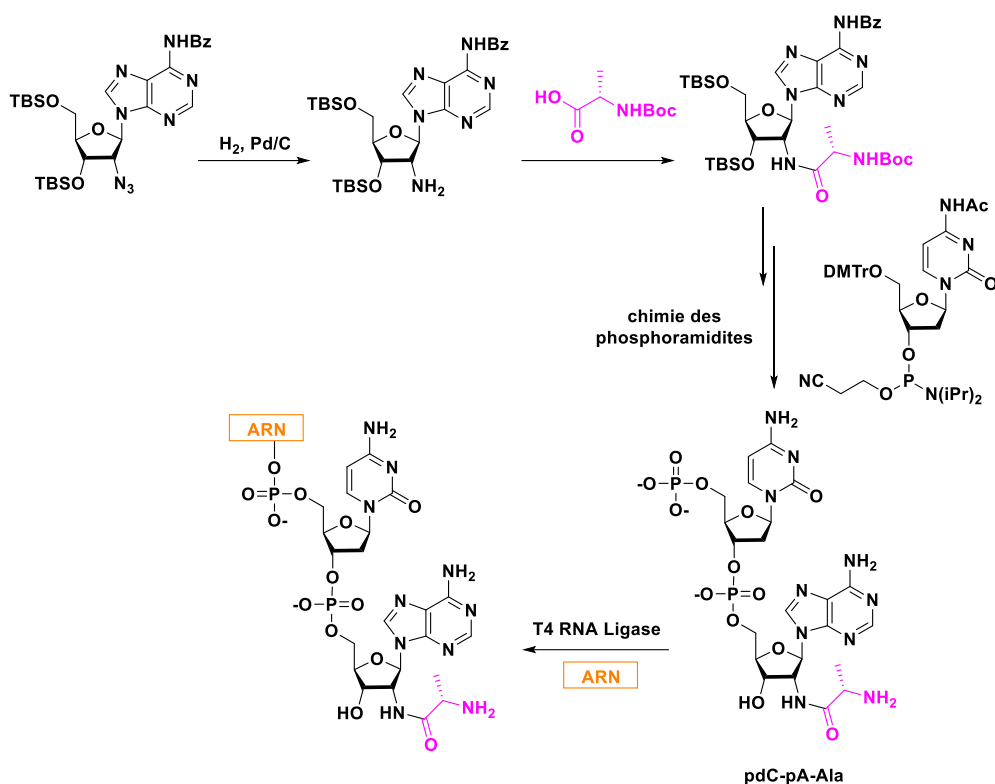


Schéma 72 : Synthèse d'analogues stables 2'-amido ARN^{Ala}

Une approche dite « bisubstrat » a également été menée afin d'obtenir une structure cristallographique de FemX_{WV}. Des conjugués peptidyl-ARN comportant une partie oligonucléotide mimant le bras accepteur de l'ARNt^{Ala} et une partie peptidique mimant le substrat UM5K ont été synthétisés (Schéma 73A).¹⁰⁵ Les deux substrats ont été liés par un triazole obtenu par CuAAC, ce conjugué a permis d'obtenir la première structure cristallographique du complexe FemX_{WV}-peptidyl-ARN avec une résolution de 1.6 Å (Schéma 73B).¹⁰⁶

¹⁰⁵ Chemama, M., Fonvielle, M., Arthur, M., Valery, J. M., Etheve-Quellejeu, M. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1929-1938.

¹⁰⁶ a) Fonvielle, M., Li de La Sierra-Gallay, I., El-Sagheer, A. H., Lecerf, M., Pantin, D., Mellal, D., Meyer, C., Blanot, D., Gale, N., Brown, T., Van Tilbeurgh, H., Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7278-7281. ; b) Fonvielle, M., Mellal, D., Patin, D., Lecerf, M., Blanot, D., Bouhss, A., Santarem, M., Mengin-Lecreux, D., Sollogoub, M., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1357-1363.

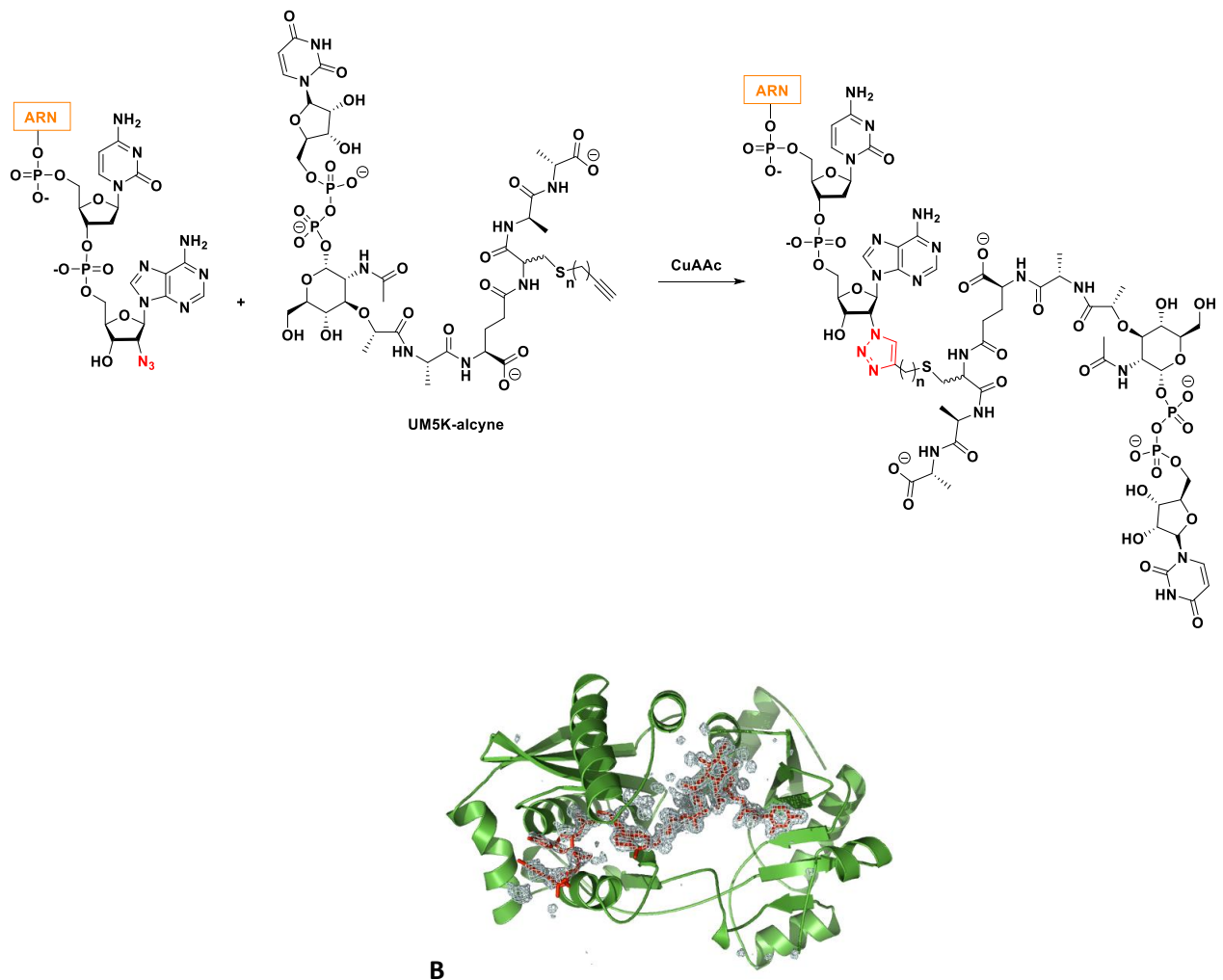


Schéma 73 : A) Bisubstrat peptidyl/ARN, B) Structure cristallographique du complexe bisubstrat FemX_{wx}

Les résultats obtenus chez la transférase modèle FemX_{wv} nous ont ensuite conduit à nous intéresser aux transférases Fem chez *S. aureus*, une bactérie pathogène.

iii) Transférase Fem chez *Staphylococcus aureus* : FmhB

Chez *Staphylococcus aureus*, le pont inter-peptidique est constitué d'un pentapeptide glycinique dont la formation fait intervenir trois transférases. FmhB permet la première étape de formation du pont en catalysant l'incorporation d'une première glycine. FemA est ensuite responsable de l'ajout séquentiel de deux autres glycines tandis que FemB conclut la formation de la chaîne en catalysant le transfert des deux dernières glycines (Schéma 74).

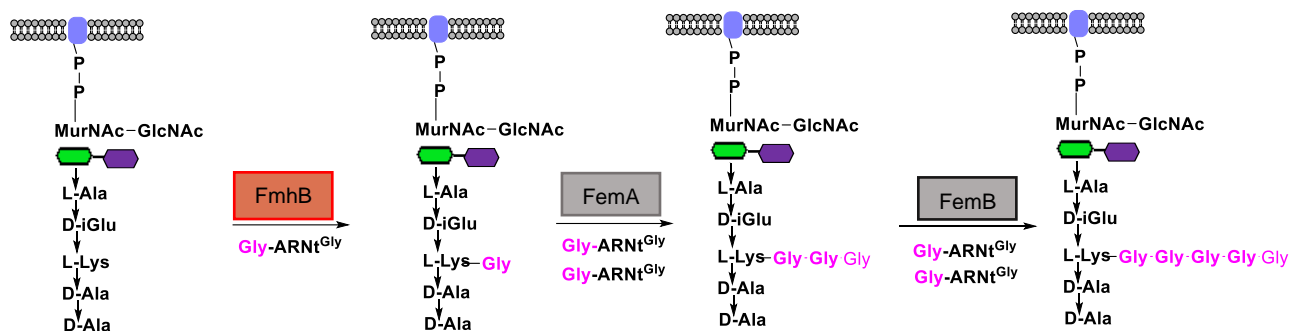


Schéma 74 : Synthèse du pentapeptide glycinique par les transférases Fem chez *Staphylococcus aureus*

Plus précisément, FmhB initie la synthèse du pont pentaglycine en catalysant le transfert de la première glycine portée par un Gly-tRNA^{Gly} sur le lipide II du peptidoglycane en croissance (Schéma 75).

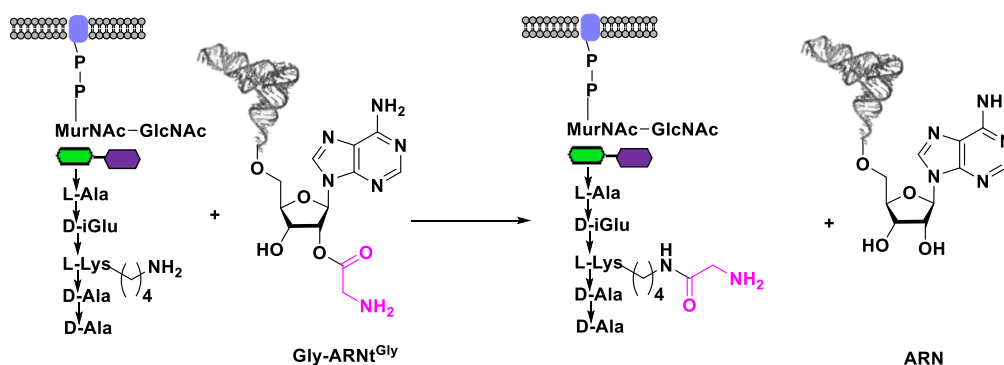


Schéma 75 : Réaction catalysée par FmhB

Des études cristallographiques ont été réalisées sur cette famille d'enzymes chez *S.aureus*, et seule la structure de Fem A a été résolue.¹⁰⁷ Elle présente de nombreuses similitudes avec celle de FemX_{Wv}.¹⁰⁸ La majeure différence réside dans la présence d'un domaine *coiled-coil* qui serait impliqué dans la spécificité de la reconnaissance enzyme/substrat par interaction avec les boucles T et D de l'ARNt.¹⁰⁹ Ce domaine flexible de 60 acides aminés est très polaire et rend l'étude de ces enzymes particulièrement complexe. Pour toutes ces raisons les transférases sont très peu étudiées (Figure 6).¹¹⁰ Il n'y a pour le moment aucune structure

¹⁰⁷ Benson, T. E., Prince, D. B., Mutchler, V. T., Curry, K. A., Ho, A. M., Sarver, R. W., Hagadorn, J. C., Choi, G. H., Garlick, R. L. *Structure*. **2002**, *10*, 1107-1115.

¹⁰⁸ Biarrotte-Sorin, S., Maillard, A. P., Delettré, J., Sougakoff, W., Arthur, M., Mayer, C. *Structure*. **2004**, *12*, 257-267.

¹⁰⁹ Rietmeyer, L., Fix-Boulier, N., Le Fournis, C., Iannazzo, L., Kitoun, C., Patin, D., Mengin-Lecreux, D., Ethèvequelquejeu, M., Arthur, M. Fonvielle, M. *Nucleic Acids Research*. **2021**, *2*, 648-699.

¹¹⁰ Shepherd, J., Ibba, M. *FEBS Letters*. **2013**, *587*, 2895-2904.

cristallographique de FmhB néanmoins notre équipe en collaboration avec l'équipe du Dr Michel Arthur a décrit le premier inhibiteur de cet enzyme.¹¹¹

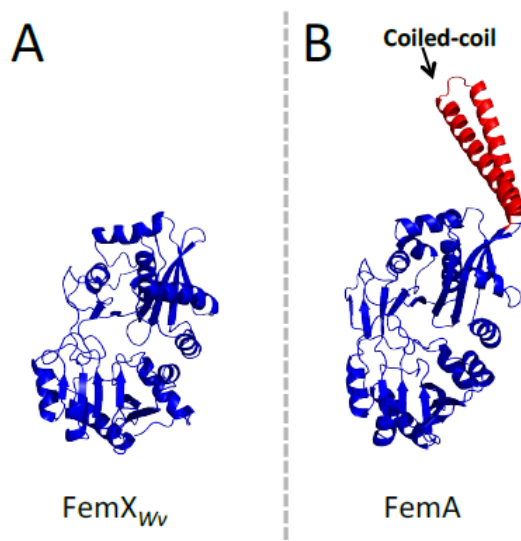


Figure 6 :A) Structures cristallographiques de FemX_{WV}, B) Structure cristallographique de FemA

4) Objectif

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous avons pour objectif de synthétiser des analogues 2'-amido-ARNt glycinique, dans le but d'étudier plus précisément les transférases Fem de *Staphylococcus aureus* (Figure 7). Nous envisageons la synthèse du 2'-amido-ARNt^{gly} dans le but d'obtenir des informations structurales sur FmhB. Des analogues 2'-Gly-Gly-amido-ARNt^{gly} et 2'-Gly-Gly-Gly-amido-ARNt^{Gly} seront également synthétisés afin d'évaluer la processivité de FemA et FemB dans l'incorporation des deux résidus glycine.

¹¹¹ Fonvielle M., Bouhss A., Hoareau C., Patin D., Mengin-Lecreux D., Iannazzo L., Sakkas N., El Sagheer A., Brown T., Ethève-Quellejeu M., Arthur M., *Chem. Eur. J.*, **2018**, 24:14911-14915.

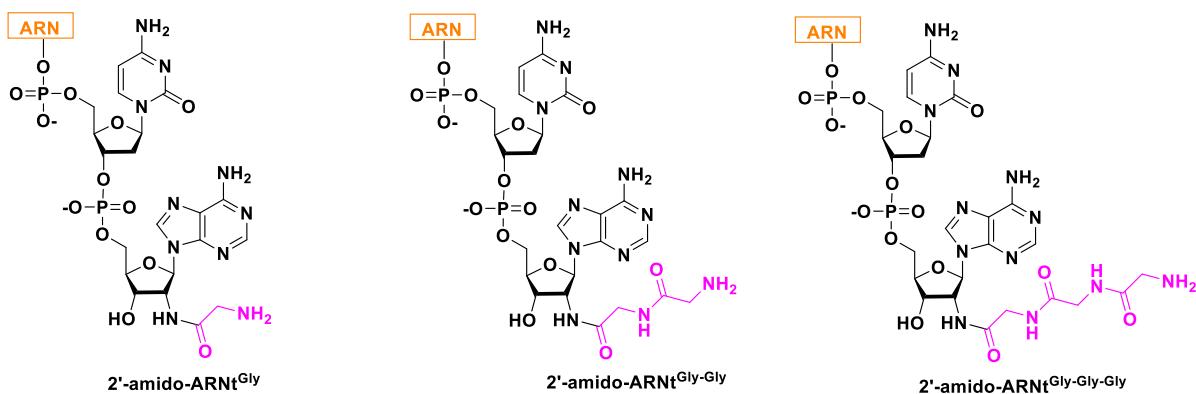
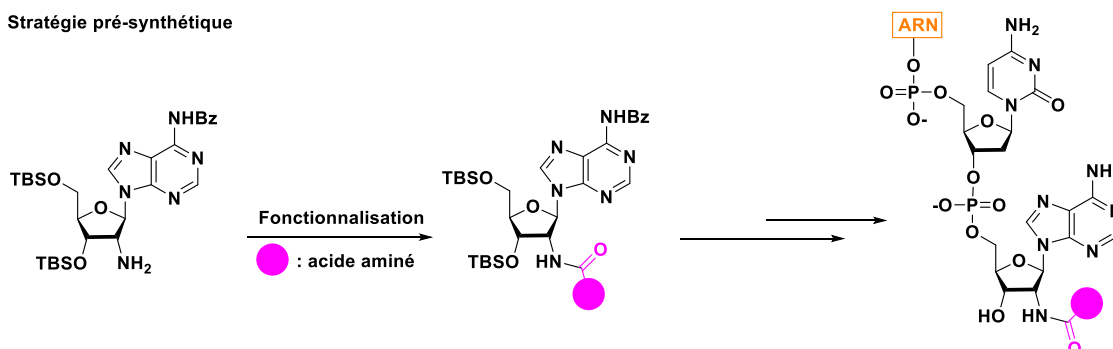


Figure 7 : 2' amido-ARNt glycinique

Deux stratégies différentes seront abordées au cours de ce chapitre. La première stratégie dite pré-synthétique repose sur l'incorporation de l'acide aminé en début de synthèse sur une adénosine tandis que le développement d'une seconde stratégie de post-fonctionnalisation par LSt permettra d'introduire un acide aminé lors de la dernière étape (Schéma 76).

Stratégie pré-synthétique



Stratégie post-synthétique

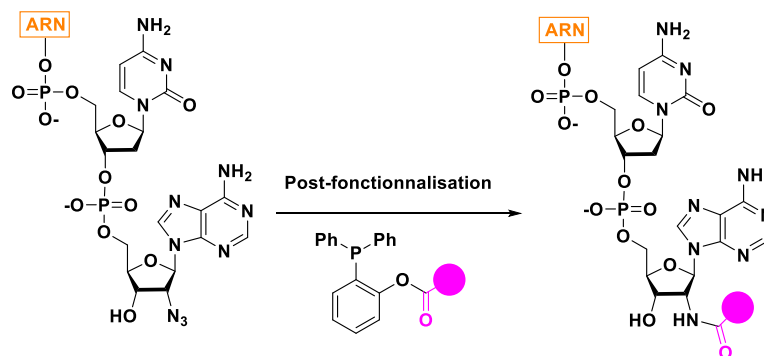


Schéma 76 : Stratégies d'accès aux 2'-amido-ARNt

B) Synthèse d'analogues 2'-amido-ARNt selon une approche pré-synthétique

Pour accéder à des analogues stables d'aminocyl-ARNt, nous avons choisi d'incorporer l'acide aminé en position 2' *via* un lien amide selon une approche pré-synthétique. Ces analogues pourront ainsi être obtenus par ligation enzymatique des dinucléotides phosphorylés **38** et **39** à un ARN. Ces derniers seront issus du couplage nucléotidique entre la désoxycytidine phosphoramidite commerciale et la 2'-amido-адéносine **6**. Cette dernière sera obtenue à partir d'une première étape de réduction de l'azoture suivi d'une étape de couplage peptidique entre l'amine et un résidu glycine ou le dimère glycérique (gly-gly) (Schéma 77).¹¹²

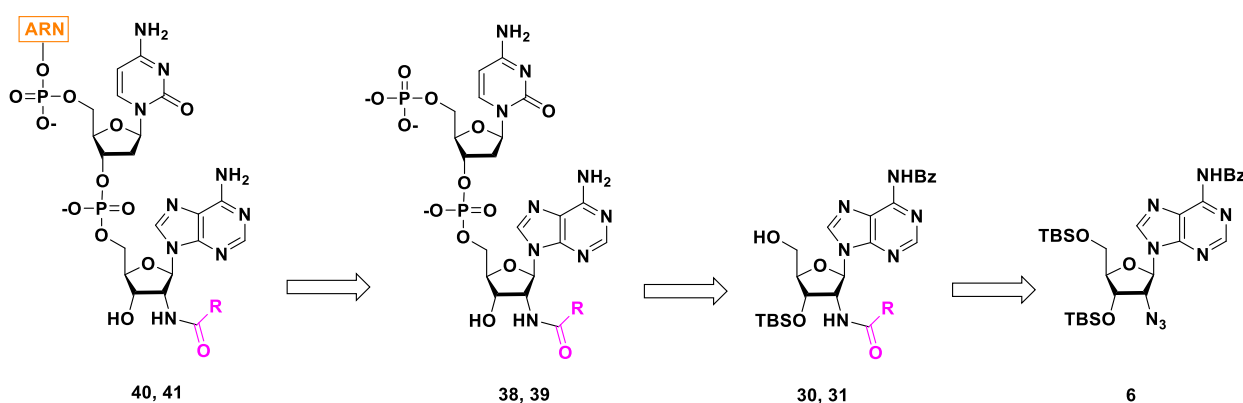


Schéma 77 : Schéma rétrosynthétique permettant d'accéder aux 2'-amido ARNt **40** et **41**

1) Synthèse des 2'-amido dinucléotides

L'introduction d'un acide aminé *via* un lien amide en position 2' a été obtenu en 2 étapes. Tout d'abord l'hydrogénolyse de l'azoture **6** en présence de palladium permet d'obtenir l'amine **27** avec un rendement de 85% (Schéma 78). Le couplage entre le nucléoside **27** et l'acide aminé Gly-Boc ou le dipeptide Gly-Gly-Boc a ensuite été réalisé en présence d'EDCI et d'HOBt dans le DMF à température ambiante pendant 16 h pour conduire à la formation des amides **28** et **29** avec des rendements respectifs de 32% et 86% (Schéma 78).

¹¹² Mellal, D., Fonvielle, M., Santarem, M., Chemama, M., Schneider, Y., Iannazzo, L., Braud, E., Arthur, M., Etheve-Quelquejeu, M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6161-616.

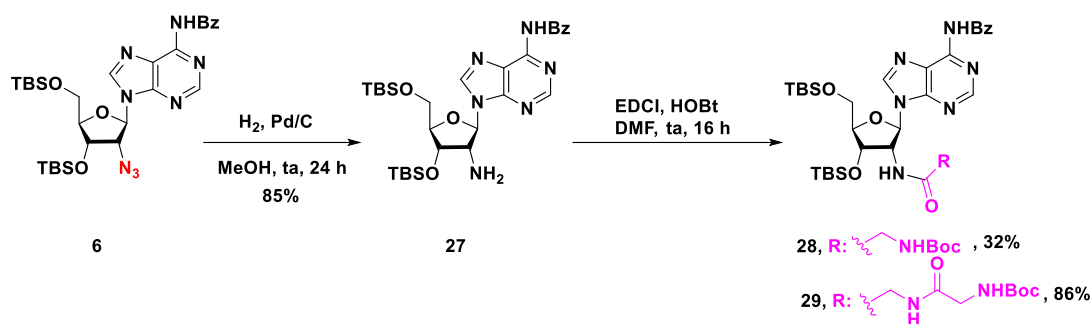


Schéma 78 : Synthèse des dérivés 2'-amido adénosines

Les composés **28** et **29** ont ensuite été utilisés sous leur forme protégée par un groupement Boc afin d'éviter que l'amine ne réagisse lors de la synthèse des dinucléotides. La synthèse des dinucléotides pdCpA-gly et pdCpA-gly-gly a été réalisée selon les conditions précédemment décrites au chapitre II.

Le traitement de l'amide **28** par une solution aqueuse d'acide trifluoroacétique (1:1) à température ambiante pendant 1 h a conduit à la formation du nucléoside **30** avec un très bon rendement de 97% (Conditions A, Schéma 79).

Dans ces mêmes conditions, la déprotection de l'alcool en 5' du composé **29** a conduit à la perte du groupement benzoyl sur l'amine exocyclique ; ce résultat, confirmé par spectrométrie de masse rend le couplage nucléotidique impossible. Nous avons donc été amenés à développer de nouvelles conditions et la déprotection du groupement TBS en position 5' est alors réalisée à 0 °C, pendant 4 h. Dans ces conditions, le monomère **31** est obtenu avec un rendement de 45% (Conditions B, Schéma 79).

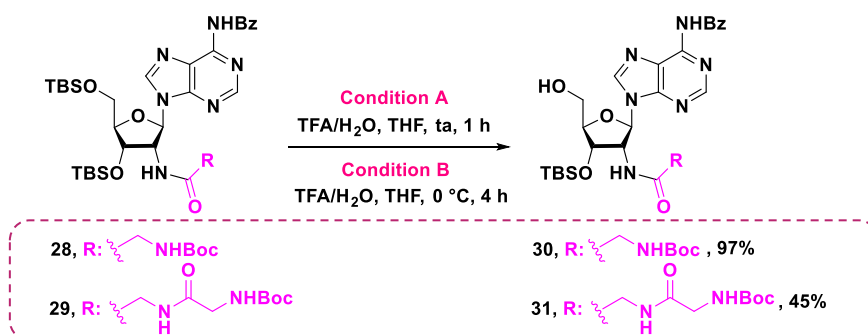


Schéma 79 : Désilylation de la position 5'

Le couplage nucléotidique par la méthode de couplage aux phosphoramidites décrite précédemment a été appliqué aux amides **30** et **31**. En présence de la désoxycytidine

phosphoramidite commerciale, les dinucléotides **32** et **33** ont été obtenus avec un rendement de 82% et 67 % respectivement (Schéma 80).

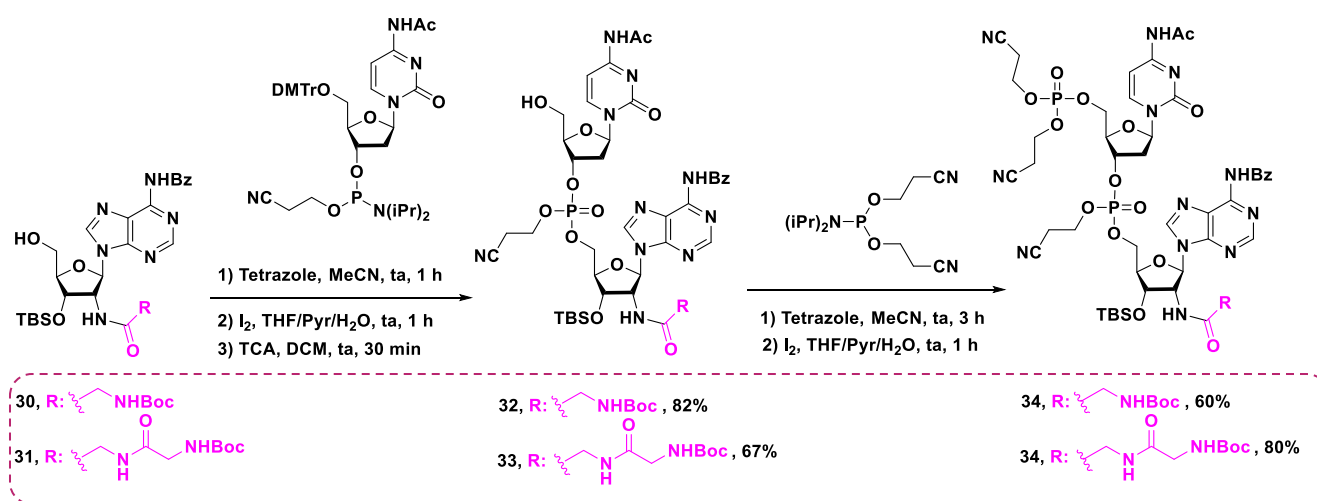


Schéma 80: Synthèse des 2'amido-dinucléotides phosphorylés en position 5'

La phosphorylation de l'extrémité 5' des dinucléotides a ensuite été réalisée en présence de bis (2-cyanoéthyl)-diisopropylphosphoramidite **21** et de tétrazole dans l'acétonitrile. Une étape d'oxydation par une solution de diiode a permis d'accéder aux composés phosphorylés **34** et **35** avec des rendements respectifs de 60% et 80% (Schéma 80).

Les dinucléotides **38** et **39** ont par la suite été obtenus après une phase de déprotection en trois temps. Tout d'abord, un traitement par une solution de méthylamine permet de cliver les groupements cyanoéthyle, acétyle et benzoyle. Un second traitement au fluorure de césium permet d'accéder aux dinucléotides partiellement protégés **36** et **37** avec des rendements de 26% et de 15% (Schéma 81). Enfin le groupement Boc est clivé en présence de bromure de zinc dans un mélange nitrométhane/isopropanol. L'utilisation de $ZnBr_2$ permet de cliver des groupements protecteurs en évitant les traitements acides ou basiques pouvant altérer les dinucléotides et plus précisément les liaisons phosphodiester.¹¹³ Les dinucléotides **38** et **39** sont ainsi obtenus avec des rendements respectifs de 23% et 19% (Schéma 81).

¹¹³ a) Kaul, R., Brouillette, Y., Sajjadi, Z., Hansford, K. A., Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 6131-6133; b) Ferreira, F., Morvan, F. *Nucleosides. Nucleotides and Nucleic Acids.* **2005**, 24, 1009-1013.

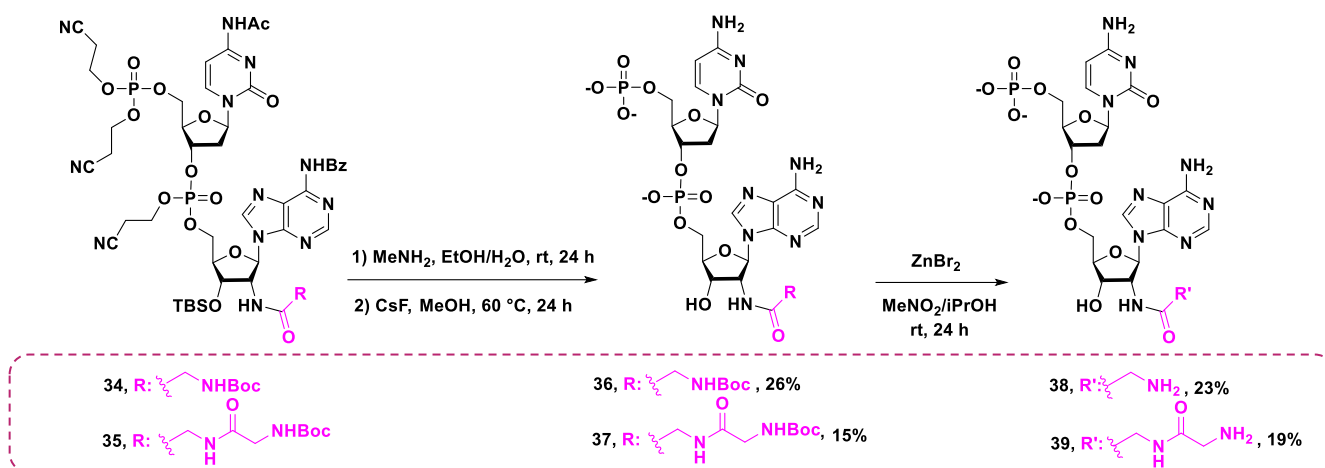


Schéma 81 : Déprotection des 2'-amido dinucléotides

Nous venons de décrire la synthèse des dinucléotides 2'-amide glycine et 2'-amide glycine-glycine selon une approche pré-synthétique. Bien que cette méthodologie soit efficace, elle nécessite de nombreuses étapes de synthèses et de purifications. Afin de développer une méthode plus performante permettant d'accéder à des analogues stables d'aminoacyl-ARNt avec un lien amide, nous nous sommes donc tournés vers la ligation de Staudinger traceless. Cette méthode permettra de créer en une seule étape le lien amide à partir d'un ARN-N₃ et d'une phosphine portant un acide aminé.

Avant de présenter la synthèse des 2'-amido ARNt par Lst, nous nous intéressons dans un premier temps à la mise au point des conditions de synthèse permettant d'accéder aux différentes phosphines acides aminés et peptides déprotégés. Nous nous focaliserons ensuite sur les résidus glycine et alanine afin d'accéder à des outils d'études pour FmhB et FemX.

2) Accès aux analogues 2'-amido-ARNt par ligation enzymatique

Les analogues stables d'aminoacyl-ARNt comportant un ou deux résidus glycines sont en cours de synthèse et d'analyse chez nos collaborateurs biochimistes au sein de l'équipe « Structures bactériennes impliquées dans la modulation de la résistance aux antibiotiques », équipe 12 de l'UMRS 1138 du Centre de Recherche des Cordeliers à Paris, dirigée par le Dr Michel Arthur.

L'incorporation des dinucléotides **38** et **39** se fait selon les conditions décrites au chapitre II. Brièvement, les dinucléotides sont incorporés sur un ARNt par ligation enzymatique grâce à l'ARN ligase du bactériophage T4 (T4RNA ligase). Un premier analogue stable de glycylyl-ARNt^{Gly} **40** a été obtenu par ligation enzymatique entre le nucléotide **38** et un ARNt^{Gly} de S.

aureus de 73 nucléotides. La séquence de cet ARN correspond à celle de l'un des cinq isoaccepteurs codant pour la glycine (ARNt^{Gly}) chez *S. aureus*.¹¹⁴ Cet ARN déléte des deux derniers nucléotides (CA) en position 3' terminal de l'ARNt (Schéma 82) a été obtenu biochimiquement par transcription *in vitro* par nos collaborateurs.

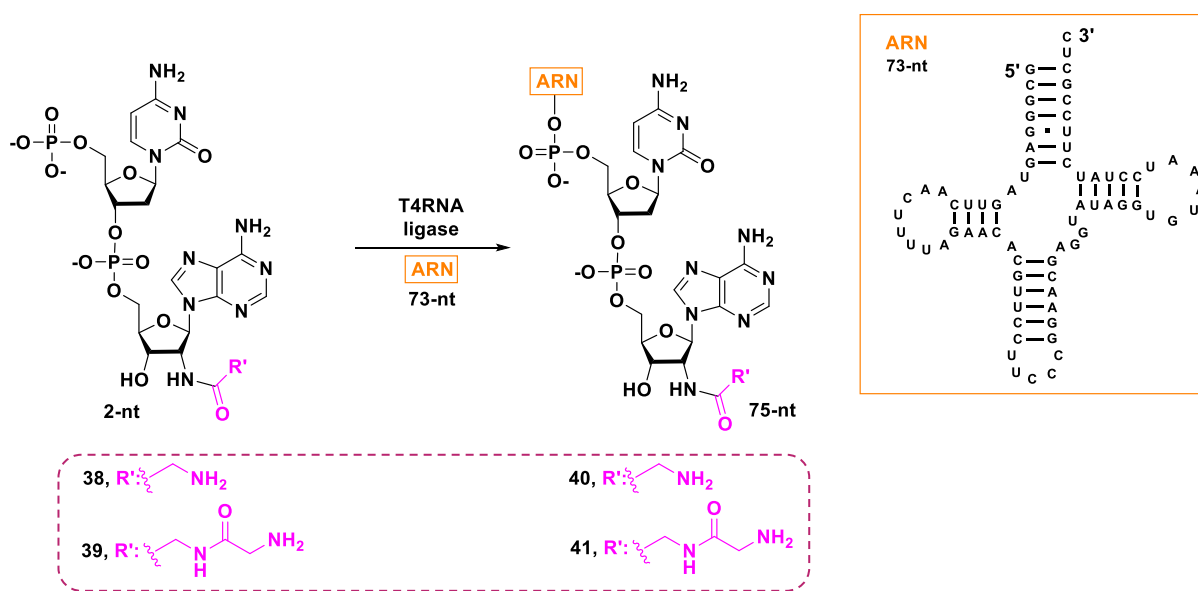


Schéma 82 : Synthèse des 2'amido-ARNt 40 et 41

La synthèse du tRNA 41 comportant un motif Gly-Gly est actuellement en cours.

3) Évaluation biologique du Gly-ARNt 40

Afin de déterminer l'activité inhibitrice sur FmhB des 2'-amido-ARNt^{Gly} synthétisés, nos collaborateurs biochimistes réalisent des tests d'inhibition de l'acyle transférase FmhB de *S. aureus*.^{114,115} Brièvement, le test enzymatique consiste à acyler un ARNt^{Gly} avec de la glycine marquée au carbone 14. Cette réaction se fait grâce à l'utilisation d'une enzyme de couplage, l'acyle synthétase GlyRS de *S. aureus* en présence d'ATP. La glycine radio-marquée au carbone 14 est ensuite transférée par FmhB de l'ARNt^{Gly} vers le substrat lipidique (Lipide II) de FmhB. Le produit formé lors de la réaction catalysée par FmhB ([¹⁴C]Gly-Lipid II)

¹¹⁴ Rietmeyer, L., Fix-Boulier, N., Le Fournis, C., Iannazzo, L., Kitoun, C., Patin, D., Mengin-Lecreux, D., Ethève-quelquejeu, M., Arthur, M., Fonvielle, M. *Nucleic Acids Research*. **2021**, 2, 648-699.

¹¹⁵ Fonvielle, M., Bouhss, A., Hoareau, C., Patin, D., Mangin-Lecreux, D., Iannazzo, L., Sakkas, N., El Sagheer, Brown, T., Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 1491-1415.

et la glycine radioactive sont séparés par chromatographie sur couche mince et identifiés par autoradiographie. La quantité de produit formé durant la réaction est quantifiée par scintillation liquide. L'activité de FmhB est déterminée en présence de concentration croissante du composé **40**. La CI_{50} indiquée ici représente la concentration de la molécule **40** permettant de faire baisser de 50% l'activité de FmhB (Schéma 83) dans les conditions du test enzymatique utilisé.

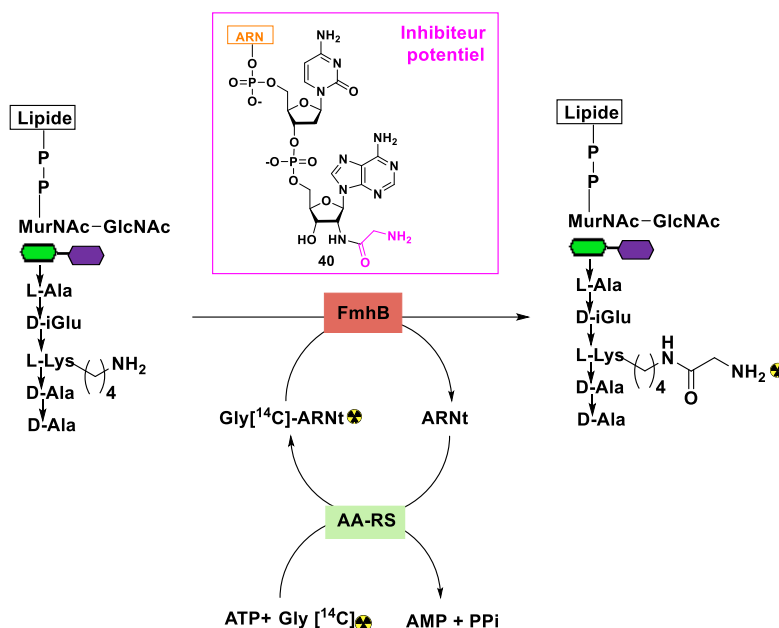


Schéma 83 : Test couplé GlyRS-FmhB pour la détermination de CI_{50} .

Les premières expériences réalisées semblent indiquer que la constante d'inhibition du composé **40** pour FmhB est de l'ordre du micromolaire ($CI_{50} = 1,7 \mu M$). Cette constante d'inhibition est du même ordre de grandeur que celles obtenus lors de l'étude d'une autre amino acyle transférase de la famille Fem (FemX de *Weissella viridescens*)¹¹⁶. Ce résultat semble indiquer que les analogues stables de Gly-ARNt comportant un lien amide entre le résidu glycyle et l'ARNt sont bien reconnus par la transférase FmhB de *S. aureus*. Cependant, l'activité inhibitrice est beaucoup moins bonne que certains inhibiteurs déjà décrits récemment par nos collaborateurs¹¹⁵ (CI_{50} de l'ordre du nanomolaire).

¹¹⁶ Mellal, D., Fonvielle, M., Santarem, M., Chemama, M., Schneider, Y., Iannazzo, L., Braud, E., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6161-6169.

C) Synthèse d'analogues d'ARNt stables selon une approche post-synthétique

1) Généralités sur les phosphines acides aminés ou peptides

On retrouve dans la littérature peu d'exemples de LSt faisant intervenir des phosphines portant des acides aminés ou des peptides. Le groupe de Raines a été le premier à développer des thiophosphines-acides aminés comportant un lien clivable de type thioester relié à la diphenylphosphine par un méthylène (Schéma 84).¹¹⁷

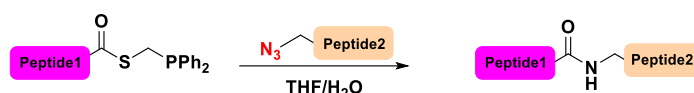


Schéma 84 : Synthèse peptidique par LSt

Ces phosphines se révèlent très efficaces puisqu'elles permettent de réaliser la ligation entre deux peptides avec des rendements pouvant atteindre 96% lorsque l'acide aminé directement lié à l'azoture est une glycine (Schéma 85).¹¹⁸

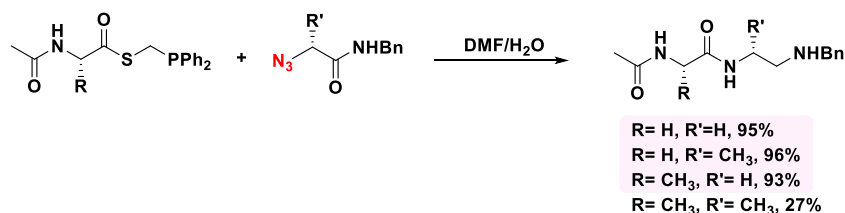


Schéma 85 : LSt en présence de phosphines acide aminés

L'emploi d'acides aminés non-glyciniques reste par ailleurs plus complexe. En effet, les faibles rendements de couplage observés peuvent s'expliquer par la formation d'un produit secondaire **V** issu d'une réaction d'aza-Wittig.¹¹⁹ Au cours du mécanisme réactionnel, l'attaque nucléophile de l'azote sur le carbonyle conduit à l'intermédiaire tétraédrique **II**. Dans le cas de la ligation d'acide aminé glycinique, cette intermédiaire conduit à l'amide **III** selon une LSt (Voie A, Schéma 86). L'encombrement stérique dûe aux chaînes latérales lors de la ligation d'acides aminés non glyciniques entraîne une interaction allylique au sein de l'intermédiaire **II**. Ce dernier se réarrange alors en formant une liaison phosphore-oxygène conduisant à

¹¹⁷ Nilsson, B. L., Kiessling, L., Raines, R. T. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2141-2143.

¹¹⁸ Nilsson, B. L., Kiessling, L., Raines, R. T. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 9-12.

¹¹⁹ Soellner, M. B., Tam, A., Raines, R. T. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 9824-9830.

l'intermédiaire **IV**. Le composé **IV** moins tendu conduit alors uniquement au composé **V** via un réarrangement d'aza-Wittig (Voie B, Schéma 86).

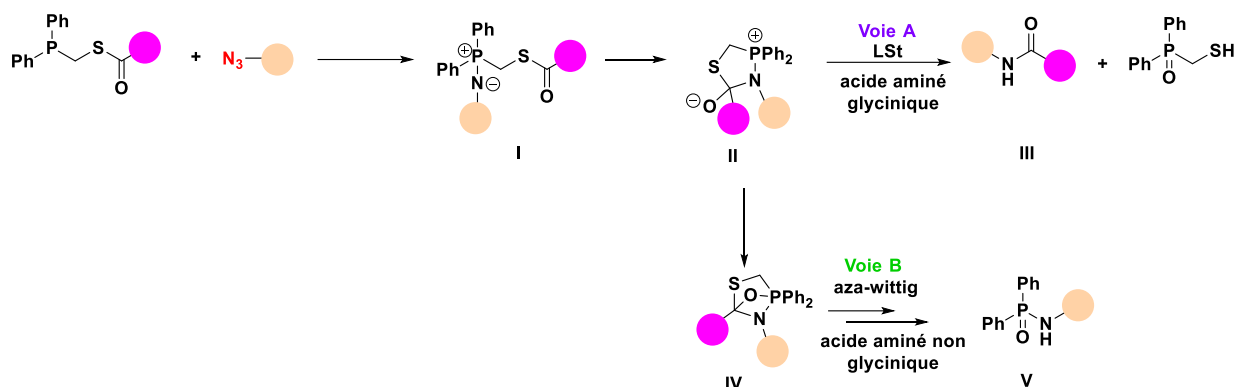


Schéma 86 : Réarrangement d'aza-wittig en compétition avec la LSt.

Afin d'empêcher ce réarrangement, un groupement O-méthoxy a été introduit en position *para* sur chacun des phényles de la phosphine. Cette modification rétablit la densité électronique autour du phosphore et déplace la réaction en faveur de la formation de l'amide (Schéma 87).¹²⁰

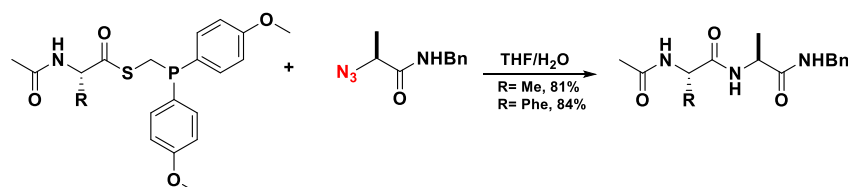


Schéma 87 : LSt entre deux peptides non glyciniques

En 2003, le groupe de Raines a réalisé la synthèse totale d'une Ribonucléase bovine RNAase (1-124), en liant 3 fragments peptidiques.¹²¹ Une première étape de LSt a permis de connecter le dipeptide FmocCys(Trt)Glu(OtBu)-SCH₂PPh₂ correspondant au fragment (110-111) au peptide azido contenant le fragment (112-124). Une seconde réaction de NCL à quant à elle conduit à la formation de la RNAse. Pour cela la cystéine N-terminale du peptide (110-124) a été liée au peptide (1-109) (Schéma 88).

¹²⁰ Tam, A., Soellner, M. B., Raines, R. T. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 1173-1175.

¹²¹ Nilsson, B. L., Hondal, J. R., Soellner, M. B., Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5268-5269.

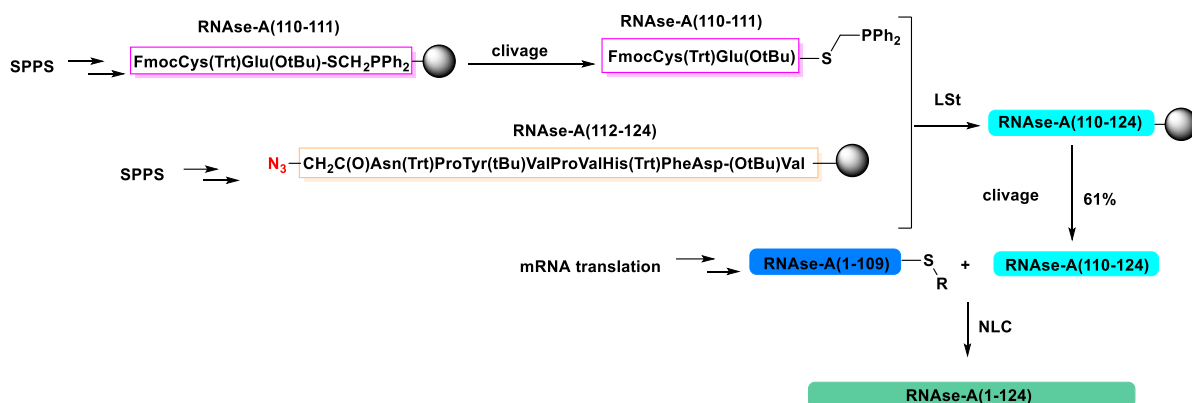


Schéma 88 : Synthèse totale de RNAase par différentes méthodes de ligations chimiques

Une autre application intéressante de l'utilisation de ces phosphines-acides aminés est la synthèse de lactame de moyenne taille décrite par l'équipe de van Maarseveen.¹²² Leur approche consiste à faire réagir l'acide carboxylique terminal d'un peptide avec une thiophosphine-borane, tandis que l'autre extrémité comporte un groupement azoture. En présence de DABCO, la thiophosphine est déprotégée et peut réagir avec l'azoture selon une LSt conduisant à un peptide cyclique (Schéma 89).

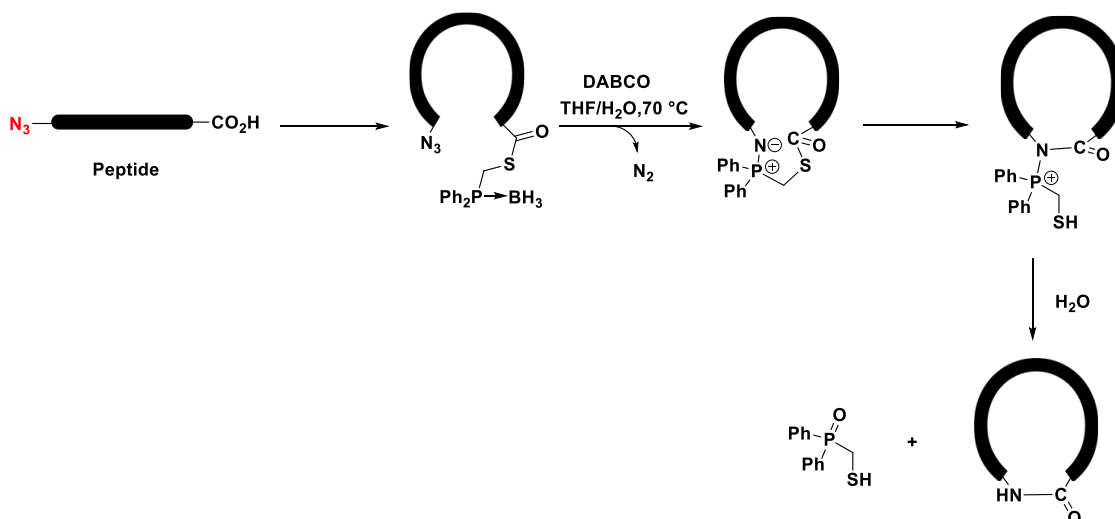


Schéma 89 : Synthèse de lactame par LSt

¹²² David, O., Meester, W. J. N., Bieräugel, H., Schoemaker, H. E., Hiemstra, H., van Maarseveen, J. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4373-4375.

Les phosphines-acides aminés ont également été utilisées pour accéder à des conjugués glycosyl-peptide. Le groupe de Bernardi a en effet décrit la synthèse de ces derniers à partir d'un azoture de glycosyl déprotégé et d'une phosphine portant un acide aminé protégé (Schéma 90).^{123,124}

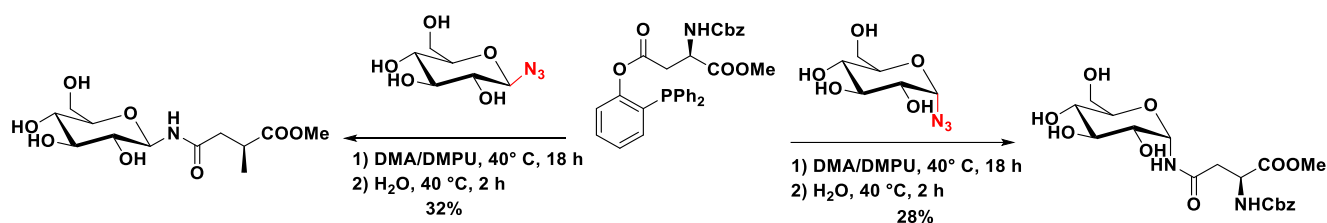


Schéma 90 : Synthèse de glycosyl amide par LSt

La stéréosélectivité de la LSt a également permis au groupe de Guo d'accéder à des analogues de l'antigène humain CD52 par ligation entre la séquence peptidique complète de l'antigène lié au partenaire phosphinothiol et d'un tri-mannose sur lequel un azoture a été introduit. Le conjugué glycane-peptide a ainsi été obtenu avec un rendement de 78% lorsque l'amine est protégée (Schéma 91).¹²⁵

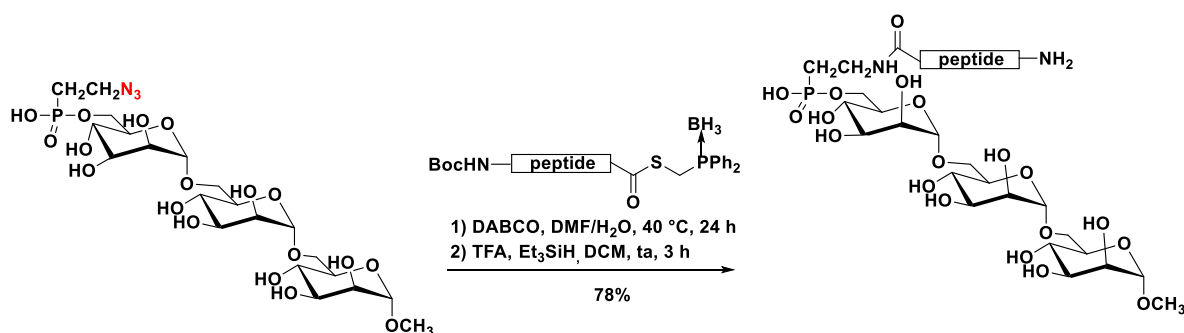


Schéma 91 : Synthèse de l'analogue de l'antigène humain CD52 par LSt

A notre connaissance et comme le montrent les exemples que nous venons de présenter, l'utilisation de phosphines acides aminées déprotégées n'a jamais été décrite. Nous souhaitons donc étudier la réactivité de ces dernières dans le cadre de la LSt.

¹²³ Bianchi, A., Bernardi, A. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 12, 4565-4577.

¹²⁴ Nisic, F., Andreini, M., Bernardi, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 5744-5751.

¹²⁵ Zhu, S., Guo, Z. *Org. Lett.* **2017**, 19, 3063-3066.

2) Synthèse des phosphines acides aminés

Afin d'accéder à des phosphines portant des acides aminés déprotégés, nous envisageons une stratégie en deux étapes (Schéma 92). Une première étape permettra de coupler un acide aminé protégé au diphénylphosphanyl phénol, puis le groupement protecteur porté par l'amine pourra être clivé afin d'obtenir les phosphines acides-aminés déprotégées correspondantes.

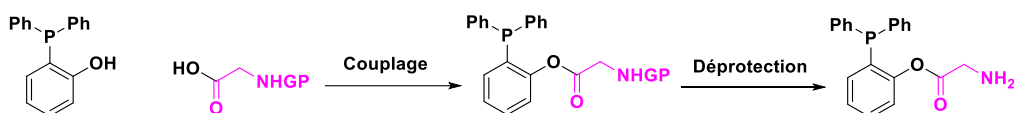


Schéma 92 : Stratégie de synthèse des phosphines acides aminés déprotégés

Dans un premier temps nous avons synthétisé des phosphines-glycine portant différents groupements protecteurs (Fmoc, Cbz, Trt et Boc). Pour cela le diphénylphosphanyl phénol a été mis en présence des résidus glycines, de DCC et de DMAP à température ambiante pendant 16 h dans le DCM. Les phosphines ester correspondantes **42-45** ont ainsi été isolées avec de bons rendements compris entre 50% et 78% (Schéma 93).

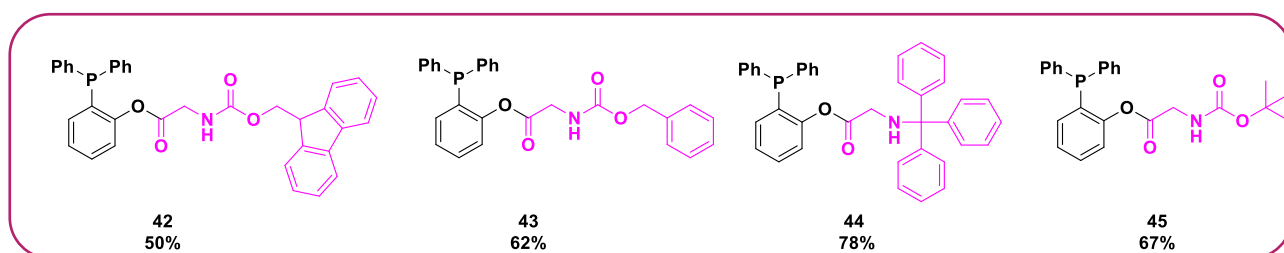
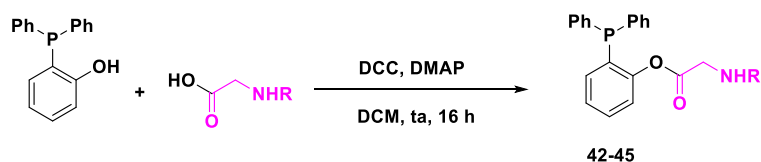
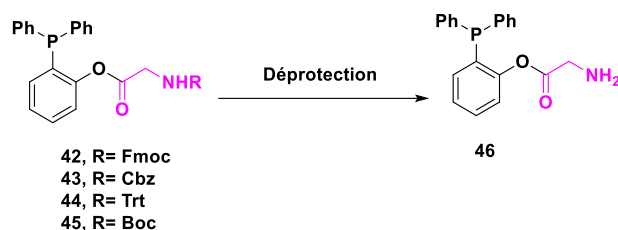


Schéma 93 : Synthèse de phosphines-glycine ester protégées

Nous avons ensuite réalisé un premier essai de déprotection du groupement Fmoc, en traitant la phosphine **42** par une solution de 20% de pipéridine dans le DMF à température ambiante pendant 16 h. Dans ces conditions, nous avons observé l'hydrolyse du lien ester et l'oxydation du diphénylphosphanyl phénol qui en résulte (Tableau 2, Entrée 1). L'hydrogénation pallado-catalysée de la phosphine **43** permettant de cliver le groupement Cbz a également conduit à la dégradation de la phosphine (Tableau 2, Entrée 2). De la même façon le traitement de la

phosphine **44** par une solution de TCA à 5% dans le DCM ne permet pas d'obtenir le composé déprotégé **46** (Tableau 2, Entrée 3).

En s'inspirant des conditions de déprotection du groupement Boc sur des fonctions amines portées par des esters phénoliques, la phosphine **45** a été traitée par une solution de 15% de TFA dans le DCM à température ambiante pendant 2 h.¹²⁶ La phosphine déprotégée **46** a ainsi été obtenue avec un rendement de 30% sous la forme de sel de TFA (Tableau 2, Entrée 4).



Entrée	Phosphine	Conditions	Produits
1	42	Piperidine 20% DMF, ta, 16 h	
2	43	H ₂ , Pd/C, THF, ta, 16 h	
3	44	TCA 5% DCM, ta, 5 min	
4	45	TFA 15% DCM, ta, 2 h	46 30%

Tableau 2 : Mise au point des conditions de déprotection des phosphines acides aminés.

Ces conditions ont par la suite été étendues à la synthèse de phosphine-acide aminés non glycinique. Le diphenylphosphanyl phénol commercial a été couplé à différents acides aminés-NHBoc, permettant ainsi d'obtenir les phosphines **47-49** avec des rendements allant de 68% à 96%. La déprotection de ces dernières, dans les conditions précédemment mises au point,

¹²⁶ Rajdev, P., Chakraborty, S., Schmutz, M., Mesini, P., Ghosh, S. *Langmuir*. **2017**, 33, 19, 4789-4795.

a permis d'isoler la phosphine-Ala-NH₂ **50** avec un bon rendement de 78%, la phosphine Val-NH₂ **51** avec un rendement de 86%, et enfin la phosphine-phénylalanine-NH₂ **52** a été obtenue avec un rendement de 73% (Schéma 94).

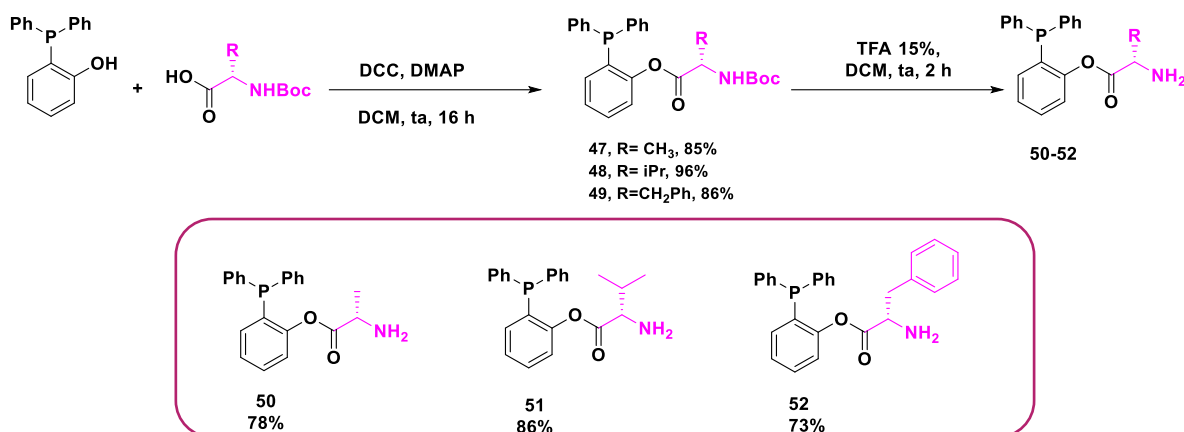


Schéma 94: Déprotection des phosphines-acides aminés

Les résultats que nous venons de présenter ont permis de mettre au point une méthode efficace permettant d'accéder à des phosphines-acides aminés déprotégées. A présent nous allons appliquer ces conditions à la synthèse de phosphines di et tri peptides

3) Synthèse des phosphines peptides

Dans le cadre de l'étude des transférases de Fem chez *S. Aureus*, nous avons envisagé la synthèse de phosphines-peptides glyciniques. Pour cela le dipeptide Gly-GlyBoc **53** a été couplé à la diphenylphosphanyl phénol en présence de DCC et de DMAP. La phosphine **54** est alors obtenue avec un rendement de 28% (Schéma 95).

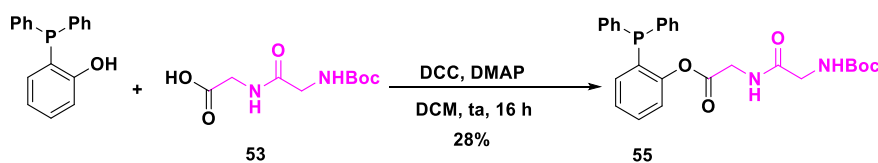


Schéma 95 : Synthèse de la phosphine dipeptide-Gly-Gy-Boc **55**

Ce faible rendement peut s'expliquer par la présence de DCU rendant la purification difficile. Nous avons donc remplacé le DCC par un autre carbodiimide l'EDCI qui a la capacité de

généraliser une urée soluble dans l'eau.¹²⁷ Dans ces nouvelles conditions, en présence de HOBt, les phosphines-peptides esters **55** et **56** sont obtenues avec des rendements respectifs de 50 et 71% (Schéma 96).

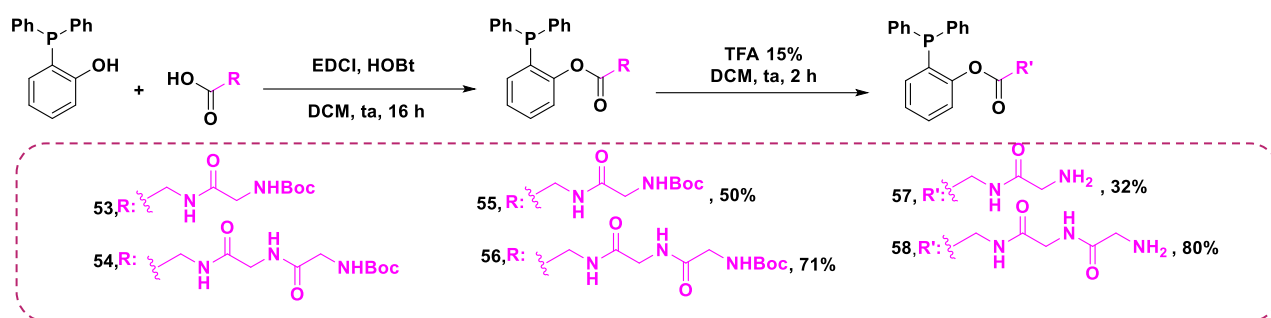


Schéma 96 : Conditions de couplage des phosphines peptides

Le traitement des phosphine **55** et **56** par une solution de 15% de TFA dans le DCM, nous a ensuite permis d'isoler les composés **57** et **58** avec des rendements de 32% et 80% (Schéma 96).

Nous avons présenté la mise au point des conditions de déprotection des phosphines acides-aminés, mais avant d'utiliser ces composés dans la synthèse d'analogues stables d'aminocyl ARNt, nous avons étudié leur réactivité dans les conditions de LSt en présence du dinucléotide modèle **9**.

4) Ligation de Staudinger traceless

- i) Évaluation de la réactivité des phosphines acides aminé comportant une fonction amine libre

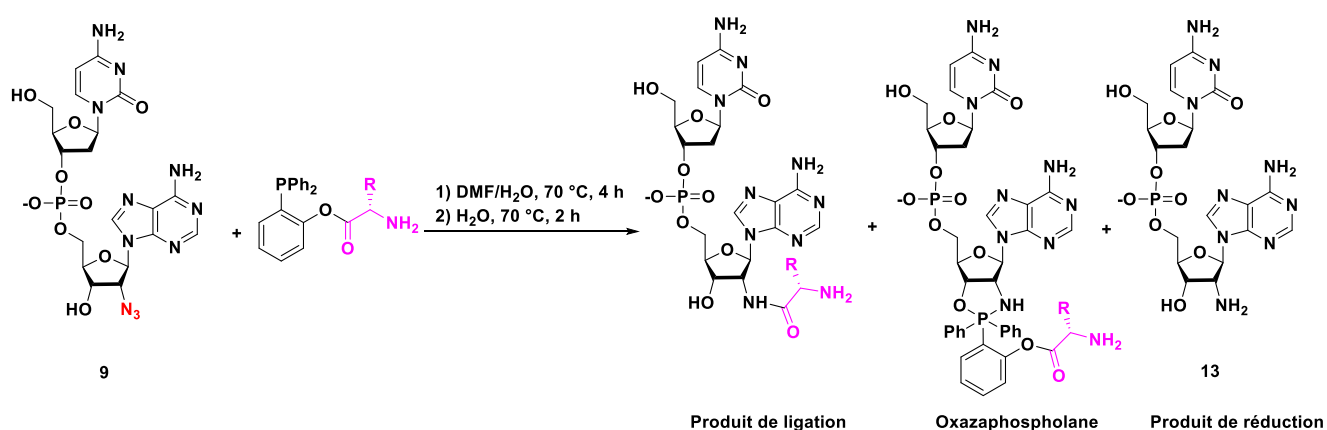
Cette étude a été menée en collaboration avec l'équipe du Dr Pauline Pointot de l'Université de Poitiers qui a réalisé l'optimisation des conditions de purification et d'analyse des produits de LSt.

Tout d'abord nous avons fait réagir le dinucléotide modèle **9** avec la phosphine-GlyNH₂ **46** dans les conditions de LSt mise au point dans le chapitre II. Chaque produit de la réaction a pu être identifié et quantifié. Le produit de ligation **59** a donc été obtenu avec un rendement de 12%, en compétition avec la formation majoritaire du produit de réduction **13** avec un rendement de 88%. On peut également noter que dans ce cas, l'espèce cyclique de type oxazaphospholane n'a pas été observée (Tableau 3, Entrée 1).

¹²⁷ Sheehan., J. C., Cruickshank. P. A, Boshart, G. L. *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2525-2528.

La réactivité de la phosphine-AlaNH₂ **50** a ensuite été évaluée en présence du dinucléotide **9**, dans les conditions de LSt. La formation de l'amide **60** a été observée avec un rendement de 18%, tandis que le produit de réduction **13** a été obtenu avec un rendement de 82% (Tableau 3, Entrée 2).

En présence de la phosphine **51** le produit de ligation **61** a été obtenu avec un rendement de 4% ; l'amine **13** étant formée majoritairement avec un rendement de 88%. Au cours de la réaction l'oxazaphospholane **61'** a également été observé avec un rendement de 8% (Tableau 3, Entrée 3).

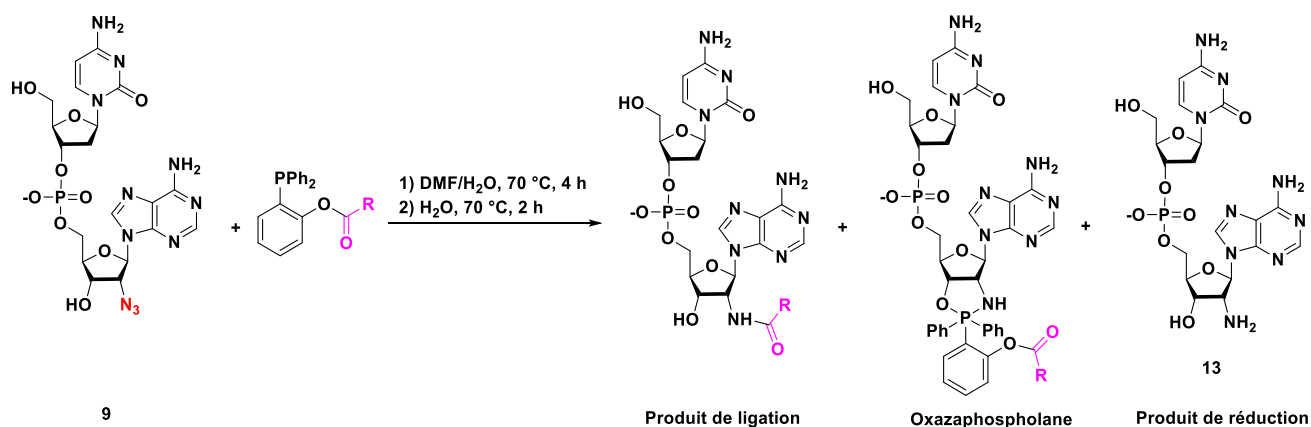


Entrée	R	Produit de ligation	Oxazaphospholane	Produit de réduction
1	H (Gly) 46	59 , 12% ^a	-	13 , 88% ^a
2	CH ₃ (Ala) 50	60 , 18% ^a	-	13 , 82% ^a
3	iPr (Val) 51	61 , 4% ^a	61' , 8% ^a	13 , 88% ^a

Tableau 3 : Évaluation des phosphines- acides aminés NH₂ dans la LSt^a : rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 254 nm

Nous avons ensuite étudié la réactivité des phosphines peptides **57** et **58** (Tableau 4). Dans le cas de **57**, le produit de ligation n'est pas formé, tandis que le produit de réduction **13** est majoritairement obtenu avec un rendement de 72%. L'oxazaphospholane **62'** est également formé avec un rendement de 28% (Tableau 4, Entrée 1).

La phosphine **58** substituée par le tripeptide Gly-Gly-Gly-NH₂ permet de former le produit de ligation **63** avec un rendement de 10% ; l'amine **13** et l'oxazaphospholane **63'** étant obtenus avec des rendements respectifs de 47% et 37% (Tableau 4, Entrée 2).



Entrée	R	Produit de ligation	Oxazaphospholane	Produit de réduction
1	Gly-Gly-NH ₂ , 57	-	62' , 28% ^a	13 , 72% ^a
2	Gly-Gly-Gly-NH ₂ , 58	63 , 10% ^a	63' , 37% ^a	13 , 47% ^a

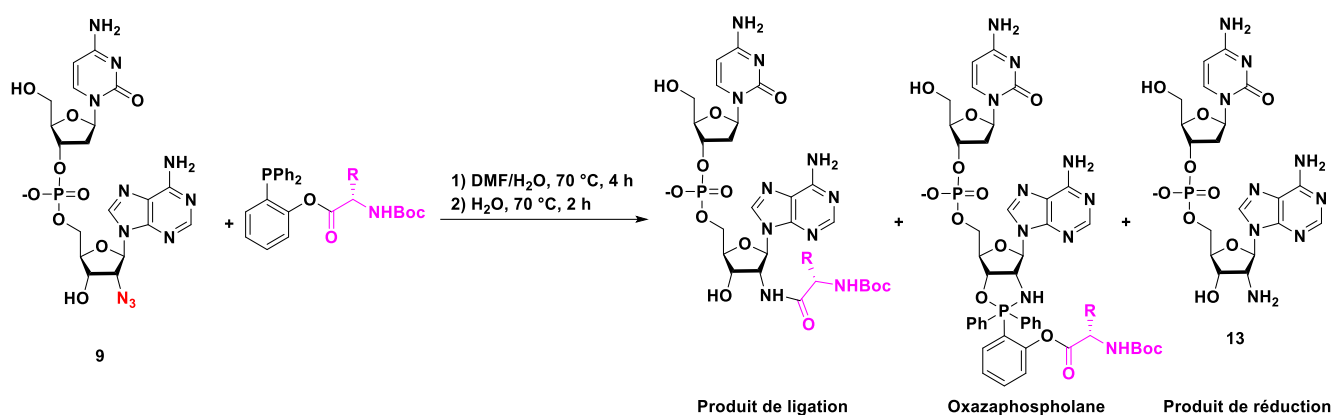
Tableau 4 : LSt en présence de phosphines di et tri peptides. ^a : rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 254 nm.

A travers cette série de résultats, nous avons constaté que l'utilisation de phosphines acide aminé déprotégées, pouvait conduire à la formation d'une liaison amide par LSt. Les rendements sont cependant relativement faibles et la réduction compétitive est majoritaire. Afin d'optimiser les rendements en faveur de la formation du 2'-amido-dinucléotide, nous nous sommes intéressés à la réactivité des phosphines acides aminés protégés.

Pour rappel nous nous intéressons à la LSt afin d'accéder à des analogues stables d'aminoacyl ARNt qui serviront d'outils d'études des transférases FemX et FmhB, nous nous intéresserons donc dans la prochaine partie principalement aux phosphines-glyciniques et à la phosphine-Alanine.

ii) Évaluation de la réactivité des phosphines acides aminés protégés

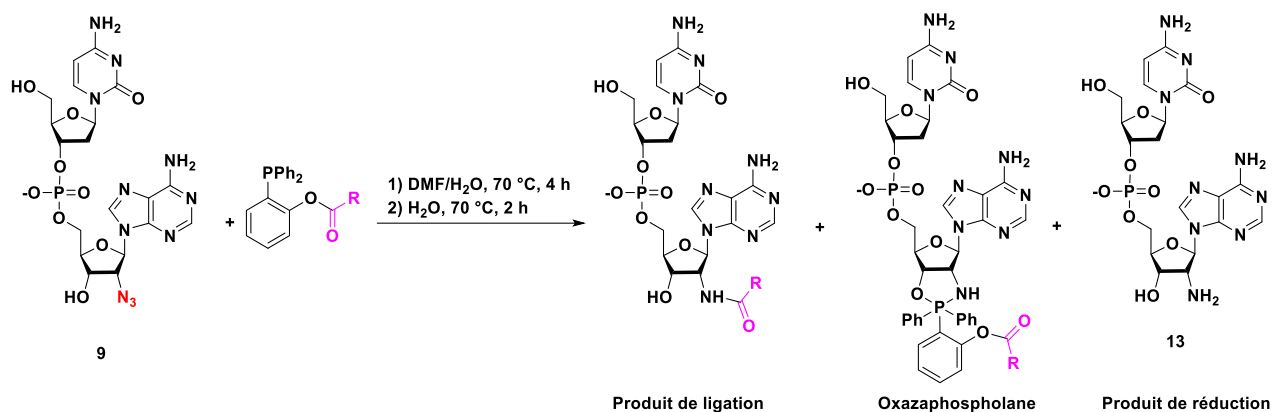
Dans un premier temps nous avons fait réagir, le dinucléotide modèle **9** en présence des phosphines acides aminés Gly-NHBoc **45** et Ala-NHBoc **47**, dans un mélange DMF/H₂O à 70 °C pendant 4 h suivi d'un traitement aqueux à 70 °C pendant 2 h. Les produits de ligation ont ainsi été obtenu avec des rendements respectifs de 29% et 35%. Nous observons également la formation majoritaire de l'oxazaphospholane avec un rendement de 63% dans le cas de la Gly-Boc **45** et 46% pour Ala-Boc **47**. Le phénomène de réduction est ici minoritaire, l'amine **13** est formée avec des rendements compris entre 6% et 20% (Tableau 5).



Entrée	R	Produit de ligation	Oxazaphospholane	Produit de réduction
1	H 45	64, 29% ^a	64', 63% ^a	13, 6% ^a
2	CH ₃ 47	65, 35% ^a	65', 46% ^a	13, 20% ^a

Tableau 5 : LSt en présence des phosphines **45** et **47**. ^a : rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 254 nm.

La réactivité des phosphines di-peptide **54** et tri-peptide **57** a ensuite été examinée. Dans les conditions de LSt, le produit de ligation est observé avec des rendements respectifs de 13% et 21%. En présence de la phosphine **54** la formation de l'oxazaphospholane **66'** étant majoritaire ce dernier est obtenu avec un rendement de 83%, alors que le produit de réduction **13** est formé avec un rendement de 4%. La phosphine **57** conduit à la formation de l'oxazaphospholane **67'** et du produit de réduction **13** avec des rendements respectifs de 48% et 31% (Tableau 6).



Entrée	R	Produit de ligation	Oxazaphospholane	Produit de réduction
1	Gly-Gly-NHBoc 54	66 , 13% ^a	66' , 83% ^a	13 , 4% ^a
2	Gly-Gly-Gly-NHBoc 57	67 , 21% ^a	67' , 48% ^a	13 , 31% ^a

Tableau 6 : LSt en présence de phosphines peptides protégés. ^a: rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 254 nm.

L'analyse des données expérimentales de cette étude montre que les phosphines protégées par un groupement Boc permettent d'obtenir le produit de ligation dans des proportions deux fois plus importante que lorsque la réaction est effectuée en présence de phosphines-acides aminés NH₂. La formation de l'oxazaphospholane reste cependant majoritaire. Ces résultats sont en accord avec le mécanisme proposé au chapitre II. La première étape du mécanisme réactionnel conduirait à la formation de l'imino-phosphorane II. En présence de phosphine portant des acides aminés protégés par un groupement Boc, l'attaque nucléophile de l'azote sur le carbonyle électrophile serait défavorisée par l'encombrement stérique généré par le groupement protecteur (Voie A, Schéma 97). Dans ce cas l'attaque de l'hydroxyle sur le phosphore conduisant au composé cyclique V serait majoritaire (Voie B, Schéma 97). L'oxazaphospholane V pourrait ensuite être réduit en présence d'eau pour conduire au composé VII. Lorsque l'acide aminé est déprotégé, ce dernier est sous forme chlorures et constituerait une source de proton. L'azote de l'oxazaphospholane présentant un fort caractère basique (pKa = 22.7),¹²⁸ pourrait se protoner (Voie C, Schéma 97) et se réduirait instantanément en amine VII.

¹²⁸ Nunez, M. G., Farley, A. G., Dixon D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 16348-16351.

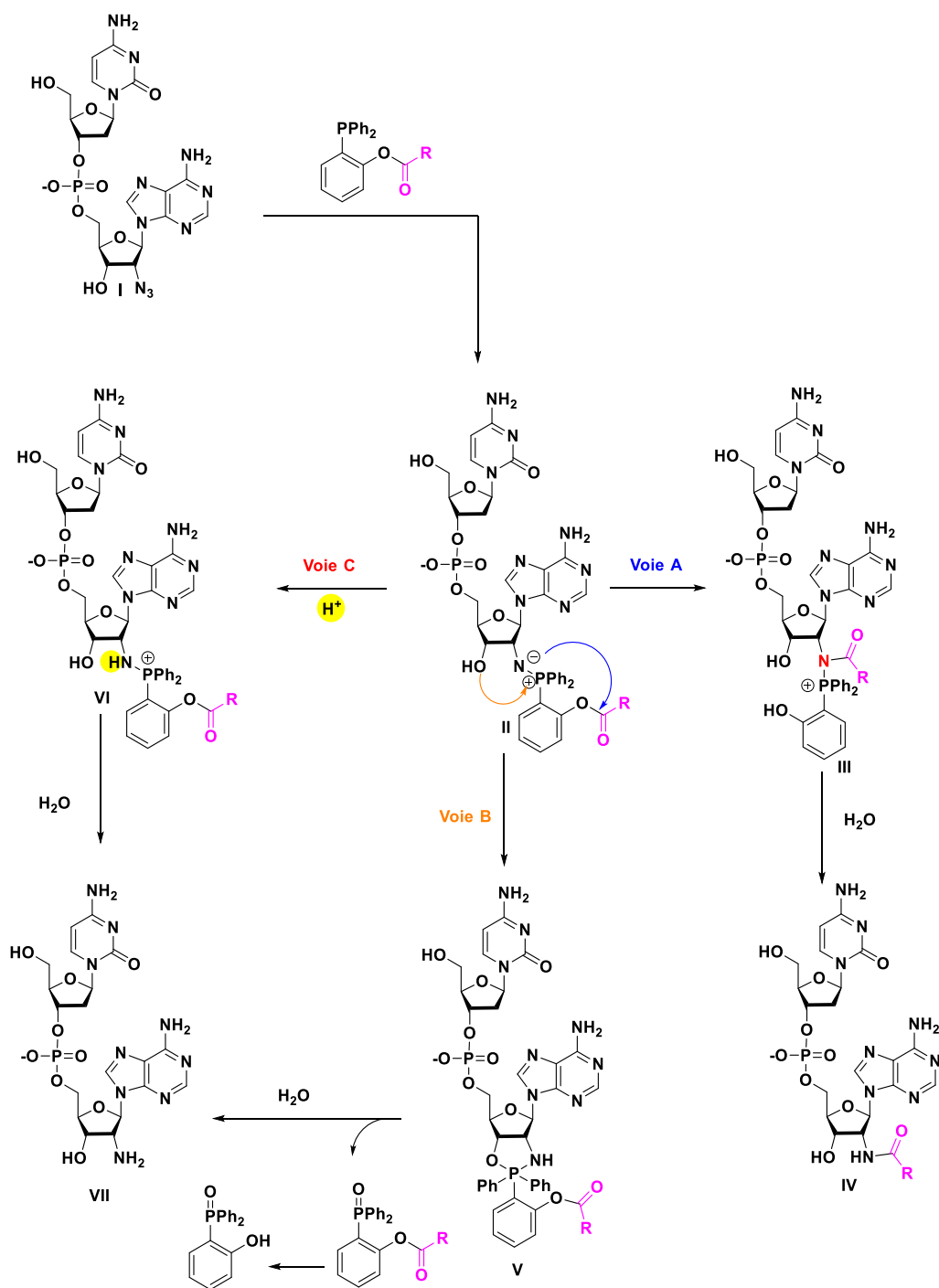
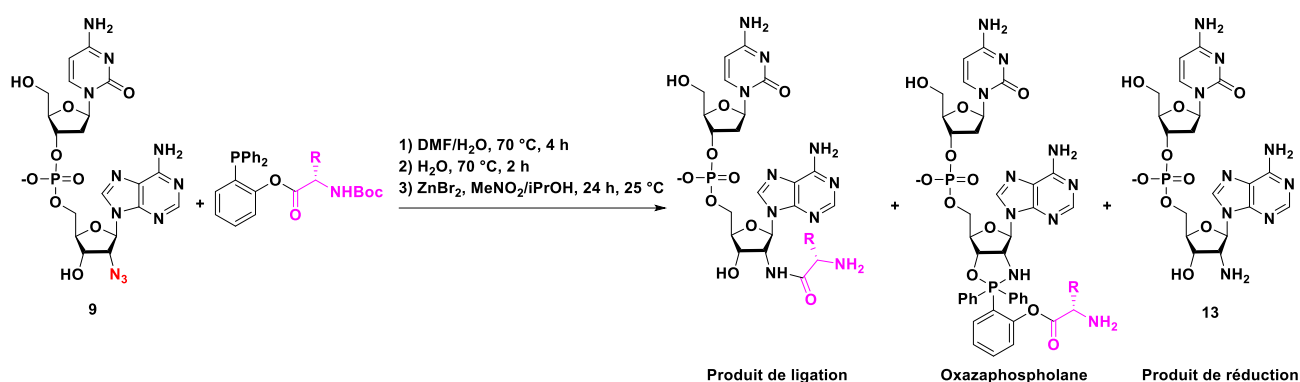


Schéma 97 : Mécanisme réactionnel proposé pour la LSt en présence de phosphines acide aminés

Nous avons montré à travers cette série de résultat que le 2'amido-dinucléotide était obtenu dans des proportions plus importante lorsque l'acide aminé était protégé Nous avons donc envisagé une stratégie permettant de déprotéger l'acide aminé après l'étape de LSt.

iii) Étape de déprotection du groupement Boc après LSt

Afin d'améliorer le rendement de LSt en faveur de l'amide nous avons opté pour une stratégie en 2 étapes. Dans un premier temps la ligation est réalisée en présence de phosphines portant l'acide aminé protégé par le groupement Boc, puis ce dernier présent sur le produit de ligation est clivé en présence de ZnBr₂. Dans ces conditions le produit de ligation **59** est obtenu avec un rendement de 13% en présence de **45** (Tableau 7, Entrée 1) tandis qu'en présence de **47**, le composé **60** est obtenu avec un rendement de 30% (Tableau 7, Entrée 2).



Entrée	R	Produit de ligation	Oxazaphospholane	Produit de réduction
1	H 45	59 , 13% ^a	59' , 4% ^a	13 , 83% ^a
2	CH ₃ 47	60 , 30% ^a	-	13 , 70% ^a

Tableau 7 : LSt en présence de phosphines-peptides protégés. ^a: rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 254 nm.

La déprotection de la fonction amine de l'acide aminé porté par la phosphine après l'étape de ligation nous a permis d'augmenter les proportions du composé désiré. En effet, cette stratégie nous permet de passer de 12% à 13% pour la ligation d'une glycine et de 18% à 30% pour la ligation de l'alanine. Ces conditions semblent les plus adéquates pour introduire un acide aminé en position 2' d'un dinucléotide par LSt.

D) Conclusion

Dans le but d'accéder à des analogues d'aminocycle ARNt 2' amide, nous avons développé deux stratégies différentes :

Une première stratégie reposant sur un couplage peptidique nous a permis d'obtenir, après ligation enzymatique, deux ARNt : le 2'-amido-Gly-ARNt^{Gly} et le 2'-amido-Gly-Gly-ARNt^{Gly} (Figure 8). Le 2'-amido-ARNt^{Gly} a été testé pour l'inhibition de FmhB et a révélé un CI₅₀ de l'ordre du μM. Ces ARN vont également pouvoir être utilisé par nos collaborateurs afin d'étudier la processivité de FemA et FemB.

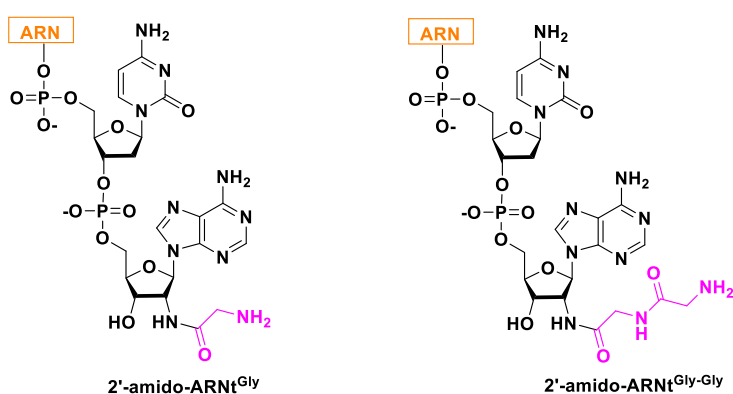


Figure 8 : 2'-amido-ARNt^{Gly} et 2'-amido-ARNt^{Gly-Gly} obtenus selon une stratégie pré-synthétique.

Dans un second temps, nous avons mis au point des conditions de ligation de Staudinger permettant d'accéder à ces analogues d'ARNt. Les conditions ont été validées sur un dinucléotide modèle en présence de différents acides aminés et nous envisageons leur application sur un ARN-2'-N₃ (Schéma 98).

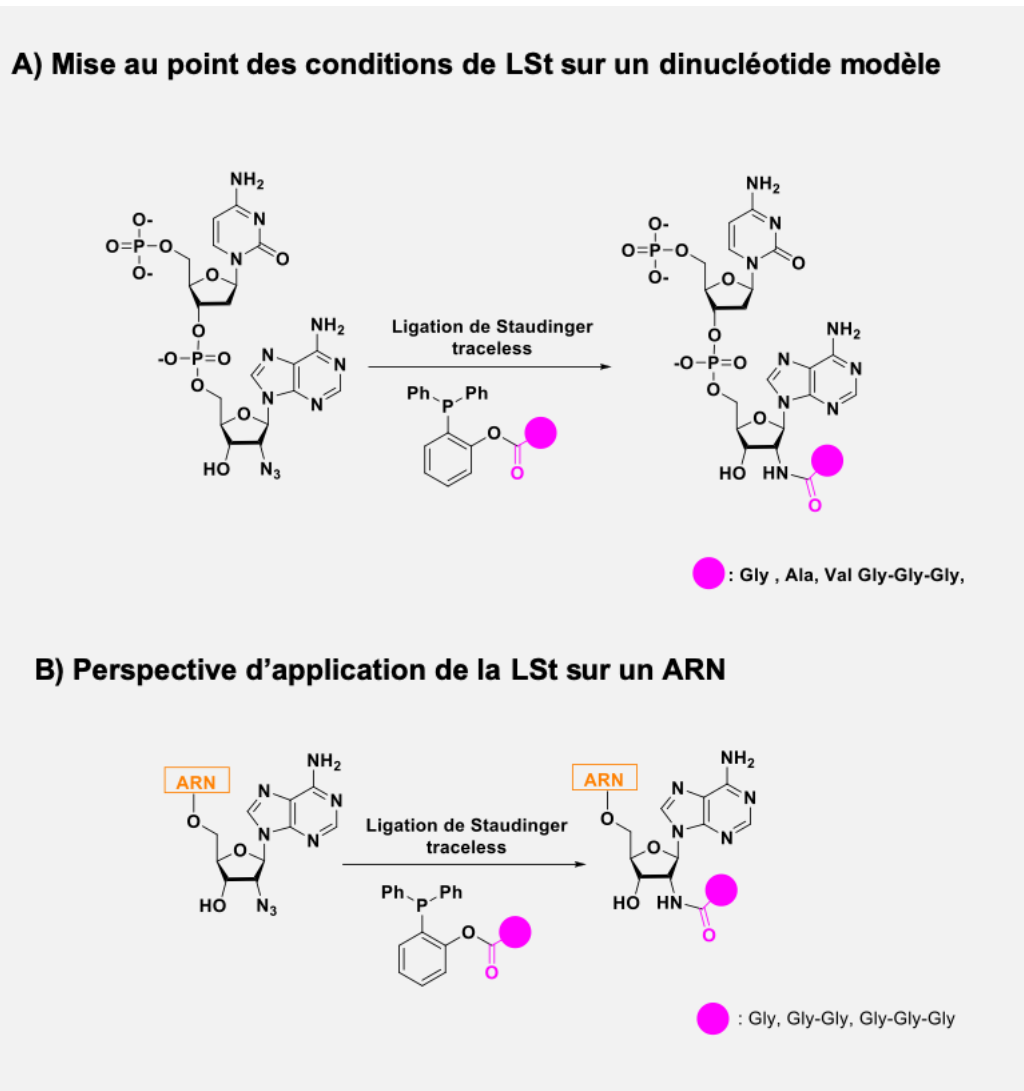


Schéma 98 : A) Mise au point des conditions de LSt sur un dinucléotide modèle, B) Perspective d'application de la LSt pour la fonctionnalisation d'ARN par des acides aminés.

CHAPITRE IV

Étude de la réactivité de l'adénosine dans des réactions de Staudinger traceless et application à la synthèse d'analogues de bisubstrats pour l'étude de méthyltransférase d'ARN

A) Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons montré le potentiel synthétique de la LSt pour la formation de liens amides afin de fonctionnaliser un ARN. Dans ce chapitre, nous avons pour but d'étudier la réactivité des positions C6 et 5'-OH de l'adénosine dans des réactions de Staudinger traceless (Figure 9A). Nous utiliserons ensuite les conditions mises au point pour accéder à des composés de type « bisubstrat » dans le cadre de l'étude de méthyltransférases d'ARN. Notre objectif est de synthétiser des dérivés dans lesquels deux adénosines seront reliées par un lien amide entre les positions C6 et 5'-OH de l'adénosine (Figure 9B). L'accès à ce type de conjugués passe par l'étude de la réactivité des positions C6 et 5'-OH en présence de phosphines dans les conditions de LSt

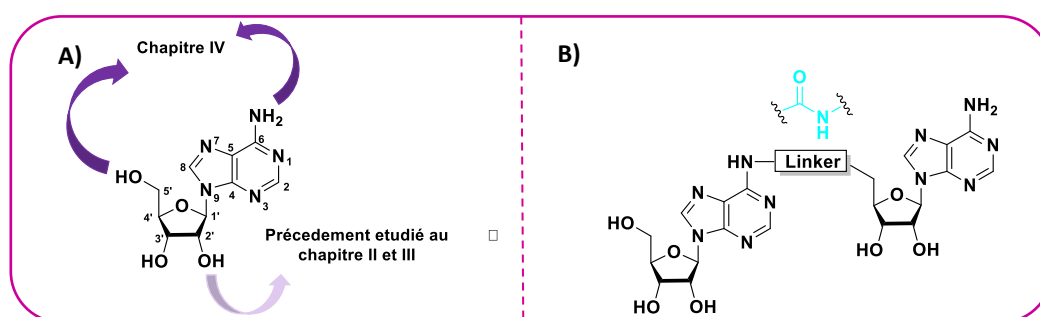


Figure 9 : A) Structure cible ; B) Application de la LSt à la fonctionnalisation de différentes positions réactives de l'adénosine

L'étude de la réactivité des positions C6 et 5'-OH de l'adénosine dans les réactions de LSt sera tout d'abord exposée dans ce chapitre avant d'aborder la préparation de composés de type bisubstrats par cette méthodologie.

B) Étude de la réactivité de la position 6 de l'adénosine par la LSt

1) Synthèse de la C6-azido adénosine

L'étude de la réactivité de la position C6 par la LSt nécessite l'accès à des dérivés 6-azido adénosine. Afin d'accéder à ce type de composés, nous nous sommes intéressés à la stratégie développée par le groupe de Lakshman en 2010 basée sur l'utilisation de nucléosides convertibles.¹²⁹

¹²⁹ Lakshman, M. K., Snigh, M. K., Parrish, D., Balachandran, R., Day, B. W. *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 2461-2473.

En effet, l'inosine traitée par le BOP en présence d'une base non nucléophile permet de générer *in situ* un nucléoside hautement électrophile stable et facilement isolable, pouvant réagir avec une grande diversité de nucléophiles (Schéma 99).¹³⁰

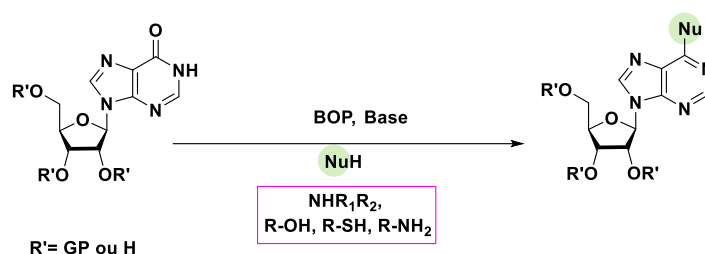


Schéma 99 : Fonctionnalisation de la position C6 de l'adénosine en présence de BOP et de différents nucléophiles.

Des études mécanistiques réalisées par le groupe de Mansour montrent que la première étape du mécanisme consiste en l'attaque de l'oxygène exocyclique de l'inosine sur le phosphore électrophile du BOP, conduisant ainsi à la formation d'un intermédiaire de type phosphonium I. Ce dernier réagit avec l'anion OBt^- afin de conduire au nucléoside hautement électrophile II, qui peut alors réagir avec un nucléophile afin de conduire à l'adénosine III (Voie A, Schéma 100). En présence d'un composé hautement nucléophile, l'intermédiaire réactionnel I peut réagir directement et conduire au composé d'intérêt III (Voie B, Schéma 100).¹³¹

¹³⁰ Bae, S., Lakshman, M. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 782-789.

¹³¹ Wan, Z. K., Wacharasindhu, S., Levins, C. G., Lin, M., Tabei, K., Mansour, T.S. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 10194-10210.

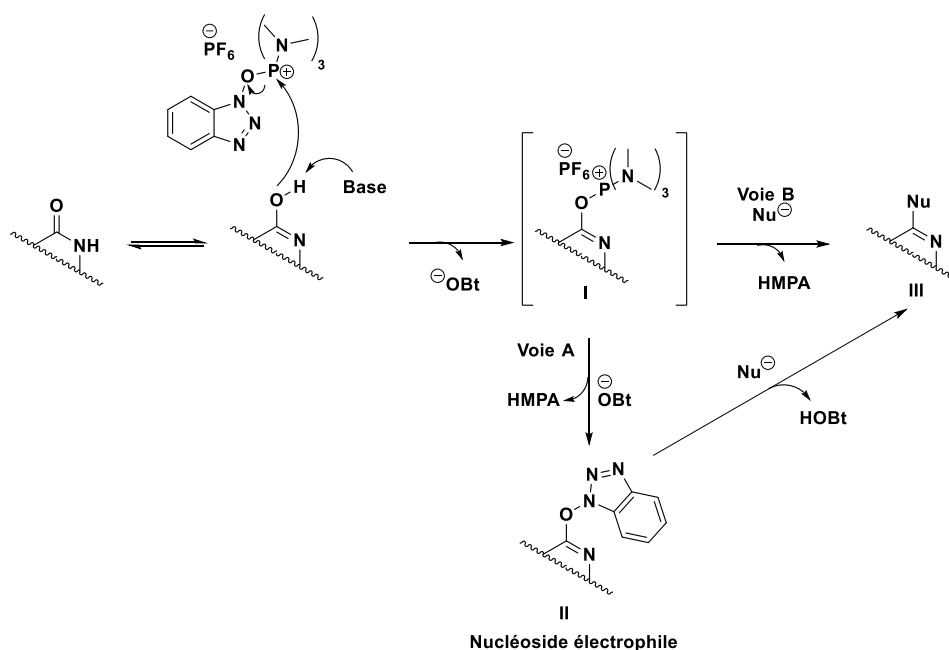


Schéma 100 : Mécanisme d'activation de l'inosine par le BOP

En nous basant sur l'ensemble de ces travaux, le composé **69** a été synthétisé selon le schéma réactionnel 101.

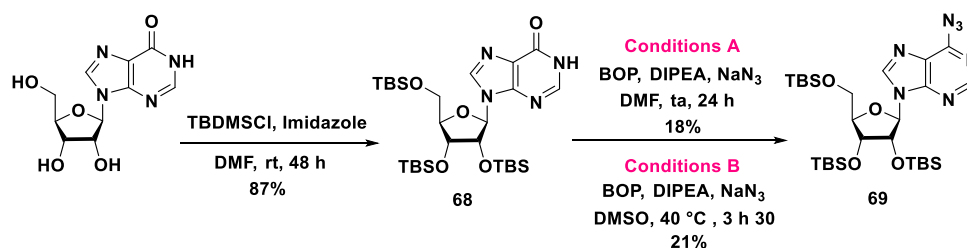


Schéma 101 : Synthèse de la C6-azido adénosine trisilylée 69

La première étape de la synthèse consiste en la protection des groupements hydroxyles de l'inosine par le *tert*-butyldiméthysilyle. Le composé **68** est alors obtenu avec un rendement de 87 %. Afin d'introduire l'azoture en position 6, une réaction de substitution nucléophile aromatique (S_NAr) a été réalisée en présence d'azoture de sodium, de BOP et de DIPEA dans le DMF à température ambiante pendant 24 h. Dans ces conditions le composé **69** a été isolé avec un rendement de 18 % (**Conditions A, Schéma 101**). La réaction a également été réalisée dans le DMSO, à 40 °C pendant 3h30, ce qui a permis d'accéder au composé **69** avec un rendement de 21% (**Conditions B, Schéma 101**).

L'analyse des spectres RMN ^1H du composé **69** réalisés dans le CDCl_3 montre la présence de 2 pics caractéristiques vers 6 ppm (H-1') correspondant à la présence de 2 nucléosides. Cette hypothèse est renforcée par la présence de plusieurs signaux dans la zone des protons aromatiques intégrant pour 4H (Figure 9).

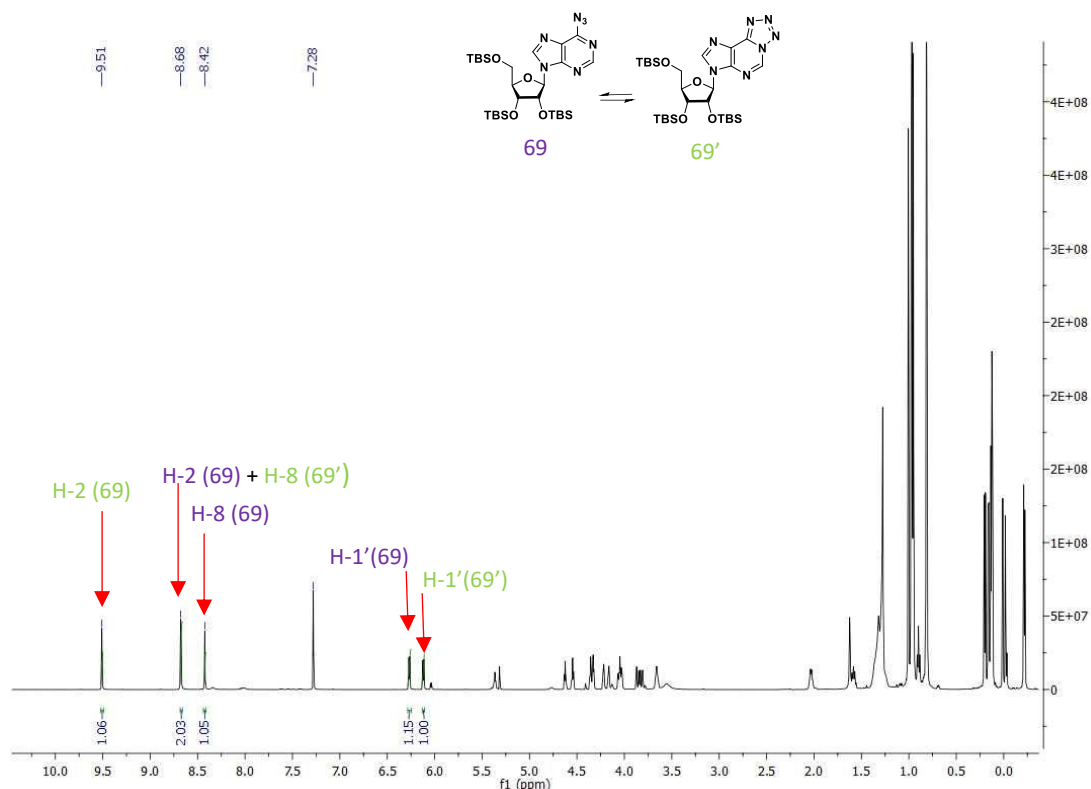


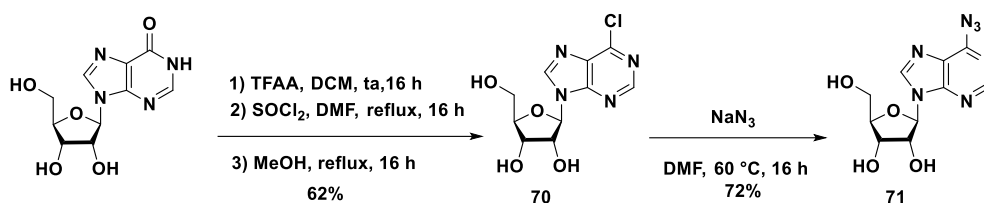
Figure 9 : Spectre RMN ^1H des composés **69** et **69'**

En effet, dans le cas des composés aza-aromatiques portant un groupement azoture en alpha d'un atome d'azote, un équilibre s'établit entre la forme ouverte azido (composé **69**) et la forme fermée tétrazole (composé **69'**). Cet équilibre est influencé par le caractère acido-basique du solvant. Dans le TFA seul le composé **69** est observé.¹³² La constante diélectrique du solvant joue également un rôle sur l'équilibre entre les deux formes **69** et **69'** : plus la constante diélectrique du solvant augmente et plus l'équilibre est déplacé en faveur du composé **69'**. Dans le chloroforme les deux formes sont présentes dans des proportions équivalentes (Figure 9).¹³³

¹³² a) Temple, C., Jr., Thorpe, M. C., Coburn, W. C., Jr., Montgomery, J. A. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 935-938; b) Temple, C., Jr., Kussner, C. L., Montgomery, J. A. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 2210-215.

¹³³ Temple, C., Jr, Thorpe, M. C., Coburn, W. C., Jr., Montgomery, J. A. *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 935-938.

La stratégie décrite par Lakshman nous a permis d'accéder au composé **69** mais avec un rendement faible. Nous avons alors décidé d'opter pour une autre stratégie qui consiste à réaliser la S_NAr sur la 6-chloro adénosine totalement déprotégée ([Schéma 102](#)).



*Schéma 102 : Synthèse de la C6-azido adénosine **71** à partir de la C6-chloro adénosine **70***

La 6-chloro adénosine **70** a été synthétisée à partir de l'inosine commerciale en 3 étapes.¹³⁴ Un traitement par l'anhydride trifluoroacétique dans le DCM permet de protéger temporairement les groupements hydroxyles, puis la chloration est réalisée en présence de chlorure de thionyle dans le DMF à reflux pendant 16 h. Une dernière étape de transestérification en présence de méthanol permet d'obtenir l'adénosine chlorée **70** avec un rendement de 62%. Ce composé a ensuite été traité par une solution de NaN₃ dans le DMF à 60 °C pendant 16 h. Dans ces conditions la C6-azido-adénosine **71** est obtenue avec un rendement de 72% ([Schéma 102](#)).

Le composé **71** étant soluble uniquement dans le DMSO, seule la forme tétrazole **71'** est observée en RMN ¹H ([Figure 10](#)).

¹³⁴ Zhao, H., Pagano, A. R., Wang, W., Shallop, A., Gaffney, B. L., Jones, R. A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7832-7835.

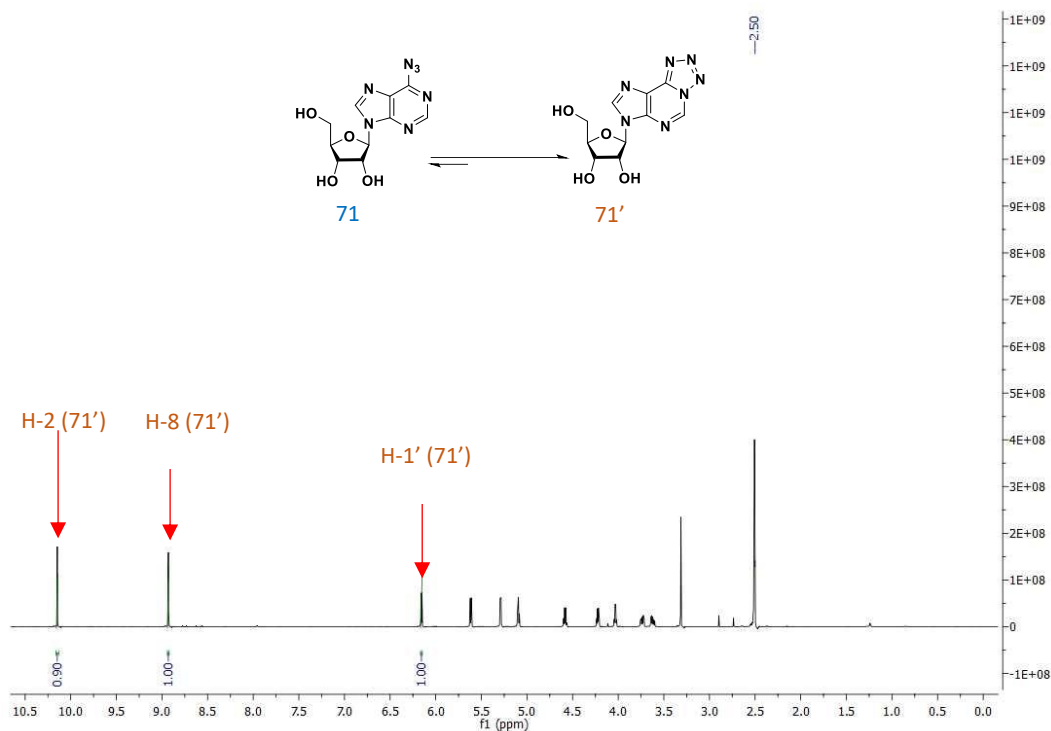


Figure 10 : Spectre RMN ^1H du composé **71'** dans le DMSO

Nous avons présenté la synthèse de la C6-azido adénosine sous forme protégée et non protégée, à présent nous allons évaluer la réactivité de ces composés en présence de phosphines dans les conditions de la LSt.

2) Ligation de Staudinger traceless

Un premier essai de LSt a été réalisé sur le composé **69** en présence de la phosphine **10b**, la réaction est réalisée dans un mélange DMF/ H_2O à $40\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 16 h. Dans ces conditions, seul l'imino-phosphorane **72** a été isolé avec un rendement de 90% (Schéma 103).

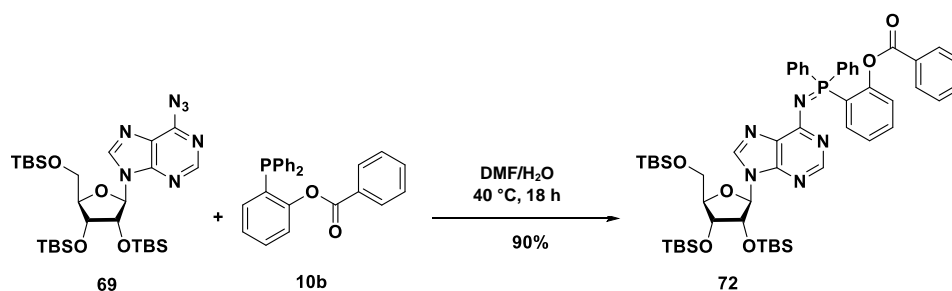


Schéma 103 : Étude de la réactivité de C6-azido adénosine **69** en présence de la phosphine **10b**

La LSt a ensuite été appliquée au nucléoside déprotégé **71** en présence de la phosphine **10d** dans un mélange DMF/H₂O. La réaction a conduit à la formation du produit de réduction **73** avec un rendement de 69% ainsi qu'à l'imino-phosphorane **74** avec un rendement de 31% (Schéma 104).

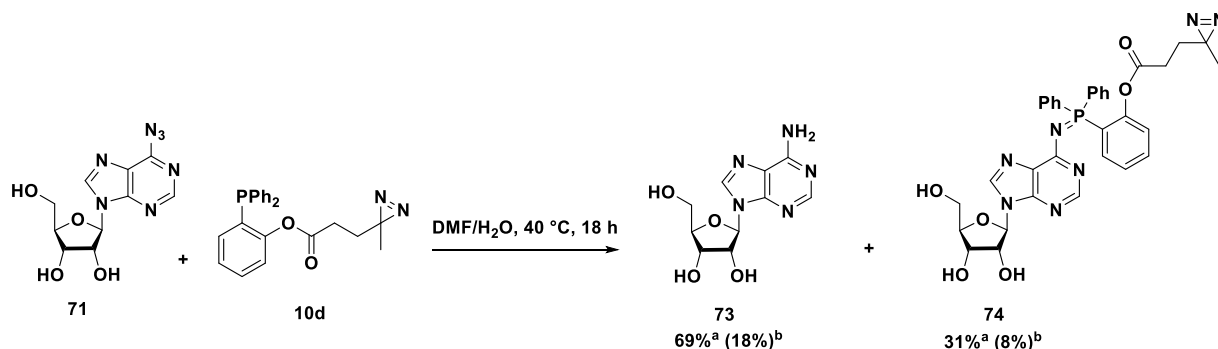


Schéma 104 : Étude de la réactivité de la C6-azido adénosine **71** en présence de la phosphine **10d**. ^a : rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 254 nm. ^b : rendement isolé.

Comme le montre ces deux résultats, la formation des dérivés imino-phosphoranes ne dépend pas de la nature de la phosphine mais de la stabilisation de cet adduit formé au cours de la LSt. Cela peut s'expliquer par le fait que les électrons de la liaison N-P sont engagés dans la mésomérie du noyau aromatique de l'adénine. Cela rend le doublet de l'azote moins nucléophile et ne permet pas le transfert d'acyle. La réaction s'arrête donc à l'imino-phosphorane stabilisé. Ce dernier peut également être hydrolysé et conduire à l'amine **73** (Schéma 105).

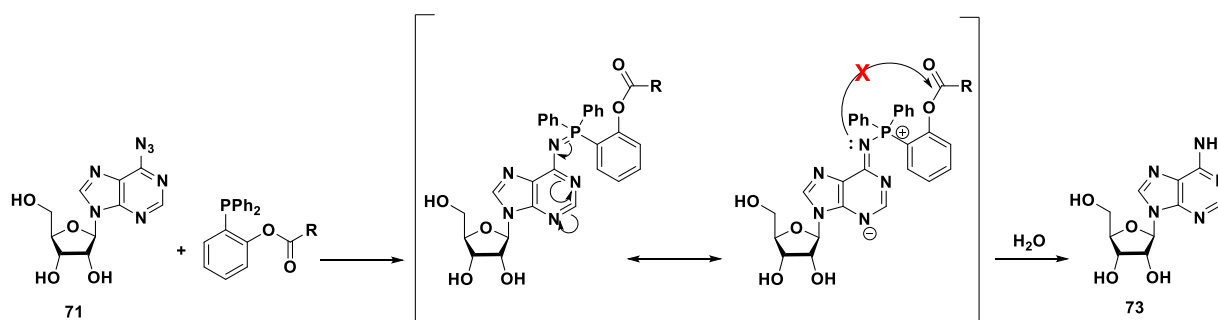


Schéma 105: Formation d'un imino-phosphorane stabilisé

Afin d'augmenter la réactivité de l'imino-phosphorane, nous avons envisagé d'éloigner l'azoture du noyau aromatique par l'intermédiaire d'un lien alkyle. L'introduction de ce dernier en

position C6 a été réalisée par S_NAr à partir de l'inosine commerciale en présence de la 2-azidoéthylamine **75**. Selon la stratégie d'activation en présence de BOP,¹³⁵ le composé **76** a ainsi été obtenu avec un rendement de 94% (Schéma 106).

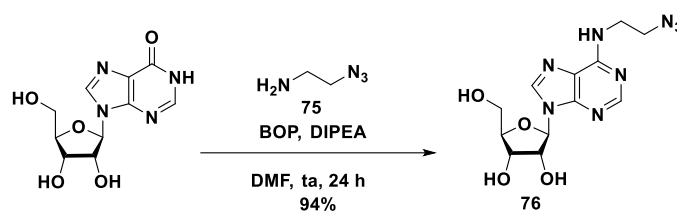
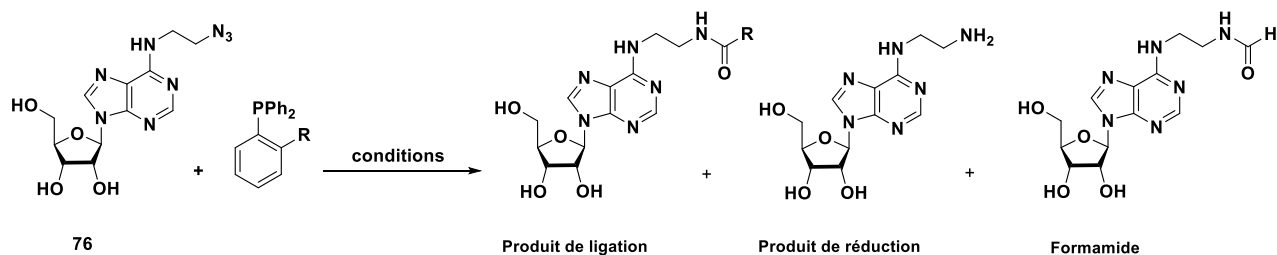


Schéma 106 : Synthèse de la N6-azido éthyle adénosine **76**

Afin d'évaluer la réactivité du composé **76** dans les conditions de LSt, cette dernière a été mise en présence de phosphines. Pour cela nous nous sommes tournés vers les phosphines portant un acide aminé.

Pour réaliser notre étude, nous avons choisi la phosphine-Phe-NH₂ **52** comme phosphine modèle. Cette dernière a été mise en présence du nucléoside **76**, dans un mélange DMF/H₂O à 40 °C pendant 16 h. Dans ces conditions, le produit de ligation a été formé avec un rendement de 28%, en compétition avec le produit de réduction **78** obtenu avec un rendement de 40%. Un sous-produit de type formamide **79** a également été formé avec un rendement de 32% (Tableau 8, Entrée 1). Afin de comprendre la formation de ce produit de formylation, nous avons tout d'abord étudié l'influence de la phosphine. Pour cela, le nucléoside **76** a été mis en présence de PPh₃ dans un mélange DMF/H₂O. Dans ce cas, la réaction conduit exclusivement au produit de réduction **78** (Tableau 8, Entrée 2). Puis, nous nous sommes intéressés à l'effet du solvant sur la LSt entre le composé **76** et la phosphine **52**. La réaction a été réalisée dans un mélange THF/H₂O à 40 °C pendant 16 h. Le produit de ligation et le produit de réduction ont été obtenus avec des rendements respectifs de 33% et 66%. Le formamide n'a pas été observé dans ces conditions (Tableau 8, Entrée 3).

¹³⁵ Bae, S., Lakshman, M. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 782-789.



Entrée	R	Conditions	Produit de ligation	Produit de réduction	Formamide
1		DMF/H ₂ O, 40 °C, 16h	77 28% ^a (8%) ^b	78 40% ^a (15%) ^b	79 32% ^a (6%) ^b
2	H	DMF/H ₂ O, 40 °C, 16 h	-	78 100% ^a (43%) ^b	-
3		THF/H ₂ O 40 °C, 16 h	77 33% ^a (7%) ^b	78 66% ^a (22%) ^b	-

Tableau 8 : Étude de la réactivité du composé **76** dans les conditions de LSt. ^a: rendement déterminé par HPLC, par intégrations des pics à 254 nm, ^b: rendement isolé.

L'analyse de ces résultats nous laisse penser que la formation du formamide serait influencée par deux paramètres : le solvant et la nature de la phosphine. Bien que généralement utilisé comme solvant, le DMF peut jouer le rôle de réactif de formylation d'amine.¹³⁶ La *N*-formylation d'amine primaire ou secondaire dans le DMF a été décrite par le groupe de Jeon. Dans ce cas, la réaction est réalisée en présence d'une quantité catalytique d'ester sous irradiation micro-ondes (Schéma 107).¹³⁷

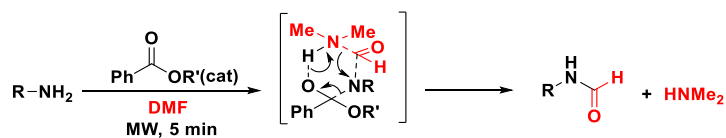


Schéma 107 : : *N*-formylation d'amines

¹³⁶ Heravi, M. M., Ghavidel, M., Mohammadkhani, L. *RSC Adv.* **2018**, 8, 27832-27862.

¹³⁷ Yang, D. S., Jeon, H. B. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, 31, 1424-1426.

Le DMF peut également réagir avec des anilines en présence d'acide. Dans ces conditions, l'attaque nucléophile de l'amine sur le DMF activé suivit de l'élimination de diéthylamine conduit à la formation de *N*-phénylformamide (Schéma 108).¹³⁶

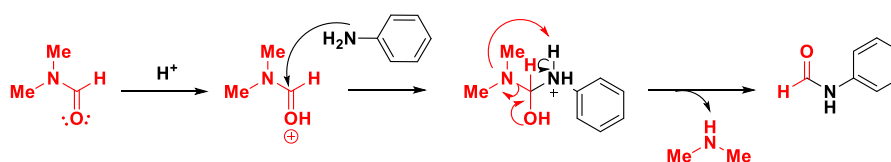


Schéma 108 : : Synthèse de *N*-phénylformamides

Par analogie, nous pouvons supposer que le sous-produit formamide observé lors de la LSt résulterait de la réaction entre le produit de réduction et le DMF. Les phosphines mise en jeu comportent une fonction ester et pourraient par conséquent catalyser la réaction entre l'amine et le DMF conduisant à la formation du formamide. De plus, les phosphines acides aminés constituent une source de protons supplémentaires capables d'induire la protonation du DMF.

3) Conclusion

Dans cette première partie nous avons étudié la réactivité de la 6-azido adénosine. Nous avons mis en évidence un équilibre entre les deux formes azido et tétrazole. L'application de la LSt a par la suite conduit à la formation d'un iminophosphorane stable ne permettant pas la formation d'un lien amide. Nous nous sommes alors tournés vers la synthèse du dérivé N6-azido ethyle **76**. La réactivité de ce dernier en LSt a été évaluée et la formation d'un sous-produit de formylation a été mis en évidence (Figure 11).

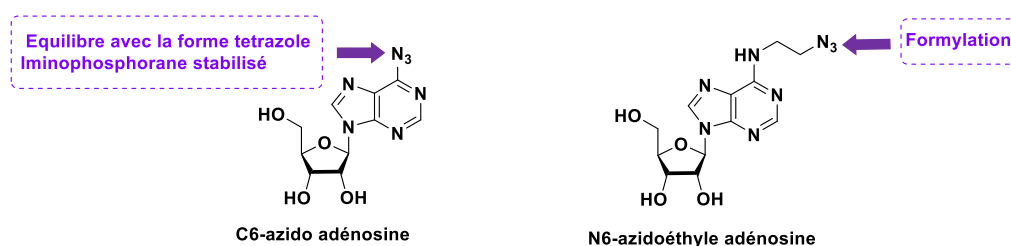


Figure 11 : Bilan de l'étude de la réactivité de la position 6 de l'adénosine

Nous nous sommes ensuite intéressés à la réactivité de la position 5'. Nous allons dans un premier temps présenter la synthèse de la 5'-azido adénosine, puis nous étudierons la réactivité du composé obtenu dans les conditions de LSt.

C) Étude de la réactivité de la position 5' de l'adénosine par LSt

1) Synthèse de la 5'-azido adénosine

La synthèse du composé **81** a été réalisée en deux étapes (Schéma 109).¹³⁸

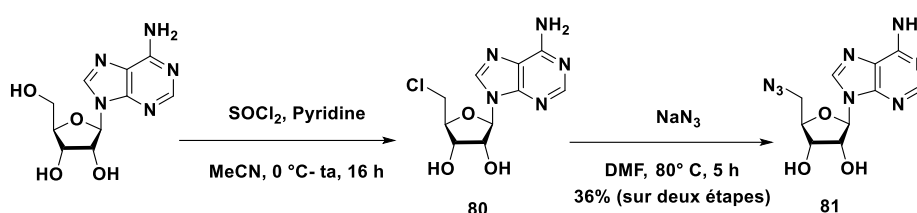


Schéma 109 : Synthèse de la 5'-azido adénosine **81**

L'adénosine commerciale a été mise en présence de chlorure de thionyle et de pyridine dans l'acétonitrile. Le composé **80** obtenu est directement engagé dans une étape de substitution nucléophile en présence d'azoture de sodium pour conduire au composé **81** avec un rendement de 36% sur deux étapes.

2) Fonctionnalisation de la position 5' de l'adénosine par LSt

Afin d'éviter les réactions secondaires induites par les phosphines-acides aminés, nous avons choisi d'utiliser la phosphine phényle **10b** pour notre étude. Cette dernière a été mise en présence du composé **81** dans les conditions de la LSt. Le produit **82** a été obtenu avec un bon rendement de 70% mais s'accompagne également de la formation du produit de réduction **83** (Schéma 110).

¹³⁸ Atdjian, C., Coelho, D., Iannazzo, L., Ethève-Quelquejeu, M., Braud, E. *Molecules*, **2020**, 25, 3241.

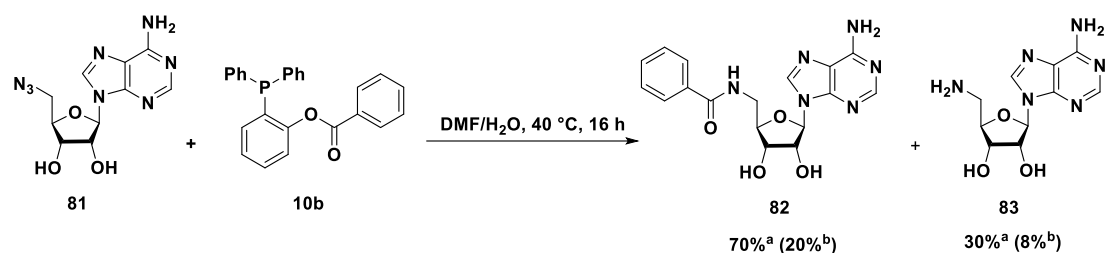


Schéma 110 : Fonctionnalisation de la position 5' de l'adénosine par LSt. ^a : rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 254 nm, ^b: rendement isolé

Ce résultat montre que la formation d'un lien amide par LSt en position 5' est plus favorable qu'en position C6. En effet la 5'-amido adénosine a été obtenue avec un rendement de 70%, tandis que la fonctionnalisation de la position C6 par cette méthode est rendue difficile par la faible nucléophilie de l'azote exocyclique.

D) Synthèse d'analogues de bisubstrats pour l'étude de méthyltransférases d'ARN

1) Contexte biologique

i) Les méthyltransférases d'ARN (RMTases)

Les méthyltransférases d'ARN (RMTases) sont des enzymes qui catalysent le transfert d'un méthyle porté par le cofacteur S-Adénosyl-L-Méthionine (SAM) sur l'ARN et conduisent à la formation de S-Adénosyl-L-Homocystéine (SAH) (Schéma 111). Il a récemment été démontré qu'une dérégulation de ce processus est associée au développement de maladies telles que des cancers, des troubles neurologiques ou métaboliques.¹³⁹ Cependant, les RMTases restent encore peu étudiées. Une des raisons, est le manque de données structurales liées à la difficulté de cristallisation des complexes ARN/protéines.

¹³⁹ Batista, P. J. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **2017**, 15, 154-163.

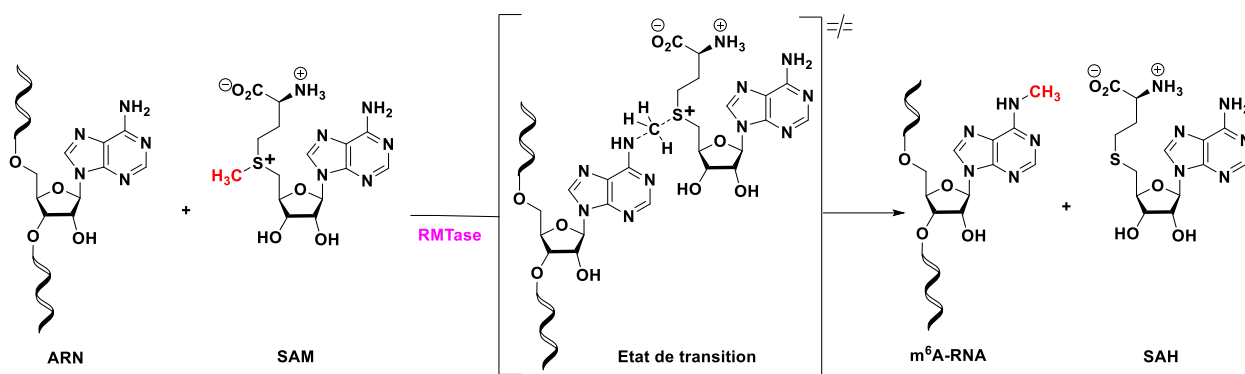


Schéma 111 : Méthylation d'ARN en position N6 de l'adénosine par les RMTases

ii) Analogues de type bisubstrats

Dans ce contexte, notre équipe a développé les premiers outils moléculaires de type bisubstrats afin d'effectuer des études structurales de RMTases impliquées dans la méthylation de la position N6 de l'adénosine (m^6A). Ces derniers sont composés d'une partie mimant l'ARN liée de manière covalente à un analogue de SAM (Figure 12). Des travaux précédents de l'équipe ont permis de mettre au point 3 familles de composés de type bisubstrats comportant des liens de natures différentes.

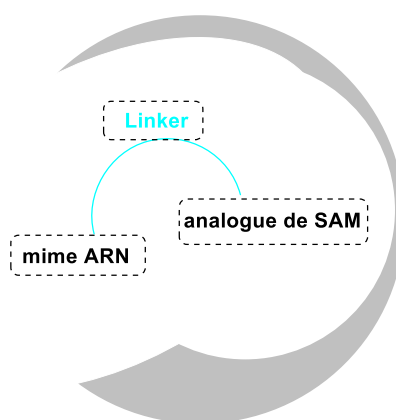


Figure 12 : Concept d'analogue de bisubstrat

iii) Bisubstrats synthétisés au laboratoire

Une première famille de conjugués SAM-adénosine comportant un lien alkyle et dans lesquels l'atome de soufre réactif de la SAM a été remplacé par un atome d'azote a été synthétisée.¹⁴⁰ Le lien alkyle est inséré en faisant réagir un analogue de SAM azoté avec l'inosine en présence de BOP. Ce dernier permet la formation *in situ* d'une O⁶-(benzotriazolyl)inosine électrophile,¹⁴¹

¹⁴⁰ Atdjian, C., Iannazzo, L., Braud, E., Ethève-Quelquejeu, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 32, 4411-4425.

¹⁴¹ Bae, S., Lakshman, M. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 782-789.

qui est fonctionnée par une réaction de substitution nucléophile aromatique (S_NAr) faisant intervenir l'amine primaire de l'analogue de SAM (Schéma 112).

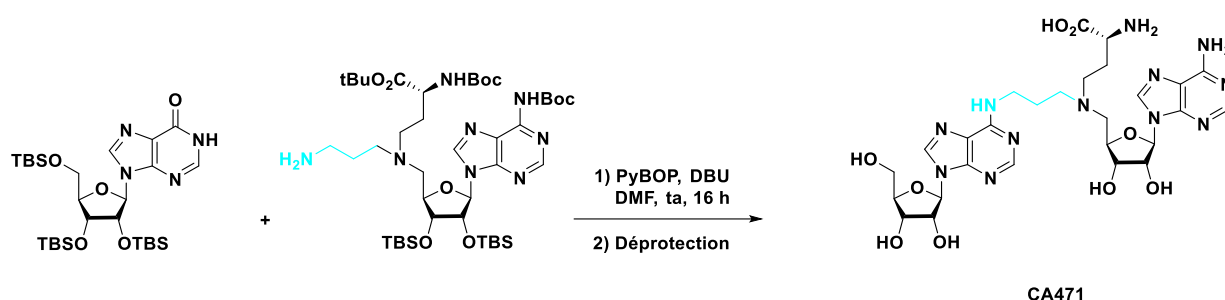


Schéma 112 : Synthèse d'un conjugué à lien alkyle

Une structure cristallographique du complexe RlmJ (m^6A rMTase modèle d'*E. coli*)/CA471 a été obtenue.¹⁴² Cette structure permet de valider l'approche bisubstrat en montrant la reconnaissance de l'enzyme pour le conjugué synthétisé. Si la partie acide aminé se place correctement dans la poche du site actif, on observe que la partie mimant le cofacteur SAM présente une variation de 120° par rapport à la position de la SAH dans la poche catalytique de RlmJ (Figure 13).

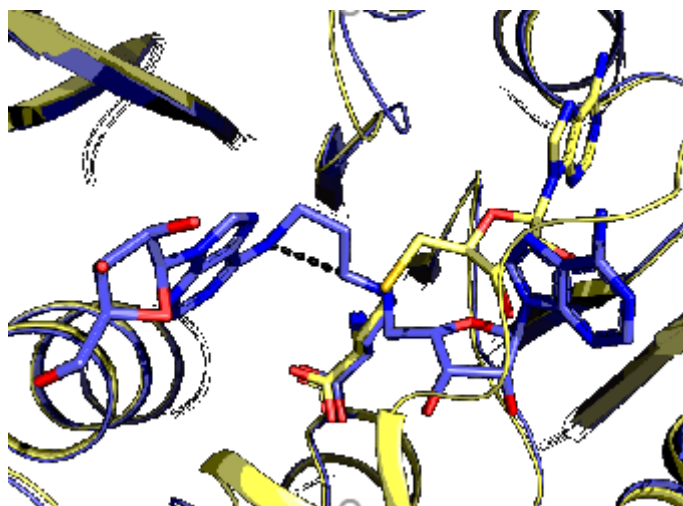


Figure 13 : Structure cristallographiques de CA471 avec RlmJ. En Bleu le bisubstrat, en jaune la SAH a été ajoutée à la structure

¹⁴² Oerum, S., Catala, M., Atdjian, C., Brachet, F., Ponchon, L., Barraud, P., Iannazzo, L., Droogmans, L., Braud, E., Ethève-Quellejeu, M., Tisné, C. *RNA Biol.* **2019**, *16*, 798-808.

D'autres liens ont été étudiés, notamment le lien urée dans le but de réduire la taille de l'espaceur entre les deux nucléosides. Pour cela, une stratégie reposant sur l'activation de la position 6 de l'adénosine sous forme de carbamate a été mise en œuvre. L'adénosine activée peut ainsi réagir avec l'amine en position 5' de l'analogue de SAM et conduire à la formation du conjugué **CA422** (Schéma 113).

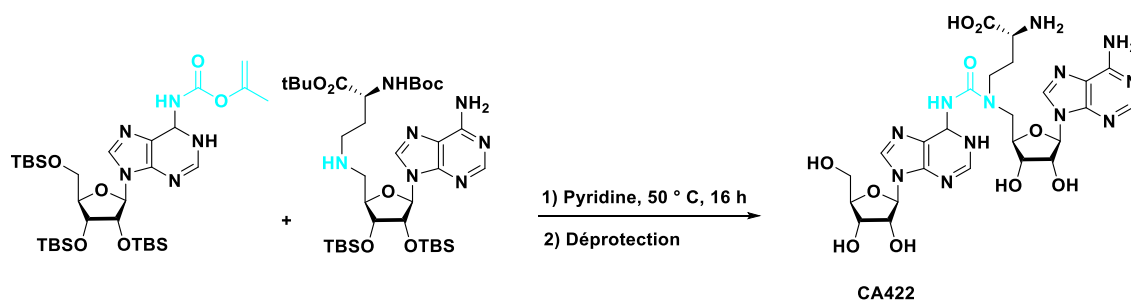


Schéma 113 : Synthèse de conjugué à lien urée

Une famille de conjugués SAM-adénosine possédant un lien triazole a également été synthétisée. Ce lien triazole permet d'augmenter la rigidité tout en conservant une longueur proche de celle du lien alkyle que l'on retrouve chez **CA471**. Ce dernier est introduit par une étape de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre (I) (CuAAC). La synthèse du conjugué SAM-adénosine a été réalisée en s'appuyant sur une approche sans groupement protecteur faisant intervenir une adénosine portant un alcyne en position 6 et un azoture en position 5' de l'analogue de SAM (Schéma 114).¹⁴³

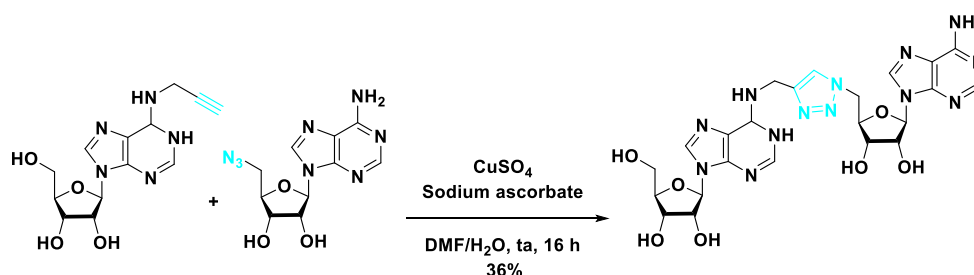


Schéma 114 : Synthèse d'un conjugué à lien triazole

Cette stratégie basée sur une approche de type bisubstrat a également été appliquée récemment à l'étude d'ARN 2'-O-méthyltransférases par le groupe de F. Debart.¹⁴⁴ Ce concept leur a permis de développer des inhibiteurs spécifiques et efficaces d'une méthyltransférase

¹⁴³ Atdjian, C., Coelho, D., Iannazzo, L., Ethève-Quellejeu, M., Braud, E. *Molecules*, **2020**, *25*, 3241.

¹⁴⁴ Belkacem, R. A., Sutto-Ortiz, P., Decroly, E., Vasseur, J., Debart, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *38*, 6486-6495.

présente chez le virus SARS-CoV : la nsp14, enzyme permettant la méthylation de la partie Cap de l'ARN viral.¹⁴⁵

Dans le cadre de mes travaux de thèse, je me suis intéressée à la synthèse d'une nouvelle famille de conjugués SAM-adénosine faisant intervenir un lien amide généré par LSt, afin d'élargir la diversité moléculaire des bisubstrats.

2) Application de la LSt à la synthèse de conjugué SAM-adénosine

Selon une première stratégie, nous avons tenté d'accéder à un conjugué SAM-adénosine présentant un lien amide par ligation entre la 5'-azido adénosine et une phosphine phényle ester substituée par une adénosine (Schéma 115).

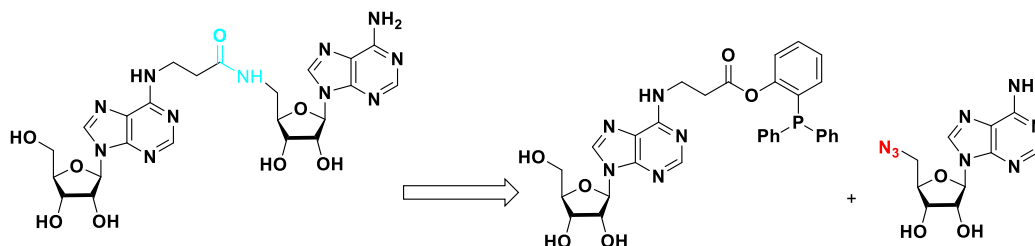


Schéma 115 : Synthèse de conjugués SAM Adénosine par la LSt

Dans un premier temps, la synthèse de la phosphine adénosine est nécessaire. L'inosine commerciale a été mise en réaction avec la phosphine **10i** dont la synthèse a été présentée au chapitre II de ce manuscrit. La réaction réalisée en présence de BOP et de DIPEA a conduit à la rupture du lien ester (Schéma 116).

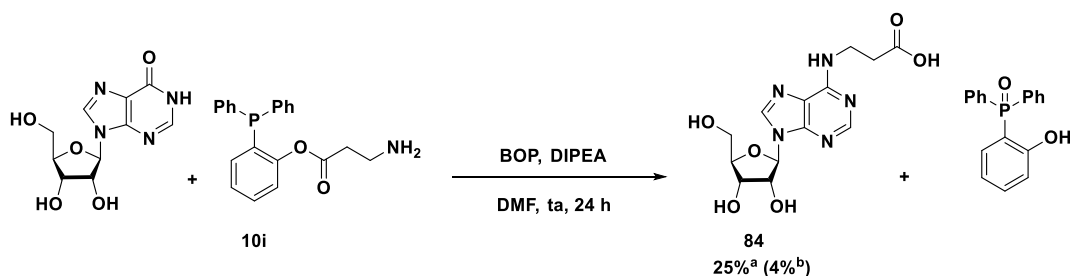


Schéma 116 : Réaction entre l'inosine et la phosphine-β-alanine-NH₂ **10i**.^a : rendement déterminé par HPLC, par intégration des pics à 254 nm, ^b: rendement isolé

¹⁴⁵ Belkacem, R. A., Sutto-Ortiz, P., Grimaud, M., Canard, B., Vasseur, J., Decroly, E., Debart, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *201*, 112557.

La synthèse de la phosphine adénosine et la fragilité du lien ester n'étant pas compatible, nous nous sommes tournés dans un second temps vers une variante de la LSt qui ne nécessite pas la synthèse de phosphines. Cette méthodologie décrite par le groupe de Ashfeld permet la création d'une fonction amide à partir d'un azoture et d'un acide carboxylique en présence de phénylsilane et d'une quantité catalytique de triphénylphosphine.¹⁴⁶ Cette stratégie efficace avec des phosphines aryles ou alkyles a également été appliquée avec succès à la synthèse peptidique et la formation de lactames (Schéma 117).

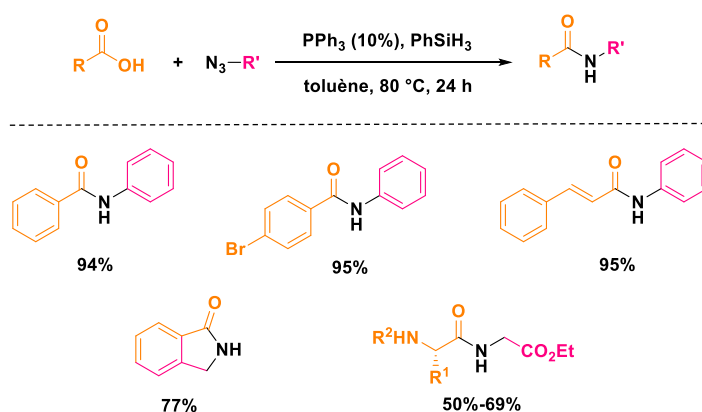


Schéma 117 : LSt en présence de PPh_3 et $PhSiH_3$

Les études mécanistiques réalisées par ce même groupe reposent sur un cycle rédox P^{III}/P^V . La première étape du mécanisme réactionnel proposé consiste en la formation de l'imino-phosphorane **I**. Puis l'azote basique de ce dernier déprotone l'acide carboxylique pour former le carboxylate de phosphonium **II**. L'activation de ce dernier par la formation d'une liaison partiellement covalente entre le phosphore et l'oxygène permet le transfert d'acyle conduisant à la formation du composé **IV** et au relargage de la phosphine oxydée. La réduction de l'oxyde de phosphine par le phénylsilane régénère la phosphine, complétant ainsi le cycle catalytique (Schéma 118).

¹⁴⁶ Kosal, A. D., Wilson, E. E., Ashfeld, B. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12036-12040.

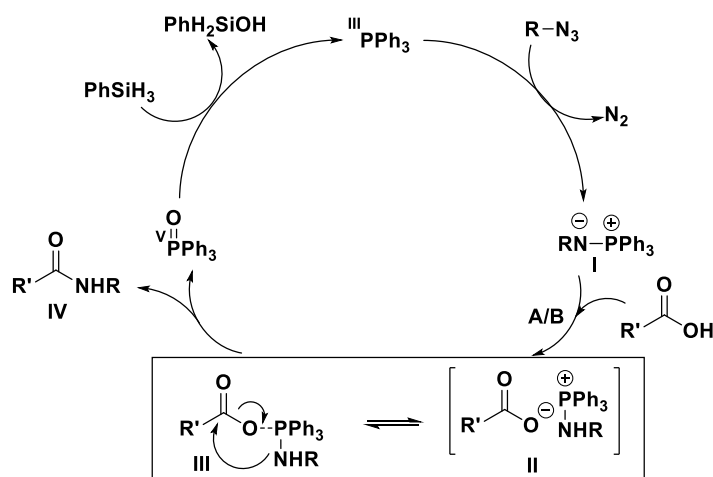


Schéma 118 : Mécanisme de ligation de Staudinger basé sur un cycle rédox P^{III}/P^V

Il a également été démontré que le transfert d'acyle au cours de la réaction dépendait de plusieurs paramètres :

- 1) Le nombre d'équivalents de phénylsilane : les silanes étant de très bon réducteurs, les réactions réalisées avec plus de 1.5 équivalent de phénylsilane conduisent à la réduction de l'azoture en amine.
- 2) L'encombrement stérique et les effets électroniques de l'acide carboxylique.
- 3) La constante de dissociabilité (pK_b) du sel de phosphonium formé au cours de la réaction. En effet, plus le pK_b est élevé, plus la formation de la liaison oxygène-phosphore est défavorisée et par conséquent moins le transfert d'acyle est efficace.

En s'appuyant sur ces conditions, nous avons envisagé d'accéder au conjugué SAM-adénosine **86** par ligation du dérivé **84** et de la 5'-azido adénosine **81**. Le composé **84** serait obtenu par attaque de la β -alanine sur l'inosine commerciale par S_NAr selon les conditions d'Ashfeld (Schéma 119).

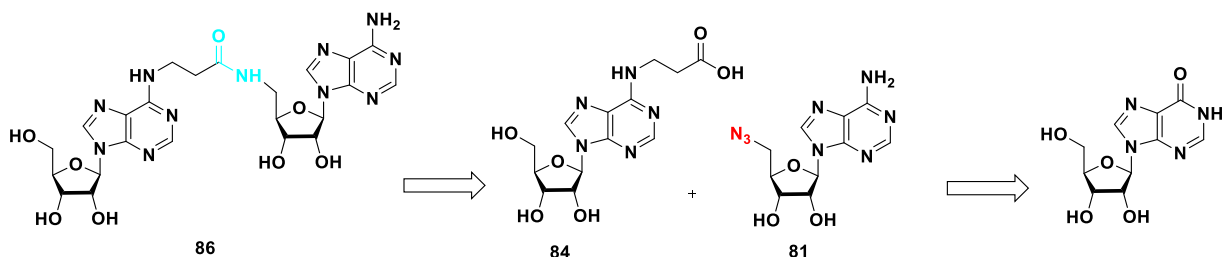


Schéma 119 : Stratégie d'accès au conjugué SAM-Adénosine

Le dérivé **84** a été préparé à partir de l'inosine commerciale en présence de β -alanine par activation *in situ* du carbone C6 par le BOP et la DIPEA dans le DMF. Dans ces conditions le composé **85** a été isolé avec un rendement de 10% (Schéma 120).

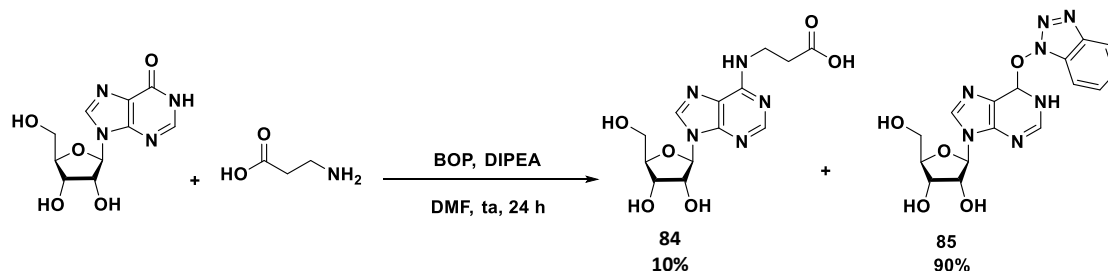


Schéma 120 : Synthèse de l'acide **84**

Le nucléoside **84** comportant la fonction acide carboxylique a ensuite été mis en présence de la 5'-azido adénosine **81**, de PhSiH_3 et de PPh_3 , dans le toluène à 80 °C pendant 24 h. Dans ces conditions, le conjugué **86** a été obtenu avec un rendement de 90%^a en une seule étape, tout en nous affranchissant de la formation d'oxyde de phosphine (Schéma 121).

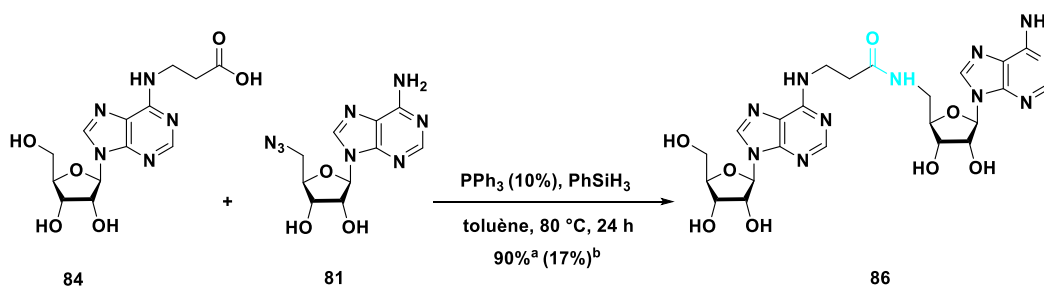


Schéma 121 : Synthèse du conjugué **86**. ^a: rendement déterminé par HPLC, par intégrations des pics à 254 nm, ^b: rendement isolé.

E) Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié la ligation de Staudinger traceless en position C6 de l'adénosine. La réactivité de cette position dans les conditions de LSt a révélé la formation d'un iminophosphorane stable ne permettant pas le transfert d'acyle. Puis un linker a été introduit sur l'amine exocyclique afin de rétablir la réactivité de l'imino-phosphorane. Dans ce cas, la formation d'un produit de ligation a été observé et un sous-produit de formylation a également été mis en évidence. Enfin, une variante de LSt catalysée par la triphénylphosphine a permis de créer une fonction amide en position 5' d'une adénosine pour conduire à la synthèse d'un conjugué SAM-adénosine (Figure 14).

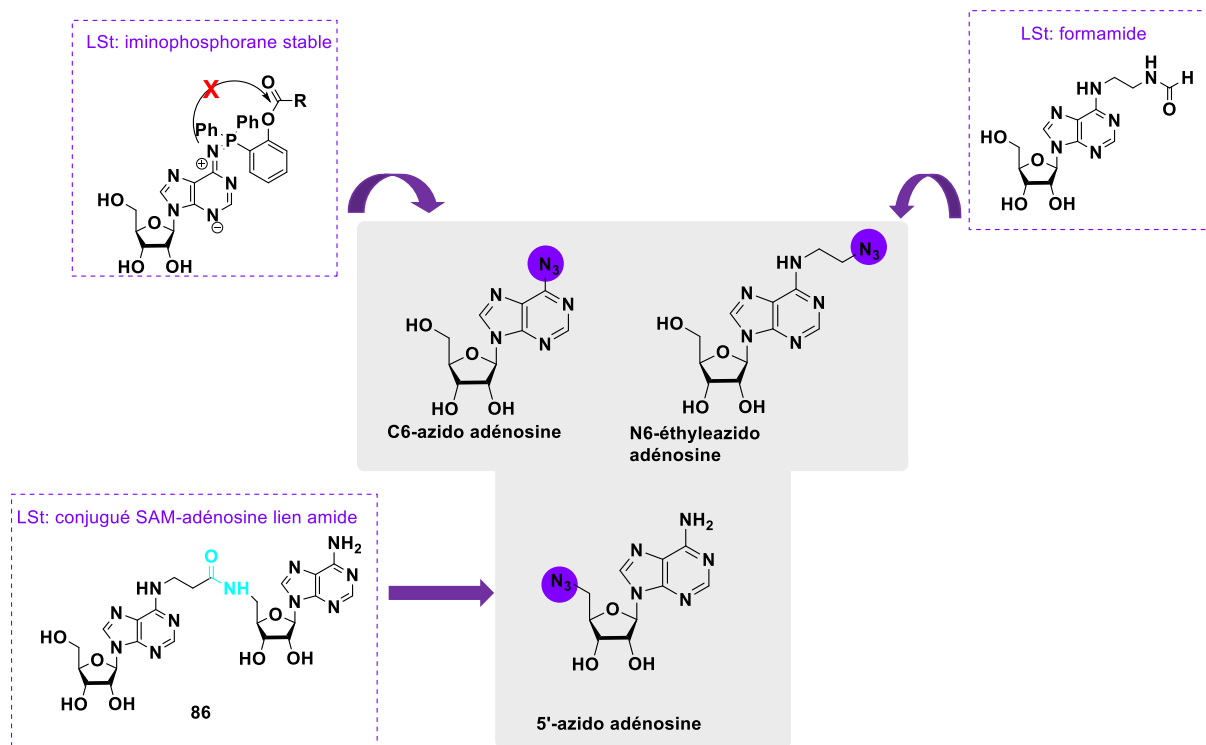


Figure 14 : Réactivité des différentes positions de l'adénosine dans les conditions de LSt

Le composé **86** est actuellement en cours d'évaluation biologique par l'équipe du Dr C. Tisé (IBPC), dans le cadre de l'étude de méthyltransférases d'ARN.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Depuis plusieurs années, les chimistes ont proposé de nouveaux concepts et des outils pour explorer des phénomènes biologiques. C'est ce que l'on appelle la « Chémobiologie » ou « Chemical Biology » en anglais. Cette nouvelle discipline a notamment inspirée de nombreux chimistes pour le développement de méthodes permettant de modifier des biomolécules, telles que les protéines et l'ADN. Plus récemment, la fonctionnalisation des ARN a connu un essor important en raison de la découverte de nouvelles fonctions des ARN dans de nombreux processus biologiques et de leurs utilisations en thérapie.

Dans ce contexte, mon travail de thèse avait pour objectif la mise au point d'une nouvelle voie de post-fonctionnalisation d'ARN basée sur la ligation de Staudinger traceless. Cette ligation est une réaction bioorthogonale qui a été largement utilisée pour modifier les protéines, les sucres ou l'ADN mais encore jamais appliquée à la fonctionnalisation d'ARN.

Dans le chapitre II de ce manuscrit, nous avons mis au point les conditions de LSt permettant de fonctionnaliser la position 3' terminale d'un ARN. J'ai tout d'abord optimisé ces conditions en utilisant un dinucléotide comportant une fonction azoture et 10 phosphines portant des groupes réactifs, des marqueurs de purification d'affinité ou des sondes photoactivables. Les dinucléotides modifiés correspondants ont été synthétisés et caractérisés par LC/MS. Une interprétation mécanistique de cette réaction a été proposée. En particulier, la formation d'un dérivé oxazaphospholane cyclique sur le ribose terminal a été observée. Un exemple de post-fonctionnalisation d'un ARN 24-nt est également décrit au sein duquel nous avons introduit *via* une fonction amide un motif photoactivable de type benzophénone (Schéma 122).¹⁴⁷

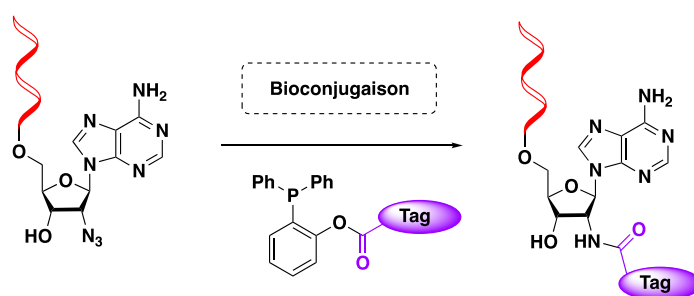


Schéma 122 : Ligation de Staudinger traceless pour la bioconjugaison d'ARN en position 3' terminale

¹⁴⁷ Kitoun, C., Fonvielle, M., Djago, F., Sakkas, N., Lefresne, M., Blancart Remaury, Q., Poinot, P., Arthur, M., Etheve-Quelquejeu, M., Iannazzo, L. *Org. Lett.* **2020**, 22, 8034-8038 ; b) Kitoun, C., Fonvielle, M., Arthur, M., Etheve-Quelquejeu, M., Iannazzo, L. *Current Protocols* **2021**, e42, DOI: 10.1002/cpz1.42.

Dans le chapitre III, notre objectif était de synthétiser des analogues stables d'aminocyl-ARNt 2'-amide dans le but d'étudier des enzymes de la famille des Fem transférases.¹⁴⁸ Nous avons tout d'abord exploré une voie de fonctionnalisation pré-synthétique qui a conduit à l'obtention des dinucléotides 2'-amido-glycine et 2'-amido-glycine-glycine. Un premier analogue stable Gly-NH-ARNt^{Gly} de 75-nt a été obtenu par ligation enzymatique entre le dinucléotide 2'-amido-glycine et l'ARNt^{Gly} de 73nt. Les premières expériences réalisées indiquent que la constante d'inhibition de ces ARN pour FmhB est de l'ordre du micromolaire ($CI_{50} = 1.7 \mu\text{M}$) (Figure 15).

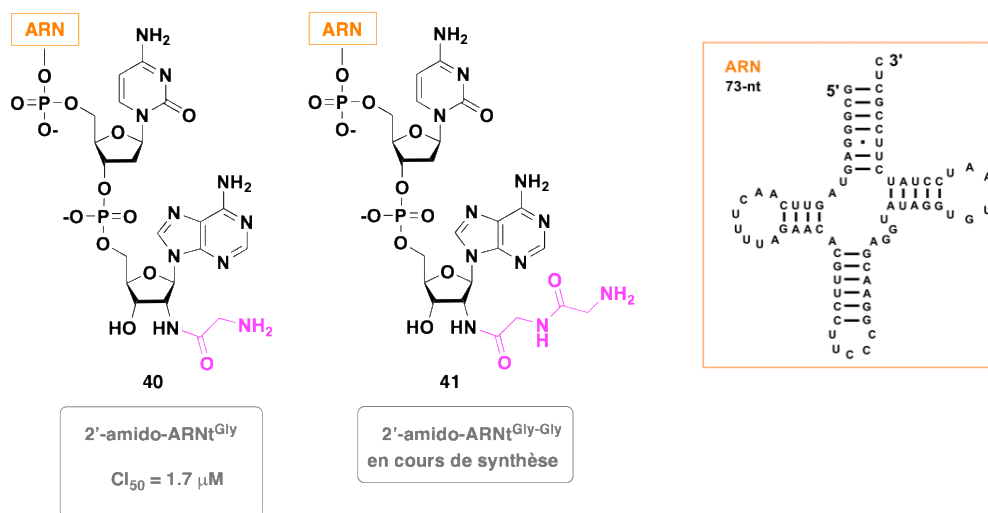


Figure 15 : Analogues d'aminocyl-ARNt étudiés dans le chapitre III

Nous avons ensuite utilisé la ligation de Staudinger traceless pour accéder, en une seule étape à partir d'un azido-ARN, à un aminocyl-ARNt stable. Nous avons donc tout d'abord appliqué la LSt pour l'introduction d'acide aminé en position terminale d'un dinucléotide. Pour cela, j'ai synthétisé différentes phosphines comportant des motifs acides aminés, protégés ou non, et les conditions de ligation par Staudinger traceless ont été mises au point. De meilleurs résultats ont été obtenus avec les phosphines dans lesquelles l'amine de l'acide aminé est protégé par un groupement Boc. Cette méthodologie nous a permis d'accéder à des dinucléotides 2'-amide fonctionnalisés par une glycine et des peptides (gly-gly, et gly-gly-gly). Cette stratégie a été validée sur un dinucléotide modèle et peut à présent être appliquée à un ARN (Schéma 123).

¹⁴⁸ Rietmeyer, L., Fix-Boulier, N., Le Fournis, C., Iannazzo, L., Kitoun, C., Patin, D., Mengin-Lecreux, D., Ethève-quelquejeu, M., Arthur, M. Fonvielle, M. *Nucleic Acids Research* **2021**, 2, 648-699.

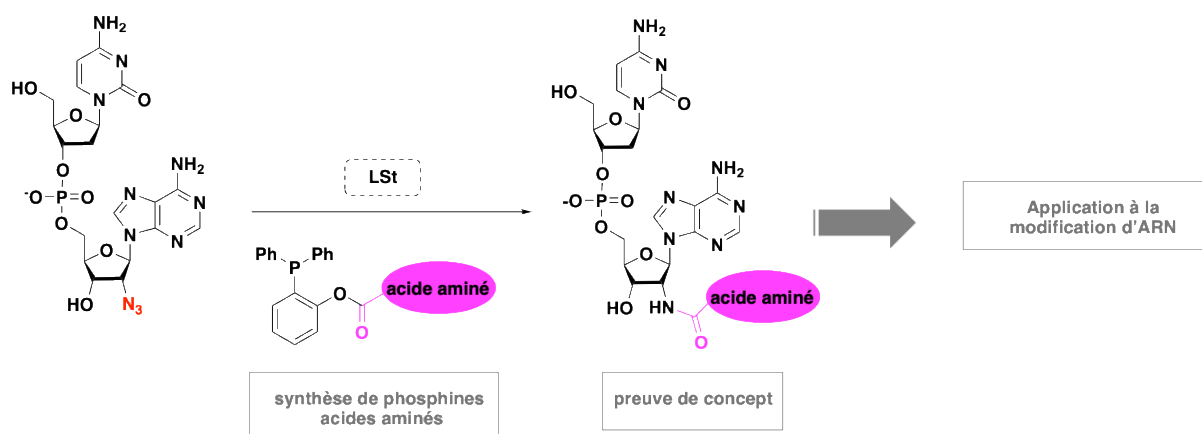


Schéma 123 : Ligation de Staudinger traceless en présence de phosphine acide aminé

Dans la dernière partie de ce manuscrit, nous nous sommes intéressés à la réactivité des positions C6 et 5'-OH de l'adénosine dans les conditions de ligation de Staudinger traceless. Cette étude a conduit à la synthèse d'un conjugué SAM-adénosine dans laquelle deux adénosines sont liées par une fonction amide. Ce composé est actuellement en cours d'évaluation biologique dans le cadre de l'étude des méthyltransférases d'ARN (Figure 16).

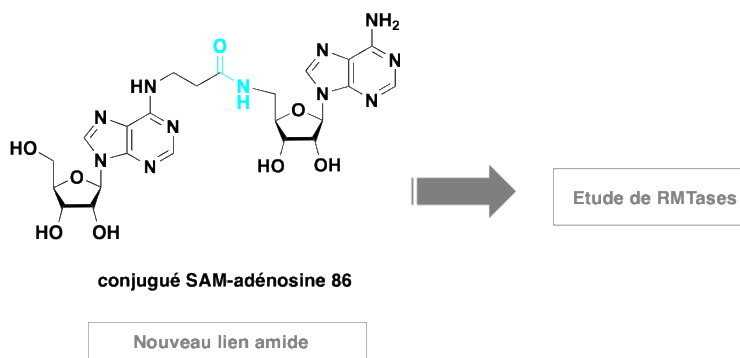


Figure 16 : Bilan du chapitre IV

Mon travail de thèse a donné lieu à la publication de 3 articles dont 2 en premier auteur (*Org. Lett.* **2020**, *Current Protocols* **2021** et *Nucleic Acid Research* **2021**).

Perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons étudié la ligation de Staudinger traceless dans le but de développer une nouvelle méthode de post-fonctionnalisation d'ARN. Cet objectif a été en partie atteint grâce à l'optimisation de conditions réactionnelles sur un dinucléotide modèle et à l'étude de la réactivité d'un groupement azoture. Cependant, le développement de réactions de bioconjugaison pour la modification spécifique des différents sites d'un ARN reste un défi. Afin d'élargir la « boîte à outils » du chimiste, à la fin de ma thèse, je me suis intéressée à une autre réaction de bioconjugaison faisant intervenir un motif sydnone.

Les sydnones sont des composés mésoioniques qui ont été largement utilisés dans des réactions de cycloadditions 1-3 dipolaire catalysées par le cuivre en présence d'alcynes.¹⁴⁹ La réactivité des sydnones a également été étudiée dans des réactions de cycloadditions sydnone-alcyne contraintes (SPSAC).¹⁵⁰ Plus récemment elles ont été utilisées par le groupe de Frédéric Taran dans des réactions dissociatives de type « click and release ».¹⁵¹

Le but de cette étude consiste à fonctionnaliser un oligonucléotide par un motif iminosydnone et d'utiliser sa réactivité dans une étape de post-fonctionnalisation pour modifier l'oligonucléotide ou l'ARN. Cette chimie des sydnones n'ayant jamais été appliquée aux acides nucléiques, je me suis donc tout d'abord intéressée à la fonctionnalisation de nucléosides.

Afin d'accéder à la synthèse de conjugués sydnone-nucléoside, 3 approches ont été envisagées ([Schéma 124](#)).

Une première stratégie reposant sur l'activation de la position N6 de l'adénosine, par introduction d'un motif carbamate, a tout d'abord été étudiée ([Schéma 124A](#)). Pour cela, l'adénosine activée¹⁵² ainsi que l'iminosydnone méthylée ont été préparées. Différents essais ont été menés dans le but de faire attaquer l'amine de l'iminosydnone sur le carbonyle pour la formation d'un fonction urée mais aucune trace du produit attendu n'a jamais été observé.

Dans un second temps, nous avons tenté d'introduire l'iminosydnone directement en position C6 de l'adénosine ([Schéma 124B](#)). L'adénosine a donc été activée en présence de BOP afin d'accéder au nucléoside convertible correspondant. Puis, différentes conditions ont été utilisées afin de faire réagir l'iminosydnone sur ce dernier. Malheureusement, l'instabilité des

¹⁴⁹ de la Conception, J. G., Martinez, R. F., cintas, P., Cintas, P., Jimenez, J. **2018**, DOI: <http://dx.medra.org/10.17374/targets.2018.21.228>

¹⁵⁰ Decuypère, E., Plougastel, L., Audisio, D., Taran, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 53, 11515-111527.

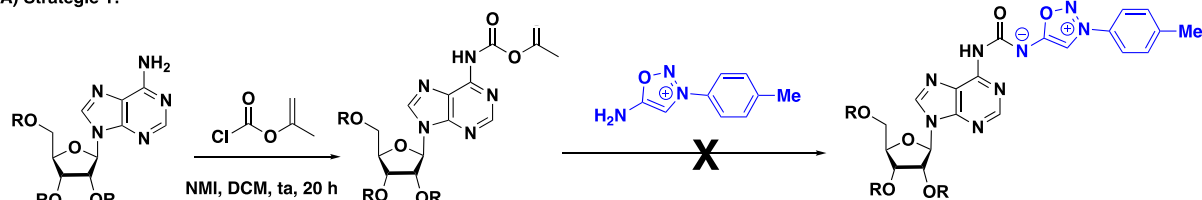
¹⁵¹ Riomet, M., Decuypere, E., Porte, K., Bernard, S., Plougastel, L., Kolodych, S., Audisio, D., Taran, F. *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 8535-8541.

¹⁵² Atdjian, C., Iannazzo, L., Braud, E., Ethève-Quelquejeu, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 4411-4425.

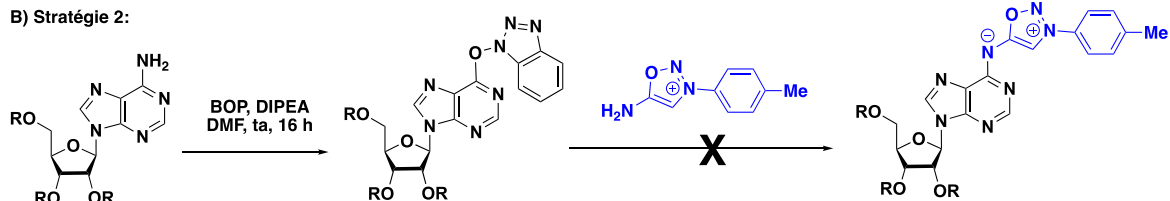
iminosydnones ne m'a pas permis d'accéder aux conjugués attendus et l'ouverture du motif iminosydnone a majoritairement été observée.

Par conséquent, pour parvenir à la synthèse de conjugués Sydnone-adénosine *via* les stratégies 1 et 2, il nous faudra trouver des conditions permettant d'activer l'adénosine tout en évitant l'ouverture de l'iminosydnone.

A) Stratégie 1:



B) Stratégie 2:



C) Stratégie 3:

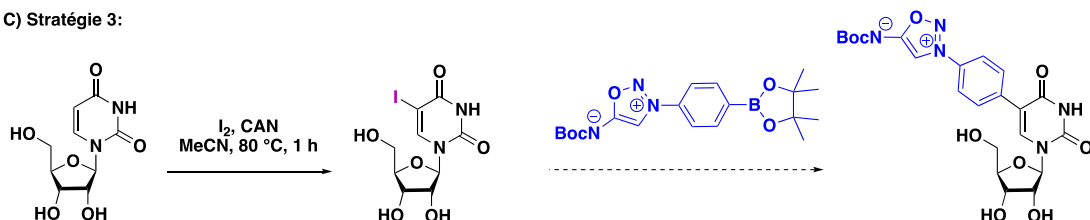


Schéma 124 : Stratégies envisagées pour l'accès à des conjugués Sydnone-adénosine

Une troisième stratégie a enfin été envisagée pour lier un nucléoside à une sydnone par couplage pallado-catalysé de Suzuki-Miyaura (Schéma 124C). Pour cela, j'ai synthétisé une iodo-uridine ainsi qu'une iminosydnone substituée par un ester boronique de type pinacol. Les essais de couplage seront prochainement menés pour accéder au conjugué sydnone-uridine attendu.

Partie expérimentale

General Considerations

Synthesis

Reactions were carried out under argon atmosphere and performed using freshly distilled solvents. THF was dried over sodium/benzophenone; DCM, DMF and MeOH were dried over calcium hydride. Phosphoramidite nucleosides, tetrazole and solvents for dinucleotides synthesis were purchased from Eurogentec. (2-Hydroxyphenyl) diphenylphosphine and acetylthiomethyl diphenylphosphine borane complex were purchased from Merck. Progress of the reactions was monitored by thin layer chromatography (TLC). TLC: precoated silica gel thin layer sheets 60 F₂₅₄(Merck) and detection by charring with 10% H₂SO₄ in ethanol or phosphomolybdic acid in ethanol followed by heating.

Purification

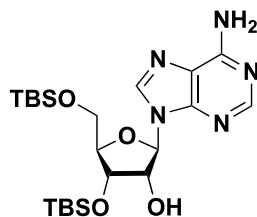
- Flash chromatography were done over silica gel (60 Å, 180-240 mesh) from Merck.
- Preparative HPLC were performed using a HPLC system with a reverse phase C-18 NUCLEOSIL column (250 mm × 21.2 mm, 5 µm) using a solvent system consisting of A: 50 mM aqueous NH₄OAc pH 4.5 and B: MeCN (linear gradient from 0% B to 63% B in 30 min) at a flow rate of 15 mL/min and UV detection at 254 nm.

Analysis

- NMR spectra were recorded on Bruker spectrometers (Avance II 500 and Avance III HD 4000). Chemical shifts (δ) are reported in parts per million (ppm) and referenced to the residual proton or carbon resonance of the solvents: CDCl₃ (δ 7.26), D₂O (δ 4.79), DMSO (δ 2.50), CD₃OD (δ 3.31) or D₂O (δ 4.79) for ¹H and CDCl₃ (δ 77.16) or (CD₃)₂SO (δ 39.52), or CD₃OD (δ 49.00) for ¹³C. Signals were assigned using 1D (¹H and ¹³C) and 2D (HSQC, COSY and HMBC) experiments. NMR coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz) and splitting patterns are indicated as follows: s (singlet), bs (broad singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), dd (doublet of doublet), m (multiplet).
- High-resolution mass spectroscopy (HRMS) were recorded with an ion trap mass analyser under electrospray ionization (ESI) in negative and positive ionization mode detection. HRMS were performed using Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL.
- LCMS conditions: conditions A: HPLC analyses were performed on C-18 100-5 NUCLEOSIL column (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) using a solvent system consisting of A: 50 mM aqueous NH₄OAc (pH 4.5) and B: MeCN (linear gradient from 0% B to 63% B in 30 min) at a flow rate of 1.3 mL/min and UV detection at 254 nm. Fractions were

detected using low resolution mass spectra (LRMS) were obtained on a LCQ Advantage mass spectrometer (ThermoElectron); conditions B: HPLC analysis was performed on Hypersil GOLD aQ (ThermoFisher Scientific) column (100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m) using a solvent system consisting of A: H₂O with 0.02% AcOH and B: MeCN with 0.02% AcOH (linear gradient from 0 to 100 % B in 30 min) at a flow rate of 0.2 mL/min at 30 °C and UV detection at 254 nm. Fractions were detected using low resolution mass spectra (HRMS) were obtained on a LC QTOF mass spectrometer; conditions C: HPLC analysis was performed on DNAPac PA-100 (ThermoFisher Scientific) column (9 mm x250 mm) with linear NH₄OAc gradient (25 to 2500 mM, pH 8.0) containing 0.5 % MeCN, which was applied for 30 min at a flow rate of 1 ml.min⁻¹ at 22 °C and UV detection at 260 nm. Fractions were detected using MALDI-TOF.

Compound 1: 3'-5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl) adenosine¹⁵³



Chemical Formula: C₂₂H₄₁N₅O₄Si₂
Molecular Weight: 495,77100

Adenosine (3.00 g, 11.2 mmol) and TBDMSCI (5.06 g, 33.6 mmol) were added to a suspension of DABCO (7.53 g, 67.2 mmol) and AgNO₃ (5.70 g, 33.6 mmol) in THF (160 mL) previously stirred for 30 min. The reaction mixture was vigorously stirred at rt for 4 h then filtered over silica gel. The filtrate was concentrated, and the residue was partitioned between DCM and brine. The phases were separated and the aqueous phase was extracted twice with DCM. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated. Flash chromatography of the residue (cyclohexane/EtOAc 4/6) yielded **1** as a white foam (2.94 g, 53 %).

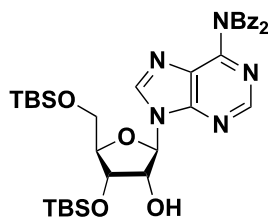
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.29 (s, 1 H, H2 or H8), 8.07 (s, 1 H, H2 or H8), 6.26 (bs, 2 H, NH₂), 6.03 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, H1'), 4.56-4.54 (m, 2 H, H2' and H3'), 4.11 (d, *J* = 2.5 Hz, 1 H, H4'), 3.91 (dd, *J* = 2.5, 27.5 Hz, 1 H, H_a5'), 3.75 (dd, *J* = 2.5, 27.5 Hz, 1 H, H_b5'), 0.92 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.87 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.15 (s, 6 H, Me^{TBS}), 0.06 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.04 (s, 3 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 155.8, 153.1 (C2 or C8), 149.8 (Cq), 139.1 (C2 or C8), 120.0 (Cq), 88.9 (C1'), 85.6 (C4'), 75.3 (C2'), 71.8 (C3'), 62.5 (C5'), 26.0 (*t*Bu^{TBS}), 25.9 (*t*Bu^{TBS}), 18.5 (Cq^{TBS}), 18.2 (Cq^{TBS}), -4.6 (Me^{TBS}), -4.7 (Me^{TBS}), -5.3 (Me^{TBS}), -5.4 (Me^{TBS}).

HRMS (ESI) m/z: [M + Na]⁺ Calcd for C₂₂H₄₁N₅O₄Si₂Na 518.2589; found 518.2516.

¹⁵³ Hakimelahi, G. H., Proba, Z. A., Olgilvie, K. K. *Canadian J. Chem.* **1982**, 60, 1106-1113.

Compound 2: 3'-5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl) N⁶-dibenzoyl adenosine¹⁵⁴



Chemical Formula: C₃₆H₄₉N₅O₆Si₂
Molecular Weight: 703,98700

To a solution of **1** (2.94 g, 5.90 mmol) in pyridine (30 mL), trimethylsilyl chloride (2.99 mL, 23.6 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 1h30. Benzoyl chloride (3.42 mL, 29.5 mmol) was added at 0 °C and the reaction mixture was stirred overnight. Water (35 mL) was added at 0 °C, and the reaction mixture was stirred for 1h30. The residue was partitioned between EtOAc and brine, and the phases were separated. The aqueous phase was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were dried over magnesium sulfate and concentrated. Flash chromatography of the residue (cyclohexane/EtOAc 7/3) yielded **2** as a white foam (3.33 g, 80%).

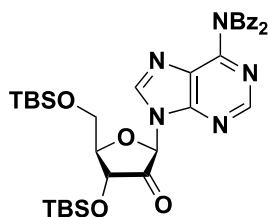
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.65 (s, 1 H, H2 or H8), 8.32 (s, 1 H, H2 or H8), 7.88-7.86 (m, 4 H, H^{Bz}), 7.47- 7.46 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.36-7.34 (m, 4H, H^{Bz}), 6.07 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, H1'), 4.64-4.62 (m, 2 H, H2' and H3'), 4.12- 4.09 (m, 1 H, H4'), 3.92 (dd, *J* = 3.5, 11.5 Hz, 1 H, H_a5'), 3.78 (dd, *J* = 3.5, 11.5 Hz, 1 H, H_b5'), 0.96 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.88 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.18 (s, 6 H, *t*Bu^{TBS}), 0.07 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.03 (s, 3 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 172.4 (2 C=O), 153.0 (Cq^A), 152.25 (C2 or C8), 151.9 (Cq^{Ad}), 143.7 (C2 or C8), 151.9 (Cq^{Ad}), 134.1 (Cq^{Bz}), 133.0, 129.6, 128.8 (10 CH^{Bz}), 128.3 (Cq^{Ad}), 89.1 (C1'), 85.7 (C4'), 74.9 (C2'), 71.7 (C3'), 62.4 (C5'), 26.0 (*t*Bu^{TBS}), 25.8 (*t*Bu^{TBS}), 18.5 (Cq^{TBS}), 18.2 (Cq^{TBS}), - 4.5 (Me^{TBS}), - 4.7 (Me^{TBS}), - 5.3 (Me^{TBS}), -5.4 (Me^{TBS}).

HRMS (ESI) m/z: [M + Na]⁺ Calcd for C₃₆H₄₉N₅O₆Si₂Na 726.3114; found 726.3180.

¹⁵⁴ Chatgialiloglu, C., Duca, M., Ferreri, C., Guerra, M., Ioele, M., Mulazzani, Q. G., Strittmatter, H., Giese, B. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1249-1255.

Compound 3: 2'-keto-3'-5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl) N⁶-dibenzoyl adenosine¹⁵⁵



Chemical Formula: C₃₆H₄₇N₅O₆Si₂
Molecular Weight: 701,97100

To a solution of **2** (3.33 g, 4.73 3.71 mmol) in DCM (60 mL), Dess-Martin Periodinane (6.02g, 14.2 mmol) in solution in DCM (60 mL) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 4 h. The reaction was stopped by the addition of a 1/1 mixture of saturated aqueous sodium hydrogenocarbonate and sodium metabisulfite solutions at 0 °C. The phases were separated. The aqueous phase was extracted twice with DCM. The combined organic layers were dried over sodium sulfate and concentrated. Flash chromatography of the residue (cyclohexane/EtOAc 8/2) yielded **3** as a white foam (2.35 g, 71%).

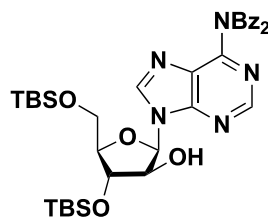
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.55 (s, 1 H, H2 or H8), 8.09 (s, 1 H, H2 or H8), 7.88-7.85 (m, 4 H, H^{Bz}), 7.50- 7.48 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.37-7.35 (m, 4 H, H^{Bz}), 5.84 (s, 1 H, H1'), 5.21 (d, *J* = 7.1 Hz, 1 H, H3'), 4.05-4.03 (m, 2 H, H4' and H_a5'), 3.92 (dd, *J* = 3.5, 12.4 Hz, 1 H, H_b5'), 0.95 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.78 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.24 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.20 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.01 (s, 3 H, Me^{TBS}), -0.13 (s, 3 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 207.0 (C=O C2'), 172.3 (C=O^{Bz}), 152.4 (C2 or C8), 152.3, 152.2 (2 Cq^{Ad}), 144.3 (C2 or C8), 134.0 (Cq^{Bz}), 133.1, 129.6, 128.9 (10 CH^{Bz}), 127.3 (Cq^{Ad}), 80.4 (C4'), 80.1 (C1'), 71.7 (C3'), 61.0 (C5'), 25.8 (*t*Bu^{TBS}), 25.7 (*t*Bu^{TBS}), 18.3 (2C, *t*Bu^{TBS}), -4.2(*t*Bu^{TBS}), -5.1(*t*Bu^{TBS}), -5.3(*t*Bu^{TBS}), -5.4 (*t*Bu^{TBS}).

HRMS (ESI) m/z: [M + Na + MeOH]⁺ Calcd for C₃₇H₅₁N₅O₇Si₂Na 756.3219; found 756.3258.

¹⁵⁵ Chatgililoglu, C., Duca, M., Ferreri, C., Guerra, M., Ioele, M., Mulazzani, Q. G., Strittmatter, H., Giese, B. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 1249-1255.

Compound 4: 3'-5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl) N⁶-benzoyl arabinose ¹⁵⁶



Chemical Formula: C₃₆H₄₉N₅O₆Si₂
Molecular Weight: 703,98700

To a solution of **3** (2.31 g, 3.29 mmol) in a 15/1 EtOH/water mixture (18 mL, 1.2 mL), sodium borohydride (224 mg, 5.92 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The reaction mixture was partitioned between EtOAc and brine, and the phases were separated. The aqueous phase was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were dried over sodium sulfate and concentrated. Flash chromatography of the residue (cyclohexane/EtOAc 8/2) yielded **4** as a white foam (1.16 g, 50%).

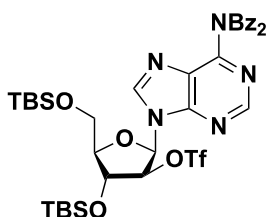
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.64 (s, 1 H, H2 or H8), 8.57 (s, 1 H, H2 or H8), 7.87-7.85 (m, 4 H, H^{Bz}), 7.49- 7.47 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.36-7.34 (m, 4 H, H^{Bz}), 6.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H, H1'), 4.75 (bs, 1 H, OH), 4.33 (s, 1 H, H3'), 4.11 (s, 1 H, H2'), 4.05 (d, *J* = 7.1 Hz, 1 H, H4'), 3.96 (dd, *J* = 2.2, 11.3 Hz, 1 H, H_a5'), 3.82 (dd, *J* = 1.8, 11.3 Hz, 1 H, H_b5'), 0.93 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.88 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.15 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.14 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.13 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.12 (s, 3 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 172.3 (2 C=O^{Bz}), 153.2 (Cq^{Ad}), 152.1 (C2 or C8), 151.5 (Cq^{Ad}), 144.8 (C2 or C8), 134.1 (Cq^{Bz}), 133.0, 129.5, 128.7 (CH^{Bz}), 127.0 (Cq^{Ad}), 86.5 (C2'), 85.2 (C1'), 78.2 (C3'), 76.1 (C4'), 63.5 (C5'), 25.9 (*t*Bu^{TBS}), 25.8 (*t*Bu^{TBS}), 18.4 (Cq^{TBS}), 18.1 (Cq^{TBS}), - 4.6 (Me^{TBS}), - 4.8 (Me^{TBS}), - 5.4 (Me^{TBS}), - 5.7 (Me^{TBS}).

HRMS (ESI) m/z: [M + Na]⁺ Calcd for C₃₆H₄₉N₅O₆Si₂Na 726.3114; found 726.3119.

¹⁵⁶ Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5115-5119.

Compound 5: 2'-O-triflyl-3'-5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl) N⁶-benzoyl arabinose¹⁵⁷



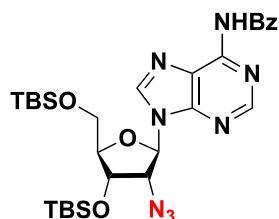
Chemical Formula: C₃₇H₄₈F₃N₅O₈SSi₂
Molecular Weight: 836,04321

To a solution of **4** (1.25 g, 1.78 mmol) in DCM (18 mL), DMAP (651 mg, 5.33 mmol) and fresh trifluoromethylsulfonate chloride (369 μ L, 3.55 mmol) were added at 0 °C. The reaction mixture was stirred at rt for 1 h. The mixture was diluted in DCM and brine. The phases were separated. The aqueous phase was extracted twice with DCM. The combined organic layers were dried over sodium sulfate and concentrated to yield **5** without further purification as a white foam.

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.66 (s, 1 H, H2 or H8), 8.24 (s, 1 H, H2 or H8), 7.86-7.77 (m, 4 H, H^{Bz}), 7.49- 7.39 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.35-7.25 (m, 4 H, H^{Bz}), 6.62 (d, J = 3.8 Hz, 1 H, H1'), 5.22 (dd, J = 2.5, 3.3 Hz, 1 H, H2'), 4.83-4.77 (m, 1 H, H3'), 4.10-4.02 (m, 1 H, H4'), 3.89-3.87 (m, 2 H, H5'), 0.94 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.92 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.18 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.17 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.10 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.09 (s, 3 H, Me^{TBS}).

¹⁵⁷ Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5115-5119.

Compound 6: 2'-azido-3'-5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl) N⁶-benzoyl adenosine¹⁵⁸



Chemical Formula: C₂₉H₄₄N₈O₄Si₂
Molecular Weight: 624,89300

To a solution of **5** (1.48 g, 1.78 mmol) in DMF (7 mL), sodium azide (1.15 g, 17.8 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 16 h. The mixture was concentrated and the residue was partitioned between EtOAc and brine. The phases were separated. The aqueous phase was extracted twice with EtOAc. The combined organic layers were dried over sodium sulfate and concentrated. Flash chromatography of the residue (cyclohexane/EtOAc 6/4) yielded **6** as a white foam over 2 steps (554 mg, 50%).

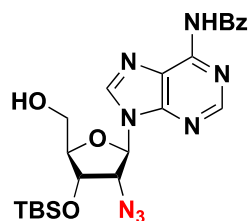
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 9.33 (bs, 1 H, NH), 8.72 (s, 1 H, H2 or H8), 8.25 (s, 1 H, H2 or H8), 8.02-7.92 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.60-7.37 (m, 3 H, H^{Bz}), 6.18 (d, *J* = 5.5 Hz, 1 H, H1'), 4.68 (dd, *J* = 4.5, 9.1 Hz, 1 H, H2'), 4.44 (t, *J* = 5.2 Hz, 1 H, H4'), 4.14 (d, *J* = 3.6 Hz, 1 H, H3'), 3.92 (dd, *J* = 3.6, 11.5 Hz, 1 H, H_a5'), 3.74 (dd, *J* = 2.8, 11.6 Hz, 1 H, H_b5'), 0.93 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.85 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.16 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.14 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.04 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.03 (s, 3 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 164.9 (C=O^{Bz}), 152.9 (C2 or C8), 151.7 (Cq^{Ad}), 149.8 (Cq^{Ad}), 141.7 (C2 or C8), 133.7 (Cq^{Bz}), 133.9, 128.9, 128.0 (CH^{Bz}), 123.5 (Cq^{Ad}), 86.2 (C1'), 86.0 (C4'), 72.6 (C3'), 65.3 (C2'), 62.1 (C5'), 26.0, 25.8 (*t*Bu^{TBS}), 18.5, 18.2 (Cq^{TBS}), -4.6 (Me^{TBS}), -4.9 (Me^{TBS}), -5.3 (Me^{TBS}), -5.4 (Me^{TBS}).

HRMS (ESI) m/z: [M + Na]⁺ Calcd for C₂₉H₄₄N₈O₄Si₂Na 647.2916; found 647.2918.

¹⁵⁸ Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5115-5119.

Compound 7: 2'-azido-3'-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5'-hydroxy N⁶-benzoyl adenosine¹⁵⁹



Chemical Formula: C₂₃H₃₀N₈O₄Si
Molecular Weight: 510,63000

A 1/1 (v/v) mixture of TFA/H₂O (3.3 mL, 44 mmol) was added at 0 °C to a solution of compound **6** (554 mg, 0.88 mmol) in a THF (25 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. EtOAc and a saturated solution of NaHCO₃ were added and the organic phase was washed 3 times with brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography using cyclohexane/EtOAc (2/8) as eluent to afford compound **7** (409 mg, 91%) as a white foam.

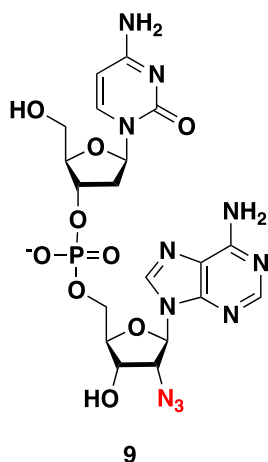
¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 8.79 (s, 1 H, H2 or H8), 8.20 (s, 1 H, H2 or H8), 8.02 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.54 (m, 3 H, H^{Bz}), 6.04 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H1'), 4.63 (m, 2 H, H-2' and H-3'), 4.22 (s, 1 H, H4'), 3.97 (d, *J* = 13.0 Hz, 1 H, H_a5'), 3.76 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, H_b5'), 0.97 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.21 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.17 (s, 3 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 165.5 (C=O), 152.2 (C2 or C8), 150.9 (Cq), 150.1 (Cq), 143.3 (C2 or C8), 133.3 (CH^{Bz}), 132.9 (Cq), 129.0 (CH^{Bz}), 128.1 (CH^{Bz}), 124.1 (Cq), 89.5 (C4'), 88.5 (C1'), 74.1 (C3'), 64.6 (C2'), 62.4 (C5'), 25.6 (tBu^{TBS}), 18.2 3 (Cq^{TBS}), - 4.8 (Me^{TBS}).

HRMS (ESI) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₂₃H₃₀N₈O₄NaSi 533.20515; found 533.20495.

¹⁵⁹ Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5115-5119.

Compound 9: dC-pA-2'-N₃



Chemical Formula: C₁₉H₂₃N₁₁O₉P⁻
Molecular Weight: 580,435.31

To a solution of 2'-azido-adenosine derivative **7** (70 mg, 0.13 mmol) in MeCN (300 μ L) were added Ac-dC-PCNE phosphoramidite (250 mg, 0.32 mmol) in MeCN (2 mL) and a 0.45 M tetrazole solution in MeCN (3 mL, 1.3 mmol). After stirring at rt for 1 h, a 0.1 M iodine solution in THF/H₂O/Pyridine (75/2/20, 4 mL) was added. After 30 min, the reaction mixture was diluted with EtOAc and washed with water, a saturated solution of Na₂S₂O₃ and brine. The organic layers were combined, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under vacuo. The residue was then stirred with a 3% TCA solution in DCM (7.6 mL) at rt for 30 min. The reaction mixture was diluted with DCM and the organic layer was washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The crude product was then dissolved in a 5 M solution of MeNH₂ (EtOH/H₂O, 1/1) (5.4 mL) and the reaction was stirred at rt for 24 h. After concentration under reduced pressure, the residue was dissolved in MeOH (10 mL) and CsF (4.1 g, 27.4 mmol) was added. The solution was then heated to 60 °C in a sealed tube for 24 h. After concentration in vacuo, the residue was purified by HPLC. The appropriate fractions were collected and lyophilized, to give the dinucleotide **9** as a white foam (16 mg, 20%). Retention time: 14.26 min.

¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.49 (s, 1 H, H8^{Ad} or H2^{Ad}), 8.26 (s, 1 H, H8^{Ad} or H2^{Ad}), 7.81 (d, J = 7.9 Hz, 1 H, H6^{Cyt}), 6.12 (d, J = 4.9 Hz, 1 H, H1^{Ad}), 6.09-6.05 (m, 2 H, H1^{Cyt}, H5^{Cyt}), 4.88-4.84 (m, 2 H, H2^{Ad}, H4^{Ad}), 4.72-4.68 (m, 1 H, H3^{Cyt}), 4.39-4.37 (m, 1 H, H3^{Ad}), 4.23-4.15 (m, 3 H, H4^{Cyt}, H5^{Ad}), 3.80-3.77 (m, 1 H, H5^{Cyt}), 3.74-3.71 (m, 1 H, H5^{Cyt}), 2.48 (ddd, J = 3.0, 6.0, 14.0 Hz, 1 H, H2^{Cyt}), 1.99-1.93 (m, 1 H, H2^{Cyt}).

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 162.1 (Cq), 154.6 (CO), 151.9 (Cq), 151.8 (C2^{Ad} or C8^{Ad}), 148.7 (Cq), 142.7 (C6^{Cyt}), 140.0 (C2^{Ad} or C8^{Ad}), 118.4 (Cq), 95.4 (C1'^{Cyt}), 86.2 (C5^{Cyt}), 86.0 (C4'^{Cyt}), 85.6 (C1'^{Ad}), 83.5 (C3'^{Ad}), 75.1 (C3'^{Cyt}), 70.4 (C4'^{Ad}), 65.1 (C2'^{Ad}), 64.2 (C5'^{Ad}), 60.5 (C5'^{Cyt}), 37.9 (C2'^{Cyt}).

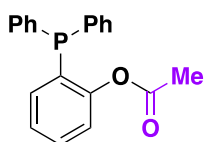
³¹P NMR (202 MHz, MeOD): δ = - 0.65.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₁₉H₂₅N₁₁O₉P 582.15743; Found 582.15601.

General procedure for preparation of phosphines 10a to 10h

To a solution of (2-hydroxyphenyl)diphenylphosphine (1 equiv) in DCM were successively added DCC (3 equiv), DMAP (4 equiv), and a carboxylic acid (3 equiv). The mixture was stirred overnight at room temperature then filtered through a pad of Celite[®] and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc as eluent to afford the desired phosphine.

Compound 10a: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl acetate



10a

Chemical Formula: C₂₀H₁₇O₂P
Molecular Weight: 320,32776

Following the general procedure for the preparation of phosphine, compound **10a** was obtained (215 mg, 93%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (95/5) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl)diphenylphosphine (200 mg, 0.7 mmol) and acetic acid (123 μ L, 2.1 mmol) in DCM (9 mL).

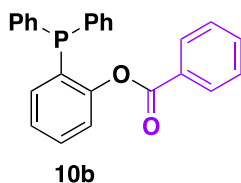
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.39-7.31 (m, 11 H, H^{Ar}), 7.15-7.12 (m, 2 H, H^{Ar}), 6.86-6.84 (m, 1 H, H^{Ar}), 1.98 (s, 3 H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 168.9 (C=O), 152.7 (C^{Ar}), 135.6 (C^{Ar}), 134.1 (2C^{Ar}), 133.9 (2 C^{Ar}), 133.7 (C^{Ar}), 130.4 (C^{Ar}), 130.3 (C^{Ar}), 129.9 (C^{Ar}), 129.1 (2C^{Ar}), 128.7 (2C^{Ar}), 128.6 (2C^{Ar}), 126.1 (C^{Ar}), 122.6 (C^{Ar}), 20.6 (CH₃).

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = - 15.8.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₀H₁₈O₂P 321.10444; found 321.10383.

Compound 10b: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl benzoate



Chemical Formula: C₂₅H₁₉O₂P
Molecular Weight: 382,39876

Following the general procedure for the preparation of phosphine, compound **10b** was obtained (247 mg, 82%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (95/5) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (200 mg, 0.7 mmol) and benzoic acid (263 mg, 2.1 mmol) in DCM (5 mL).

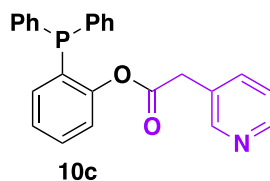
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.72 (d, *J* = 5.0 Hz, 2 H, H^{Ar}), 7.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H^{Ar}), 7.26 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H^{Ar}), 7.22-7.14 (m, 13 H, H^{Ar}), 7.01 (t, *J* = 5.0 Hz, 1 H, H^{Ar}), 6.76-6.74 (m, 1 H, H^{Ar}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 164.3 (C=O), 152.8 (C^{Ar}), 135.5 (C^{Ar}), 134.2 (2C^{Ar}), 134.0 (2C^{Ar}), 133.6 (C^{Ar}), 133.4 (C^{Ar}), 130.8 (C^{Ar}), 130.7 (C^{Ar}), 130.2 (2C^{Ar}), 129.9 (C^{Ar}), 129.2 (C^{Ar}), 129.0 (2C^{Ar}), 128.6 (2C^{Ar}), 128.5 (2C^{Ar}), 128.3 (2C^{Ar}), 126.2 (C^{Ar}), 122.6 (C^{Ar}).

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = - 15.4.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₅H₂₀O₂P 383.11954; found 383.11975.

Compound 10c: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl pyridine



Chemical Formula: C₂₅H₂₀NO₂P
Molecular Weight: 397,41376

Following the general procedure for the preparation of phosphine, compound **10c** was obtained (270 mg, 95%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (5/5) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (200 mg, 0.7 mmol) and 2-(pyridin-3-yl) acetic acid (311 mg, 2.1 mmol) in DCM (10 mL).

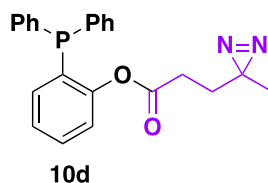
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.39 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, H^{Ar}), 8.27 (s, 1 H, H^{Ar}), 7.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 2 H, H^{Ar}), 7.29-7.21 (m, 10 H, H^{Ar}), 7.08-7.02 (m, 3 H, H^{Ar}), 6.74-6.71 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.43 (s, 2 H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 168.6 (C=O), 152.7 (C^{Ar}), 150.6 (C^{Ar}), 148.6 (C^{Ar}), 137.1 (C^{Ar}), 135.5 (C^{Ar}), 134.1 (2C^{Ar}), 133.9 (2C^{Ar}), 133.8 (C^{Ar}), 130.3 (C^{Ar}), 130.2 (C^{Ar}), 130.0 (C^{Ar}), 129.2 (2C^{Ar}), 128.9 (C^{Ar}), 128.8 (2C^{Ar}), 128.7 (2C^{Ar}), 126.4 (C^{Ar}), 123.4 (C^{Ar}), 122.4 (C^{Ar}), 37.9 (CH₂).

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = - 15.8.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₅H₂₁NO₂P 398.13099; found 398.13031.

Compound 10d: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl diazirine¹⁶⁰



Chemical Formula: C₂₃H₂₁N₂O₂P
Molecular Weight: 388,40676

Following the general procedure for the preparation of phosphine, compound **10d** was obtained (289 mg, 79%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (95/5) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl)diphenylphosphine (262 mg, 0.9 mmol) and 3-(3-methyl-3 H-diazirin-3-yl) propionic acid (363 mg, 2.7 mmol) in DCM (10 mL).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.27-7.23 (m, 11 H, H^{Ar}), 7.10-7.08 (m, 1 H, H^{Ar}), 7.04 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, H^{Ar}), 6.77-6.74 (m, 1 H, H^{Ar}), 2.04 (t, J = 10.0 Hz, 2 H, CH₂), 1.45 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, CH₂), 0.89 (s, 3 H, CH₃).

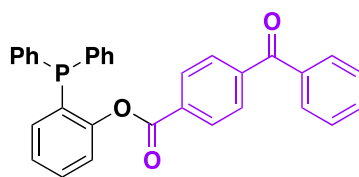
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.1 (C=O), 152.6 (C^{Ar}), 135.5 (C^{Ar}), 134.0 (2C^{Ar}), 133.9 (2C^{Ar}), 133.7 (C^{Ar}), 130.3 (C^{Ar}), 130.2 (C^{Ar}), 129.9 (C^{Ar}), 129.1 (2C^{Ar}), 128.7 (2C^{Ar}), 128.6 (2C^{Ar}), 126.2 (C^{Ar}), 122.5 (C^{Ar}), 29.4 (CH₂), 28.5 (CH₂), 24.9 (C^q^{diazirine}), 19.6 (CH₃).

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = - 15.8.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₃H₂₂O₂N₂P 389.14134; found 389.14165.

¹⁶⁰ Ahad, A. M., Jensen, S. M., Jewett, J. C. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5060-5063.

Compound 10e: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl benzophenone



10e

Chemical Formula: C₃₂H₂₃O₃P
Molecular Weight: 486,50676

Following the general procedure for the preparation of phosphine, compound **10e** was obtained (230 mg, 88%) as a colorless oil, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (95/5) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (150 mg, 0.54 mmol) and 4-benzoylbenzoic acid (366 mg, 1.62 mmol) in DCM (10 mL).

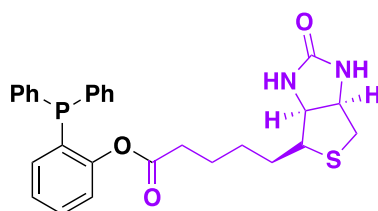
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.89 (d, *J* = 8.25 Hz, 2 H, H^{Ar benzo}), 7.74 (d, *J* = 7.7 Hz, 2 H, H^{Ar benzo}), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, H^{Ar benzo}), 7.55 (t, *J* = 7.35 Hz, 1 H, H^{Ar benzo}), 7.44 (t, *J* = 7.65 Hz, 2 H, H^{Ar benzo}), 7.38-7.36 (m, 1 H, H^{Ar phos}), 7.32-7.27 (m, 11 H, H^{Ar phos}), 7.13 (t, *J* = 7.55 Hz, 1 H, H^{Ar phos}), 6.84-6.82 (m, 1 H, H^{Ar phos}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 196.0 (C=O), 163.6 (C=O), 152.7 (C^{Ar phos}), 141.7 (C^{Ar benzo}), 137.0 (C^{Ar benzo}), 135.4 (C^{Ar phos}), 135.3 (C^{Ar phos}), 134.3 (2C, C^{Ar phos}), 134.1 (2C, C^{Ar phos}), 133.7 (C^{Ar phos}), 133.1 (C^{Ar benzo}), 132.3 (C^{Ar phos}), 130.8 (C^{Ar phos}), 130.7 (C^{Ar phos}), 130.2 (2C, C^{Ar benzo}), 130.1 (2C, C^{Ar benzo}), 130.0 (C^{Ar phos}), 129.7 (2C, C^{Ar benzo}), 129.2 (C^{Ar phos}), 128.8 (2C, C^{Ar phos}), 128.7 (2C, C^{Ar phos}), 128.6 (2C, C^{Ar benzo}), 126.5 (C^{Ar phos}), 122.5 (C^{Ar phos}).

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = -15.3.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₃₂H₂₄O₃P 487.14631; found 487.14520.

Compound 10f: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl biotin



10f

Chemical Formula: C₂₈H₂₉N₂O₃PS
Molecular Weight: 504,58476

Following the general procedure for the preparation of phosphine, compound **10f** was obtained (33 mg, 18%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (4/6) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl)diphenylphosphine (100 mg, 0.35 mmol) and Biotin (256 mg, 1.05 mmol) in DCM (8 mL).

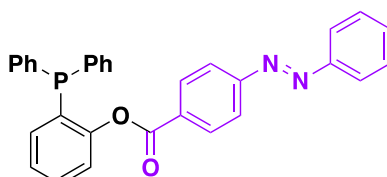
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.40-7.30 (m, 11 H, H^{Ar}), 7.17-7.13 (m, 2 H, H^{Ar}), 6.84-6.82 (m, 1 H, H^{Ar}), 5.84 (bs, 1 H, NH), 5.32 (bs, 1 H, NH), 4.49-4.46 (m, 1 H, CH), 3.13-3.09 (m, 1 H, CH), 2.91-2.87 (m, 1 H, CH₂), 2.74-2.71 (m, 1 H, CH₂), 2.31 (t, *J* = 15.0 Hz, 2 H, CH₂), 4.29-4.27 (m, 1 H, CH), 1.69-1.62 (m, 2 H, CH₂), 1.61-1.52 (m, 2 H, CH₂), 1.42-1.37 (m, 2 H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 171.6 (C=O), 163.6 (C=O), 153.0 (C^{Ar}), 135.8 (C^{Ar}), 135.7 (C^{Ar}), 134.2 (C^{Ar}), 134.1 (C^{Ar}), 134.0 (2C^{Ar}), 133.9 (C^{Ar}), 130.4 (C^{Ar}), 130.2 (C^{Ar}), 130.1 (C^{Ar}), 129.2 (2C^{Ar}), 128.8 (2C^{Ar}), 128.7 (2C^{Ar}), 126.3 (C^{Ar}), 122.7 (C^{Ar}), 62.0 (CH), 60.2 (CH), 55.5 (CH), 40.7 (CH₂), 33.7 (CH₂), 28.3 (CH₂), 24.5 (CH₂).

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = - 16.3.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₈H₃₀O₃N₂PS 505.17093; found 505.17132.

Compound 10g: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl diazobenzene



10g

Chemical Formula: C₃₁H₂₃N₂O₂P
Molecular Weight: 486,51076

Following the general procedure for the preparation of phosphine, compound **10g** was obtained (323 mg, 92%) as an orange foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (95/5) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (200 mg, 0.7 mmol) and (*E*)-4-(phenyldiazenyl) benzoic acid (406 mg, 2.1 mmol) in DCM (10 mL).

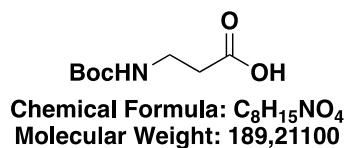
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.94-7.89 (m, 4 H, H^{Ar}), 7.83-7.80 (m, 2 H, H^{Ar}), 7.49-7.40 (m, 3 H, H^{Ar}), 7.38 (t, *J* = 7.7 Hz, 1 H, H^{Ar}), 7.32-7.28 (m, 11 H, H^{Ar}), 7.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H^{Ar}), 6.85-6.82 (m, 1 H, H^{Ar}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 163.8 (C=O), 155.4 (C^{Ar}), 152.9 (C^{Ar}), 152.7 (C^{Ar}), 135.4 (C^{Ar}), 134.3 (2C^{Ar}), 134.1 (2C^{Ar}), 133.7 (C^{Ar}), 131.9 (C^{Ar}), 131.3 (2C^{Ar}), 130.9 (C^{Ar}), 130.8 (C^{Ar}), 130.0 (C^{Ar}), 129.3 (2C^{Ar}), 129.2 (2C^{Ar}), 128.7 (3C^{Ar}), 128.6 (2C^{Ar}), 126.4 (C^{Ar}), 123.3 (2C^{Ar}), 122.7 (C^{Ar}), 122.6 (2C^{Ar}).

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = - 15.2.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₃₁H₂₄N₂O₂P 487.15754; found 487.15692.

N-Boc- β -Ala



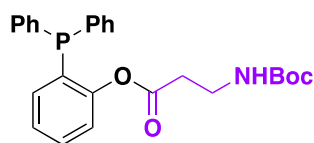
β -alanine (1 g, 11.2 mmol) was dissolved in a (2:1) solution of NaOH (1M in 1,4-dioxane) and di-*tert*-butyldicarbonate (2.45 g, 11.2 mmol) was added at 0° C. The reaction was stirred for 16h at room temperature. The aqueous mixture was extracted with Et₂O, the aqueous layer was acidified with HCl 1M until pH 2 and partitioned between EtOAc and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduce pressure to yield *N*-Boc- β -alanine (1.2 g, 56%) as a white foam.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 2.94 (t, *J* = 6.80 Hz, 2 H, CH₂), 2.12 (t, *J* = 6.80 Hz, 2 H, CH₂), 1.08 (s, 9 H, H^{Boc}).

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 175.4 (C=O), 158.3 (C=O^{Boc}), 80.1 (C^q^{Boc}), 37.4 (CH₂), 35.3 (CH₂), 28.7 (3C, CH₃).

HRMS (ESI) m/z: [M - H]⁻ Calcd for C₈H₁₅NO₄ 188.09283; found 188.09276.

Compound 10h: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl *N*-Boc-β-Ala



10h

Chemical Formula: C₂₆H₂₈NO₄P
Molecular Weight: 449,48676

Following the general procedure for the preparation of phosphine, compound **10h** was obtained (272 mg, 84%) as a colorless oil, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (8/2) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl)diphenylphosphine (200 mg, 0.72 mmol) and *N*-Boc-β-alanine previously prepared (339 mg, 2.16 mmol) in DCM (10 mL).

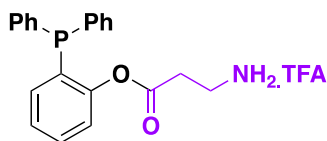
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.40-7.34 (m, 7 H, H^{Ar}), 7.30-7.26 (m, 4 H, H^{Ar}), 7.18-7.15 (m, 2 H, H^{Ar}), 6.84-6.82 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.23 (t, *J* = 6.6 Hz, 2 H, CH₂), 2.47 (t, *J* = 6.60 Hz, 2 H, CH₂), 1.43 (s, 9 H, H^{Boc}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.6 (C=O), 156.0 (C=O), 152.8 (C^{Ar}), 135.5 (C^{Ar}), 135.4 (C^{Ar}), 134.2 (2C^{Ar}), 134.0 (2C^{Ar}), 132.0 (C^{Ar}), 131.9 (C^{Ar}), 130.2 (C^{Ar}), 129.3 (2C^{Ar}), 128.8 (2C^{Ar}), 128.7 (2C^{Ar}), 126.5 (C^{Ar}), 122.7 (C^{Ar}), 79.5 (C^q^{Boc}), 36.0 (CH₂), 34.9 (CH₂), 28.6 (3C, CH₃).

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = -16.7.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₆H₂₉NO₄P 450.18342; found 450.18237.

Compound 10i: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl β -Ala



Chemical Formula: C₂₃H₂₀F₃NO₃P
Molecular Weight: 446,38597

Compound **10h** (270 mg, 0.60 mmol) was suspended in 3.3 ml of 2M TFA solution in DCM and the reaction was stirred 2h at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (DCM/ MeOH 9/1) to yield **10i** (210 mg, 75%) as a white foam.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.46-7.42 (m, 1 H, H^{Ar}), 7.40-7.36 (m, 6 H, H^{Ar}), 7.30-7.26 (m, 4 H, H^{Ar}), 7.23-7.19 (m, 2 H, H^{Ar}), 6.86-6.83 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.09 (t, J = 6.82 Hz, 2 H, CH₂), 2.73 (t, J = 6.90 Hz, 2 H, CH₂).

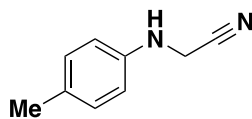
¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 171 (C=O), 154.1 (C^{Ar}), 136.7 (C^{Ar}), 136.6 (C^{Ar}), 135.0 (2C^{Ar}), 134.9 (2C^{Ar}), 131.6 (C^{Ar}), 131.5 (C^{Ar}), 131.3 (C^{Ar}), 130.4 (2C^{Ar}), 129.9 (2C^{Ar}), 129.8 (2C^{Ar}), 127.7 (C^{Ar}), 123.7 (C^{Ar}), 36.1 (CH₂), 32.3 (CH₂).

³¹P NMR (202 MHz, MeOD): δ = - 16.9.

¹⁹F NMR (471 MHz, MeOD): δ = - 77.0.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₁H₂₁NO₂P 350.13099; found 350.13044.

2-(*p*-tolylamino)acetonitrile¹⁶¹



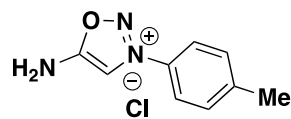
Chemical Formula: C₉H₁₀N₂
Molecular Weight: 146,19300

To a mixture of *p*-toluidine (3 g, 28 mmol) in MeCN (60 mL) were successively added NaI (2.1 mg, 14 mmol), K₂CO₃ (4.4 g, 34 mmol) and bromoacetonitrile (2.07 mL, 30 mmol). The mixture was refluxed for 3 h. The reaction mixture was filtered and partitioned between EtOAc and H₂O. The organic layer was separated and washed with brine. The crude product was purified by column chromatography using cyclohexane/EtOAc 8/2 as eluent to give the desired product as a yellow oil (3.7 g, 90%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H^A), 6.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, H^A), 4.07 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H, CH₂), 2.31 (s, 3 H, CH₃).

¹⁶¹ Dai, L.-L., Zhang, H.-Z., Nagarajan, S., Rasheed, S., Zhou, C.-H. *Med. Chem. Commun.* **2015**, 6, 147.

5-amino-3-(p-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium chloride¹⁶²



Chemical Formula: C₉H₁₀N₃OCl
Molecular Weight: 211,64900

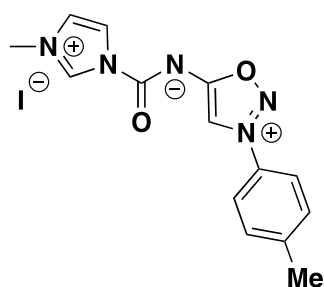
To a solution of 2-(p-tolylamino)acetonitrile (3.7g, 25.3 mmol) in Et₂O (60 mL) was added isopentyl nitrite (6.81 mL, 50.6 mmol). The mixture was stirred for 20 h at room temperature. Then a solution of HCl 4M in dioxane (64 mL) was added to the mixture and the reaction was stirred for 24 h. The precipitate was collected by filtration and the iminosydnone was obtained as a beige powder (3.75 g, 70%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 9.90 (bs, 2 H, NH₂), 8.60 (s, 1 H, CH^{Syd}), 7.94 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H, H^{Ar}), 7.56 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H, H^{Ar}), 2.46 (s, 3 H, CH₃).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ = 169.4 (C^q^{Syd}), 144.1 (C^{Ar}), 130.7 (C^{Ar}, 2C), 130.4 (C^{Ar}), 122.3 (C^{Ar}, 2C), 101.9 (CH), 20.9 (CH₃).

¹⁶² Riomet, M., Decuypere, E., Porte, K., Bernard, K., Plougastel, L., Kolodych, S., Audisio, D., Taran, F. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 8535-8541.

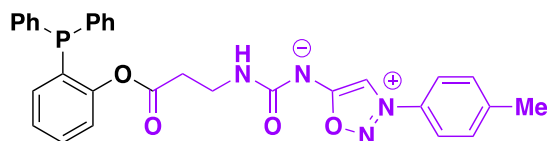
Compound 11: (3-methyl-1H-imidazol-3-ium-1-carbonyl)(3-(p-tolyl)-1,2,3-oxadiazol-3-ium-5-yl)amide iodide¹⁶³



Iminosynone (300 mg, 1.4 mmol) was added to a solution of 1,1'-carbonyldiimidazole (252 mg, 1.55 mmol) in a DMF/MeCN mixture (3/1, 4 mL). The solution was stirred at room temperature for 1 h before being concentrated under reduced pressure. The crude product was dissolved in anhydrous acetonitrile (4 mL), and MeI (294 μ L, 4.72 mmol) was added. The mixture was stirred for 16 h at room temperature before being concentrated under reduced pressure leading to compound **11** (430 mg, 75% over 2 steps). Due to its instability, the activated synone **11** was used in the next step without further purification.

¹⁶³ Riomet, M., Porte, K., Madegard, L., Thuéry, P., Audisio, D., Taran, F. *Org. Lett.* **2020**, *6*, 2403-2408.

Compound 10j: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl sydnone



Chemical Formula: $C_{31}H_{27}N_4O_4P$
Molecular Weight: 550,55476

Compound **10i** (50 mg, 0.10 mmol) and DIPEA (26 μ l, 0.15 mmol) were added to a solution of compound **11** (30 mg, 0.10 mmol) in anhydrous DCM (5 mL). The mixture was stirred for 16 h at room temperature before being concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography (DCM/MeOH, 95/5) to give the desired product **10j** as a yellow foam (30 mg, 54%).

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.16 (s, 1 H, CH^{Syd}), 7.67 (d, J = 8.50 Hz, 2 H, H^{ArSyd}), 7.43 (d, J = 8.25 Hz, 2 H, H^{ArSyd}), 7.38-7.33 (m, 11 H, H^{Ar}), 7.19-7.14 (m, 2 H, H^{Ar}), 6.87-6.84 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.46-3.42 (m, 2 H, CH_2), 2.54 (t, J = 6.3 Hz, 2 H, CH_2), 2.50 (s, 3 H, CH_3).¹

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 172.9 (C_q), 170.4 ($C=O$), 161.7 ($C=O$), 152.8 (C^{Ar}), 143.8 (C^{Ar}), 135.7 (C^{Ar}), 134.2 ($2C^{Ar}$), 134.0 ($2C^{Ar}$), 133.9 (C^{Ar}), 132.0 (C^{Ar}), 131.9 (C^{Ar}), 131.0 ($2C^{Ar}$), 130.4 (C^{Ar}), 130.3 (C^{Ar}), 130.1 (C^{Ar}), 129.2 ($2C^{Ar}$), 128.8 ($2C^{Ar}$), 128.7 ($2C^{Ar}$), 126.3 (C^{Ar}), 122.8 (C^{Ar}), 121.4 ($2C^{Ar}$), 101.8 (CH^{Syd}), 35.9 (CH_2), 34.9 (CH_2), 21.6 (CH_3).

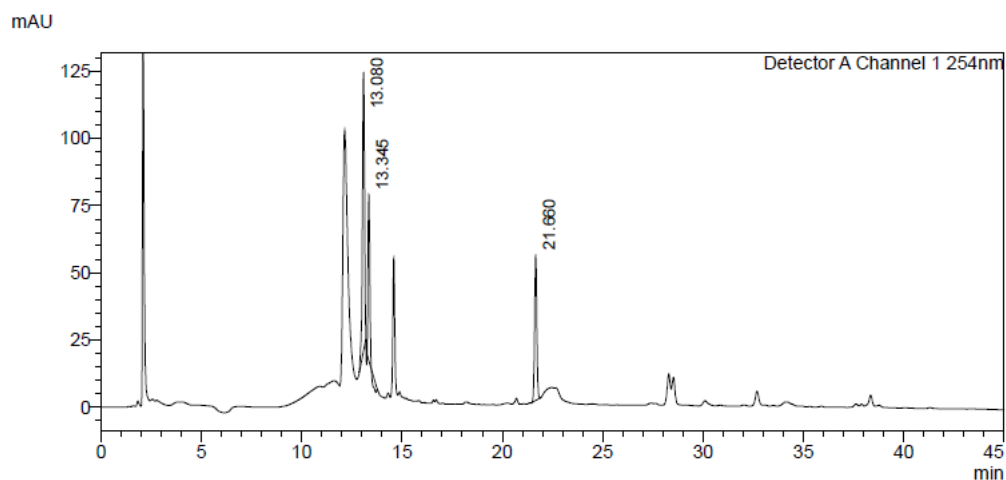
^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = - 16.2.

HRMS (ESI) m/z : $[M + H]^+$ Calcd for $C_{31}H_{28}N_4O_2P$ 551.18427; found 551.18386.

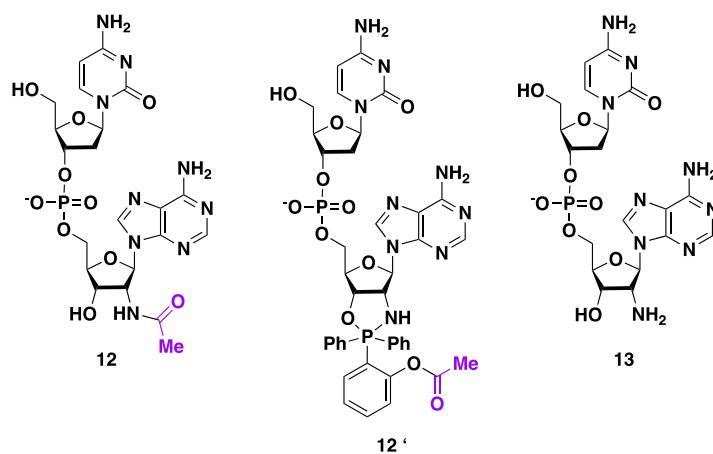
General procedure for traceless Staudinger ligation with dinucleotide **9**

*The reactions were performed in an Eppendorf tube and heated in a Thermo-Shaker plate (Grant Bio). To a solution of dinucleotide **9** (1 equiv) in DMF/H₂O (9/1, 1mL) was added the phosphine (10 equiv) and the mixture was stirred 4 h at 70°C. Then, an excess of water (3mL) was added, and the mixture was stirred 2 h at 70°C. After lyophilization, the residue was purified by HPLC, yields were determined by relative integration at 254 nm and all peaks were characterized by masse.*

LCMS analysis for compound 12 (conditions A)



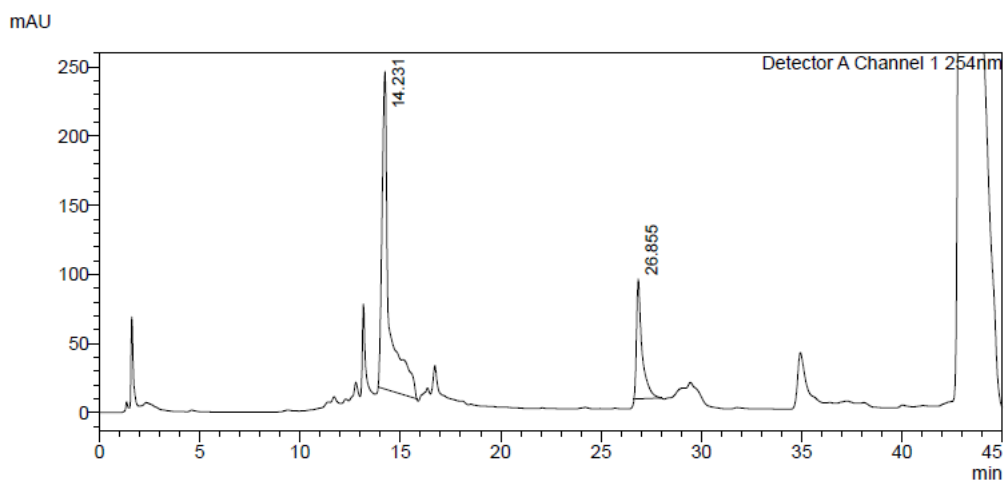
C18 100-5 NUCLEOSIL (Macherey Nagel), 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m. Flow: 1,3 mL/min; gradient: 0 to 63 % B in 30 min (A: NH_4OAc ; B: MeCN) at rt.



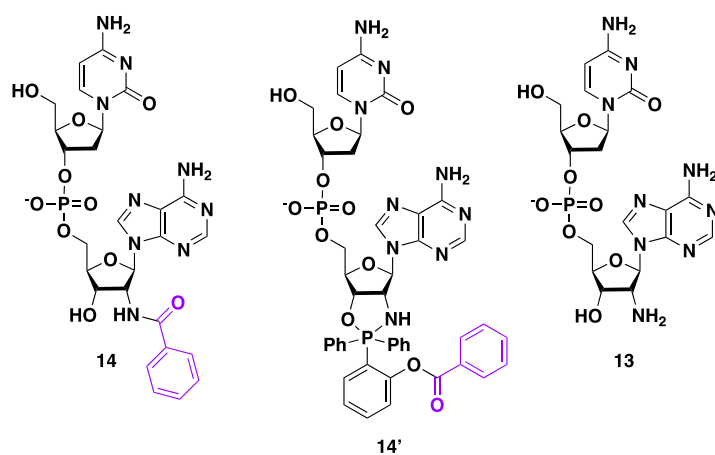
Ret. Time ^a	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
				Calculated	Found
13.080	759 866	13	50%	556.19	556.07
13.345	334 308	12	22%	597.16	598.13
21.660	413 245	12'	28%	873.24	874.07

^a peaks after 30 min were attributed to phosphine derivatives and were not incorporated in the global yield.

LCMS analysis for compound **14** (conditions A)



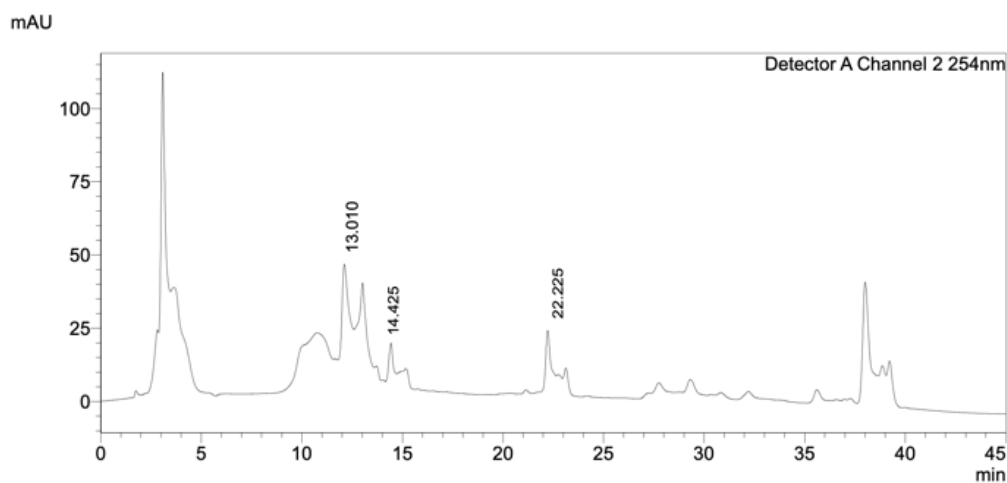
C18 100-5 NUCLEOSIL (Macherey Nagel), 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m. Flow: 1,3 mL/min; gradient: 0 to 63 % B in 30 min (A: NH_4OAc ; B: MeCN) at rt.



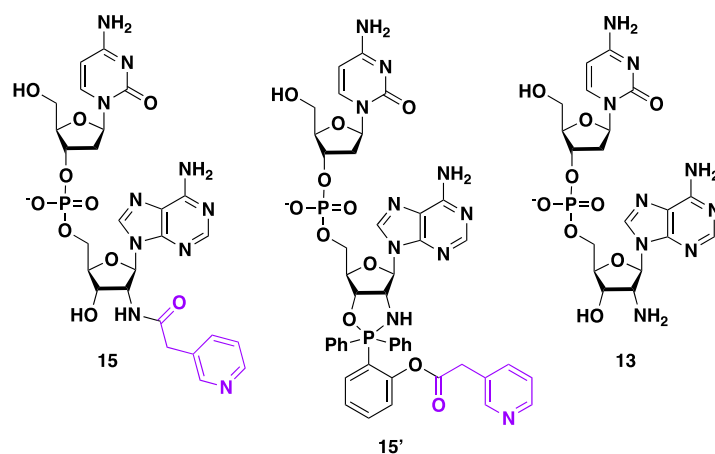
Ret. Time ^a	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
				Calculated	Found
14.231	5 710 000	14	77%	660,19	660.27
26.855	1 666 418	14'	23%	936,26	936.33

^a peaks after 30 min were attributed to phosphine derivatives and were not incorporated in the global yield.

LCMS analysis for compound 15 (conditions A)



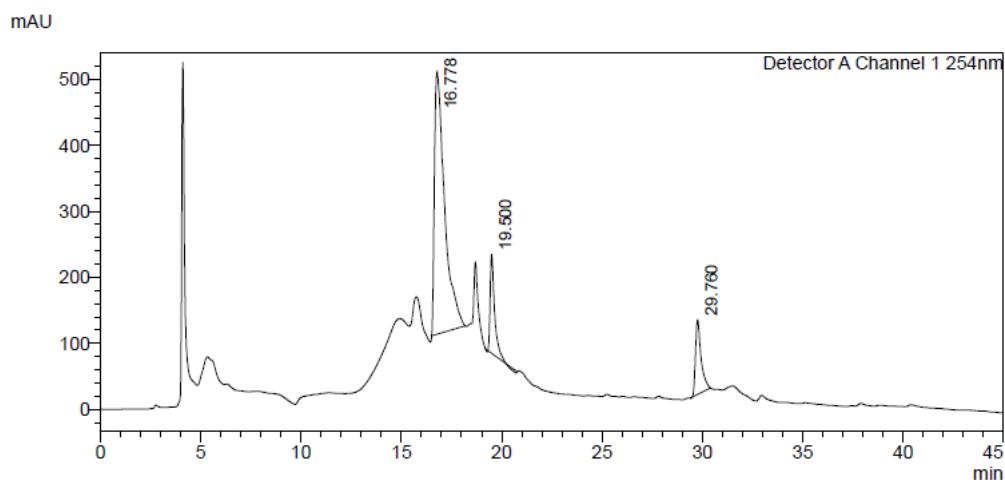
C18 100-5 NUCLEOSIL (Macherey Nagel), 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m. Flow: 1,3 mL/min; gradient: 0 to 63 % B in 30 min (A: NH_4OAc ; B: MeCN) at rt.



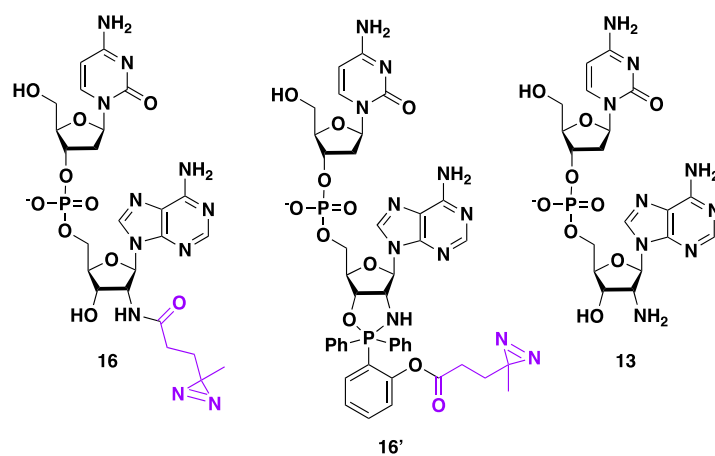
Ret. Time ^a	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
				Calculated	Found
13.010	350 929	13	27%	556.16	556.27
14.425	380 149	15	24%	675.20	675.13
22.225	647 221	15'	49%	951.27	951.20

^a peaks after 30 min were attributed to phosphine derivatives and were not incorporated in the global yield.

LCMS analysis for compound 16 (conditions A)



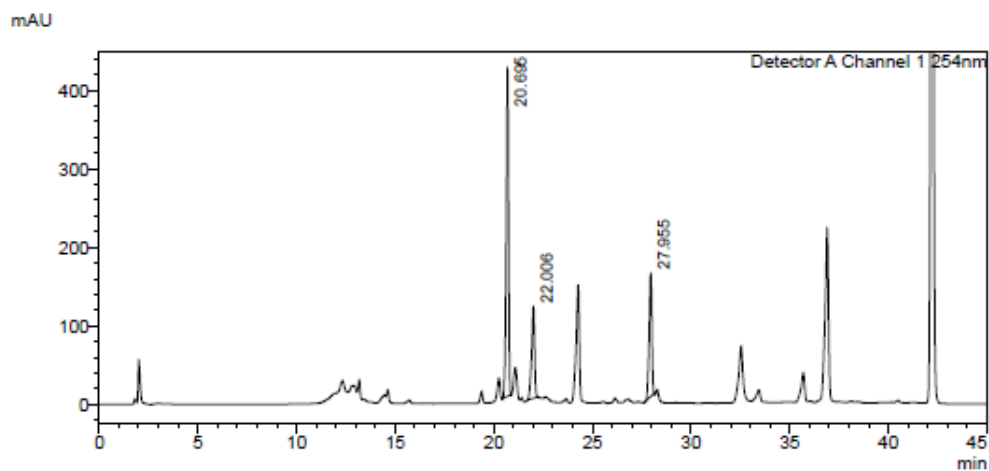
C18 100-5 NUCLEOSIL (Macherey Nagel), 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m. Flow: 1,3 mL/min; gradient: 0 to 63 % B in 30 min (A: NH_4OAc ; B: MeCN) at rt.



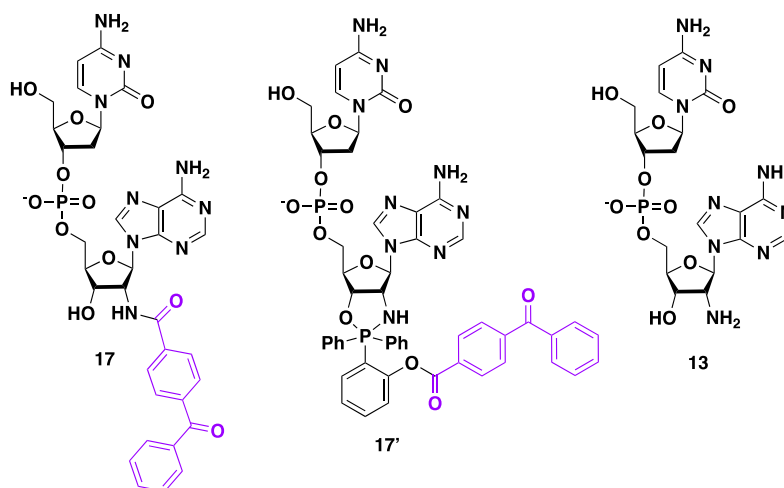
Ret. Time ^a	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
				Calculated	Found
16.778	1 406 407	13	76%	556.15	556.20
19.500	2 223 096	16	12%	666.21	666.20
29.760	2 197 759	16'	12%	942.29	942.27

^a peaks after 30 min were attributed to phosphine derivatives and were not incorporated in the global yield.

LCMS analysis for compound **17** (conditions A)



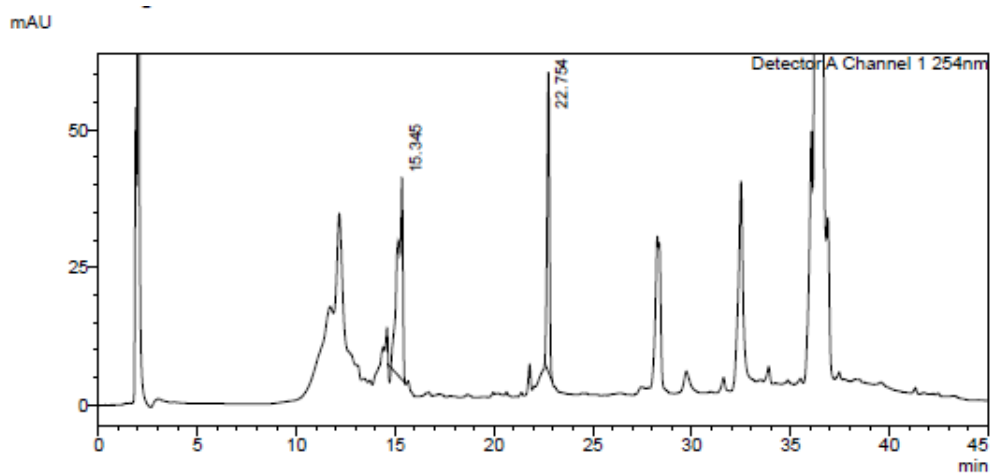
C18 100-5 NUCLEOSIL (Macherey Nagel), 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m. Flow: 1,3 mL/min; gradient: 0 to 63 % B in 30 min (A: NH_4OAc ; B: MeCN) at rt.



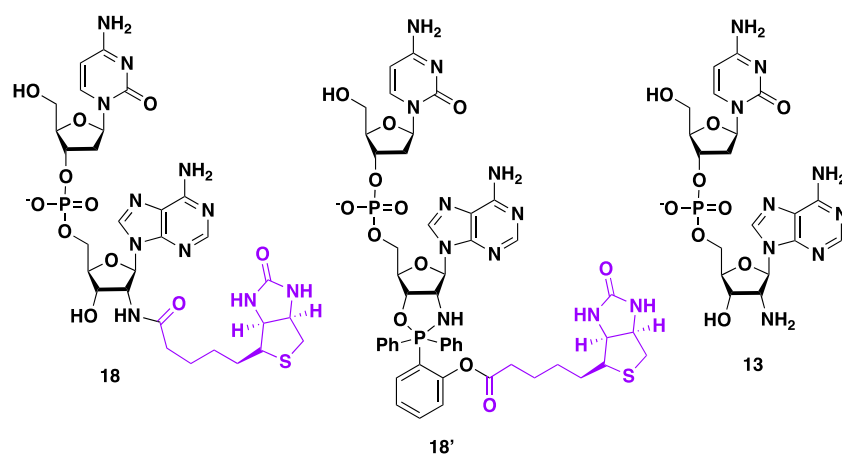
Ret. Time ^a	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	
				Calculated	Found
20.695	3 410 158	17^b	56%	764.21	764.13
22.006	1 172 578	17^b	20%	764.21	764.20
27.955	1 459 669	17'	24%	1040.28	1040.33

^a peak after 30 min were attributed to phosphine derivatives and were not incorporated in the global yield; ^b Ligated compound **17** was detected in 2 peaks probably due to the different protonation state of the molecule.

LCMS analysis for compound 18 (conditions A)



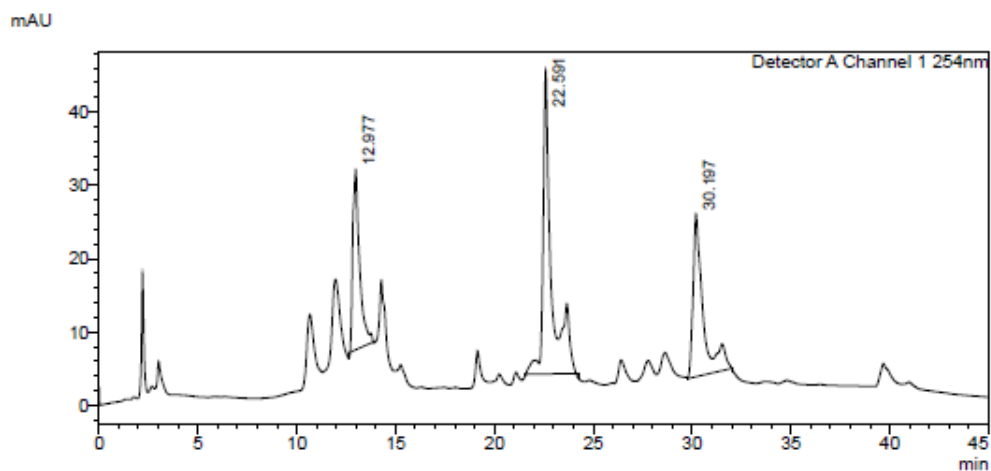
C18 100-5 NUCLEOSIL (Macherey Nagel), 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m. Flow: 1,3 mL/min; gradient: 0 to 63 % B in 30 min (A: NH_4OAc ; B: MeCN) at rt.



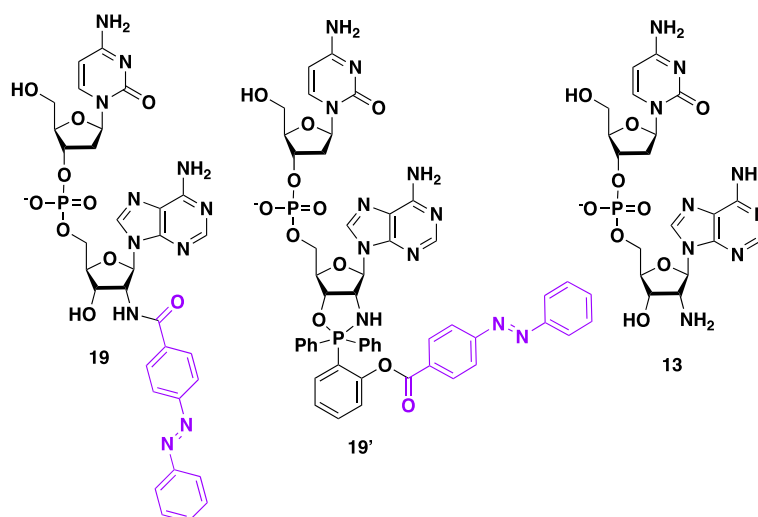
Ret. Time ^a	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
				Calculated	Found
15.345	656 184	18	59%	782.24	782.20
22.754	451 062	18'	41%	1058.31	1058.33

^a peaks after 30 min were attributed to phosphine derivatives and were not incorporated in the global yield.

LCMS analysis for compound 19 (conditions A)



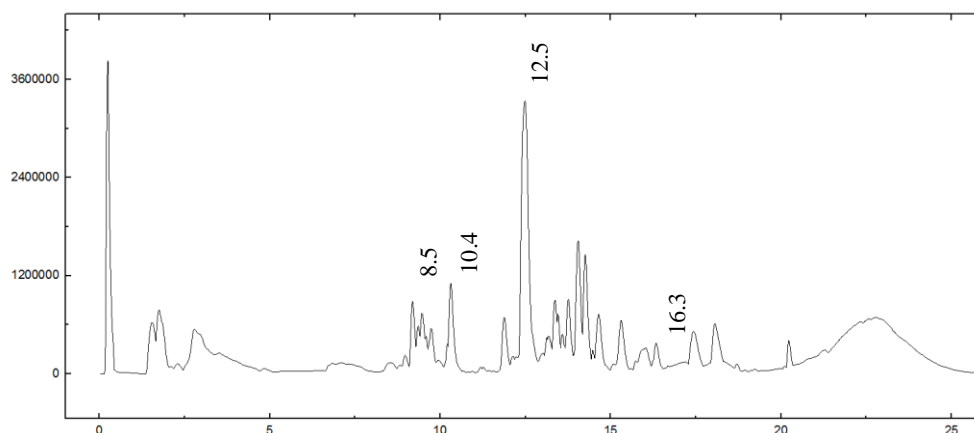
C18 100-5 NUCLEOSIL (Macherey Nagel), 150 mm x 4.6 mm, 5 μ m. Flow: 1,3 mL/min; gradient: 0 to 63 % B in 30 min (A: NH_4OAc ; B: MeCN) at rt.



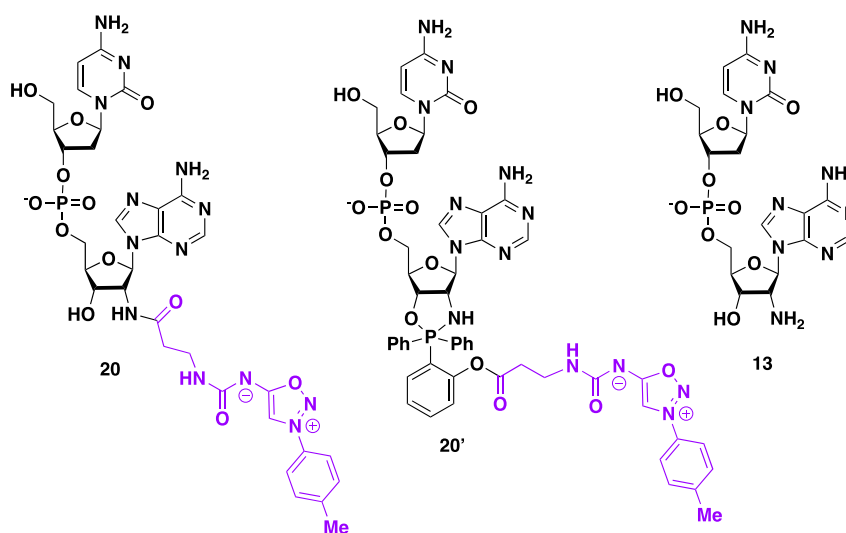
Ret. Time ^a	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺ Calculated	[M+H] ⁺ Found
12.977	585 495	13	23%	556.17	556.07
22.591	1 209 759	19	47%	764.23	764.13
30.197	782 812	19'	30%	1040.30	1040.47

^a peaks after 30 min were attributed to phosphine derivatives and were not incorporated in the global yield.

LCMS analysis for compound 20 (conditions B)



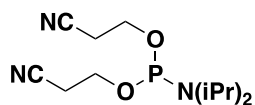
C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2 % to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH₃CN + 0.02% CH₃COOH ; B: H₂O + 0.02% CH₃COOH)



Ret. Time ^a	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁻	[M+H] ⁻
				Calculated	Found
8.5	2 844 798	13	5%	554.1518	554.1418
10.4	780 009	9	2%	580.1423	580.1445
12.5	50 520 148	20	86%	826.2428	826.2437
16.3	3 968 332	20'	7%	1102.3132	1102.3125

^a peaks after 30 min were attributed to phosphine derivatives and were not incorporated in the global yield.

Compound 21: bis(2-cyanoethyl) diisopropylphosphoramidite¹⁶⁴



Chemical Formula: C₁₂H₂₂N₃O₂P
Molecular Weight: 271,30076

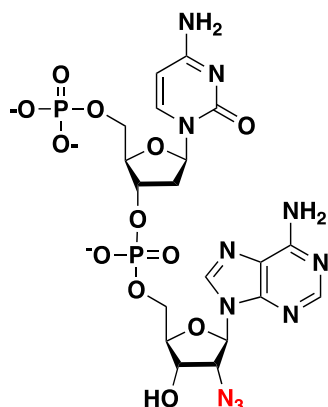
(2-cyanoethyl)-diisopropylchlorophosphoramidite (1 g, 4.2 mmol) was added at 0 °C to a solution of 3-hydroxypropanenitrile (577 μL, 8.4 mmol) and DIPEA (2.2 mg, 12.6 mmol) in THF (3 mL). The reaction was stirred 15 min at 0 °C and 30 min at room temperature. The reaction mixture was partitioned between EtOAc and a phosphate buffer solution (pH = 7). The organic layer was separated and washed with brine. The crude product was purified by column chromatography using cyclohexane/EtOAc 6/4 as eluent to give the desired product as a colorless oil (205 mg, 18%).

Note: The silica gel was neutralized with a solution of cyclohexane with 1% NEt₃ before the purification.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 3.95-3.74 (m, 4 H, CH₂), 3.69-3.54 (m, 2 H, CH^{iPr}), 2.67-2.62 (m, 4 H, CH₂), 1.20 (s, 6 H, Me^{iPr}), 1.17 (s, 6 H, Me^{iPr}).

¹⁶⁴ Uhlmann, E., Engels, J. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 1023-1026.

Compound 22: pdC-pA-2'-N₃



Chemical Formula: C₁₉H₂₂N₁₁O₁₂P₂³⁻
Molecular Weight: 658,39917

To a solution of 2'-azido-adenosine derivative **8** (70 mg, 0.13 mmol) in MeCN (300 μ L) was added Ac-dC-PCNE phosphoramidite (250 mg, 0.32 mmol) in MeCN (2 mL) and a 0.45 M tetrazole solution in MeCN (3 mL, 1.37 mmol) and. After stirring at rt for 1 h, a 0.1 M iodine solution in THF/H₂O/Pyridine (75/2/20, 4 mL) was added. After 30 min, the reaction mixture was diluted with EtOAc, washed with water, a saturated solution of Na₂S₂O₃ and brine. The organic layers were combined, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under vacuo. The residue was then stirred with a 3% TCA solution in DCM (7.6 mL) at rt for 30 min. The reaction mixture was diluted with DCM and the organic layer washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The crude product was then dissolved in MeCN (2 mL) and bis(2-cyanoethyl)diisopropylphosphoramidite **21** (92 mg, 0.34 mmol), followed by tetrazole (3 mL, 1.37 mmol, 0.45 M solution in MeCN) were added. The mixture was stirred at rt for 3 h and a 0.1 M solution of I₂, in THF/H₂O/Pyridine (75/2/20, 3.4 mL) was added. After being stirred at rt for 1 h, the mixture was diluted with EtOAc and washed successively with a saturated solution of Na₂S₂O₃ and brine, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated to dryness. The crude was dissolved in a 5 M solution of MeNH₂ (EtOH/H₂O, 1/1) (5.5 mL) and the reaction was stirred at rt 24 h. The residue was then dissolved in MeOH (15 mL) and CsF (4.1 g, 27.4 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 24 h. After concentration under vacuo, the residue was purified by HPLC. The appropriate fractions were collected and lyophilized, to give the dinucleotide **22**¹⁶⁵ as a white foam (6 mg, 16%).

¹⁶⁵ Fonvielle, M., Mellal, D., Patin, D., Lecerf, M., Blanot, D., Bouhss, A., Santarem, M., Mengin-Lecreux, D., Sollogoub, M., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 1357-1363.

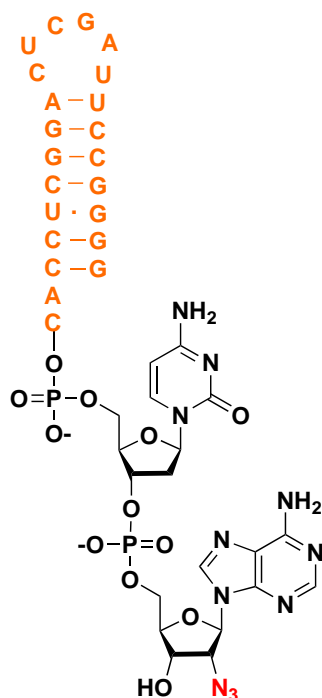
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.50 (s, 1 H, H8^{Ad} or H2^{Ad}), 8.27 (s, 1 H, H8^{Ad} or H2^{Ad}), 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H6^{Ad}), 6.17-6.14 (m, 2 H, H5^{Cyt}, H1^{Ad}), 6.03 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H1^{Cyt}), 4.89-4.86 (m, 2 H, H2^{Ad}, H3^{Cyt}), 4.80 (m, 1 H, H4^{Cyt}), 4.38-4.37 (m, 1 H, H3^{Ad}), 4.28 (s, 1 H, H4^{Ad}), 4.22-4.14 (m, 2 H, H5^{Ad}), 4.03-4.01 (m, 2 H, H5^{Cyt}), 2.40-2.36 (m, 1 H, H2^{Cyt}), 1.89-1.83 (m, 1 H, H2^{Cyt}).

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 165.6 (Cq), 155.5 (C=O), 153.1 (C2^{Ad} or C8^{Ad}), 141.1 (C2^{Ad} or C8^{Ad}), 139.6 (Cq), 96.5 (C1^{Cyt}), 86.2 (C5^{Cyt}), 86.0 (C4^{Cyt}), 85.6 (C1^{Ad}), 83.6 (C3^{Ad}), 76.2 (C3^{Cyt}), 70.4 (C4^{Ad}), 64.9 (C2^{Ad}), 64.2 (C5^{Ad}), 64.5 (C5^{Cyt}), 38.0 (C2^{Cyt}).

³¹P NMR (202 MHz, D₂O): δ = 0.19.

HRMS (ESI) m/z: [M - H]⁻ Calcd for for C₁₉H₂₂N₁₁O₁₂P₂ 660.1087; found: 660.1116.

Compound 23: 24-nt RNA



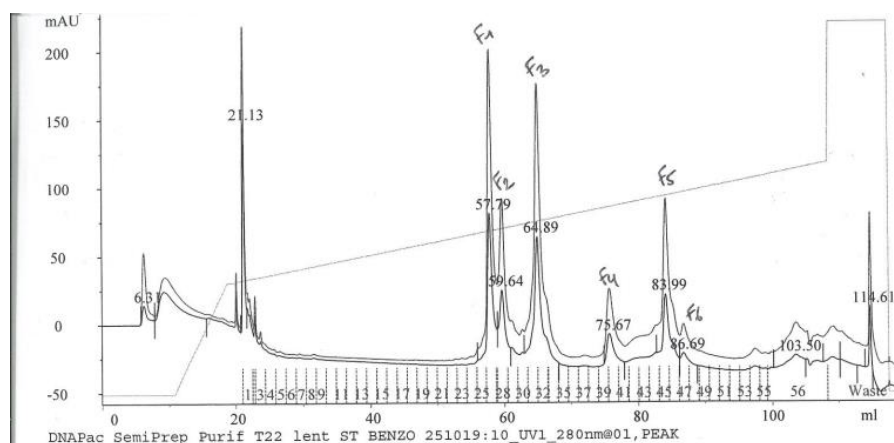
2'-azido-dinucleotide **22** was ligated to RNA-helix (5'-GGGGCCUUAGCUCAGGCUCCAC-3') with purified T4 RNA ligase. RNA-helix was synthesized by the phosphoramidite method and purified by polyacrylamide gel electrophoresis (Eurogentec). The ligation reaction was performed at 37 °C for 120 min in 500 μ L of HEPES buffer (50 mM, pH 7.5) containing RNA helix (40 nmol, 40 μ M), 2'-azido-dinucleotide **22** (400 nmol, 400 μ M), T4 RNA ligase (0.6 mg/mL), DMSO (10%), ATP (1 mM), and MgCl₂ (15 mM). The product of the ligation reaction **23** was purified by anion exchange chromatography (DNAPac PA 100, 250 x 4 mm; Dionex) with linear NH₄OAc gradient (25 to 2500 mM, pH 8.0) containing 0.5 % MeCN, which was applied for 30 min at a flow rate of 1 ml.min⁻¹. Fractions containing the ligation product were identified by PAGE-SDS, lyophilized, dissolved in RNase-free water and stored at -20 °C ($\epsilon_{260\text{ nm}} = 2.26 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; 15.4 nmol, 46%).

MS (ESI) m/z: [M-H]⁻ Calcd for C₂₂₇H₂₈₄N₉₃O₁₆₄P₂₃ 7651.6; found: 7651.5.

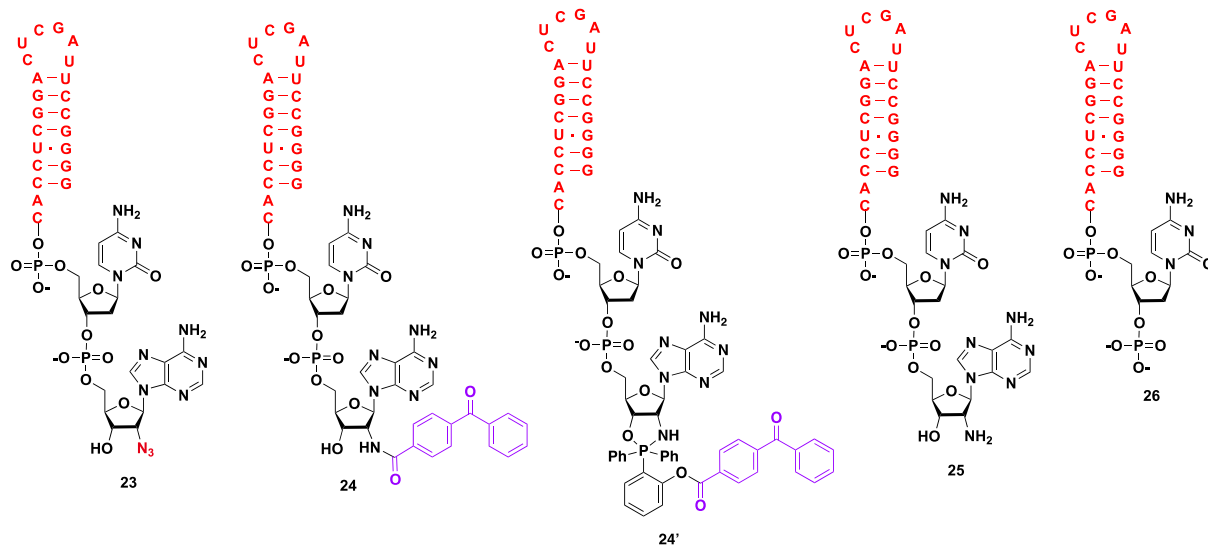
Procedure for traceless Staudinger ligation with RNA16

RNA **23** (5nmol) was diluted in a DMF/ RNase free H₂O mixture (1/1.7 μ L) in a PCR tube and 7 μ L of a solution of phosphine **10e** at the concentration 100 mM (700 nmol) in DMF / RNase free H₂O (1/1) was added. The mixture was incubated for 4 h at 70 °C in a thermocycler with the lid heated at 80 °C to avoid condensation on the cap of the tube. RNase free H₂O (42 μ L) was then added and the mixture was incubated for an additional 2 h at 70 °C. The crude was centrifuged 5 min at 4°C and the supernatant purified by HPLC using conditions C.

LCMS analysis for compound **24** (conditions C)

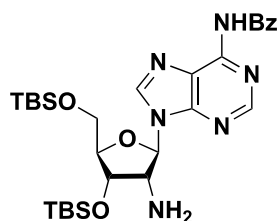


DNAPac PA-100 (ThermoFisher Scientific) column (9 mm \times 250 mm) with linear NH₄OAc gradient (25 to 2500 mM, pH 8.0) containing 0.5 % MeCN, which was applied for 30 min at a flow rate of 1 ml.min⁻¹ at 22 °C and UV detection at 260 nm.



Peak	Ret time (mL of B)	Area	Attribution	Yield	MS Maldi Calculated	MS Maldi Found
F1	57.79	92 8083	26	27%	7377.36	7378.4
F2	59.64	49 8690	25	15%	7625.60	7624.6
F3	64.89	114 8341	23	33%	7651.60	7647.2
F4	75.67	24 2585	24	7%	7833.81	7838.8
F5	83.99	61 6558	24'	18%	8110.08	8111.6

Compound 27: 2'-amino-3'-5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl) N⁶-benzoyl adenosine



Chemical Formula: C₂₉H₄₆N₆O₄Si₂
Molecular Weight: 598,89500

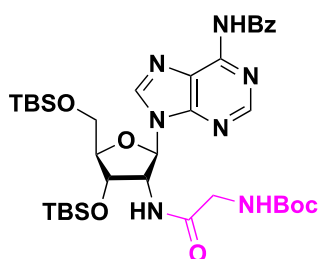
Compounds **6** (170 mg, 0.27 mmol) was dissolved in MeOH (6 mL) and 10 % wt Pd/C (5.8 mg, 0.05 mmol) was added. The reaction mixture was stirred under 1 atm hydrogen atmosphere for 16 h. The mixture was then filtered over Celite[®] and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography using Cyclohexane/EtOAc (2/8) as eluent to afford compound **27** as white foam (139 mg, 85%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 9.16 (s, 1 H, NH^{Bz}), 8.77 (s, 1 H, H2 or H8), 8.28 (s, 1 H, H2 or H8), 8.07-7.92 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.66-7.38 (m, 3 H, H^{Bz}), 5.97 (d, *J* = 7.3 Hz, 1 H, H1'), 4.34 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H3'), 4.18-4.12 (m, 1 H, H4'), 4.07-3.94 (m, 1 H, H2'), 3.93-3.83 (m, 1 H, H_a5'), 3.81-3.74 (m, 1 H, H_b5'), 2.12 (bs, 2 H, NH₂), 0.96 (s, 9 H, tBu^{Boc}), 0.91 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.16 (bs, 6 H, Me^{TBS}), 0.10 (m, 6 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 165.8 (C=O), 152.7 (C2 or C8), 152.4 (Cq), 150.3 (Cq), 141.7 (C2 or C8), 134.2 (Cq), 132.8 (CH^{Bz}), 128.4 (2CH^{Bz}), 128.0 (2CH^{Bz}), 124.0 (Cq), 89.9 (C1'), 87.2 (C4'), 74.1 (C3'), 63.5 (C5'), 59.4 (C2'), 26.3 (tBu^{Boc}), 25.9 (2 C, tBu^{TBS}), 18.5 (Cq^{TBS}), 18.3 (Cq^{TBS}) - 4.2 (Me^{TBS}), - 4.4 (Me^{TBS}), - 5.0 (Me^{TBS}), - 5.1 (Me^{TBS}).

HRMS (ESI) m/z: [M + Na]⁺ Calcd for C₂₉H₄₆N₆O₄Si₂Na 621.31011; found 621.2918.

Compound 28: 2'-GlyBoc-3'-5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl) N⁶-benzoyl adenosine



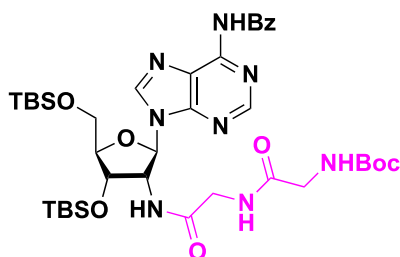
Chemical Formula: C₃₆H₅₇N₇O₇Si₂
Molecular Weight: 756,06400

To a solution of *N*-Boc-Gly (176 mg, 1mmol) in DCM (8 mL) were successively added EDCI (192 mg, 1 mmol) and HOBT (135 mg, 1 mmol). The mixture was stirred 30 min at room temperature and compound **27** (300 mg, 0.5 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 16 h. EtOAc and brine were added and the organic phase was washed 3 times with brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography using cyclohexane/EtOAc (4/6) as eluent to afford compound **28** (120 mg, 32%) as a white foam.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.64 (s, 1 H, H2 or H8), 8.49 (s, 1 H, H2 or H8), 8.03-8.02 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.59-7.57 (m, 1 H, H^{Bz}), 7.51-7.48 (m, 2 H, H^{Bz}), 6.17 (d, *J* = 7.2 Hz, 1 H, H1'), 5.21-5.19 (m, 1 H, H2'), 4.61 (s, 1 H, H3'), 4.13 (s, 1 H, H4'), 3.69-3.93 (m, 1 H, H_a5'), 3.82-3.80 (m, 1 H, H_b5') 3.70-3.65 (m, 1 H, CH₂^{Gly}), 3.55 (s, 1H, CH₂^{Gly}), 1.3 (s, 9 H, tBu^{Boc}), 0.96 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.87 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.15 (s, 6 H, Me^{TBS}), 0.06 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.05 (m, 3 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 172.0 (C=O), 168.0 (C=O), 153.3 (C2 or C8), 151.2 (Cq), 144.2 (C2 or C8), 135.0 (Cq), 133.9 (CH^{Bz}), 129.7 (2CH^{Bz}), 129.4 (2CH^{Bz}), 128.2 (Cq), 125.1 (Cq) 86.6 (C1'), 88.1 (C1'), 80.8 (Cq^{Boc}), 73.5 (C3'), 64.2 (CH₂^{Gly}) 57.0 (C2'), 44.8 (C5'), 28.7 (tBu^{Boc}), 26.5 (2 C, tBu^{TBS}), 19.3 (Cq^{TBS}), 19.0 (Cq^{TBS}) - 4.4 (Me^{TBS}), - 4.5 (Me^{TBS}), - 5.3 (Me^{TBS}), - 5.1 (Me^{TBS}).

Compound 29: 2'-GlyGlyBoc-3'-5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl) N⁶-benzoyl adenosine



Chemical Formula: C₃₈H₆₀N₈O₈Si₂
Molecular Weight: 813,11600

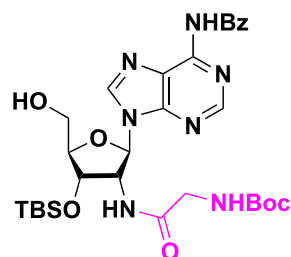
To a solution of *N*-Boc dipeptide **53** (89 mg, 0.37 mmol) in DMF (1 mL) were successively added EDCI (73 mg, 0.37 mmol) and HOBT (52 mg, 0.37 mmol). The mixture was stirred 30 min at room temperature and compound **27** (191 mg, 0.31 mmol) was added at 0 °C. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 16 h. EtOAc and brine were added and the organic phase was washed 3 times with brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography using cyclohexane/EtOAc (2/8) as eluent to afford compound **29** (222 mg, 86%) as a white foam.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.50 (s, 1 H, H₂ or H₈), 8.18 (s, 1 H, H₂ or H₈), 7.87-7.86 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.43-7.40 (m, 1 H, H^{Bz}), 7.34-7.31 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.13 (bs, 1 H, NH), 6.85 (bs, 1 H, NH), 6.01 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, H^{1'}), 5.46 (bs, 1 H, NH), 4.96-4.92 (m, 1 H, H^{2'}), 4.35-4.34 (m, 1 H, H^{3'}), 4.00 (s, 1 H, H^{4'}), 3.84-3.53 (m, 6 H, 2 CH₂^{Gly} and H^{5'}), 1.23 (s, 9 H, tBu^{Boc}), 0.81 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.77 (s, 9 H, tBu^{TBS}), -0.00 (s, 6 H, Me^{TBS}), -0.06 (s, 6 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.3 (C=O), 169.2 (C=O), 165.2 (C=O), 156.1 (C=O), 152.3 (C_q), 152.1 (C₂ or C₈), 149.5 (C_q), 141.7 (C₂ or C₈), 133.6 (C_q), 132.7 (CH^{Bz}), 128.7 (CH^{Bz}), 128.1 (CH^{Bz}), 123.0 (CH^{Bz}), 87.3 (C^{4'}), 86.3 (C^{1'}), 80.0 (C_q^{Boc}), 72.5 (C^{3'}), 63.4 (CH₂^{Gly}), 55.8 (C^{2'}), 44.0 (C^{5'}), 42.9 (CH₂^{Gly}), 28.3 (tBu^{Boc}), 25.9 (tBu^{Boc}), 25.8 (tBu^{Boc}), 18.4 (C_q^{TBS}), 18.1 (C_q^{TBS}), -4.6 (Me^{TBS}), -4.7 (Me^{TBS}), -5.3 (Me^{TBS}), -5.4 (Me^{TBS}).

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₃₈H₆₁N₈O₈Si₂ 813.41509; found 813.41347.

Compound 30: 2'-GlyBoc-3'-O-(tert-butylidimethylsilyl)-5'-hydroxy N⁶-benzoyl adenosine



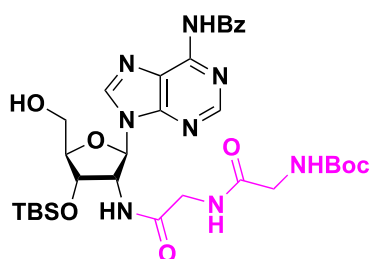
Chemical Formula: C₃₀H₄₃N₇O₇Si
Molecular Weight: 641,80100

A 1/1 (v/v) mixture of TFA/H₂O (600 μ L, 7.5 mmol) was added at 0 °C to a solution of compound **28** (120 mg, 0.15 mmol) in a THF (3 mL). The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. EtOAc and a saturated solution of NaHCO₃ were added and the organic phase was washed 3 times with brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography using DCM/MeOH (96/4) as eluent to afford compound **30** (93 mg, 97%) as a white foam.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.64 (s, 1 H, H₂ or H₈), 8.53 (s, 1 H, H₂ or H₈), 8.03-8.01 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.61-7.58 (m, 1 H, H^{Bz}), 7.52-7.49 (m, 2 H, H^{Bz}), 6.14-6.12 (d, J = 7.65 Hz, 1 H, H_{1'}), 5.20-5.17 (m, 1 H, H_{2'}), 4.59-4.59 (m, 1 H, H_{3'}), 4.16 (s, 1 H, H_{4'}), 3.86-3.83 (m, 1 H, H_{a5'}), 3.77-3.73 (m, 1 H, H_{b5'}), 3.86-3.83 (m, 1 H, CH₂^{Gly}), 3.55-3.51 (m, 1 H, CH₂^{Gly}), 1.38 (s, 9 H, tBu^{Boc}), 0.97 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.15 (s, 6 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 172.6 (C=O), 167.9 (C=O), 158.3 (C=O), 153.2 (C_q), 153.0 (C₂ or C₈), 151.3 (C_q), 144.5 (C₂ or C₈), 135.0 (C_q), 133.9 (CH^{Bz}), 129.7 (2CH^{Bz}), 129.4 (2 CH^{Bz}), 125.3 (C_q), 89.6 (C_{1'}), 89.0 (C_{4'}), 80.9 (C_q^{Boc}), 74.0 (C_{3'}), 63.1 (C_{5'}), 57.1 (C_{2'}), 44.8 (CH₂^{Gly}), 28.7 (tBu^{Boc}), 26.4 (2 C, tBu^{TBS}), 19.0 (C_q^{TBS}), - 4.5 (Me^{TBS}), - 4.6 (Me^{TBS}).

Compound 31: 2'-GlyGlyBoc-3'-5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5'-hydroxy N⁶-benzoyl adenosine



Chemical Formula: C₃₂H₄₆N₈O₈Si
Molecular Weight: 698,85300

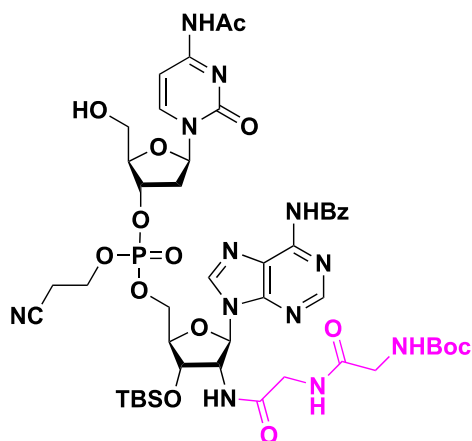
A 1/1 (v/v) mixture of TFA/H₂O (508 μ L, 6.6 mmol) was added at 0 °C to a solution of compound **29** (108 mg, 0.13 mmol) in a THF (5 mL). The reaction mixture was stirred at 4 °C for 4 h. EtOAc and a saturated solution of NaHCO₃ were added and the organic phase was washed 3 times with brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography using DCM/MeOH (96/4) as eluent to afford compound **31** (42 mg, 45%) as a white foam.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 8.65 (s, 1 H, H2 or H8), 8.25 (s, 1 H, H2 or H8), 7.99-7.97 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.57-7.54 (m, 1 H, H^{Bz}), 7.47-7.44 (m, 2 H, H^{Bz}), 7.34 (bs, 1 H, NH), 6.90 (bs, 1 H, NH) 5.95 (d, J = 5.0 Hz, 1 H, H1'), 5.54 (bs, 1 H, NH), 5.21-5.20 (m, 1 H, H2'), 4.56-4.66 (m, 1 H, H3'), 4.19 (s, 1 H, H4'), 3.96-3.54 (m, 6 H, H5' and 2 CH₂^{Gly}), 1.38 (s, 9 H, tBu^{Boc}), 0.94 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.14 (s, 6 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170.8 (C=O), 169.5 (C=O), 165.3 (C=O), 156.4 (C=O), 151.9 (Cq), 151.2 (C2 or C8), 150.1 (Cq), 143.4 (C2 or C8), 133.5 (Cq), 132.9 (CH^{Bz}), 129.2 (Cq), 128.9 (CH^{Bz}), 128.3 (CH^{Bz}), 128.1 (Cq), 124.9 (Cq), 90.0 (C1'), 89.4 (C4'), 80.3 (Cq^{Boc}), 73.1 (C3'), 62.7 (C5' or CH₂^{Gly}), 55.8 (C2'), 44.1 (C5' or CH₂^{Gly}), 43.3 (C5' or CH₂^{Gly}), 29.7 (tBu^{Boc}), 25.9 (2 C, tBu^{TBS}), 18.2 (Cq^{TBS}), - 4.5 (Me^{TBS}), - 4.6 (Me^{TBS}).

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₃₂H₄₇N₈O₈Si 699.32861; found 699.32729.

Compound 33: protected dCpA-2'GlyGlyBoc



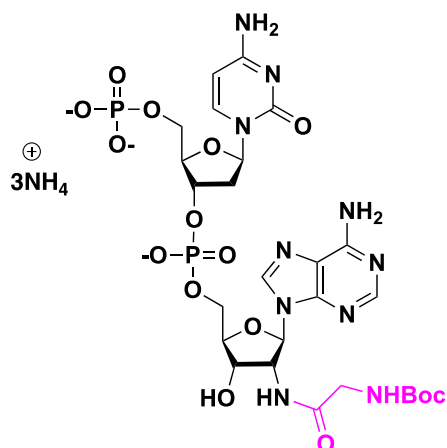
Chemical Formula: $C_{46}H_{63}N_{12}O_{15}PSi$
Molecular Weight: 1083,13776

To a solution of compound **31** (60 mg, 0.08 mmol) in MeCN (300 μ L) was added Ac-dC-PCNE phosphoramidite (250 mg, 0.32 mmol) in MeCN (2 mL) and a 0.45 M tetrazole solution in MeCN (1.9 mL, 0.80 mmol) and. After stirring at rt for 1 h, a 0.1 M iodine solution in THF/H₂O/Pyridine (75/2/20, 2.6 mL) was added. After 30 min, the reaction mixture was diluted with EtOAc, washed with water, a saturated solution of Na₂S₂O₃ and brine. The organic layers were combined, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated under vacuo. The residue was then stirred with a 3% TCA solution in DCM (4.7 mL) at rt for 30 min. The reaction mixture was diluted with DCM and the organic layer washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The residue was purified by silica gel chromatography using DCM/MeOH (96/4) as eluent to afford compound **33** (62 mg, 67%).

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): $\delta = -3.0$.

HRMS (ESI) m/z: [M + Na]⁺ Calcd for C₄₆H₆₃N₁₂O₁₅PSi₂Na 1105.39404; found 1105.39219.

Compound 36: pdCpA-2'-GlyBoc



Chemical Formula: $C_{26}H_{47}N_{13}O_{15}P_2$
Molecular Weight: 843,68552

Compound **34** (70 mg, 57 μ mol) was dissolved in a 5 M solution of $MeNH_2$ (EtOH/ H_2O , 1/1) (2.3 mL) and the reaction was stirred at rt 24 h and concentrated. The residue was then dissolved in MeOH (10 mL) and CsF (1.73 g, 11.4 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 $^{\circ}C$ for 24 h. After concentration under vacuo, the residue was purified by HPLC. The appropriate fractions were collected and lyophilized, to give the dinucleotide **36** (12 mg, 26% over 2 steps).

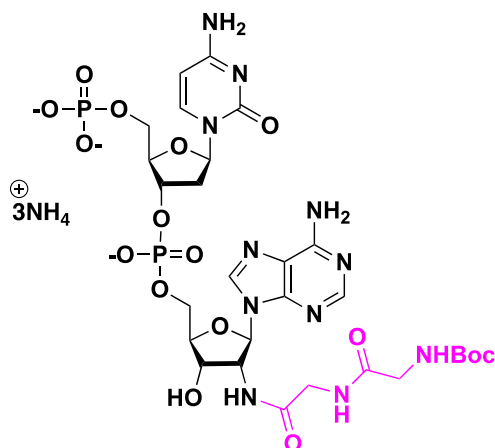
HPLC retention time : 12.5 min

1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.54 (s, 1 H, $H2^{Ad}$ or $H8^{Ad}$), 8.16 (s, 1 H, $H2^{Ad}$ or $H8^{Ad}$), 8.12 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, $H5^{Cyt}$), 6.23-6.20 (m, 1 H, $H1^{Cyt}$), 6.07 (d, J = 7.75 Hz, 1 H, $H1^{Ad}$), 5.95 (d, J = 7.65 Hz, 1 H, $H6^{Cyt}$), 5.04 (m, 1 H, $H2^{Ad}$), 4.88 (m, 1 H, $H3^{Cyt}$), 4.50 (m, 1 H, $H3^{Ad}$), 4.31 (s, 1 H $H4^{Cyt}$), 4.24 (s, 1H, s, $H4^{Ad}$), 4.11-4.03 (m, 4 H, $H5^{Ad}$ and $H5^{Cyt}$), 3.59 (s, 2 H, CH_2^{Gly}) 2.51-2.48 (m, 1 H, $H2^{Cyt}$), 2.15-2.10 (m, 1 H, $H2^{Cyt}$), 1.36 (s, 9 H, tBu^{Boc}).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): 172.9 (C=O), 171.7 (C=O), 164.5 (C=O), 158.5 (Cq), 156.5 (Cq), 153.7 ($C2^{Ad}$ or $C8^{Ad}$), 151.1 (Cq), 144.8 ($C2^{Ad}$ or $C8^{Ad}$), 141.9 ($C5^{Cyt}$), 120 (Cq), 95.9 ($C6^{Cyt}$), 88.0 (2C, $C1^{Cyt}$ or $C1^{Ad}$ or $C4^{Cyt}$ or $C4^{Ad}$), 87.6 (2C, $C1^{Cyt}$ or $C1^{Ad}$ or $C4^{Cyt}$ or $C4^{Ad}$), 80.2 (Cq^{Boc}), 77.7 ($C3^{Cyt}$), 72.2 ($C3^{Ad}$), 66.2 (CH_2^{Gly} or $C5^{Ad}$ or $C5^{Cyt}$), 66.1 (CH_2^{Gly} or $C5^{Ad}$ or $C5^{Cyt}$), 57.6 ($C2^{Ad}$), 44.7 (CH_2^{Gly} or $C5^{Ad}$ or $C5^{Cyt}$), 41.0 ($C2^{Cyt}$), 28.8 (tBu^{Boc}).

^{31}P NMR (202 MHz, MeOD): δ = 0.16, -1.12.

Compound 37: pdCpA-2'GlyGlyBoc



Chemical Formula: $C_{28}H_{50}N_{14}O_{16}P_{23}$
Molecular Weight: 900,73917

Compound **35** (96 mg, 75 μ mol) was dissolved in a 5 M solution of MeNH₂ (EtOH/H₂O, 1/1) (2.8 mL) and the reaction was stirred at rt 24 h and concentrated. The residue was then dissolved in MeOH (10 mL) and CsF (2.15 g, 0.01 mmol) was added. The reaction mixture was stirred at 60 °C for 24 h. After concentration under vacuo, the residue was purified by HPLC. The appropriate fractions were collected and lyophilized, to give the dinucleotide **37** (10 mg, 15% over 2 steps).

HPLC retention time : 14.3 min

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.58 (s, 1 H, H2^{Ad} or H8^{Ad}), 8.20 (s, 1 H, H2^{Ad} or H8^{Ad}), 8.01 (d, J = 5.0 Hz, 1 H, H5^{Cyt}), 6.35 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, H1^{Cyt}), 6.15 (d, J = 5.0 Hz, 1 H, H1^{Ad}), 5.97 (d, J = 10 Hz, 1 H, H6^{Cyt}), 5.16 (t, J = 5.0 Hz, 1 H, H2^{Ad}), signal of H3^{Cyt} is masked in the residual peak of water, 4.55 (d, J = 5.0 Hz, 1 H, H3^{Ad}), 4.23 (s, 2 H, H4^{Ad} and H4^{Cyt}), 4.15-4.13 (m, 2 H, CH₂^{Gly} or H5^{Ad} or H5^{Cyt}), 4.08-4.06 (m, 2 H, CH₂^{Gly} or H5^{Ad} or H5^{Cyt}), 3.92-3.84 (m, 2 H, CH₂^{Gly} or H5^{Ad} or H5^{Cyt}), 3.74-3.73 (m, 2 H, CH₂^{Gly} or H5^{Ad} or H5^{Cyt}), 2.51-2.47 (m, 1 H, H2^{Cyt}), 2.13-2.11 (m, 1 H, H2^{Cyt}), 1.44 (s, 9 H, tBu^{Boc}).

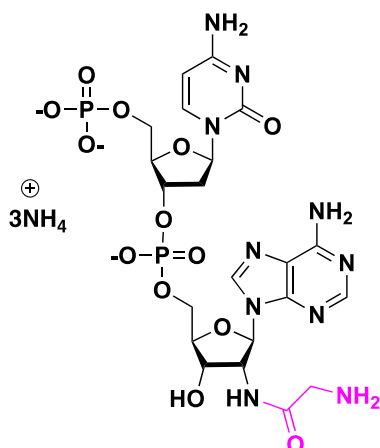
¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 176.6 (C=O), 173.0 (C=O), 171.7 (C=O), 167.3 (C=O), 158.4 (Cq), 157.9 (Cq), 157.2 (Cq), 153.9 (C2^{Ad} or C8^{Ad}), 151.1 (Cq), 142.9 (C2^{Ad} or C8^{Ad}), 141.3 (C5^{Cyt}), 119.9 (Cq), 96.5 (C6^{Cyt}), 87.4 (2C, C1^{Cyt} or C1^{Ad} or C4^{Cyt} or C4^{Ad}), 87.2 (2C, C1^{Cyt} or C1^{Ad} or C4^{Cyt} or C4^{Ad}), 80.8 (Cq^{Boc}), 77.4 (C3^{Cyt}), 72.2 (C3^{Ad}), 66.6 (CH₂^{Gly} or C5^{Ad} or C5^{Cyt}

), 65.9 (CH₂^{Gly} or C5'^{Ad} or C5'^{Cyt}), 57.4 (C2'^{Ad}), 44.6 (CH₂^{Gly} or C5'^{Ad} or C5'^{Cyt}), 43.3 (CH₂^{Gly} or C5'^{Ad} or C5'^{Cyt}), 40.5 (C2'^{Cyt}), 28.6 (tBu^{Boc}).

³¹P NMR (202 MHz, MeOD): δ = 0.8, -1.0.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₈H₄₂N₁₁O₁₆P₂ 850.22862; found 850.22685.

Compound 38: pdCpA-2'-Gly



Chemical Formula: $C_{21}H_{39}N_{13}O_{13}P_2$
Molecular Weight: 743,56852

Compound **36** (12 mg, 14 μ mol) was dissolved in a 5M solution of $ZnBr_2$ in a 1/1 (v/v) mixture of iPrOH/MeNO₂ (1.1 mL, 5.6 mmol) and the reaction mixture was stirred 24h at room temperature. Water was added and the mixture was lyophilized. The residue purified by HPLC and the appropriate fractions were collected and lyophilized, to give the dinucleotide **38** (2.4 mg, 23%).

HPLC retention time : 11.4 min

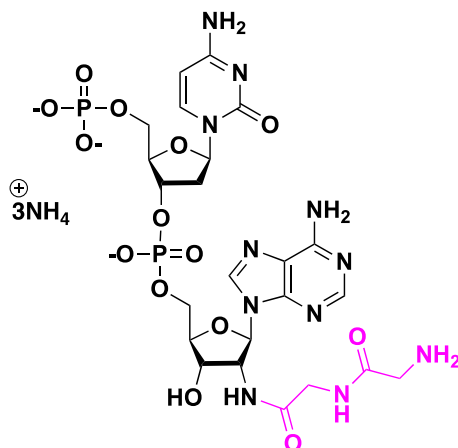
¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ = 8.55 (s, 1 H, H2^{Ad} or H8^{Ad}), 8.25 (s, 1 H, H2^{Ad} or H8^{Ad}), 7.79 (d, J = 7.62 Hz, 1 H, H5^{Cyt}), 6.07-6.05 (m, 1 H, H1^{Cyt}), 6.18-6.16 (d, J = 7.85 Hz, 1 H, H1^{Ad}), 6.06 (d, J = 7.65 Hz, 1 H, H6^{Cyt}), 5.17-5.15 (m, 1 H, H2^{Ad}), signal of H3^{Cyt} and H3^{Ad} are masked in the residual peak of water, 4.46 (s, 1 H, H4^{Ad}), 4.32 (s, 1 H, H4^{Cyt}), 4.19 (s, 2 H, CH₂^{Gly} or H5^{Ad} or H5^{Cyt}), 4.05-4.04 (m, 2 H, CH₂^{Gly} or H5^{Ad} or H5^{Cyt}), 3.92-3.76 (m, 2 H, CH₂^{Gly} or H5^{Ad} or H5^{Cyt}), 2.45-2.41 (m, 1 H, H2^{Cyt}), 1.94-1.88 (m, 1 H, H2^{Cyt}).

¹³C NMR (126 MHz, D₂O): δ = 167.3 (C=O), 165.2 (C=O), 156.3 (Cq), 155.4 (Cq), 153.0 (C2^{Ad} or C8^{Ad}), 149.2 (Cq), 141.3 (C2^{Ad} or C8^{Ad}), 139.8 (C5^{Cyt}), 118.4 (Cq), 96.5 (C6^{Cyt}), 85.7 (C1^{Cyt} or C1^{Ad} or C4^{Cyt} or C4^{Ad}), 85.2 (C1^{Cyt} or C1^{Ad} or C4^{Cyt} or C4^{Ad}), 84.8 (C1^{Cyt} or C1^{Ad} or C4^{Cyt} or C4^{Ad}), 84.7 (C1^{Cyt} or C1^{Ad} or C4^{Cyt} or C4^{Ad}), 76.3 (C3^{Cyt}), 70.1 (C3^{Ad}), 65.1 (CH₂^{Gly} or C5^{Ad} or C5^{Cyt}), 64.7 (CH₂^{Gly} or C5^{Ad} or C5^{Cyt}), 55.8 (C2^{Ad}), 40.4 (CH₂^{Gly} or C5^{Ad} or C5^{Cyt}), 38.1 (C2^{Cyt}).

³¹P NMR (202 MHz, D₂O): δ = 0.34, -1.12

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₁H₃₁N₁₀O₁₃P₂ 693.15473; found 693.15421.

Compound 39: pdCpA-2'GlyGly



Chemical Formula: $C_{23}H_{42}N_{14}O_{14}P_{23}$
Molecular Weight: 800,62217

Compound **37** (10 mg, 11 μ mol) was dissolved in a 5M solution of $ZnBr_2$ in a 1/1 (v/v) mixture of $iPrOH/MeNO_2$ (900 μ L, 2.2 mmol) and the reaction mixture was stirred 24h at room temperature. Water was added and the mixture was lyophilized. The residue purified by HPLC and the appropriate fractions were collected and lyophilized, to give the dinucleotide **39** (1.7 mg, 19%).

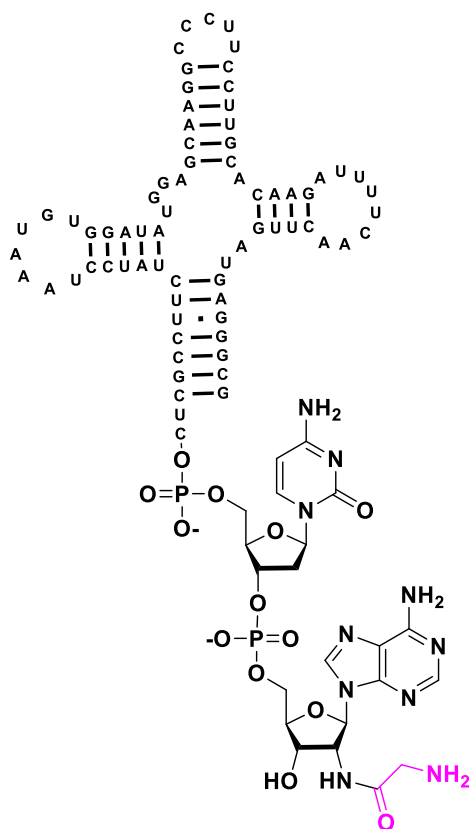
HPLC retention time : 10.8 min

1H NMR (500 MHz, D_2O): δ = 8.53 (s, 1 H, H2^{Ad} or H8^{Ad}), 8.26 (s, 1 H, H2^{Ad} or H8^{Ad}), 7.82 (d, J = 5.0 Hz, 1 H, H5^{Cyt}), 6.22-6.18 (m, 1 H, H1^{Cyt}), 6.18-6.16 (d, J = 10.0 Hz, 1 H, H1^{Ad}), 6.09 (d, J = 5 Hz, 1 H, H6^{Cyt}), 5.14-5.11 (m, 1 H, H2^{Ad}), signal of H3^{Cyt} and H3^{Ad} are masked in the residual peak of water, 4.66 (s, 2 H, H4^{Ad} and H4^{Cyt}), 4.44 (s, 2 H, CH₂^{Gly} or H5^{Ad} or H5^{Cyt}), 4.19-4.17 (m, 2 H, CH₂^{Gly} or H5^{Ad} or H5^{Cyt}), 4.01-4.87 (m, 4 H, CH₂^{Gly} or H5^{Ad} or H5^{Cyt}), 2.46-2.42 (m, 1 H, H2^{Cyt}), 1.94-1.88 (m, 1 H, H2^{Cyt}).

^{13}C NMR (126 MHz, D_2O): δ = 171.1 (C=O), 167.5 (C=O), 165.0 (C=O), 156.0 (Cq), 155.2 (Cq), 152.8 (C2^{Ad} or C8^{Ad}), 149.1 (Cq), 141.1 (C2^{Ad} or C8^{Ad}), 139.7 (C5^{Cyt}), 118.2 (Cq), 96.4 (C6^{Cyt}), 85.5 (C1^{Cyt} or C1^{Ad} or C4^{Cyt} or C4^{Ad}), 85.1 (C1^{Cyt} or C1^{Ad} or C4^{Cyt} or C4^{Ad}), 84.9 (C1^{Cyt} or C1^{Ad} or C4^{Cyt} or C4^{Ad}), 84.6 (C1^{Cyt} or C1^{Ad} or C4^{Cyt} or C4^{Ad}), 76.3 (C3^{Cyt}), 70.1 (C3^{Ad}), 65.0 (CH₂^{Gly} or C5^{Ad} or C5^{Cyt}), 64.5 (CH₂^{Gly} or C5^{Ad} or C5^{Cyt}), 55.4 (C2^{Ad}), 41.9 (CH₂^{Gly} or C5^{Ad} or C5^{Cyt}), 42.0 (CH₂^{Gly} or C5^{Ad} or C5^{Cyt}), 39.7 (C2^{Cyt}).

^{31}P NMR (202 MHz, D_2O): δ = 0.23, - 1.08.

Compound 40: ligation enzymatique entre 38 et ARN

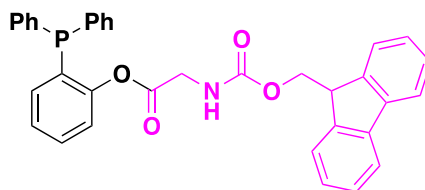


2'-Gly-dinucleotide **38** was ligated to RNA-helix (5'-GCGGGAGUAGUUCAACUUUUAGAACACGUUCCUUCGGAACGAGGUAUAGGUGUAA AUCCUAUCUUCGUC-3') with purified T4 RNA ligase. RNA-helix was synthesized by the phosphoramidite method and purified by polyacrylamide gel electrophoresis (Eurogentec). The ligation reaction was performed at 37 °C for 120 min in 500 μ L of HEPES buffer (50 mM, pH 7.5) containing RNA helix (40 nmol, 40 μ M), 2'-Gly-dinucleotide **38** (400 nmol, 400 μ M), T4 RNA ligase (0.6 mg/mL), DMSO (10%), ATP (1 mM), and MgCl₂ (15 mM). The product of the ligation reaction **40** was purified by anion exchange chromatography (DNAPac PA 100, 250 x 4 mm; Dionex) with linear NH₄OAc gradient (25 to 2500 mM, pH 8.0) containing 0.5 % MeCN, which was applied for 30 min at a flow rate of 1 ml.min⁻¹. Fractions containing the ligation product were identified by PAGE-SDS, lyophilized, dissolved in RNase-free water and stored at -20°C.

General procedure 1 for preparation of amino acid-phosphines

To a solution of (2-hydroxyphenyl)diphenylphosphine (1 equiv) in DCM were successively added DCC (3 equiv), DMAP (4 equiv), and a *N*-protected amino acid (3 equiv). The mixture was stirred overnight at room temperature then filtered through a pad of Celite® and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc as eluent to afford the desired phosphine.

Compound 42: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl *N*-Fmoc-Glycine



Chemical Formula: $C_{35}H_{28}NO_4P$
Molecular Weight: 557,58576

Following the general procedure 1 for the preparation of amino acid-phosphine, compound **42** was obtained (150 mg, 50%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (7/3) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (150 mg, 0.54 mmol) and *N*-Fmoc-Gly (480 mg, 1.62 mmol) in DCM (5 mL).

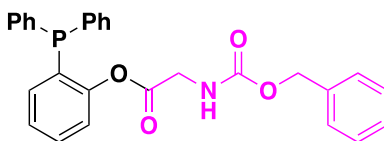
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.70 (d, J = 7.5 Hz, 2 H, H^{Ar}), 7.53 (d, J = 7.3 Hz, 2 H, H^{Ar}), 7.34 (d, J = 7.3 Hz, 2 H, H^{Ar}), 7.28-7.24 (m, 13 H, H^{Ar}), 7.11-7.08 (m, 2 H, H^{Ar}), 6.83-6.80 (m, 1 H, H^{Ar}), 4.99 (bs, 1 H, NH), 4.34 (d, J = 7.0 Hz, 2 H, CH_2^{Fmoc}), 4.18-4.15 (m, 1 H, CH^{Fmoc}), 3.85-3.84 (m, 2 H, CH_2^{Gly}).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 168.1 (C=O), 156.1 (C=O), 152.4, 143.9, 141.4, 135.4, 134.2, 134.0, 130.4, 130.2, 129.3, 128.8, 127.8, 127.2, 126.7, 125.2, 122.5, 120.1, 67.3 (CH_2^{Fmoc}), 47.3 (CH^{Fmoc}), 42.8 (CH_2^{Gly}).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = - 15.7.

HRMS (ESI) m/z : $[M + H]^+$ Calcd for $C_{35}H_{29}NO_4P$ 558.18342; found 558.18175.

Compound 43: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl N-Cbz-Glycine



Chemical Formula: $C_{28}H_{24}NO_4P$
Molecular Weight: 469,47676

Following the general procedure 1 for the preparation of amino acid-phosphine, compound **43** was obtained (157 mg, 62%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (8/2) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (150 mg, 0.54 mmol) and *N*-Cbz-Gly (338 mg, 1.62 mmol) in DCM (10 mL).

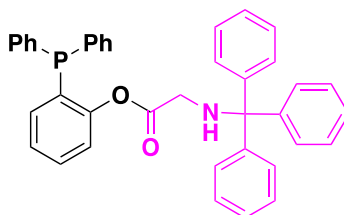
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.28-7.23 (m, 17 H, 5 H^{ArCbz} , 12 H^{ArPhos}), 7.08-7.05 (m, 1 H, H^{ArPhos}), 6.78-6.76 (m, 1 H, H^{ArPhos}), 5.02 (s, 2 H, CH_2^{Cbz}), 3.80-3.79 (m, 2 H, CH_2^{Gly}).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 168.1 (C=O), 156.2 (C=O), 152.3, 136.3, 135.4, 135.3, 134.1 (2C), 133.9 (2C), 130.5, 130.3, 130.2, 129.3 (2C), 128.8 (2C), 128.7 (2C), 128.6 (2C), 128.5, 128.3, 128.2, 126.7, 122.5, 67.21 (CH_2^{Cbz}), 42.71 (CH_2^{Gly}).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = - 15.8.

HRMS (ESI) m/z: $[M + H]^+$ Calcd for $C_{28}H_{25}NO_4P$ 470.15212; found 470.15210.

Compound 44: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl *N*-Trt-Glycine



Chemical Formula: C₃₉H₃₂NO₂P
Molecular Weight: 577,66376

Following the general procedure 1 for the preparation of amino acid-phosphine, compound **44** was obtained (250 mg, 78%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (95/5) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (150 mg, 0.54 mmol) and *N*-Trt-Gly (513 mg, 1.62 mmol) in DCM (5 mL).

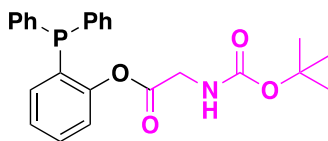
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.54-7.50 (m, 6 H, H^{Ar}), 7.43-7.27 (m, 20 H, H^{Ar}), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1 H, H^{Ar}), 7.11-7.09 (m, 1 H, H^{Ar}), 6.89-6.87 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.16 (s, 2 H, CH₂^{Gly}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 170 (C=O), 152.6, 145.4, 144.1, 135.6, 134.1; 133.9, 133.8, 130.5, 130.4, 130, 129.1, 128.9, 128.8, 128.7, 128.1, 127.9, 126.6, 70.8, 52.1, 46.1.

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = - 16.2

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₃₉H₃₃NO₂P 578.22489; found 578.22489.

Compound 45: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl *N*-Boc-Glycine



Chemical Formula: $C_{25}H_{26}NO_4P$
Molecular Weight: 435,45976

Following the general procedure 1 for the preparation of amino acid-phosphine, compound **45** was obtained (262 mg, 67%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (8/2) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (250 mg, 0.89 mmol) and *N*-Boc-Gly (472 mg, 2.67 mmol) in DCM (10 mL).

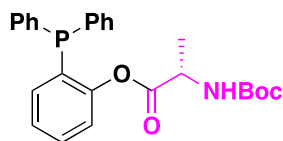
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.40-7.33 (m, 11 H, H^{Ar}), 7.20-7.16 (m, 2 H, H^{Ar}), 6.90-6.88 (m, 1 H, H^{Ar}), 4.70 (bs, 1 H, NH), 3.84 (d, J = 5.0 Hz, 2 H, CH_2^{Gly}), 1.49 (s, 9 H, tBu^{Boc}).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 168.5, 155.6, 152.3, 135.5, 134.1, 134.0, 133.7, 133.5, 130.5, 130.4, 130.2, 129.3, 129.2, 128.8, 128.7, 126.6, 122.6, 80.1 (Cq^{Boc}), 42.4 (CH_2^{Gly}), 28.4 (tBu^{Boc}).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = - 15.7.

HRMS (ESI) m/z : $[M+H]^+$ Calcd for $C_{25}H_{27}NO_4P$ 436.16777; found 436.16634.

Compound 47: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl *N*-Boc-Alanine



Chemical Formula: $C_{26}H_{28}NO_4P$
Molecular Weight: 449,48676

Following the general procedure 1 for the preparation of amino acid-phosphine, compound **47** was obtained (276 mg, 85%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (8/2) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (200 mg, 0.7 mmol) and *N*-Boc-Ala (407 mg, 2.1 mmol) in DCM (10 mL).

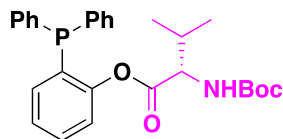
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.28-7.17 (m, 11 H, H^{Ar}), 7.09-7.06 (m, 1 H, H^{Ar}), 7.02 (t, J = 7.5 Hz, 1 H, H^{Ar}), 6.71-6.69 (m, 1 H, H^{Ar}), 4.82 (bs, 1 H, NH), 4.26 (bs, 1 H, H_{α}), 1.35 (s, 9 H, tBu^{Boc}), 1.16 (d, J = 5 Hz, 3 H, CH_3^{Ala}).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 171.2, 152.6, 135.4, 134.0, 133.8, 133.5, 133.3, 131.9, 132.5, 130.0, 129.9, 129.1, 128.9, 128.6, 126.4, 122.2, 121.0, 116.1, 79.8 (Cq^{Boc}), 49.5 (CH_{α}), 28.3 (tBu^{Boc}), 18.1 (CH_3^{Ala}).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = - 16.8.

HRMS (ESI) m/z : $[M]^+$ Calcd for $C_{26}H_{28}NO_4P$ 449.1555; found 449.1744.

Compound 48: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl *N*-Boc-Valine



Chemical Formula: $C_{28}H_{32}NO_4P$
Molecular Weight: 477,54076

Following the general procedure 1 for the preparation of amino acid-phosphine, compound **48** was obtained (329 mg, 96%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (9/1) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (200 mg, 0.7 mmol) and *N*-Boc-Val (390 mg, 2.1 mmol) in DCM (10 mL).

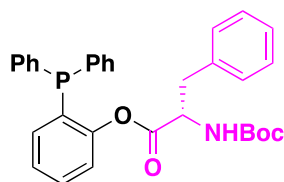
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.39-7.32 (m, 7 H, H^{Ar}), 7.31-7.37 (m, 4 H, H^{Ar}), 7.19-7.17 (m, 1 H, H^{Ar}), 7.14 (t, J = 10 Hz, 1 H, H^{Ar}), 6.83-6.81 (m, 1 H, H^{Ar}), 4.88 (d, J = 10 Hz, 1 H, NH), 4.29-4.27 (m, 1 H, $H\alpha$), 4.18-4.16 (m, 1 H, $H\beta$), 1.46 (s, 9 H, tBu^{Boc}), 0.94 (d, J = 5 Hz, 3 H, CH_3^{Val}), 0.82 (d, J = 5 Hz, 3 H, CH_3^{Val}).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 170.4, 155.8, 153.1, 152.9, 135.9, 135.8, 135.7, 134.2, 134.1, 134.0, 130.3, 130.2, 129.3, 129.2, 128.9, 128.8, 126.5, 122.3, 79.8 (Cq^{Boc}), 58.8 ($C\alpha$), 31.1 ($C\beta$), 28.5 (tBu^{Boc}), 19.4 (CH_3^{Val}), 17.3 (CH_3^{Val}).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = - 17.2.

HRMS (ESI) m/z : $[M]^+$ Calcd for $C_{28}H_{32}NO_4P$ 477.2069; found 477.2057.

Compound 49: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl *N*-Boc-Phenylalanine



Chemical Formula: $C_{32}H_{32}NO_4P$
Molecular Weight: 525,58476

Following the general procedure 1 for the preparation of amino acid-phosphine, compound **49** was obtained (324 mg, 86%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (9/1) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (200 mg, 0.7 mmol) and *N*-Boc-Phe (551 mg, 2.1 mmol) in DCM (10 mL).

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.41-7.31 (m, 11 H, H^{Ar}), 7.30-7.26 (m, 2 H, H^{Ar}), 7.24-7.20 (m, 1 H, H^{Ar}), 7.15-7.12 (m, 4 H, H^{Ar}), 6.84-6.81 (m, 1 H, H^{Ar}), 4.78 (bs, 1 H, NH), 4.52 (bs, 1 H, H_α), 3.14-3.10 (m, 1 H, CH_2^β), 2.80-2.76 (m, 1 H, CH_2^β), 1.39 (s, 9 H, tBu^{Boc}).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 169.8, 155.1, 152.7, 136.6, 135.5, 134.2, 134.0, 133.9, 133.6, 133.4, 130.1, 129.6, 129.2, 129.1, 128.8, 128.6, 127.0, 126.5, 122.2, 121.7, 116.2, 80.0 (Cq^{Boc}), 54.7 (CH_α), 31.9 (CH_2^{Phe}), 28.4 (tBu^{Boc}).

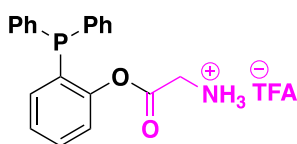
^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = - 16.6.

HRMS (ESI) m/z : $[M]^+$ Calcd for $C_{32}H_{32}NO_4P$ 525.2069; found 525.2051.

General procedure for the deprotection of *N*-Boc amino acid-phosphine

N-Boc amino acid-phosphine (1 eq) was suspended in a 2M TFA solution (11 eq) in DCM and the reaction was stirred 2h at room temperature. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by flash chromatography (DCM/ MeOH 9/1) to yield the corresponding TFA salt.

Compound 46: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl Glycine



Chemical Formula: $C_{22}H_{19}F_3NO_3P$
Molecular Weight: 433,36642

Following the general procedure for the deprotection of *N*-Boc amino acid-phosphine, compound **46** was obtained (43 mg, 30%) as a white foam, after purification by HPLC, starting from compound **45** (147 mg, 0.33 mmol) and TFA (1.69 mL, 3.37 mmol).

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ = 7.49-7.46 (m, 1 H, H^{Ar}), 7.39-7.38 (m, 6 H, H^{Ar}), 7.30-7.24 (m, 6 H, H^{Ar}), 6.91-6.89 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.82 (s, 2 H, CH_2^{Gly}).

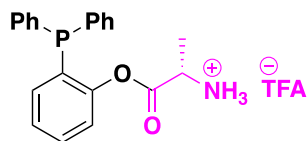
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, MeOD): δ = 167.2, 153.7, 136.7, 135.3, 134.9, 134.7, 132.8, 131.6, 130.4, 130.1, 129.8, 129.6, 128.2, 123.3, 40.9 (CH_2^{Gly}).

$^{31}\text{P NMR}$ (202 MHz, MeOD): δ = - 17.6.

$^{19}\text{F NMR}$ (471 MHz, MeOD): δ = - 76.9.

HRMS (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_2\text{P}$ 336.11479; found 336.11480.

Compound 50: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl Alanine



Chemical Formula: C₂₃H₂₁F₃NO₃P
Molecular Weight: 447,39342

Following the general procedure for the deprotection of *N*-Boc amino acid-phosphine, compound **50** was obtained (212 mg, 78%) as a white foam, after purification by flash chromatography using DCM/MeOH (9/1) as eluent, starting from compound **47** (262 mg, 0.58 mmol) and a 2M TFA solution (3.2 ml, 6.38 mmol).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.27-7.20 (m, 7 H, H^{Ar}), 7.18-7.14 (m, 4 H, H^{Ar}), 7.06-7.01 (m, 2 H, H^{Ar}), 6.71-6.69 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.89-3.82 (m, 1 H, H_α), 1.26 (d, *J* = 5 Hz, 3 H, CH₃^{Ala})

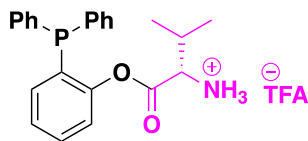
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 168.5, 152.1, 152.0, 135.1, 135.0, 134.9, 134.0, 133.9, 130.4, 130.0, 129.9, 129.4, 128.9, 128.8, 122.1, 49.3 (C_α), 15.3 (CH₃^{Ala})

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = - 17.1.

¹⁹F NMR (471 MHz, CDCl₃): δ = - 75.8.

HRMS (ESI) m/z: [M]⁺ Calcd for C₂₁H₂₀NO₂P 349.1231; found 349.1230.

Compound 51: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl Valine



Chemical Formula: $C_{25}H_{25}F_3NO_3P$
Molecular Weight: 475.44742

Following the general procedure for the deprotection of *N*-Boc amino acid-phosphine, compound **51** was obtained (239 mg, 86%) as a white foam, after purification by flash chromatography using DCM/MeOH (96/4) as eluent, starting from compound **58** (271 mg, 0.56 mmol) and 2M TFA solution (3.1 ml, 6.16 mmol).

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.39-7.32 (m, 7 H, H^{Ar}), 7.29-7.22 (m, 5 H, H^{Ar}), 6.84-6.82 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.86 (bs, 1 H, H_{α}), 2.30-2.27 (m, 1 H, H_{β}), 1.00 (d, J = 5 Hz, 3 H, CH_3^{Val}), 0.92 (d, J = 5 Hz, 3 H, CH_3^{Val}).

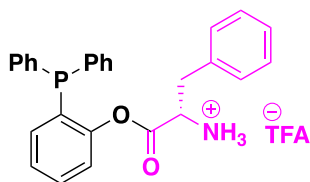
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 167.8, 152.5, 152.4, 135.4, 135.3, 134.2, 134.1, 134.0, 133.9, 133.8, 130.4, 129.7, 129.3, 128.9, 127.0, 122.1, 58.7 (C_{α}), 29.4 (C_{β}), 16.9 (CH_3^{Val}).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = - 17.6.

^{19}F NMR (471 MHz, $CDCl_3$): δ = - 75.6.

HRMS (ESI) m/z: $[M]^+$ Calcd for $C_{23}H_{24}NO_2P$ 377.1545; found 377.1544.

Compound 52: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl Phenylalanine



Chemical Formula: $C_{29}H_{25}F_3NO_3P$
Molecular Weight: 523,49142

Following the general procedure for the deprotection of *N*-Boc amino acid-phosphine, compound **52** was obtained (170 mg, 73%) as a white foam, after purification by flash chromatography using DCM/MeOH (96/4) as eluent, starting from compound **49** (227 mg, 0.43 mmol) and 2M TFA solution (2.37 ml, 4.73 mmol).

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.41-7.32 (m, 11 H, H^{Ar}), 7.31-7.24 (m, 3 H, H^{Ar}), 7.20-7.13 (m, 4 H, H^{Ar}), 6.85-6.83 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.73-3.71 (m, 1 H, H_{α}), 3.11 (dd, J = 5, 10 Hz, 1 H, H_{β}), 2.83-2.78 (m, 1 H, H_{β}).

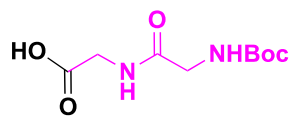
^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 171.0, 159.2, 152.4, 136.0, 135.3, 134.6, 134.4, 134.0, 133.9, 133.6, 133.5, 131.5, 130.2, 129.6, 129.3, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 127.3, 126.6, 122.2, 121.3, 121.0, 115.6, 55.4 (C_{α}), 38.6 (C_{β}).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = - 17.1.

^{19}F NMR (471 MHz, $CDCl_3$): δ = - 75.5.

HRMS (ESI) m/z : $[M]^+$ Calcd for $C_{27}H_{24}NO_2P$ 425.1544; found 425.1551.

Compound 53: GlyGly-N-Boc



Chemical Formula: C₉H₁₆N₂O₅
Molecular Weight: 232,23600

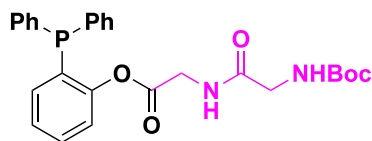
Dipeptide Gly-Gly (1 g, 7.5 mmol) was dissolved in a (2:1) solution of NaOH (1M in 1,4-dioxane) and di-*tert*-butyldicarbonate (1.65 g, 7.5 mmol) was added at 0° C. The reaction was stirred for 16h at room temperature. The aqueous mixture was extracted with Et₂O, the aqueous layer was acidified with HCl 1M until pH 2 and partitioned between EtOAc and brine. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated under reduce pressure to yield compound **53** (1 g, 58%) as a white foam.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 3.95 (m, 2 H, CH₂), 3.76 (s, 2 H, CH₂), 1.46 (s, 9 H, tBu^{Boc})

General procedure 2 for preparation of amino acid-phosphines

To a solution of *N*-Boc di- or tri-peptide (1 equiv) in DCM were successively added EDCI (2 equiv) and HOBT (2 equiv). The mixture was stirred 30 min at room temperature and (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (2 equiv) was added at 0 °C. The reaction mixture was then stirred at room temperature for 16 h. DCM and brine were added and the organic phase was washed 3 times with brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography using cyclohexane/EtOAc as eluent to afford the desired phosphine.

Compound 55: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl GlyGly-N-Boc



Chemical Formula: $C_{27}H_{29}N_2O_5P$
Molecular Weight: 492,51176

Following the general procedure 2 for the preparation of amino acid-phosphine, compound **55** was obtained (260 mg, 50%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (6/4) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (300 mg, 1.0 mmol), EDCI (412 mg, 2.0 mmol), HOBT (290 mg, 2.0 mmol) and *N*-Boc-GlyGly **53** (505 mg, 2.0 mmol) in DCM (10 mL).

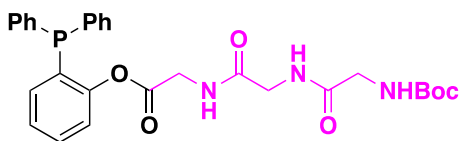
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 7.36-7.11 (m, 13 H, H^{Ar}), 6.80-6.74 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.91-3.87 (m, 2 H, CH_2), 3.71-3.67 (m, 2 H, CH_2), 1.40 (s, 9 H, tBu^{Boc})

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ = 171.5 (C=O), 1697.9 (C=O), 159.2, 156.9 (C=O), 152.8, 136.7, 135.5, 134.4, 133.6, 133.5, 133.4, 133.3, 129.9, 129.8, 128.8, 128.3, 128.2, 127.9, 126.1, 122.2, 119.4, 114.2, 79.3 (Cq^{Boc}), 40.4 (CH_2), 40.3 (CH_2), 27.2 (2 tBu^{Boc}), 24.6(tBu^{Boc})

$^{31}\text{P NMR}$ (202 MHz, CDCl_3): δ = - 19.4

HRMS (ESI) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{P}$ 493.18923; found 493.18743.

Compound 56: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl GlyGlyGly-N-Boc



Chemical Formula: $C_{29}H_{32}N_3O_6P$
Molecular Weight: 549,56376

Following the general procedure 2 for the preparation of amino acid-phosphine, compound **55** was obtained (140 mg, 71%) as a white foam, after purification by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (3/7) as eluent, starting from (2-hydroxyphenyl) diphenylphosphine (100 mg, 0.36 mmol), EDCI (138 mg, 0.72 mmol), HOBt (97 mg, 0.72 mmol) and *N*-Boc-GlyGlyGly **54** (208 mg, 0.72 mmol) in DCM (10 mL).

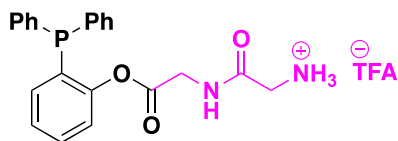
1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.36-7.27 (m, 7 H, H^{Ar}), 7.24-7.21 (m, 4 H, H^{Ar}), 7.14-7.11 (m, 2 H, H^{Ar}), 6.81-6.79 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.89 (s, 2 H, CH_2^{Gly}), 3.86 (s, 2 H, CH_2^{Gly}), 3.71 (s, 2 H, CH_2^{Gly}), 1.41 (s, 9 H, tBu^{Boc}).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 173.0, 122.0, 169.3, 158.3, 155.6, 138.2, 136.9, 136.8, 134.9, 134.7, 134.5, 131.7, 131.6, 131.4, 131.1, 130.2, 129.8, 129.7, 129.6, 129.4, 129.3, 127.5, 123.6, 120.8, 115.9, 80.9 (Cq^{Boc}), 43.1 (CH_2^{Gly}), 41.8 (CH_2^{Gly}), 41.7 (CH_2^{Gly}), 28.7 (tBu^{Boc}).

^{31}P NMR (202 MHz, MeOD): δ = - 17.2.

HRMS (ESI) m/z : $[M + H]^+$ Calcd for $C_{29}H_{33}N_3O_6P$ 550.21070; found 550.20908.

Compound 57: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl GlyGly



Chemical Formula: $C_{24}H_{22}F_3N_2O_4P$
Molecular Weight: 490,41842

Following the general procedure for the deprotection of *N*-Boc amino acid-phosphine, compound **57** was obtained (20 mg, 32%) as a white foam, after purification by HPLC starting from compound **55** (60 mg, 0.12 mmol) and TFA (0.7 ml, 1.32 mmol).

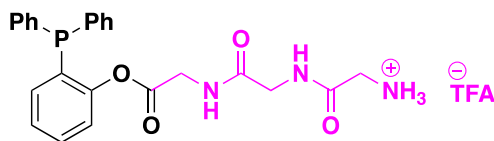
1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.27-7.15 (m, 11 H, H^{Ar}), 7.01-6.96 (m, 2 H, H^{Ar}), 6.74-6.71 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.74 (m, 2 H, CH_2), 3.6 (s, 2 H, CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$): δ = 168.2 (C=O), 167.0 (C=O), 152.4, 135.4, 135.3, 134.1, 133.9, 132.2, 132.1, 130.3, 130.4, 129.3 (2C), 128.9 (2C), 128.8 (2C), 126.7, 122.6, 41.2 (CH_2^{Gly}), 41.6 (CH_2^{Gly}).

^{31}P NMR (202 MHz, $CDCl_3$): δ = -16.2.

HRMS (ESI) m/z : $[M + H]^+$ Calcd for $C_{22}H_{22}N_2O_3P$ 393.13626; found 393.13669.

Compound 58: 2-(diphenylphosphanyl)phenyl GlyGlyGly



Chemical Formula: $C_{26}H_{25}F_3N_3O_5P$
Molecular Weight: 547.47042

Following the general procedure for the deprotection of *N*-Boc amino acid-phosphine, compound **58** was obtained (45 mg, 80%) as a white foam, after purification by HPLC, starting from compound **56** (60 mg, 0.1 mmol) and TFA (0.55 ml, 1.1 mmol).

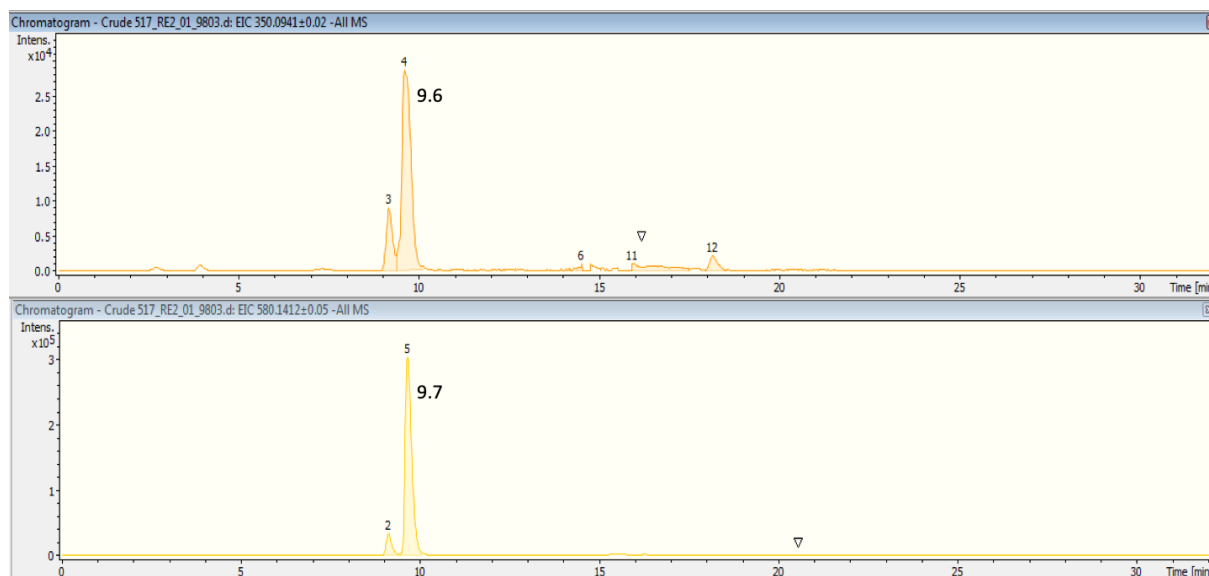
1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 7.44-7.16 (m, 13 H, H^{Ar}), 6.89-6.84 (m, 1 H, H^{Ar}), 3.96 (d, J = 5.25, 2 H; CH_2), 3.74 (s, 2 H, CH_2), 3.26 (s, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 171.6 (C=O), 169.4 (C=O), 168 (C=O), 154, 136.9, 136.8, 135.0 (2C), 134.8 (2C), 131.8, 131.7, 131.3, 130.3 (2C), 129.8 (2C), 129.7 (2C), 127.6, 129.6, 42.9 (CH_2^{Gly}), 41.9 (CH_2^{Gly}), 41.5 (CH_2^{Gly}).

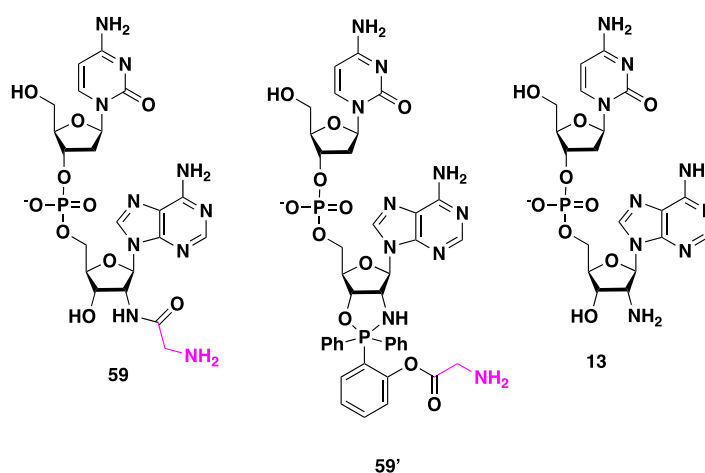
^{31}P NMR (202 MHz, MeOD): δ = - 17.1

HRMS (ESI) m/z : $[M + H]^+$ Calcd for $C_{24}H_{25}N_3O_4P$ 450.15772; found 450.15811.

LCMS analysis for compound 59 and 59' starting from phosphine 46 (conditions B)

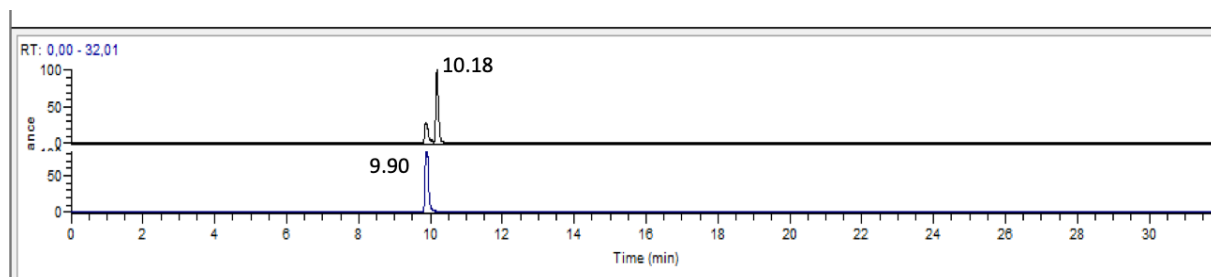


C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2 % to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH₃CN + 0.02% CH₃COOH ; B: H₂O + 0.02% CH₃COOH)

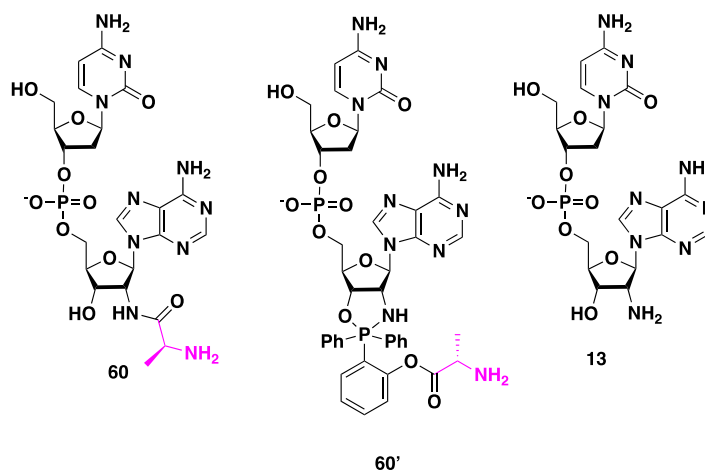


Ret. Time	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺ Calculated	[M+H] ⁺ Found
9.6	507 596	59	12%	611.1733	611.1542
9.7	3 846 738	13	88%	554.15183	554.1345

LCMS analysis for compound 60 and 60' starting from phosphine 50 (conditions B)

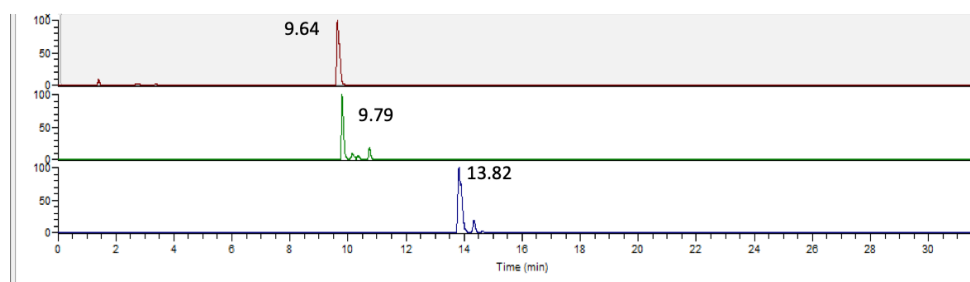


C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2 % to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH₃CN + 0.02% CH₃COOH ; B: H₂O + 0.02% CH₃COOH)

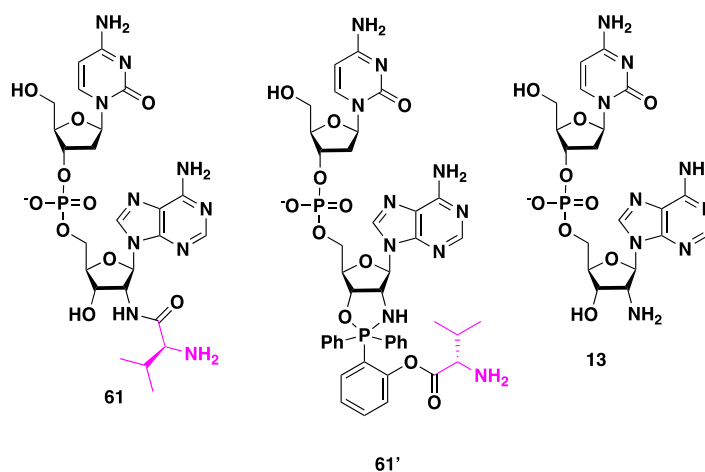


Ret. Time	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	
				Calculated	Found
9.90	2 904 334 173	13	82%	554.15183	554.15228
10.18	657 944 121	60	18%	625.18895	625. 18982

LCMS analysis for compound 61 and 61' starting from phosphine 51 (conditions B)

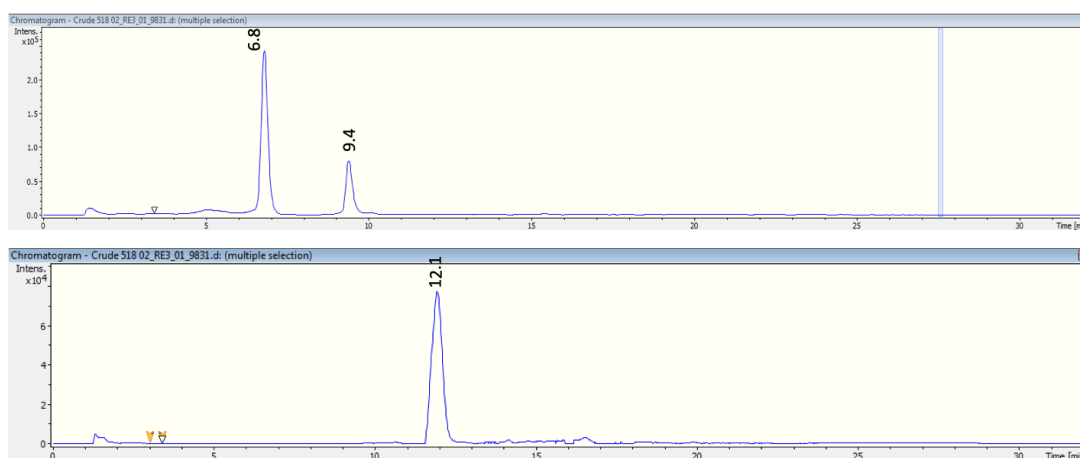


C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2 % to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH₃CN + 0.02% CH₃COOH ; B: H₂O + 0.02% CH₃COOH)

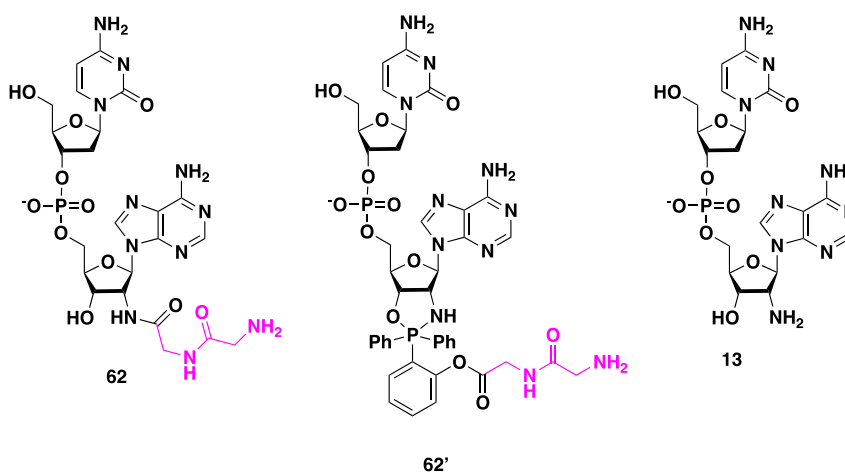


Ret. Time	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺ Calculated	[M+H] ⁺ Found
9.64	3 400 882 381	13	88%	554.15183	554.15262
9.79	140 920 277	61	4%	653.22025	653.22174
13.82	311 221 621	61'	8%	929.29065	929.29285

LCMS analysis for compound 62 and 62' starting from phosphine 55 (conditions B)

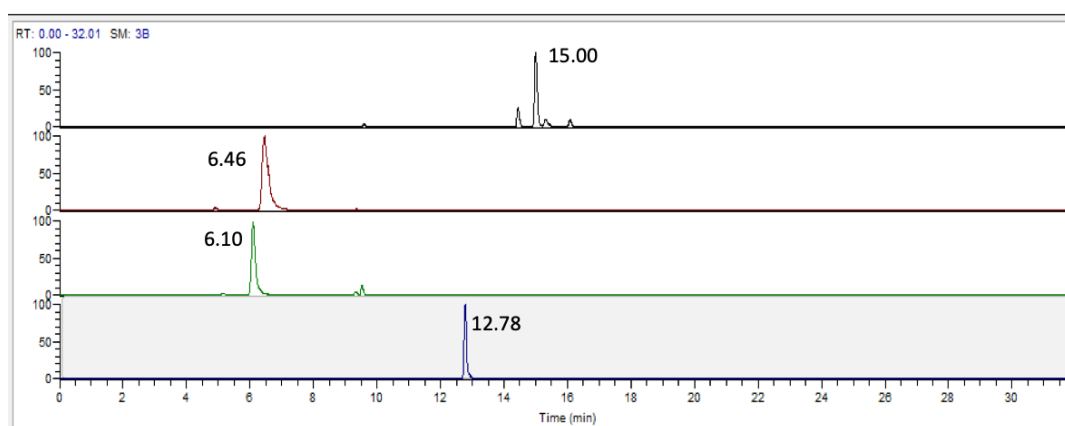


C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2% to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH₃CN + 0.02% CH₃COOH ; B: H₂O + 0.02% CH₃COOH)

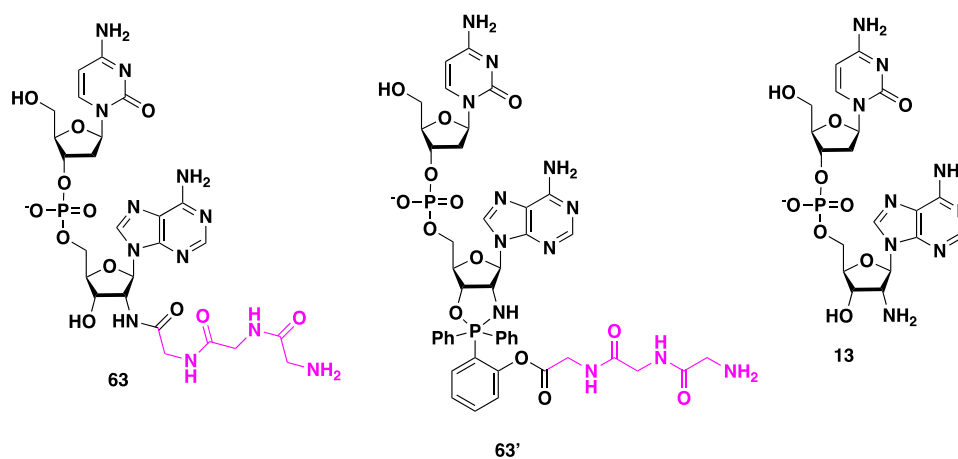


Ret. Time	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺ Calculated	[M+H] ⁺ Found
6.8	3 573 016	13	53%	554.15183	554.1303
9.4	1 245 992	13	19%	554.15183	554.1303
12.2	1 861 416	62'	28%	944.26516	944.2640

LCMS analysis for compound 63 and 63' starting from phosphine 58 (conditions B)

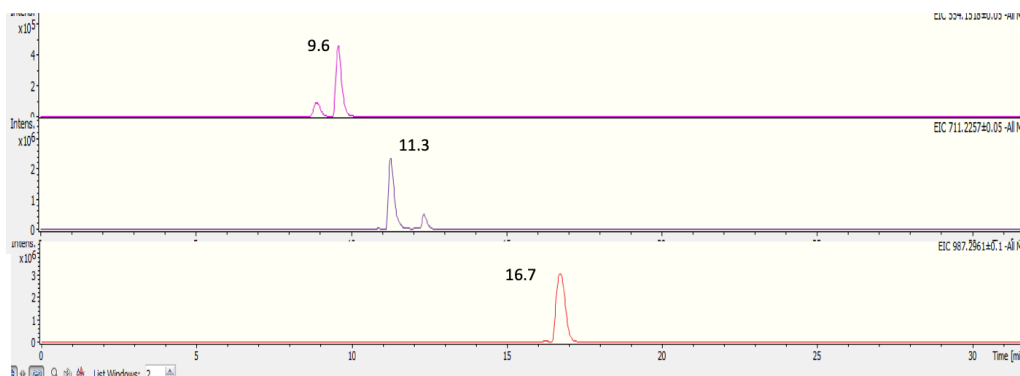


C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2% to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH₃CN + 0.02% CH₃COOH ; B: H₂O + 0.02% CH₃COOH)

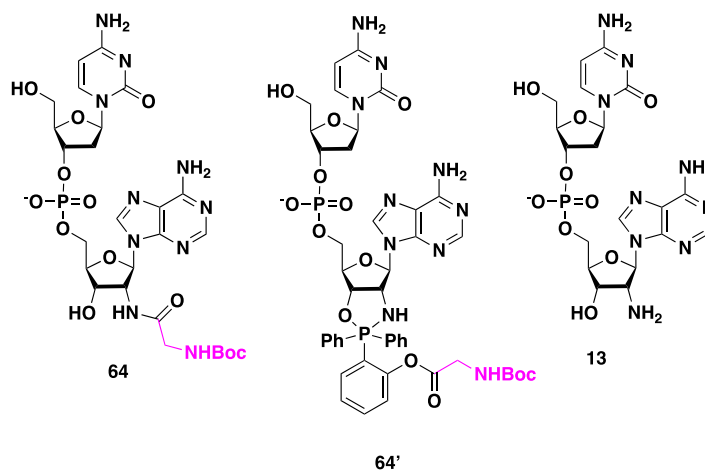


Ret. Time	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
				Calculated	Found
6.10	91 928 922	63	9%	725.21622	725.21820
6.46	372 003 546	13	38%	554.15183	554.15302
12.78	467 923 240	63'	47%	1001.28663	1001.28888
15.00	59 024 316	9	6%	580.14233	580.14246

LCMS analysis for compound 64 and 64' starting from phosphine 45 (conditions B)

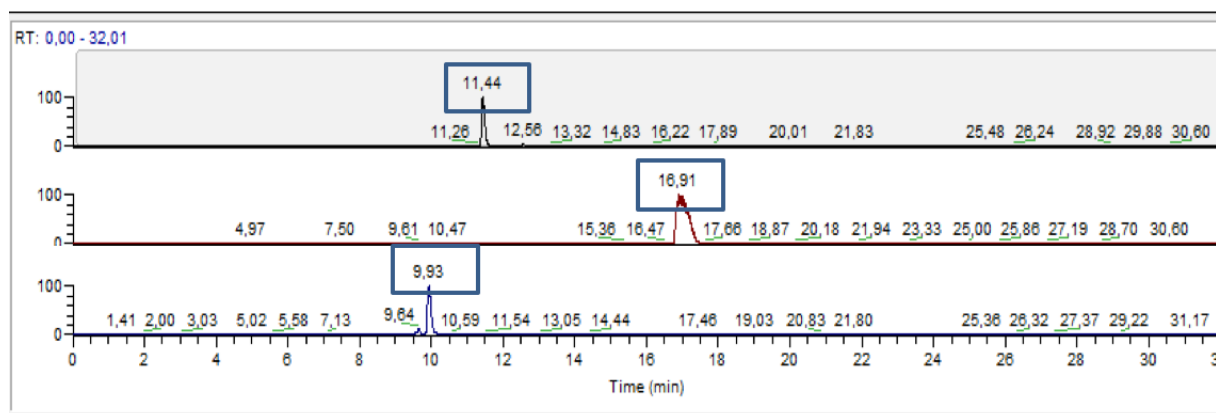


C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2% to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH₃CN + 0.02% CH₃COOH ; B: H₂O + 0.02% CH₃COOH)

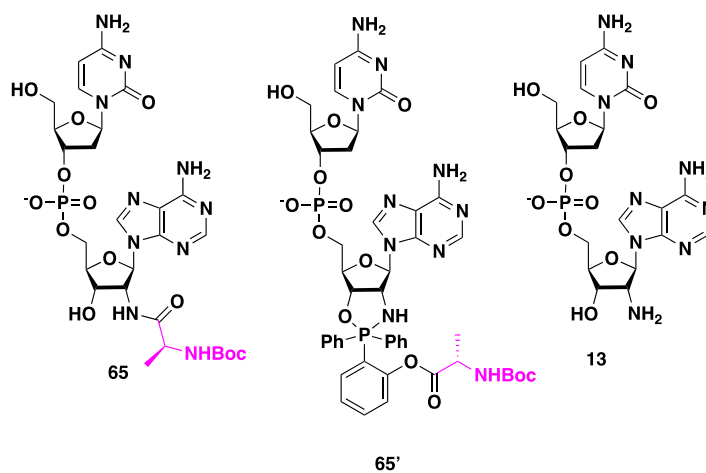


Ret. Time	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
				Calculated	Found
9.6	6 219 472	13	6%	554.15183	554.1272
11.3	28 808 556	64	29%	711.22573	711.1952
16.7	61 953 424	64'	64%	987.29613	987.2558

LCMS analysis for compound 65 and compound 65' starting from phosphine 47 (conditions B)

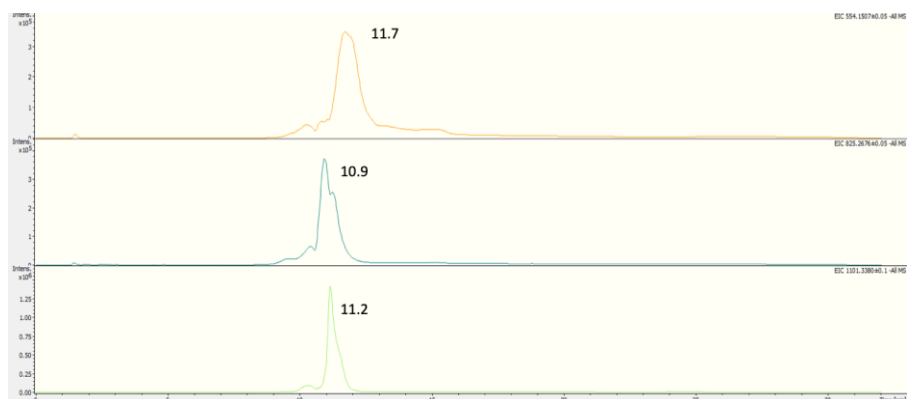


C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2% to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH₃CN + 0.02% CH₃COOH ; B: H₂O + 0.02% CH₃COOH)

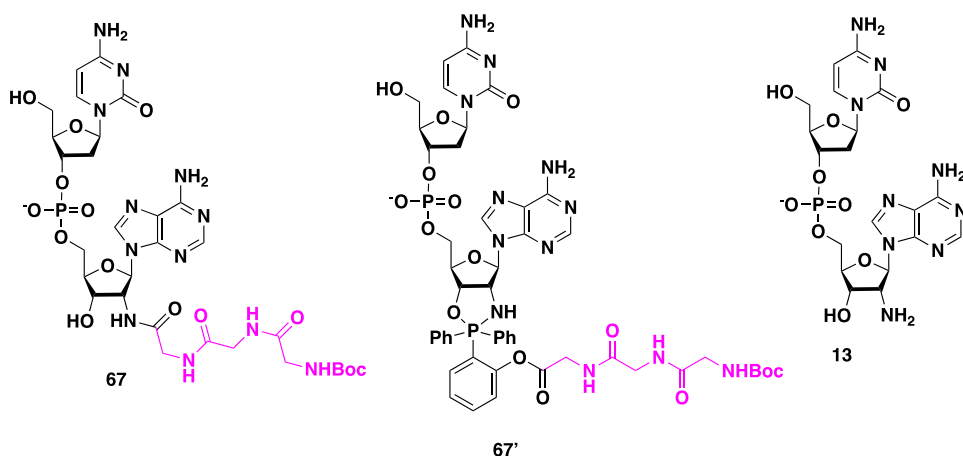


Ret. Time	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺ Calculated	[M+H] ⁺ Found
9.93	5 015 057 197	13	20%	554.15183	554.15247
11.44	9 056 410 435	65	35%	725.24138	725.24237
16.91	11 955 547 432	65'	46%	1001.31178	1001.31293

LCMS analysis for compound 67 and 67' starting from phosphine 57 (conditions B)

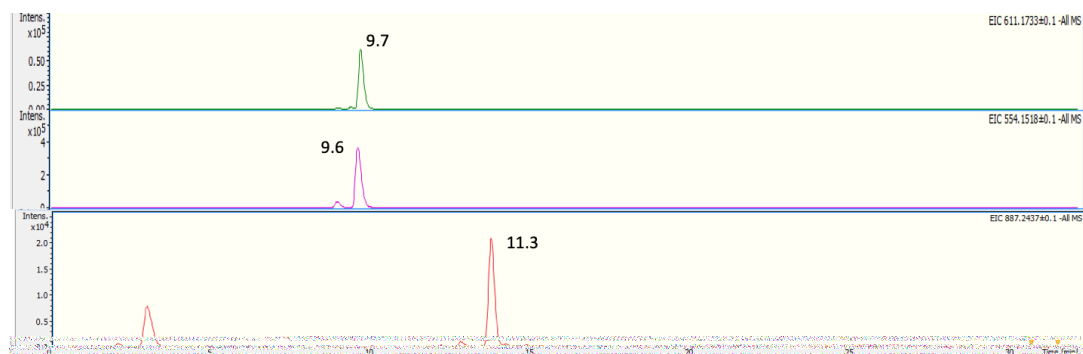


C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2% to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH₃CN + 0.02% CH₃COOH ; B: H₂O + 0.02% CH₃COOH)

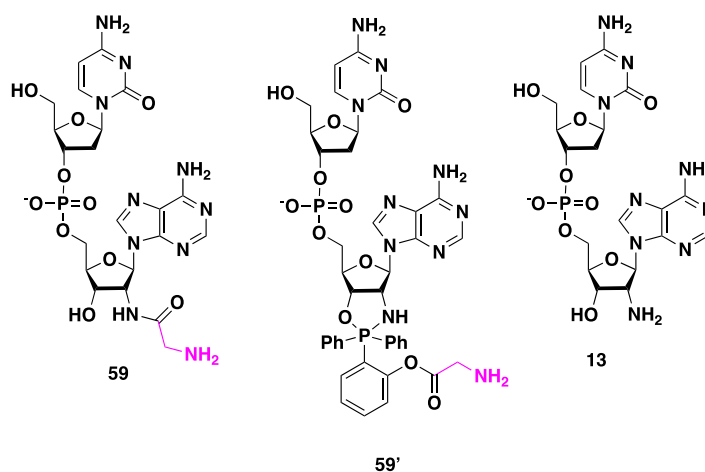


Ret. Time	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺ Calculated	[M+H] ⁺ Found
10.9	14 531 500	67	21%	825.26865	825.26756
11.2	33 831 800	67'	48%	1101.33906	1101.3380
11.7	22 078 848	13	31%	554.15183	554.15073

LCMS analysis for compound 59 and 59' starting from phosphine 45 (conditions B)

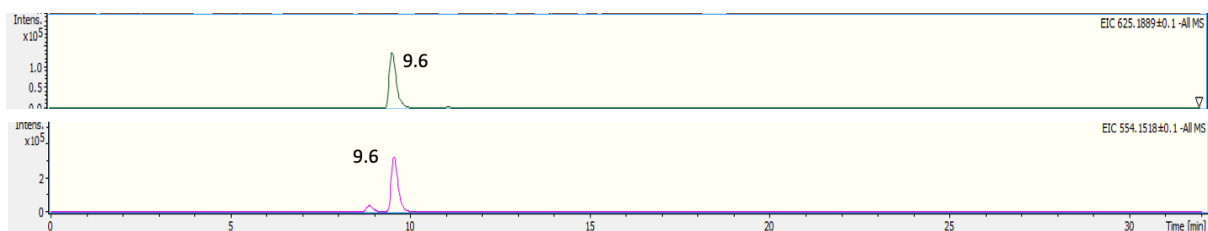


C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2% to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH₃CN + 0.02% CH₃COOH ; B: H₂O + 0.02% CH₃COOH)

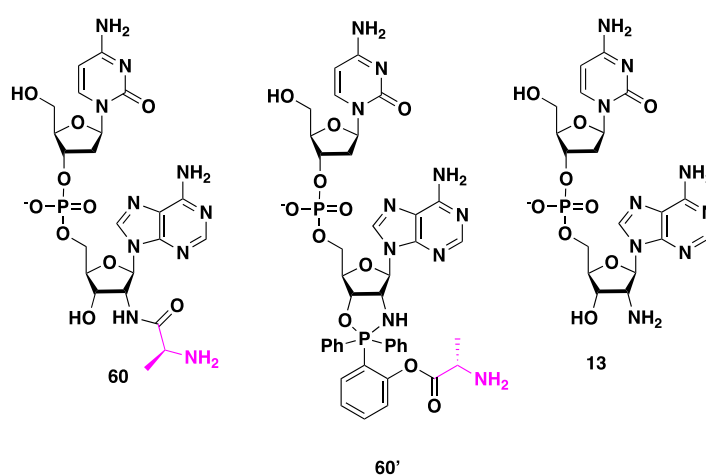


Ret. Time	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
				Calculated	Found
9.6	4 407 206	13	83%	554.15128	554.1297
9.7	659 037	59	13%	611.17275	611.1486
11.3	224 178	59'	4%	887.24370	887.2092

LCMS analysis for compound 60 and 60' starting from phosphine 47 (conditions B)

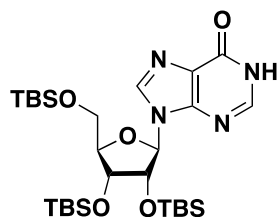


C18 Hypersil GOLD aQ (Thermoscientific), 100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m. Flow: 0.2 mL/min; gradient: 2% A during 5 min, from 2% to 70% A in 15 min, final equilibration with 2% A during 10 min (A: CH_3CN + 0.02% CH_3COOH ; B: H_2O + 0.02% CH_3COOH)



Ret. Time ^a	Area	Attribution	Yield	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺
				Calculated	Found
9.6	3 953 992	13	70%	554,15183	554.1272
9.6	1 726 125	60	30%	625,18895	625.1609

Compound 68 : 3'-5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl) inosine¹⁶⁶



Chemical Formula: C₂₈H₅₄N₄O₅Si₃
Molecular Weight: 611,01800

To a solution of inosine (1.0 g, 3.7 mmol, 1 eq) and imidazole (2.03 g, 29.8 mmol, 8 eq) in DMF (11 mL) was added TBDMSCl (2.25 g, 14.9 mmol, 4 eq) at 0 °C. The reaction mixture was then stirred at 50 °C for 16 h. The residue was partitioned between ethyl acetate and brine. The organic phase was washed 5 times with brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc 5:5) to provide the desired compound **68** as a white foam (1.96 g, 87%).

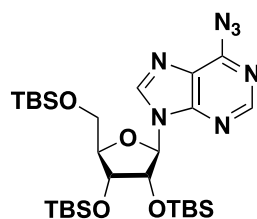
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 12.92 (bs, 1 H, NH), 8.23 (s, 1 H, H8), 8.10 (s, 1 H, H2), 6.02 (d, *J* = 4.9 Hz, 1 H, H1'), 4.53-4.51 (m, 1 H, H2'), 4.31-4.30 (m, 1 H, H3'), 4.14 (s, 1 H, H4'), 4.01-3.98 (m, 1 H, H5'), 3.81-3.79 (m, 1 H, H5'), 0.96 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.93 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.81 (s, 9 H, *t*Bu^{TBS}), 0.15-0.14 (m, 6 H, Me^{TBS}), 0.11-0.10 (m, 6 H, Me^{TBS}), -0.02 (s, 3 H, Me^{TBS}), -0.18 (s, 3 H, Me^{TBS}).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 159.4 (Cq), 149.0 (Cq), 144.6 (C2), 139.2 (C8), 125.2 (Cq), 88.4 (C1'), 85.6 (C4'), 76.7 (C2'), 71.9 (C3'), 62.6 (C5'), 26.2 (3C, *t*Bu^{TBS}), 26.0 (3C, *t*Bu^{TBS}), 25.8 (3C, *t*Bu^{TBS}), 18.7 (Cq^{TBS}), 18.2 (Cq^{TBS}), 18.0 (Cq^{TBS}), -4.2 (Me^{TBS}), -4.5 (Me^{TBS}), -4.5 (Me^{TBS}), -4.8 (Me^{TBS}), -5.2 (2C, 2 Me^{TBS}).

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₈H₅₅N₄O₅Si₃ 611.3480; found: 611.3482.

¹⁶⁶ Gadakh, B., Vondenhoff, G., Lescrinier, E., Rozenski, J., Froeyen, M., Van Aerschot, A. *Bioorg Med Chem* **2014**, *22*, 2875-2886.

Compound 69: 3'-5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl) N6-azido adenosine¹⁶⁷



Chemical Formula: $C_{28}H_{53}N_7O_4Si_3$
Molecular Weight: 636,03200

To solution of **68** (300 mg, 0.49 mmol) in anhydrous DMSO (5ml) were added BOP (581.6 mg, 1.47 mmol), DIPEA (256 μ mol, 1.47 mmol) and NaN_3 (191.52 mg, 2.94 mmol). The reaction mixture was then stirred at 40 °C for 3 h30. The residue was partitioned between ethyl acetate and brine. The organic layer was dried over $MgSO_4$, filtered and concentrated. The residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc 8:2) to provide the desired compound **69** as a white foam (67 mg, 21%).

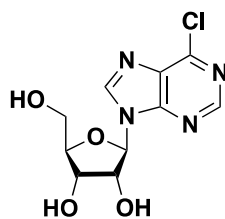
¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 10.19 (s, 1 H, H2), 8.88 (s, 1 H, H8), 6.18 (d, J = 5.5 Hz, 1 H, H1'), 4.79 (t, J = 5.0 Hz, 1 H, H2'), 4.37 (m, 1 H, H3'), 4.10-4.07 (m, 1 H, H4'), 4.02 (dd, J = 5.6, 11.0 Hz, 1 H, H5') 3.80 (dd, J = 3.0, 11 Hz, 1 H, H5'), 0.93 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.91 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.74 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.14 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.11(s, 9 H, Me^{TBS}), 0.05 (s, 3 H, Me^{TBS}), 0.27(s, 3 H, Me^{TBS})

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ = 145.3, 142.5, 141.8, 136.2, 120.3, 87.8, 85.3, 75.2, 71.6, 62.1, 25.8, 25.7, 25.4, 18.0, 17.7, 17.4, -4.6, -4.9, -5.4, -5.5, -5.6.

HRMS (ESI) m/z: $[M + Na]^+$ Calcd for $C_{28}H_{53}N_7O_4Si_3Na$ 658.3359; found 658.3340.

¹⁶⁷ Lakshman, M. K., Snigh, M. K., Parrish, D., Balachandran, R., Day, B. W. *J. Org. Chem*, **2010**, 75, 2461-2473.

Compound 70: N6-chloro adenosine.¹⁶⁸



Chemical Formula: C₁₀H₁₁ClN₄O₄
Molecular Weight: 286,67200

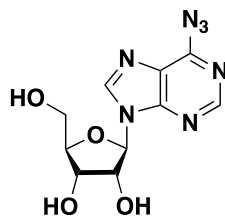
A mixture of inosine (3 g, 11.2 mmol) and trifluoroacetic anhydride (17.8 mL) in DCM (30 mL) was stirred at rt for 16 h and then concentrated under vacuum. The residue was dissolved in DCM (150 mL) and cooled to 0 °C. To this solution was added over 10 min a premixed solution of DMF (2.4 mL) and thionyl chloride (4.5 mL) and the resulting suspension was refluxed for 16 h. This solution was concentrated and washed with saturated NaHCO₃. The aqueous phase was extracted with DCM and the combined organic phases were dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The resulting yellow oil was dissolved in MeOH (16 mL), and the mixture was refluxed for 16 h. Diethyl ether (30 mL) was added at 0 °C, and the resulting precipitate was filtered and dried under vacuum to afford **70** over 3 steps (1.98 g, 62 %).

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 8.97 (s, 1 H, H2 or H8), 8.84 (s, 1 H, H2 or H8), 6.06 (d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, 1H'), 5.59 (d, *J* = 5.9 Hz, 1 H, H2'), 5.28 (d, *J* = 5.1 Hz, 1 H, H3'), 5.12 (t, *J* = 5.9 Hz, 1 H, H4'), 4.58 (m, 1 H, OH), 4.21 (m, 1 H, OH), 4.10 (m, 1 H, OH), 3.5-3.8 (m, 2 H, H5').

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ = 151.9, 151.8, 149.5, 145.9, 88.3, 85.8, 74.1, 70.3, 61.2.

¹⁶⁸ Zhao, H., Pagano, A. R., Wang, W., Shallop, A., Gaffney, B. L., Jones, R. A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7832-7835.

Compound 71: N6-azido adenosine¹⁶⁹



Chemical Formula: C₁₀H₁₁N₇O₄
Molecular Weight: 293,24300

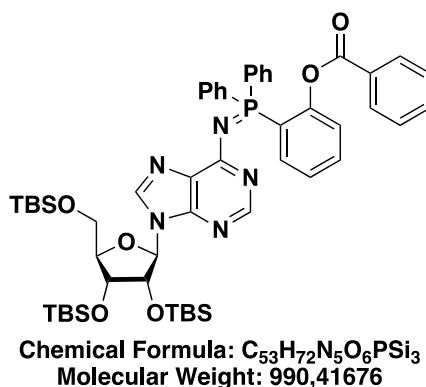
NaN₃ (357 mg, 5.2 mmol) was added to a solution of compound **70** (500 mg, 1.75 mmol) in 10 mL of DMF and the reaction mixture was heated at 60 °C for 16 h. The solution was cooled and concentrated to dryness. The resulting product was crystallized from water-methanol giving **71** as a white solid (377 mg, 72%).

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ = 10.15 (s, 1 H, H₂), 6.15 (d, *J* = 4.86 Hz, 1 H, H1'), 5.62 (d, *J* = 5.9, 1 H, OH), 5.29 (d, *J* = 5,25 Hz, 1 H, OH), 5.10 (t, *J* = 5.4 Hz, 1 H, OH), 4.60-4.57 (m, 1 H, H2'), 4.24-4.21 (m, 1 H, H3'), 4.04-4.02 (m, 1 H, H4'), 3.76-3.72 (m, 1 H, H5'), 3.64-3.60 (m, 1 H, H5').

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ = 145.4, 142.6, 136.1, 120.2, 88.3, 85.7, 74.5, 70.0, 60.9.

¹⁶⁹ Friden, M., Aviñó, A., Eritja, R. *Nucleosides Nucleotides Nucleic acids*. **2003**, 2, 193-209.

Compound 72: 3'-5'-Bis-O-(tert-butyldimethylsilyl) N6-iminophosphorane-phenyl ester adenosine



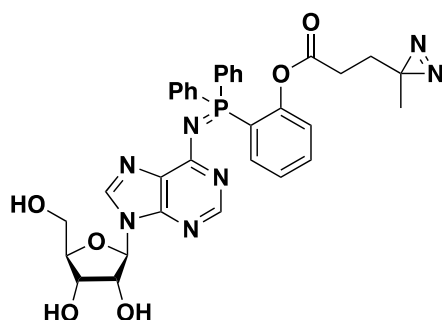
To a solution of compound **69** (20 mg, 0.031 mmol) in DMF/H₂O (9/1, 1 mL) was added the phosphine **10b** (24 mg, 0.062 mmol) and the mixture was stirred 18 h at 40 °C. Water was added and the solution was lyophilized. The residue was purified by silica gel chromatography (cyclohexane/EtOAc 8:2) to provide the desired compound **72** as a white foam (21 mg, 90%).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.93 (s, 1 H, H2 or H8), 7.89 (s, 1 H, H2 or H8), 7.82 (s, 4 H, H^{Ar}), 7.56-7.55 (m, 3H, H^{Ar}), 7.38-7.35 (m, 1 H, H^{Ar}), 7.30-7.28 (m, 3 H, H^{Ar}), 7.20-7.16 (m, 8 H, H^{Ar}), 5.85 (s, 1 H, H1'), 4.65 (s, 1 H, H2'), 4.26 (s, 1 H, H3'), 3.99 (s, 1H, H4'), 3.95-3.95 (m, 1 H, H5'), 3.66 (d, *J* = 10.9 Hz, 1 H, H5'), 0.83 (s, 18 H, tBu^{TBS}), 0.66 (s, 9 H, tBu^{TBS}), 0.00 (s, 12 H, Me^{TBS}), - 0.18 (s, 3 H, Me^{TBS}), - 0.35 (s, 3 H, Me^{TBS}).

³¹P NMR (202 MHz, CDCl₃): δ = 14.0.

MS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₅₃H₇₃N₅O₆PSi₃ 990;45 found 990.60.

Compound 74: 3'-5'-Bis-O-(tert-butylidimethylsilyl) N6-iminophosphorane-diazirine ester adenosine



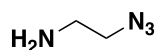
Chemical Formula: C₃₃H₃₂N₇O₆P
Molecular Weight: 653,63576

To a solution of compound **71** (30 mg, 0.10 mmol) in DMF/H₂O (9/1, 1mL) was added the phosphine **10d** (79 mg, 0.20 mmol) and the mixture was stirred 18 h at 40 °C. Water was added and the solution was lyophilized. The residue was purified by HPLC. The appropriate fractions were collected and lyophilized, to give compound **74** (8 mg, 8%).

HPLC retention time : 23.6 min

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.24 (s, 1 H, H2 or H8), 7.87 (s, 1 H, H2 or H8), 7.72-7.40 (m, 13 H, H^{Ar}), 7.26-7.24 (m, 1 H, H^{Ar}), 5.23 (d, *J* = 6.5 Hz, 1 H, H1'), 4.57 (t, *J* = 5.2 Hz, 1 H, H2'), 4.32-4.30 (m, 1 H, H3'), 4.16-4.15 (m, 1 H, H4'), 3.87 (dd, *J* = 2.2, 12.5 Hz, 1 H, H5'), 3.72 (dd, *J* = 2.4, 12.5 Hz, 1 H, H5'), 1.86 (t, *J* = 6.6 Hz, 2 H, CH₂), 1.26 (t, *J* = 7.7 Hz, 2 H, CH₂), 0.86 (s, 3 H, Me).

Compound 75: 2-azidoethan-1-amine¹⁷⁰



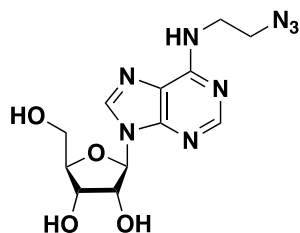
Chemical Formula: C₂H₆N₄
Molecular Weight: 86,09800

Sodium azide (1.8 g, 27.7 mmol) was added to a solution of 2-bromoethylamine. HBr (2.5 g, 12.2 mmol), in H₂O (30 mL) and the reaction mixture was heated at 80 °C for 24h. After cooling at room temperature, sodium hydroxide (488 mg, 12.2 mmol) was added and stirring was maintained for 30 min. The aqueous layer was then extracted with DCM. The combined organic layers were combined and dried over MgSO₄, filtered and concentrated to afford compound **75** (798 mg, 76%).

¹H NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 3.37 (t, *J* = 5.6 Hz, 2 H, CH₂), 2.89 (d, *J* = 5.6 Hz, 2 H, CH₂).

¹⁷⁰ Angelos, S., Yang, Y.-W., Patel, K., Stoddart, J. F., Zink, J. I. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47*, 2222–2226

Compound 76: N6-2-azidoethane adenosine



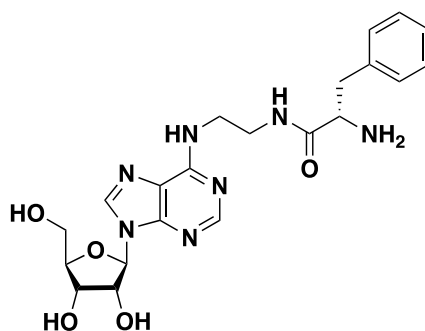
Chemical Formula: $C_{12}H_{16}N_8O_4$
Molecular Weight: 336,31200

BOP (791 mg, 1.8 mmol), DIPEA (389 μ L, 2.2 mmol) and compound **75** (154 mg, 1.8 mmol) were added at 0 °C to a solution of inosine (400 mg, 1.5 mmol) in DMF (5 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. Water was added and the solution was lyophilized. The residue was purified by silica gel chromatography (DCM/MeOH 96:4) to provide the desired compound **76** as a white foam (470 mg, 94%).

^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.26 (s, 2 H, H2 and H8), 5.96 (d, J = 5 Hz, 1 H, H1'), 4.76-4.74 (m, 1 H, H2'), 4.34-4.32 (m, 1 H, H3'), 4.17 (s, 1 H, H4'), 3.90-3.87 (m, 1 H, H_a5'), 3.80 (bs, 2 H, CH₂), 3.76-3.73 (m, 1 H, H_b5'), 3.59-3.57 (m, 2 H, CH₂).

HRMS (ESI) m/z: $[\text{M} + \text{H}]^+$ Calcd for $C_{12}H_{17}N_8O_4$ 337.13728; found 337.13592.

Compound 77 : N6-Phe adenosine



Chemical Formula: $C_{21}H_{27}N_7O_5$
Molecular Weight: 457,49100

To a solution of compound **76** (38 mg, 0.11 mmol) in DMF/H₂O or THF/H₂O (9/1, 3 mL) was added the phosphine **52** (122 mg, 0.22 mmol) and the mixture was stirred 16 h at 40 °C. After lyophilization, the residue was purified by HPLC. The appropriate fractions were collected and lyophilized, to give compound **77** (4 mg, 8% in DMF and 3.5 mg, 7% in THF).

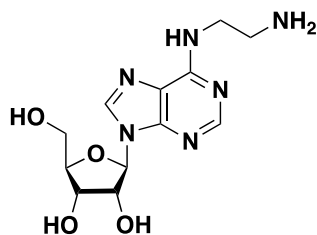
HPLC retention time : 14.9 min

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.20-8.08 (m, 2 H, H2 and H8); 7.28-7.27 (m, 5 H, H^A), 5.86 (d, J = 6.4 Hz, 1 H, H1'), 4.69-4.62 (m, 1 H, H2'), 4.23-4.21 (m, 1 H, H3'), 4.07-4.06 (m, 1 H, H4'), 3.98-3.95 (m, 1 H, CH), 3.80-3.77 (m, 1 H, H_a5'), 3.70-3.63 (m, 5 H, H_b5' and CH₂), 3.17-3.11 (m, 1 H, CH₂), 2.97-2.88 (m, 1 H, CH₂).

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 153.4, 141.6, 130.5, 130.4, 130.4, 130.3, 129.9, 128.4, 91.2, 88.2, 75.4, 72.7, 63.5, 63.4, 61.8, 57.5, 44.1, 39.0, 38.2.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₂₁H₂₈N₇O₅ 458.2152; found 458.21454.

Compound 78 : N6-amino ethyl adenosine



Chemical Formula: C₁₂H₁₈N₆O₄
Molecular Weight: 310,31400

Compound **78** (5.2 mg, 15%) was isolated during the synthesis of compound **77**.

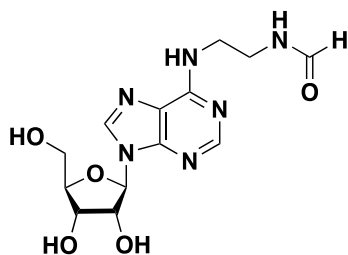
HPLC retention time : 6.7 min

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.67 (s, 1 H, H2 or H8), 8.60 (s, 1 H, H2 or H8), 6.11 (d, *J* = 5.2 Hz, 1 H, H1'), 4.79-4.74 (m, 2 H, CH₂), 4.60 (t, *J* = 5.1 Hz, 1 H, H2'), 4.34 (t, *J* = 4.8 Hz, 1 H, H3'), 4.22-4.14 (m, 3 H, CH₂ and H4'), 3.9-3.8 (m, 2 H, H5').

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 153.1, 150.7, 145.5, 144.5, 118.5, 90.6, 87.6, 76.6, 71.9, 62.6, 46.5, 46.2.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₁₂H₁₉N₆O₄ 311.1468; found 311.1458.

Compound 79 : N6-formamide adenosine



Chemical Formula: C₁₃H₁₈N₆O₅
Molecular Weight: 338,32400

Compound **79** (1.8 mg, 6%) was isolated during the synthesis of compound **77**.

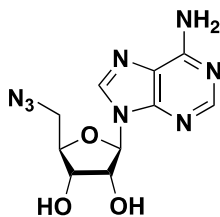
HPLC retention time : 13.1 min

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.29-8.26 (m, 2 H, H2 or H8 and H^{formamide}), 8.15-8.12 (m, 1 H, H2 or H8), 6.00 (d, *J* = 6.4 Hz, 1 H, H1'), 4.81-4.78 (m, 1 H, H2'), 4.45-4.43 (t, *J* = 5.3 Hz, 2 H, CH₂), 4.32-4.35 (m, 1 H, H3'), 4.21-4.19 (m, 1 H H4'), 3.95-3.90 (m, 2 H, CH₂), 3.81-3.76 (m, 2 H, H5').

¹³C NMR (126 MHz, MeOD): δ = 162.8, 153.4, 141.7, 130.5, 130.3, 128.9, 127.9, 91.3, 88.2, 74.5, 72.7, 63.5.

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ Calcd for C₁₃H₁₉N₆O₅ 339.1417; found 339.1428.

Compound 81: 5'-azido adenosine



Chemical Formula: $C_{10}H_{12}N_8O_3$
Molecular Weight: 292,25900

Pyridine (610 μ L, 7.48 mmol) and thionyl chloride (1.4 mL, 18.7 mmol) were added at 0 °C, over 5 min to a solution of adenosine (1 g, 3.74 mmol) in MeCN (10 mL). The reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 h before being warmed to room temperature and stirred for 16 h. The resulting precipitate was filtered and dissolved in water/MeOH (5:1) and aqueous ammonia (25%, 2 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min and the solvent was removed under reduced pressure to provide 5'-chloroadenosine **80**.¹⁷¹ The resulting 5'-chloroadenosine was then solubilized in DMF (5 mL) and sodium azide (1.2 g, 18.7 mmol) was added. The reaction mixture was heated at 80 °C for 16 h, and cooled to room temperature. The excess of sodium azide was removed by filtration and the filtrate purified by flash chromatography (DCM/MeOH 9:1) to give **81**.¹⁷² as a white foam (393 mg, 36% over 2 steps).

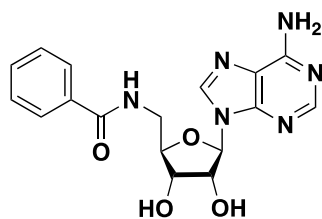
¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 8.29 (s, 1 H, H8), 8.21 (s, 1 H, H2), 6.03 (s, 1 H, H1'), 4.80-4.78 (m, 1 H, H2'), 4.40-4.36 (m, 1 H, H4'), 4.27 (q, J = 5 Hz, 0.5 H, H3'), 4.18 (q, J = 5 Hz, 0.5 H, H3'), 3.94 (dd, J = 10, 5 Hz, 0.5 H, H5'), 3.84 (dd, J = 10, 5 Hz, 0.5 H, H5'), 3.69-3.62 (m, 1 H, H5').

HRMS (ESI) m/z: [M + H]⁺ calcd for C₁₀H₁₃N₈O₃: 293.1110; found: 293.1098.

¹⁷¹ Sadler, J.C., Humphreys, L.D., Snajdrova, R., Burley, G.A. *ChemBioChem* **2017**, *18*, 992-995.

¹⁷² Ciuffreda, P., Loseto, A., Alessandrini, L., Terraneo, G., Santaniello, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4748-4751.

Compound 82 : 5'-benzoylamino adenosine



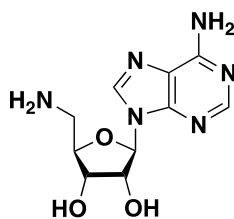
Chemical Formula: $C_{17}H_{18}N_6O_4$
Molecular Weight: 370,36900

To a solution of compound **81** (10 mg, 0.034 mmol) in DMF/H₂O (9/1, 2 mL) was added the phosphine **10b** (26 mg, 0.62 mmol) and the mixture was stirred 16 h at 40°C. Water was added and the mixture was lyophilized. The residue was purified by HPLC purification and the appropriate fractions were collected and lyophilized, to give compound **82** (2.5 mg, 20%).

HPLC retention time : 14.9 min.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 8.25 (s, 1 H, H2 or H8), 7.90 (s, 1 H, H2 or H8), 7.81-7.79 (m, 2 H, H^A), 7.56-7.53 (m, 1 H, H^A), 7.47-7.44 (m, 2 H, H^A), 5.95 (d, J = 7.5 Hz, 1 H, H1'), 4.38-4.36 (m, 1 H, H2'), signal of H3'^{Cyt} masked in the residual peak of water, 4.30-4.28 (m, 1 H, H4'), 3.94 (dd, J = 4.8, 14.2 Hz, 1 H, H_a5'), 3.64 (dd, J = 4.8, 14.2 Hz, 1 H, H_b5').

Compound 83 : 5'-amino adenosine



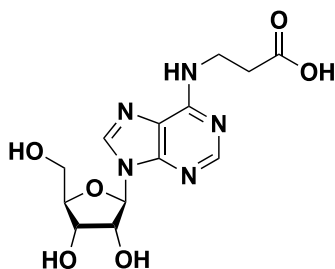
Chemical Formula: C₁₀H₁₄N₆O₃
Molecular Weight: 266,26100

Compound **83** (1 mg, 8%) was isolated during the synthesis of compound **82**.

HPLC retention time : 13.7 min.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ = 8.28 (s, 1 H, H2 or H8), 8.21 (s, 1 H H2 or H8), 6.04 (d, *J* = 5.0 Hz, 1 H, H1'), 4.79 (t, *J* = 5.2 Hz, 1 H, H2'), 4.39 (t, *J* = 4.6 Hz, 1 H, H3') 4.28-4.25 (m, 1 H, H4'), 3.95 (dd, *J* = 5.0, 11.9 Hz, 1 H, H_a5') 3.83 (dd, *J* = 4.9, 11, 9 Hz, 1 H, H_b5').

Compound 84: N6-propionic acid adenosine



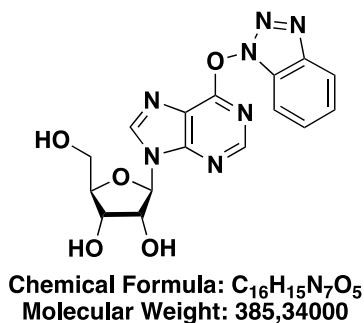
Chemical Formula: C₁₃H₁₇N₅O₆
Molecular Weight: 339,30800

BOP (138 mg, 0.31 mmol), DIPEA (68 μ L, 39 mmol) and β -Ala (28 mg, 0.31 mmol) were added at 0 °C to a solution of inosine (70 mg, 0.26 mmol) in DMF (1 mL) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h. Water was added and the solution was lyophilized. The residue was purified by HPLC to provide the desired compound **84** as a white foam (9 mg, 10%).

HPLC retention time : 10.8 min

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.19 (s, 1 H, H2 or H8), 8.18 (s, 1 H, H2 or H8), 5.94 (d, J = 5 Hz, 1 H, H1'), 4.75-4.73 (m, 1 H, H2'), 4.33-4.31 (m, 1 H, H3'), 4.17-4.16 (m, 1 H, H4'), 3.90-3.87 (m, 1 H, H_a5'), 3.76-3.70 (m, 3 H, H_b5' and CH₂), 3.32-3.20 (m, 2 H, CH₂).

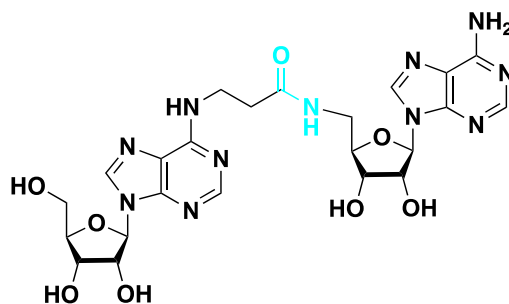
Compound 85: activated inosine with benzotriazolyl



Compound **85** (90 mg, 90%) was isolated during the synthesis of compound **84**.

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ = 8.85 (s, 1 H, H2 or H8), 8.43 (s, 1 H, H2 or H8), 8.12-8.10 (m, 1 H, H^{OBt}), 7.64-7.63 (m, 2 H, H^{OBt}), 7.56-7.54 (m, 1 H, H^{OBt}), 6.19 (d, *J* = 5 Hz, 1 H, H1'), 4.75-4.74 (m, 1 H, H2'), 4.40-4.38 (m, 1 H, H3'), 4.19-4.17 (m, 1 H, H4'), 3.92-3.89 (m, 1 H, H_a5'), 3.81-3.78 (m, 1 H, H_b5').

Compound 86: SAM-adenosine conjugate with amide link



Chemical Formula: $C_{23}H_{29}N_{11}O_8$
Molecular Weight: 587,55400

Compound **81** (4.13 mg, 0.014 mmol) was dissolved in toluene (1 mL) and $PhSiH_3$ (1.4 μ L, 0.012 mmol), PPh_3 (0.3 mg, 0.0012 mmol) and compound **84** (4 mg, 0.012 mmol) were added to the solution. The reaction mixture was stirred at 80 °C for 24 h. After concentration, the residue was purified by HPLC to afford the desired compound **86** as a white foam (1.2 mg, 17%).

HPLC retention time : 13.7 min

1H NMR (500 MHz, CD_3OD): δ = 8.18 (s, 1 H, H2 or H8), 8.12 (s, 1H, H2 or H8), 8.08 (d, J = 5.1 Hz, 2 H, H2 or H8), 5.93 (t, J = 5.0 Hz, 1 H, H1' or H1''), 5.85 (d, J = 6.4 Hz, 1 H, H1' or H1''), H2' or H2'' are masked in residual peak of water, 4.64-4.62 (m, 1 H, H2' or H2''), 4.45 (s, 4 H, 2 CH_2), 4.30-4.26 (m, 1 H, H3' or H3''), 4.22-4.21 (m, 1 H, H3' or H3''), 4.08-4.06 (m, 2 H, H 4' and H4''), 4.30-4.26 (m, 2 H, H4' and H4''), 3.80-3.75 (m, 2 H, H5' or H5''), 3.66-3.64 (m, 2 H, H5' or H5'').

HRMS (ESI) m/z: $[M - H]^-$ Calcd for $C_{23}H_{28}N_{11}O_8$ 586.2128; found 586.22434.

Références

- 1 Meister, G. *ChemBioChem*, 2011, 12, 2699-2700.
- 2 Rodnina, M. V., Wintermeyer, W. *Curr Opin Struct Biol.* 2003, 13,334-340.
- 3 Lilley, D. M. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2011, 366, 2910-2917.
- 4 Holoch, D., Moazed, D. *Nat. Rev. Genet.* 2015, 16, 71-84.
- 5 Shannon, A., Selisko, B., Le, N., Huchting, J., Touret, F., Piorkowski, G., Fattorini, V., Ferron, F., Decroly, E., Meier, C., Coutard, B., Peersen, O., Canard, B. *Nat Commun.* 2020, 11, 4682-4691.
- 6 a) Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., Sementchenko, V., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Ganesh, M., Ghosh, S., Bell, I., Gerhard, D., Gingeras, T. R. *Science.* 2005, 308, 1149-115.
b) The ENCODE Project Consortium, *Nature.* 2007, 447, 799-816.
- 7 Krieg, P. A., Melton, D. A. *Methods In Enzymology.* 1987, 155, 397-415.
- 8 Beckert, B., Masquida, B. *Methods in Molecular Biology.* 2010, 703, 29-41.
- 9 Englend, T., Uhlenbeck, O. *Nature.* 1978, 275, 560-561.
- 10 Santarem, M., Fonvielle, M., Sakkas, N., Laisné, G., Chemama, M., Herbeuval, J., Braud, E., Arthur, M., Ethève- Quelquejeu, M. *Bioorg Med Chem.* 2014, 24, 3231-3233.
- 11 Beaucage, S. L., Caruthers, M. H. *Tetrahedron.* 1981, 22, 1859-1862.
- 12 Caruthers, M. H. *Acc Chem Res.* 1991, 24, 278-284.
- 13 Yu, M., Ojwang, J., Yamada, O., Hampel, A., Rapaport, J., Looney, D., Wong-Staal, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993, 90, 6340-6344.
- 14 a) Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, G. C. *Nature.* 1998, 391, 806-811. b) Tuschl, T. *ChemBioChem.* 2001, 2, 239-245.
- 15 Edwards, T. E., Sigurdsson, S. T. *Modified RNAs as Tools in RNA Biochemistry*, in *Handbook of RNA Biochemistry: Second, Completely Revised and Enlarged Edition.* 2014, 112-129, (eds R. K. Hartmann, A. Bindereif, A. Schön and E. Westhof).
- 16 Arthur, M. and Etheve-Quelquejeu, M. (2015) *Covalent Organic Functionalization of Nucleic Acids*, in *Chemistry of Organo-Hybrids: Synthesis and Characterization of Functional Nano-Objects* (eds B. Charleux, C. Copéret and E. Lacôte), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- 17 Malakhov, A. D., Malakhova, E. V., Kuznitsova, S. V., Grechichnikova, I. V., Prokhorenko, I. A., Skorobogaty, M. V., Korshun, V. A., Berlin, Y. A. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2000, 26, 34-44.
- 18 Caruthers, M. H. *Biochem Soc Trans.* 2011, 39, 572-580.
- 19 Arthur, M. and Etheve-Quelquejeu, M. (2015) *Covalent Organic Functionalization of Nucleic Acids*, in *Chemistry of Organo-Hybrids: Synthesis and Characterization of Functional Nano-Objects* (eds B. Charleux, C. Copéret and E. Lacôte), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- 20 Klöcker, N., Weissenboeck, F. P., Rentmeister, A. *Chem. Soc. Rev.* 2020, 49, 8749-8773.
- 21 Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2004-2021.
- 22 Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 3057-3064.
- 23 a) El-Sagheer, A. F., Brown, T. *Chem Soc. Rev.* 2010, 39, 1388-1405.
b) Gramlich, P. M. E., Wirges, C. T., Manetto, A., Carell, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47, 8350-8358.

24 a) Chan, T. R., Hilgraf, R., Sharpless, K. B., Fokin, V. V. *Org. Lett.* 2004, 6, 2853-2855. b) Besanceney-Webler, C., Jiang, H., Zheng, T. Q., Feng, L., del Amo, D. S., Wang, W., Klivansky, L. M., Marlow, F. L., Y. Liu, Y., Wu, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 8051-8056.

25 a) Jao, C. Y., Salic, A. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008, 105, 15779-15784. b) Jayaprakash, K. N., Peng, C. G., Butler, D., Varghese, J. P., Maier, M. A., Rajeev, K. G., Manoharan, M. *Org. Lett.* 2010, 12, 5410-5413. c) Motorin, Y., Burhenne, J., Teimer, R., Koynov, K., Willnow, S., Weinhold, E., Helm, M. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 1943- 1952. d) Yamada, T., Peng, C. G., Matsuda, S., Addepalli, H., Jayaprakash, K. N., Alam, M. R., Mills, K., Maier, M. A., Charisse, K., Sekine, M., Manoharan, M., and Rajeev, K. G. *J. Org. Chem.* 2011, 76, 1198-1211.

26 Paredes, E., Das, S. R. *ChemBioChem.* 2011, 12, 125-131.

27 Fauster, K., Hartl, M., Santner, T., Aigner, M., Kreutz, C., Bister, K., Ennifar, E., Micura, R. *ACS Chem. Biol.* 2012, 7, 581-589.

28 Fonvielle, M., Mellal, D., Patin, D., Lecerf, M., Blanot, D., Bouhss, A., Santarem, M., Mengin-Lecreux, D., Sollogoub, M., Arthur, M., Ethève-Quellejeu, M. *Chem. Eur. J.* 2012. 4, 1357-1363.

29 Ganz, D., Harijan, D., Wagenknecht, H-A., *RSC Chem. Biol.* 2020, 1, 86-97.

30 a) George, T. J., Srivatsan, S. *Methods.* 2017, 102, 28-38. b) Anhäuser, A., Rentmeister, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017, 48, 69-76.

31 a) Chalker, J. M., Wood, C. S. C., Davis, B. G. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 16346-1634. b) Lercher, L., McGouran, J. F., Kessler, B. M., Schofield, C. J., Davis, B. G. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 10553-10558.

32 Walunj, M. B., Tanpure, A. A., Srivastan, S. G. *Nucleic Acids Research.* 2018, 11, e65.

33 Stille, J. K. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1986, 25, 508–524. b) Diederich, F., Stang, P. *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*; Wiley-VCH: Weinheim, 1998. c) Farina, V. *The Stille reaction*; J. Wiley: New York, 1998.

34 Wicke, L., Engels, J. W. *Bioconjugate Chem.* 2012, 23, 627-642.

35 Agard, N. J., Prescher, J. A. Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 15046-15047.

36 a) Abendroth, F., Seitz, O. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53, 10504-10509. b) Di Pisa, M., Seitz, O. *ChemMedChem.* 2017, 12, 872-882.

37 Li, F., Dong, J., Hu, X., Li, W. G. J., Shen, J., Tian, H., Wang, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 1-7.

38 Sawant, A. A., Tanpure, A. A., Mukherjee, P. P., Athavale, S., Kelkar, A., Galande, S., Srivatsan, S. G. *Nucleic Acids Research.* 2016, 44, e16.

39 Carboni, R. A., Lindsey R.V. *J. Am. Chem. Soc.* 1959, 81, 4342-4346.

40 Oliveira, B. L., Guo, Z., Bernardes, G. J. L. *Chem. Soc. Rev.* 2017, 46, 4895-4950.

41 Asare-Okai, P. N., Agustin, E., Fabris, D., Royzen, M. *Chem. Commun.* 2014, 50, 7844-7847.

43 Domnick, C., Eggert, F., Kath-Schorr, S. *Chem. Commun.* 2015, 51, 8253-8256.

44 Debart, F., Dupouy, C., Vasseur, J. J. *Beilstein J Org Chem.* 2018, 14, 436-469.

45 Franzini, R. M., Kool, E. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 16021-16023.

46 Augustin, A., Asare Okai, P. N., Khan, I., Miller, M. R., Wang, R., Sheng, J., Royzen, M. *Chem. Commun.* 2016, 52, 1405-1408.

47 Khan, I., Seebald, L. M., Robertson, N. M., Yigit, M. V., Royzen, M. *Chem. Sci.* 2017, 8, 5705-5712.

48 Gampe, C. M., Hollis-Symynkywicz, M., Zécéri, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 55, 10283-10286.

49 Koo, B., Yoo, H., Choi, H. J., Kim, M., Kim, C., Kim, K. T. *Molecules*. 2021, 26, 556-580.

50 a) Poplata, S., Troster, A., Zou, Y.Q., Bach, T. *Chem. Rev.* 2016, 116, 9748–9815; b) Lei, T., Zhou, C., Wei, X.Z., Yang, B., Chen, B.; Tung, C.H.; Wu, L.Z. *Chem. Eur. J.* 2019, 25, 879–884; c) Kolmel, D.K., Loach, R.P., Knauber, T., Flanagan, M.E. *ChemMedChem*. 2018, 13, 2159–2165; d) Kolmel, D.K., Meng, J., Tsai, M.H., Que, J., Loach, R.P., Knauber, T., Wan, J., Flanagan, M.E. *ACS Comb. Sci.* 2019, 21, 588–597; e) Kolmel, D.K., Ratnayake, A.S., Flanagan, M.E., Tsai, M.H., Duan, C., Song, C. *Org. Lett.* 2020, 22, 2908–2913.

51 a) Zuo, Z., Ahneman, D.T., Chu, L., Terrett, J.A., Doyle, A.G., MacMillan, D.W. *Science*. 2014, 345, 437-440; b) Ruff, Y., Martinez, R., Pelle, X., Nimsgern, P., Fille, P.; Ratnikov, M., Berst, F. *ACS Comb. Sci.* 2020, 22, 120-128; c) Phelan, J.P., Lang, S.B., Sim, J., Berritt, S., Peat, A.J.; Billings, K., Fan, L., Molander, G.A. *J. Am. Chem. Soc.* 2019, 141, 3723-3732; d) Badir, S.O., Sim, J., Billings, K., Csakai, A., Zhang, X., Dong, W., Molander, G.A. *Org. Lett.* 2020, 22, 1046-1051.

52 Nappi, M., Hofer, A., Balasubramanian, S., Gaunt, M. *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 21484-21492.

53 Steger, J., Graber, D., Moroder, H., Geiermann, A.-S., Aigner, M., Micura, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 7470-7472.

54 Fonvielle, M., Sakkas, N., Iannazzo, L., Le Fournis, C., Patin, D., Mengin-Lecreux, D., El-Sagheer, A., Braud, E., Cardon, S., Brown, T., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, 55, 13553-13557

55 Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., Kent, S. B. *Science*. 1994, 266, 776-779.

56 Wieland, T., Bokelmann, E., Bauer, L., Lang, H. U., Lau, H., *Justus Liebigs Ann. Chem.* 1953, 583, 129-149.

57 Geiermann, A-S., Polacek, N., Micura, R. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 19068-19071.

58 Saxon, E., Bertozzi, C. R. *Science*. 2000, 287, 2007-2010.

59 Staudinger, H., Meyer, J. *Helv. Chim. Acta.* 1919, 2, 635-646.

60 Schilling, C. I., Jung, N., Biskup, M., Schepers, U., Bräse, S. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 4840-4871.

61 Aigner, M., Hartl, M., Fauster, K., Steger, J., Bister, K., Micura, R. *ChemBiochem*. 2011, 12, 47-51.

62 Saxon, E., Armstrong, J. I., Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* 2000, 2, 1939-1941.

63 Nilsson, B. L., Kiessling, L., Raines, R. T. *Org. Lett.* 2000, 2, 2141-2143.

64 Charfeddine, A., Dayoub, W., Chapuis, H., Strazewski, P. *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 5566-5584.

65 Saxon, E., Armstrong, J. I., Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* 2000, 2, 1939-1941.

66 Nilsson, B. L., Kiessling, L., Raines, R. T. *Org. Lett.* 2000, 2, 2141-2143.

67 a) Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., Kent, S. B. *H. Science* 1994, 266, 776-779. b) Shin, Y., Winans, K. A., Backes, B. J., Kent, S. B. H., Ellman, J. A.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 11684-11689. c) Johnson, E. C. B., Kent, S. B. H. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 128, 6640-6646.

68 Nilsson, B. L., Kiessling, L., Raines, R. T. *Org. Lett.* 2001, 3, 9-12.

69 Soellner, M. B., Tam, A., Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 11421-11430.

70 Bianchi, A., Bernardi, A. *J. Org. Chem.* 2006, 71, 12, 4565-4577.

71 Grandjean, C., Boutonnier, A., Guerreiro, C., Fourniers, J. M., Mulard, L. A. *J. Org. Chem.* 2005, 70, 7123-7132.

72 Zhu, S., Guo, Z. *Org. Lett.* 2017, 19, 3063-3066.

73 Bernardes, G. J. L., Linderoth, L., Doores, K. J., Boutureira, O., Davis, B. G. *ChemBioChem*. 2011, 12, 1383-1386.

- 74 Chemama, M., Fonvielle, M., Villet, R., Arthur, M., Valery, J. M., Etheve-Quellejeu, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 129, 12642-12643.
- 75 Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, A., Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 5115-5119.
- 76 Hakimelahi, G.H., Proba, Z.A., Ogilvie, K.K. *Tet. Lett.* 1981, 22, 5243-5246.
- 77 Chemama, M., Fonvielle, M., Villet, R., Arthur, M., Valery, J. M., Etheve-Quellejeu, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 129, 12642-12643.
- 78 de la Conception, J. G., Martinez, R. F., Cintas, P., Cintas, P., Jimenez, J. 2018, DOI: <http://dx.medra.org/10.17374/targets.2018.21.228>.
- 79 Decuypere, E., Plougastel, L., Audisio, D., Taran, F. *Chem. Commun.* 2017, 53, 11515-11527.
- 80 Riomet, M., Porte, K., Madegard, L., Thuéry, P., Audisio, D., Taran, F. *Org. Lett.* 2020, 6, 2403-2408.
- 81 Saxon, E., Armstrong, J. I., Bertozzi, C. R. *Org. Lett.* 2000, 2, 1939-1941.
- 82 Nisic, F., Speciale, G., Bernardi, A. *Chem. Eur. J.* 2012, 18, 6895-6909.
- 83 a) Bianchi, A., Bernardi, A. *J. Org. Chem.* 2006, 71, 12, 4565-4577. b) Nisic, F., Andreini, M., Bernardi, A. *Eur. J. Org. Chem.* 2009, 5744-5751.
- 84 Grandjean, C., Boutonnier, A., Guerreiro, C., Fourniers, J. M., Mulard, L. A. *J. Org. Chem.* 2005, 70, 7123-7132.
- 85 Nisic, F., Speciale, G., Bernardi, A. *Chem. Eur. J.* 2012, 18, 6895-6909.
- 86 Nisic, F., Speciale, G., Bernardi, A. *Chem. Eur. J.* 2012, 18, 6895-6906.
- 87 Nunez, M. G., Farley, A. G., Dixon D. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 16348-16351.
- 88 Marchan, V., Rodriguez-Tanty, C., Estrada, M., Pedroso, E., Grandas, A. *Eur. J. Org. Chem.* 2000, 13, 2495-2500.
- 89 a) Heckler, T., Chang, L. H., Zama, Y., Naka, T., Chorghade, M. S., Hecht, S. M. *Biochemistry* 1984, 23, 1468-147; b) Robertson, S. A., Noren, C. J., Anthony-Cahill, S. J., Grith, M. C, Schultz, P. G. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 9649-9660; c) Mellal, D., Fonvielle, M., Santarem, M., Chemama, M., Schneider, Y., Iannazzo, L., Braud, E., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M. *Org. Biomol. Chem.* 2013, 11, 6161-6169.
- 90 a) Kitoun, C., Fonvielle, M., Djago, F., Sakkas, N., Lefresne, M., Blancart Remaury, Q., Poinot, P., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M., Iannazzo, L. *Org. Lett.* 2020, 22, 8034-8038 ; b) Kitoun, C., Fonvielle, M., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M., Iannazzo, L. *Current Protocols*, 2021, e42, DOI: 10.1002/cpz1.42.
- 91 Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J., Zhao, X. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008, 52, 385-392.
- 92 Galimand, M., Courvalin, P., Lambert, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 3960-3962.
- 93 Lewis, K. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2013, 12, 371-387.
- 94 Davies, J., Davies, D. *Microbiology and Molecular Review.* 2010, 74, 417-433.
- 95 Tomoo, S., Keizo, Y. *Japon Medical Association Journal.* 2009, 52, 103-108.
- 96 Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J., Courvalin, P. *N. Engl. J. Med.* 1988, 319, 157-161.
- 97 a) Chang, F.Y., Peacock, J. E., Jr., Musher, D. M., Triplett, P., MacDonald, B. B., Mylotte, J. M., O'Donnell, A., Wagner, M. M., Yu, V.L. *Medicine.* 2003, 82, 333-339; b) Weigel, L. M., Clewell, D. B., Gill, S. R., Clark, N. C., McDougal, L. K., Flannagan, S. E., Kolonay, J. F., Shetty, J., Killigore, G. E., Tenover, F. C. *Science*, 2003. 302, 1569-1571.
- 98 Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32, 149-167.
- 99 Barnickel, N., Labischinski, H., Bradaczek, H., Giesbresht, P. *Eur. J. Biochem.* 1979, 95, 157-65.

- 100 a) Holtje, J. V. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998, 62, 181-203; b) Nanninga, N. *Mol. Biol. Rev.* 1998, 62, 110-29.
- 101 a) Hegde, S. S., Shader, T. E. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 6988-7003; b) Rohrer, S., Berger-Bachi, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 837-846.
- 102 Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, A., Etheve-Quelquejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 5115-5119.
- 103 Mainardi, J. L., Villet, R., Bugg, T. D., Mayer, C., Arthur, M. *FEMS Microbiol Rev.* 2008, 386-408; b) Hedge, S. S., Shrader, T.E. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 6998-7003.
- 104 Mellal, D., Fonvielle, M., Santarem, M., Chemama, M., Schneider, Y., Iannazzo, L., Braud, E., Arthur, M., Etheve-Quelquejeu, M. *Org. Biomol. Chem.* 2013, 11, 6161-6169.
- 105 Chemama, M., Fonvielle, M., Arthur, M., Valery, J. M., Etheve-Quelquejeu, M. *Chem. Eur. J.* 2009, 15, 1929-1938.
- 106 a) Fonvielle, M., Li de La Sierra-Gallay, I., El-Sagheer, A. H., Lecerf, M., Pantin, D., Mellal, D., Meyer, C., Blanot, D., Gale, N., Brown, T., Van Tilbeurgh, H., Etheve-Quelquejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 7278-7281. ; b) Fonvielle, M., Mellal, D., Patin, D., Lecerf, M., Blanot, D., Bouhss, A., Santarem, M., Mengin-Lecreux, D., Sollogoub, M., Arthur, M., Etheve-Quelquejeu, M. *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 1357-1363.
- 107 Benson, T. E., Prince, D. B., Mutchler, V. T., Curry, K. A., Ho, A. M., Sarver, R. W., Hagadorn, J. C., Choi, G. H., Garlick, R. L. *Structure.* 2002, 10, 1107-1115.
- 108 Biarotte-Sorin, S., Maillard, A. P., Delettré, J., Sougakoff, W., Arthur, M., Mayer, C. *Structure.* 2004, 12, 257-267.
- 109 Rietmeyer, L., Fix-Boulier, N., Le Fournis, C., Iannazzo, L., Kitoun, C., Patin, D., Mengin-Lecreux, D., Ethevequelquejeu, M., Arthur, M. Fonvielle, M. *Nucleic Acids Research.* 2021, 2, 648-699.
- 110 Shepherd, J., Ibba, M. *FEBS Letters.* 2013, 587, 2895-2904.
- 111 Fonvielle M., Bouhss A., Hoareau C., Patin D., Mengin-Lecreux D., Iannazzo L., Sakkas N., El Sagheer A., Brown T., Etheve-Quelquejeu M., Arthur M., *Chem. Eur. J.*, 2018, 24:14911-14915.
- 112 Mellal, D., Fonvielle, M., Santarem, M., Chemama, M., Schneider, Y., Iannazzo, L., Braud, E., Arthur, M., Etheve-Quelquejeu, M. *Org. Biomol. Chem.* 2013, 11, 6161-616.
- 113 a) Kaul, R., Brouillette, Y., Sajjadi, Z., Hansford, K. A., Lubell, W. D. *J. Org. Chem.* 2004, 69, 6131-6133; b) Ferreira, F., Morvan, F. *Nucleosides. Nucleotides and Nucleic Acids.* 2005, 24, 1009-1013.
- 114 Rietmeyer, L., Fix-Boulier, N., Le Fournis, C., Iannazzo, L., Kitoun, C., Patin, D., Mengin-Lecreux, D., Ethevequelquejeu, M., Arthur, M. Fonvielle, M. *Nucleic Acids Research.* 2021, 2, 648-699.
- 115 Fonvielle, M., Bouhss, A., Hoareau, C., Patin, D., Mangin-Lecreux, D., Iannazzo, L., Sakkas, N., El Sagheer., Brown, T., Etheve-Quelquejeu, M., Arthur, M. *Chem. Eur. J.* 2018, 24, 1491-1415.
- 116 Mellal, D., Fonvielle, M., Santarem, M., Chemama, M., Schneider, Y., Iannazzo, L., Braud, E., Arthur, M., Etheve-Quelquejeu, M. *Org. Biomol. Chem.* 2013, 11, 6161-6169.
- 117 Nilsson, B. L., Kiessling, L., Raines, R. T. *Org. Lett.* 2000, 2, 2141-2143.
- 118 Nilsson, B. L., Kiessling, L., Raines, R. T. *Org. Lett.* 2001, 3, 9-12.
- 119 Soellner, M. B., Tam, A., Raines, R. T. *J. Org. Chem.* 2006, 71, 9824-9830.
- 120 Tam, A., Soellner, M. B., Raines, R. T. *Org. Biomol. Chem.* 2008, 6, 1173-1175.
- 121 Nilsson, B. L., Hondal, J. R., Soellner, M. B., Raines, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 5268-5269.

- 122 David, O., Meester, W. J. N., Bieräugel, H., Schoemaker, H. E., Hiemstra, H., van Maarseveen, J. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42, 4373-4375.
- 123 Bianchi, A., Bernardi, A. *J. Org. Chem.* 2006, 71, 12, 4565-4577.
- 124 Nisic, F., Andreini, M., Bernardi, A. *Eur. J. Org. Chem.* 2009, 5744-5751.
- 125 Zhu, S., Guo, Z. *Org. Lett.* 2017, 19, 3063-3066.
- 126 Rajdev, P., Chakraborty, S., Schmutz, M., Mesini, P., Ghosh, S. *Langmuir.* 2017, 33, 19, 4789-4795.
- 127 Sheehan, J. C., Cruickshank, P. A, Boshart, G. L. *J. Org. Chem.* 1961, 26, 2525-2528.
- 128 Nunez, M. G., Farley, A. G., Dixon D. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 16348-16351.
- 129 Lakshman, M. K., Snigh, M. K., Parrish, D., Balachandran, R., Day, B. W. *J. Org. Chem.* 2010, 75, 2461-2473.
- 130 Bae, S., Lakshman, M. K. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 782-789.
- 131 Wan, Z. K., Wacharasindhu, S., Levins, C. G., Lin, M., Tabei, K., Mansour, T.S. *J. Org. Chem.* 2007, 72, 10194-10210.
- 132 a) Temple, C., Jr., Thorpe, M. C., Coburn, W. C., Jr., Montgomery, J. A. *J. Org. Chem.* 1966, 31, 935-938; b) Temple, C., Jr., Kussner, C. L., Montgomery, J. A. *J. Org. Chem.* 1966, 31, 2210-215.
- 133 Temple, C., Jr, Thorpe, M. C., Coburn, W. C., Jr., Montgomery, J. A. *J. Org. Chem.* 1966, 31, 935-938.
- 134 Zhao, H., Pagano, A. R., Wang, W., Shallop, A., Gaffney, B. L., Jones, R. A. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 7832-7835.
- 135 Bae, S., Lakshman, M. K. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 782-789.
- 136 Heravi, M. M., Ghavidel, M., Mohammadkhani, L. *RSC Adv.* 2018, 8, 27832-27862.
- 137 Yang, D. S., Jeon, H. B. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2010, 31, 1424-1426.
- 138 Atdjian, C., Coelho, D., Iannazzo, L., Ethève-Quelquejeu, M., Braud, E. *Molecules*, 2020, 25, 3241.
- 139 Batista, P. J. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2017, 15, 154-163.
- 140 Atdjian, C., Iannazzo, L., Braud, E., Ethève-Quelquejeu, M. *Eur. J. Org. Chem.* 2018, 32, 4411-4425.
- 141 Bae, S., Lakshman, M. K. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 782-789.
- 142 Oerum, S., Catala, M., Atdjian, C., Brachet, F., Ponchon, L., Barraud, P., Iannazzo, L., Droogmans, L., Braud, E., Ethève-Quelquejeu, M., Tisé, C. *RNA Biol.* 2019, 16, 798-808.
- 143 Atdjian, C., Coelho, D., Iannazzo, L., Ethève-Quelquejeu, M., Braud, E. *Molecules*, 2020, 25, 3241.
- 144 Belkacem, R. A., Sutto-Ortiz, P., Decroly, E., Vasseur, J., Debart, F. *Eur. J. Chem.* 2019, 201, 6486-6495.
- 145 Belkacem, R. A., Sutto-Ortiz, P., Grimaud, M., Canard, B., Vasseur, J., Declroy, E., Debart, F. *Eur. J. Chem.* 2020, 201, 112557.
- 146 Kosal, A. D., Wilson, E. E., Ashfeld, B. L. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 12036-12040.
- 147 Kitoun, C., Fonvielle, M., Djago, F., Sakkas, N., Lefresne, M., Blancart Remaury, Q., Poinot, P., Arthur, M., Etheve-Quelquejeu, M., Iannazzo, L. *Org. Lett.* 2020, 22, 8034-8038 ; b) Kitoun, C., Fonvielle, M., Arthur, M., Etheve-Quelquejeu, M., Iannazzo, L. *Current Protocols* 2021, e42, DOI: 10.1002/cpz1.42.
- 148 Rietmeyer, L., Fix-Boulier, N., Le Fournis, C., Iannazzo, L., Kitoun, C., Patin, D., Mengin-Lecreux, D., Ethèvequelquejeu, M., Arthur, M. Fonvielle, M. *Nucleic Acids Research* 2021, 2, 648-699.
- 149 de la Conception, J. G., Martinez, R. F., cintas, P., Cintas, P., Jimenez, J. 2018, DOI:

<http://dx.medra.org/10.17374/targets.2018.21.228>

- 150 Decuypère, E., Plougastel, L., Audisio, D., Taran, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 53, 11515-11527.
- 151 Riomet, M., Decuypere, E., Porte, K., Bernard, S., Plougastel, L., Kolodych, S., Audisio, D., Taran, F. *Chem. Eur. J.* 2018, 24, 8535-8541.
- 152 Atdjian, C., Iannazzo, L., Braud, E., Ethève-Quellejeu, M. *Eur. J. Org. Chem.* 2018, 4411-4425.
- 153 Hakimelahi, G. H., Proba, Z. A., Olgilvie, K. K. *Canadian J. Chem.* 1982, 60, 1106-1113.
- 154 Chatgillaloglu, C., Duca, M., Ferreri, C., Guerra, M., Ioele, M., Mulazzani, Q. G., Strittmatter, H., Giese, B. *Chem. Eur. J.* 2004, 10, 1249-1255.
- 155 Chatgillaloglu, C., Duca, M., Ferreri, C., Guerra, M., Ioele, M., Mulazzani, Q. G., Strittmatter, H., Giese, B. *Chem. Eur. J.* 2004, 10, 1249-1255.
- 156 Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 5115-5119.
- 157 Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 5115-5119.
- 158 Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 5115-5119.
- 159 Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 5115-5119.
- 160 Ahad, A. M., Jensen, S. M., Jewett, J. C. *Org. Lett.* 2013, 15, 5060-5063.
- 161 Dai, L.-L., Zhang, H.-Z., Nagarajan, S., Rasheed, S., Zhou, C.-H. *Med. Chem. Commun.* 2015, 6, 147.
- 162 Riomet, M., Decuypere, E., Porte, K., Bernard, K., Plougastel, L., Kolodych, S., Audisio, D., Taran, F. *Chem. Eur. J.* 2018, 24, 8535-8541.
- 163 Riomet, M., Porte, K., Madegard, L., Thuéry, P., Audisio, D., Taran, F. *Org. Lett.* 2020, 6, 2403-2408.
- 164 Uhlmann, E., Engels, J. *Tetrahedron Lett.* 1986, 27, 1023-1026.
- 165 Fonvielle, M., Mellal, D., Patin, D., Lecerf, M., Blanot, D., Bouhss, A., Santarem, M., Mengin-Lecreux, D., Sollogoub, M., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M. *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 1357-1363.
- 165 Fonvielle, M., Mellal, D., Patin, D., Lecerf, M., Blanot, D., Bouhss, A., Santarem, M., Mengin-Lecreux, D., Sollogoub, M., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M. *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 1357-1363.
- 166 Gadakh, B., Vondenhoff, G., Lescrinier, E., Rozenski, J., Froeyen, M., Van Aerschot, A. *Bioorg Med Chem* 2014, 22, 2875-2886.
- 167 Lakshman, M. K., Snigh, M. K., Parrish, D., Balachandran, R., Day, B. W. *J. Org. Chem.* 2010, 75, 2461-2473.
- 168 Zhao, H., Pagano, A. R., Wang, W., Shallop, A., Gaffney, B. L., Jones, R. A. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 7832-7835.
- 169 Friden, M., Aviñó, A., Eritja, R. *Nucleosides Nucleotides Nucleic acids.* 2003, 2, 193-209.
- 170 Angelos, S., Yang, Y.-W., Patel, K., Stoddart, J. F., Zink, J. I. *Angew. Chemie Int. Ed.* 2008, 47, 2222-2226.
- 171 Sadler, J.C., Humphreys, L.D., Snajdrova, R., Burley, G.A. *ChemBioChem* 2017, 18, 992-995.
- 172 Ciuffreda, P., Loseto, A., Alessandrini, L., Terraneo, G., Santaniello, E. *Eur. J. Org. Chem.* 2003, 4748-4751.

Résumé

La modification chimique des biomolécules permet d'obtenir des outils très utiles pour la compréhension de processus biologiques. Dans ce contexte, la modification des ARN a été moins étudiée que celle des protéines ou de l'ADN. Dans ce travail de thèse, j'ai développé une méthodologie de post-fonctionnalisation d'ARN basée sur la ligation de Staudinger « *traceless* ». L'optimisation des conditions de cette réaction a été réalisée sur un dinucléotide-2'-N₃ modèle qui a été obtenu par couplage entre une adénosine et une désoxycytidine en utilisant la chimie des phosphoramidites. Il nous a fallu aussi développer la synthèse de différentes phosphines fonctionnalisées par exemple par des sondes de type biotine, photo-switch ou des composés photoactivables. L'utilisation de la ligation de Staudinger *traceless* nous permis d'obtenir une série de 8 dinucléotides fonctionnalisés avec des rendements variables. Nous avons ensuite été capable d'appliquer cette réaction à la modification 3' terminal d'un ARN de 24 nucléotides. Au-delà de l'aspect méthodologique de ce projet, la synthèse de phosphines substituées par des acides aminés a permis la synthèse d'analogues stables d'ARNt par cette stratégie. Ces molécules seront utilisées comme outils pour l'étude de transférases bactériennes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane. Ces enzymes sont aminoacyl-ARNt dépendantes et sont impliquées dans l'une des étapes essentielles de la biosynthèse de peptidoglycane. Dans la dernière partie de ce travail de thèse, les conditions de ligation de Staudinger *traceless* ont été étendues à la fonctionnalisation des positions C6 et 5'-OH de l'adénosine. Cette approche a conduit à la synthèse d'un analogue de type bisubstrat qui pourra être utilisé pour l'étude de méthyltransférases d'ARN.

Mots-clés : Ligation de Staudinger *traceless*, Chimie des nucléosides, ARN, post-fonctionnalisation, Fem Transférases.

Abstract

Chemical modification of biomolecules provides very useful tools for understanding biological processes. In this context, the chemical modification of RNAs has been less studied than that of proteins or DNA. In this thesis work, I developed a RNA post-functionalization methodology based on "traceless" Staudinger ligation. The optimization of the conditions for this reaction was carried out on a model dinucleotide-2'-N₃ which was obtained by a coupling step between an adenosine and a deoxycytidine using phosphoramidite chemistry. We also developed the synthesis of different phosphines functionalized by probes such as biotin, photo-switch or photoactivable tags. The use of the *traceless* Staudinger ligation allowed us to obtain a series of 8 functionalized dinucleotides with varying yields. We were then able to apply this reaction to the 3' terminal modification of a 24 nucleotides RNA. Beyond the methodological aspect of this project, the synthesis of phosphines substituted by amino acids allowed the synthesis of stable analogs of tRNA by this strategy. These molecules will be used as tools for the study of bacterial transferases involved in the biosynthesis of peptidoglycan. These enzymes are aminoacyl-tRNA dependent and are involved in one of the essential steps in peptidoglycan biosynthesis. In the last part of this thesis work, the *traceless* Staudinger ligation conditions were extended to the functionalization of the C6 and 5'-OH positions of adenosine. This approach has led to the synthesis of a bisubstrate-like analogue that will be used to study RNA methyltransferases.

Keywords : Traceless Staudinger Ligation, Nucleosides chemistry, RNA, post-fonctionnalisation, Fem Transferases.