



**HAL**  
open science

## Elaboration de catalyseurs chiraux à partir d'oligonucléotides contraints

Yoann Colas

► **To cite this version:**

Yoann Colas. Elaboration de catalyseurs chiraux à partir d'oligonucléotides contraints. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV056 . tel-03890122

**HAL Id: tel-03890122**

**<https://theses.hal.science/tel-03890122v1>**

Submitted on 8 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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Yoann COLAS**

Thèse dirigée par **Nicolas SPINELLI**,  
et codirigée par **Caroline MARCHI-DELAPIERRE**

préparée au sein du **Département de Chimie Moléculaire**  
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

**Élaboration de catalyseurs chiraux à  
partir d'oligonucléotides contraints**

**Constrained oligonucleotides based  
chiral catalyst**

Thèse soutenue publiquement le **13 juillet 2022**,  
devant le jury composé de :

**Madame Geneviève PRATVIEL**

Directrice de recherche CNRS, Université Paul Sabatier Toulouse III  
(Examinatrice)

**Madame Corinne RAVELET**

Professeure, Université Grenoble Alpes (Présidente du jury)

**Monsieur François MORVAN**

Directeur de recherche INSERM, Université de Montpellier (Rapporteur)

**Monsieur Jean-Marc ESCUDIER**

Directeur de recherche CNRS, Université Paul Sabatier Toulouse III  
(Rapporteur)

**Monsieur Nicolas SPINELLI**

Maître de conférence, Université Grenoble Alpes (Directeur de thèse)

**Madame Caroline MARCHI-DELAPIERRE**

Maître de conférence, Université Grenoble Alpes (Co-directrice de thèse)





## Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir évalué mes travaux de thèse mais aussi pour la pertinence de leurs questions et la discussion qui en a résulté :

- Mme Geneviève Pratviel, Directrice de recherche CNRS, Université Paul Sabatier Toulouse III
- Mme Corinne Ravelet, Professeure des universités, Université Grenoble Alpes
- M. François Morvan, Directeur de recherche INSERM, Université Montpellier
- M. Jean-Marc Escudier, Directeur de recherche CNRS, Université Paul Sabatier Toulouse III

Je remercie aussi mes directeurs de thèse, Nicolas Spinelli et Caroline Marchi-Delapierre, pour m'avoir permis de vivre cette aventure, même s'il y a eu des hauts et des bas, vous avez su m'encadrer et me pousser de l'avant quand il était nécessaire #redactiondernièreminute. J'ai beaucoup appris avec vous pendant ces trois années et j'espère que le projet pourra continuer afin de concevoir les catalyseurs de demain. Je ne t'oublie pas non plus Stéphane Ménage, pour ton soutien et ta disponibilité sur la fin de ma thèse qui m'ont grandement aidé.

Un grand merci à tous les doctorants et post-doctorants avec qui je garderai de merveilleux souvenirs ! Merci aux anciens : Alexandre, Benjamin, Romain, Laury-Anne et Vinicius pour ces vendredi soir autour d'une bière avec le fameux « John Bolt ». Merci à Pierre, Jonny, Eugénie, Sean, Silvia et Claire pour ces bons moments au labo et en dehors. Nos discussions diverses et variées me manqueront. Merci Jordan, Thibaut et Coelio pour m'avoir poussé à faire ce saut à l'élastique, vous savez ou me joindre pour le parachute ! Enfin, merci Umberto, Charlotte et Manel pour m'avoir accueilli au sein du labo BioCE alors que je ne connaissais personne. Je n'oublierai jamais ce film qu'est ta vie Manel ahah.

Merci à l'équipe I2BM et BioCE pour m'avoir accueilli et permis de rencontrer plein de belles personnes qui m'auront aidé de près ou de loin dans mes travaux de recherche. Je remercie aussi tous les stagiaires qui ont été de passage à Nanobio ou au CEA et qui sont trop nombreux pour que je les nomme tous.

Pour finir, je souhaite remercier ma famille, Papou et Mamou, mes parents et mes deux frères, qui m'ont toujours soutenu et sans qui tout cela n'aurait pas été possible. J'espère que ma soutenance vous a permis de comprendre sur quoi je travaillais. Bien sûr aussi, Laura pour avoir surmonté cette épreuve avec moi ainsi que tous mes amis d'enfance de MTP et d'école d'ingénieur auprès de qui j'ai pu me ressourcer et me changer les idées.

J'oublie certainement de nombreuses personnes et si c'est le cas, j'espère que vous ne m'en tiendriez pas rigueur, Merci à tous



## SOMMAIRE

<b>ABREVIATIONS</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>3</b>
<b>I. Contexte actuel</b>	<b>4</b>
<b>II. Les métalloenzymes artificielles, de nouveaux biocatalyseurs</b>	<b>6</b>
II.1. Concept général	6
II.2. Choix de la biomolécule	7
<b>III. Les G-quadruplexes comme supports bio-macromoléculaires</b>	<b>9</b>
III.1. Rappels sur les acides nucléiques	9
III.2. Les G-quadruplexes	10
III.3. Utilisation de G-quadruplexes en catalyse	12
<b>IV. Présentation du projet</b>	<b>14</b>
<b>CHAPITRE I : SYNTHÈSE DE G-QUADRUPLEXES CONTRAINTS</b>	<b>17</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>18</b>
I.1. Généralités sur la synthèse peptidique	19
I.2. Généralités sur la synthèse d'oligonucléotides	19
I.3. Généralités sur les ligations bio-orthogonales	21
<b>II. Synthèse des structures « sur gabarit »</b>	<b>27</b>
II.1. Synthèse du gabarit peptidique	27
II.2. Synthèse des oligonucléotides modifiés	29
II.3. Bio-conjugaison des ODN et du châssis	31
II.4. Etude de la stabilité de la liaison éther d'oxime	33
<b>III. Synthèse de G-quadruplexes contraints parallèles</b>	<b>34</b>
III.1. Insertion des fonctions azotures et synthèse du gabarit peptidique	36
III.2. Synthèse des oligonucléotides modifiés	37
III.3. Bio-conjugaison des ODN et du châssis	38
<b>IV. Synthèse de G-quadruplexes contraints antiparallèles</b>	<b>40</b>
IV.1. Synthèse de G-quadruplexes de contrôle	40
IV.2. Stratégie de synthèse de l'édifice contraint	41
IV.3. Bio-conjugaison des ODN et châssis et observations	42
IV.4. Perspectives	44
<b>V. Les catalyseurs</b>	<b>49</b>
V.1. Salen de manganèse	50
V.2. Synthèse du complexe de cuivre	50
V.3. Stratégies de ligations covalentes du complexe de cuivre aux structures contraintes	51
<b>VI. Conclusion sur la synthèse de G-quadruplexes contraints</b>	<b>57</b>

<b>CHAPITRE II : ETUDES DES TOPOLOGIES DE G-QUADRUPLEXES</b>	<b>59</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>60</b>
I.1. Le dichroïsme circulaire	60
I.2. Le polymorphisme des G-quadruplexes	66
I.3. Conditions d'analyses utilisées en dichroïsme circulaire	71
<b>II. Etude des séquences de contrôles négatifs poly dT</b>	<b>73</b>
<b>III. Etude des séquences télomérique et de l'incidence du RAFT</b>	<b>74</b>
III.1. Séquence télomérique « HT21 »	74
III.2. Incidence du RAFT	77
III.3. Bilan sur les G-quadruplexes télomériques et l'incidence du RAFT	80
<b>IV. Etude des structures parallèles</b>	<b>80</b>
IV.1. Structures télomériques contrainte et libre : $[d(5'AGGG3')]_4$ et $[d(5'AGGGTTA3')]_4$	81
IV.2. Modulation de la composition du « flanking »	83
IV.3. Modulation de la longueur du « flanking »	87
IV.4. Conclusion sur l'analyse des structures parallèles	90
<b>V. Etudes des structures antiparallèles</b>	<b>91</b>
V.1. « HT21 + T » : un G-quadruplexe antiparallèle de type « panier »	91
V.2. L'aptamère « TBA » : un G-quadruplexe antiparallèle de type « chaise »	93
V.3. Structure antiparallèle contrainte	94
V.4. Stabilité des structures	96
V.5. Bilan sur la topologie antiparallèle	96
<b>VI. Conclusion sur l'étude par dichroïsme circulaire</b>	<b>97</b>
<b>CHAPITRE III : SULFOXYDATION ASYMETRIQUE EN PRESENCE DE G-QUADRUPLEXES</b>	<b>98</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>99</b>
I.1. Mise en place de la réaction de sulfoxydation	99
I.2. Détermination des zones d'interactions	101
I.3. Bilan sur la publication de Can Li	105
<b>II. Adaptation des travaux de Can Li</b>	<b>106</b>
II.1. Reproduction des travaux de la publication	107
II.2. Variation de la proportion en G-quadruplexe	109
II.3. Variation de la proportion en solvant organique	110
II.4. Bilan sur la reproduction des travaux de Can Li	113
<b>III. Influence de la présence du châssis peptidique</b>	<b>114</b>
III.1. Incidence du RAFT seul	114
III.2. Incidence du RAFT en présence de G-quadruplexe	115
III.3. Influence de la proportion en acétonitrile	120
III.4. Bilan sur l'influence du RAFT	122
<b>IV. Réaction de sulfoxydation en présence de G-quadruplexes parallèles</b>	<b>123</b>
IV.1. Rappels sur la topologie parallèle	123

---

IV.2. Séquence télomérique humaine	125
IV.3. Importance de la nature du flanking	128
IV.4. Apport de la contrainte	134
IV.5. Bilan et perspectives sur les G-quadruplexes parallèles	138
<b>V. Catalyse en présence de G-quadruplexes antiparallèles</b>	<b>141</b>
V.1. Rappels sur la topologie antiparallèle	141
V.2. Catalyse en présence d'un G-quadruplexe antiparallèle de type « panier »	142
V.3. Catalyse en présence d'un G-quadruplexe antiparallèle de type « chaise »	144
V.4. Bilan et perspectives pour la topologie antiparallèle	145
<b>VI. Conclusion et perspectives sur la catalyse</b>	<b>146</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>150</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>156</b>
<b>I. Materials and equipment</b>	<b>157</b>
<b>II. General procedure for peptide synthesis</b>	<b>157</b>
II.1. Syntheses of linear protected peptides by SPPS	157
II.2. General procedure for cyclisation reactions	158
II.3. General procedure for N-ε Boc or oxyamine deprotection	158
II.4. Experimental procedures	158
<b>III. General procedure for oligonucleotides synthesis</b>	<b>163</b>
III.1. General procedure for DNA synthesis	164
III.2. General procedure for 3'-diol DNA and oxidation	164
III.3. Experimental procedures	164
<b>IV. General procedure for conjugate synthesis</b>	<b>173</b>
IV.1. General procedure for oxime ligation	174
IV.2. General procedures for CuAAC	174
IV.3. General procedure for tBu deprotection	174
IV.4. Experimental procedures	175
<b>V. Circular Dichroism studies</b>	<b>185</b>
<b>VI. General procedure for catalysis</b>	<b>188</b>
VI.1. General procedure for sulfoxidation reaction	188
VI.2. Characterisation of references	188
<b>ANNEXES</b>	<b>190</b>
<b>I. Spectres de dichroïsme circulaire des structures tétramoléculaires parallèles</b>	<b>191</b>
<b>II. Courbes de dénaturation des structures parallèles</b>	<b>194</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>196</b>



## Abréviations

### A

A : adénosine  
 Ac<sub>2</sub>O : *anhydride acétique*  
 AcOEt : *acétate d'éthyle*  
 AcOH : *acide acétique*  
 ADN : *Acide DésoxyriboNucléique*  
 AMA : *mélange ammoniaque/méthylamine (1/1 ; v/v)*  
 ARN : *Acide RiboNucléique*  
 ARN<sub>t</sub> : *Acide RiboNucléique de transfert*

### B

BioCE : *Catalyse Bioinorganique et Environnement*  
 bipy : *2,2'-bipyridine*  
 Boc : *tert-butoxycarbonate*

### C

C : *cytidine*  
 CES : *cartouche d'exclusion stérique*  
 cgmHT21 · *Séquence mutée de "HT21" :*  
*d[<sup>5'</sup>(GGGTTA)<sub>2</sub>GTGTTAGGG<sup>3'</sup>]*  
 CuAAC : *Copper Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition*  
 CuSO<sub>4</sub> : *sulfate de cuivre*

### D

DC : *dichroïsme circulaire*  
 DCC : *N,N' dicyclohexylcarbodiimide*  
 DCM : *dichlorométhane*  
 DIPEA : *N,N Diisopropyléthylamine*  
 dmbipy : *4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine*  
 DMF : *N,N-Diméthylformamide*  
 DMTr<sup>+</sup> : *cation diméthoxytritylium*

### E

EDC.HCl : *1-ethyl-3-carbodiimide hydrochloride*  
 ee : *excès énantiomériques*  
 Eei : *1-éthoxyéthylidène*

### F

FAM : *carboxyfluorescéine*  
 Fmoc : *fluorénylméthoxycarbonate*

### G

G : *guanosine*  
 G4 : *G-quadruplexe*

### H

H<sub>2</sub>O : *eau*  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : *peroxyde d'hydrogène*  
 HEPES : *acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique*  
 HOAt : *1-hydroxy-7-aza-benzotriazole*

### I

I : *Hypoxanthine*  
 ISAHC : *chlorhydrate d'imidazole-1-sulfuryl azoture*

### M

MeAr : *métalloenzymes artificielles*  
 MeOH : *méthanol*  
 MOPS : *acide 3-morpholino-1-propanesulfonique*

### N

NaHCO<sub>3</sub> : *hydrogénocarbonate de sodium*  
 NHS : *N-hydroxysuccinimide*  
 nucléo-hémine : *G-quadruplexe-hémine*

### O

ODN : *oligo-désoxyribonucléotide*

### P

PEG : *polyéthylène glycol*

PyBOP · : *benzotriazol 1 yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate*

---

**R**

RAFT · : *Regioselectively Addressable Functionalized Template*

RMN · : *résonnance magnétique nucléaire*

RP-HPLC · : *Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography*

---

**S**

SPOS · : *Solid Phase Oligonucleotide Synthesis*

SPPS · : *Synthèse Peptidique en Phase Solide*

---

**T**

T · : *thymidine*

tBu · : *tert-butyle*

TEAA · : *acétate de triéthyl ammonium*

TFA · : *acide trifluoroacétique*

TFE · : *2,2,2-trifluoroéthanol*

THF · : *tétrahydrofurane*

THPTA · : *tris(benzyltriazolylméthyle)amine*

T<sub>m</sub> · : *température de transition*

TMPyP4 · : *tétra (N méthyle 4 pyridyle)porphyrine*

---

**U**

U · *uridine*

---

# Introduction

---

## I. Contexte actuel

Depuis la révolution industrielle, la chimie n'a cessé de prospérer et de développer de nouveaux procédés de plus en plus performants, afin de répondre aux besoins d'une société en pleine expansion. La chimie est, en effet, omniprésente dans notre quotidien, de par les vêtements que nous portons, l'utilisation de produits cosmétiques, ou encore ne serait-ce que par son rôle majeur dans la production agroalimentaire. Elle représente, de plus, un facteur clé dans de nombreux secteurs d'innovation à haute valeur ajoutée, telle que les domaines automobile ou encore pharmaceutique. Ces deux dernières années, l'apparition de maladies émergentes telles la COVID-19 a démontré l'importance de la chimie dans le domaine de la recherche, notamment pour la mise au point des médicaments et des vaccins de demain. Cependant, avec le contexte climatique actuel, il est désormais évident que toute activité doit prendre en considération son influence sur l'environnement. Cela est d'autant plus vrai pour l'industrie chimique puisqu'elle est à l'origine de la plupart des produits manufacturés, et par conséquent de la pollution mondiale. A titre d'exemple, la plupart des réactions d'oxydation d'hydrocarbure sont encore réalisées soit dans des conditions drastiques c'est à dire à des températures et pression élevées, ou nécessitent l'utilisation de métaux nobles onéreux, toxiques et peu abondants.

Ainsi, après environ deux siècles de prospérité et de développement, l'industrie chimique est aujourd'hui confrontée à un défi de taille : repenser la plupart de ses procédés afin de promouvoir le développement de procédés plus respectueux de l'environnement. C'est ainsi que dans les années 1990, Anastas et Warner, ont introduit le concept de « chimie verte », préconisant le développement d'une chimie plus respectueuse de l'environnement.<sup>1</sup> Pour cela douze principes ont été introduits s'appuyant sur les quatre axes suivants :

- Limiter la pollution à la source en réduisant l'utilisation de solvants et d'auxiliaires, tel que des groupements protecteurs, afin de développer des synthèses plus économes en termes d'atomes,
- Diminuer la toxicité des réactions *via* l'utilisation de produits et solvants moins toxiques,
- Réduire les dépenses énergétiques en prônant l'utilisation de ressources biodégradables et en **développant des catalyseurs** permettant de réaliser les réactions dans des conditions plus douces,
- Prévenir les dangers par la mise au point de méthodes d'analyse en temps réel.

Parmi les nombreux procédés ayant depuis été mis au point pour respecter les principes de la chimie verte, nous pouvons citer par exemple la production d'Ibuprofène par la société BHC.<sup>2</sup> Le procédé historique Boots, développé dans les années 1960, comportant de nombreuses étapes réactionnelles et impliquant la formation de nombreux sous-produits, a, en effet, été

---

<sup>1</sup> Anastas, P., Eghbali, N., *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301-312.

<sup>2</sup> Murphy, M. A., *Found Chem* **2018**, 20, 121-165.

remplacé par une nouvelle voie de synthèse catalytique, plus éco-responsable, comme représentée sur la Figure 1.

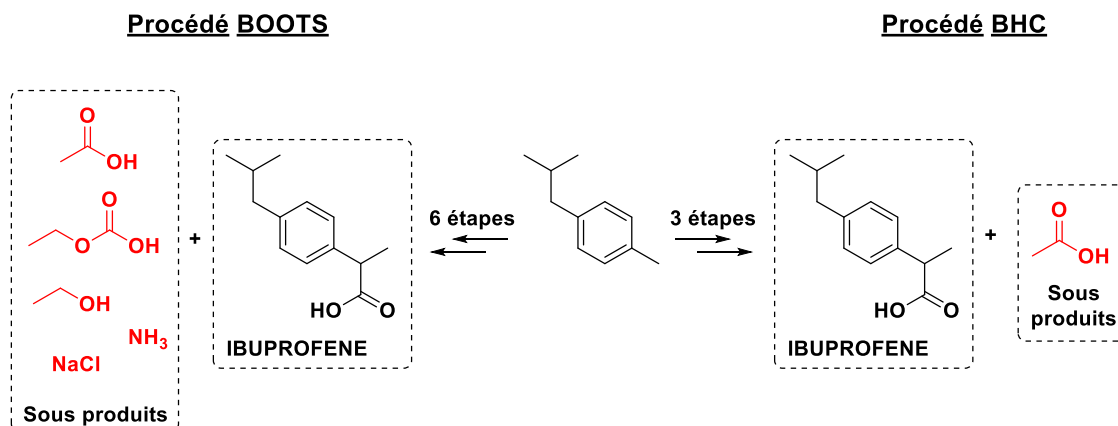


Figure 1 : Comparaison des procédés BOOTS et BHC pour la production d'Ibuprofène.

De nombreuses études se sont notamment focalisées sur le domaine des réactions d'oxydations, *i.e.* sur la mise en place de réactions catalytiques efficaces et stables, compatibles en conditions douces. L'oxydation sélective d'alcènes et de thioéthers représentent en effet des étapes clés pour la synthèse de nombreux produits à haute valeur ajoutée dans le domaine pharmaceutique, avec par exemple la production de l'Atazanavir<sup>3</sup> (agent antiviral) ou de l'Oméprazole<sup>4</sup> (utilisé dans le traitement d'ulcère gastrique) (Figure 2).

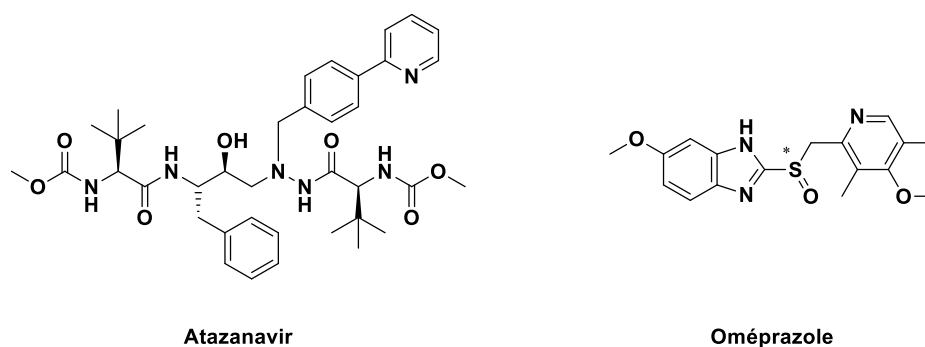


Figure 2 : Molécules d'Atazanavir (à gauche) et d'Oméprazole (à droite).

Tandis que des efforts sont faits pour mettre au point de nouveaux catalyseurs susceptibles de réaliser ces réactions dans des conditions plus douces et éco-responsables, une des stratégies retenues par les chercheurs est tout simplement de s'inspirer du modèle universel : la Nature.

<sup>3</sup> Fuster, D., Clotet, B., *Expert Opin. Pharmacother.* **2005**, *6*, 1565–1572.

<sup>4</sup> Massoomi, F., *Pharmacother.* **1993**, *13*, 14.

## II. Les métalloenzymes artificielles, de nouveaux biocatalyseurs

### II.1. Concept général

Les principales approches catalytiques pour obtenir des composés chiraux purs sont la catalyse homogène, qui comprend la catalyse par les métaux de transitions,<sup>5</sup> l'organocatalyse,<sup>6</sup> et la biocatalyse.<sup>7</sup> Ces différentes approches se sont développées en parallèle, en tant que domaines distincts, et ce n'est que dernièrement que l'idée de les combiner a émergée.<sup>8</sup> Les enzymes sont connues comme étant des biocatalyseurs naturels très efficaces, capables de catalyser de façon énantio- et régio-sélective différentes réactions en conditions douces. Cependant, le panel de réactions possibles est limité par la nature des métaux de transitions naturellement présents.<sup>9</sup> Ainsi, au cours des dernières décennies, de nombreux efforts ont été déployés afin de combler l'écart entre ces domaines, donnant ainsi naissance aux métalloenzymes artificielles (noté MeAr). Il s'agit de catalyseurs hybrides dans lesquels un complexe métallique de transition, catalytiquement actif, est incorporé dans une bio-macromolécule « hôte », généralement une protéine<sup>10</sup> ou de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique).<sup>11</sup> Une métalloenzyme est alors composée de deux sphères de coordination qui lui confèrent ses propriétés de catalyse et de sélectivité (Figure 3).

La première sphère est composée d'un ligand capable de chélater le métal. Le choix du complexe métallique est fait en fonction du type de réaction souhaitée (hydrogénation, cyclopropanation, oxydation ...).

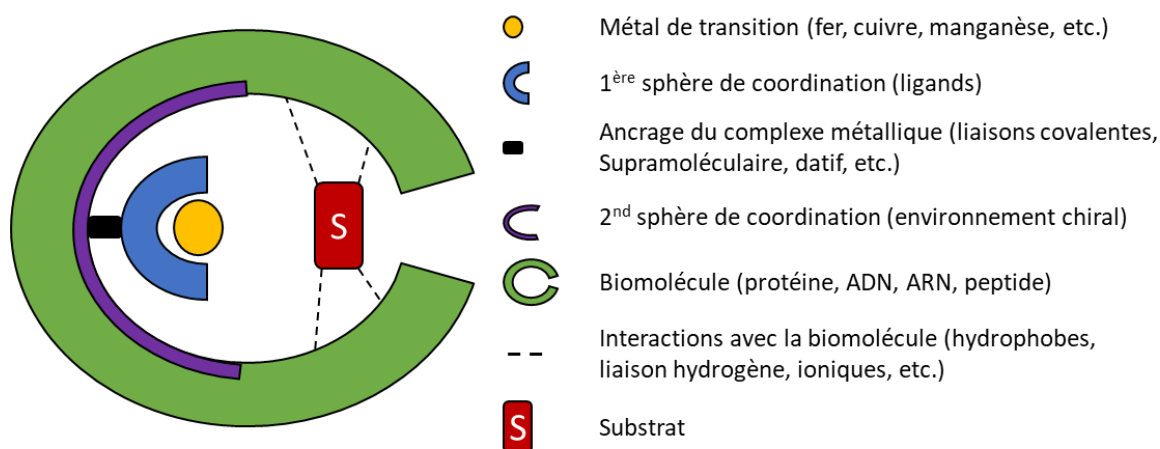


Figure 3 : Représentation schématique du concept général d'une métalloenzyme artificielle.

<sup>5</sup> Jacobsen, E. N., *Comprehensive Asymmetric Catalysis*, Springer, Berlin, 2000.

<sup>6</sup> Seayad, J., List, B., *Org. Biomol. Chem.* 2005, 3, 719.

<sup>7</sup> Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011.

<sup>8</sup> (a) Reetz, M. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004, 101, 5716-5722 ; (b) Perez-Rizquez, C., Rodriguez-Otero, A., Palomo, J. M., *Org. Biomol. Chem.* 2019, 17, 7114-7123; (c) Thomas, C. M., Ward, T. R., *Chem. Soc. Rev.* 2005, 34, 337.

<sup>9</sup> Lewis, J. C., *ACS Catalysis* 2013, 3, 2954-2975.

<sup>10</sup> Steinreiber, J., Ward, T. R., *Coord. Chem. Rev.* 2008, 252, 751-66.

<sup>11</sup> Roelfes, G., *Mol. BioSyst.* 2007, 3, 126-135.

Contrairement à la méthodologie employée en catalyse inorganique, ce ne sont pas des ligands chiraux autour de l'ion métallique qui vont définir la sélectivité de la réaction, mais une seconde sphère de coordination, constituée d'acides aminés ou de nucléotides. Ainsi, la combinaison d'interactions fournies par l'échafaudage biomoléculaire, telles que des liaisons hydrogènes et/ou des interactions hydrophobes, contribuent de manière importante à l'activité et à la sélectivité catalytiques. La seconde sphère de coordination est donc, généralement, responsable de la discrimination chirale ; elle peut induire une sélectivité dans les réactions catalysées en complétant structurellement l'état de transition vers un énantiomère du produit et/ou en dirigeant un réactif chimique vers une face prochirale d'un substrat. La seconde sphère de coordination protège, le plus souvent, la première sphère des dégradations dues au milieu réactionnel.

La synthèse de métalloenzymes artificielles vise ainsi à exploiter les interactions de la deuxième sphère de coordination pour créer des complexes de métaux de transition qui présentent des activités et des sélectivités de type enzymatique.

## II.2. Choix de la biomolécule

Lors de la conception de MeAr, plusieurs paramètres tels que la disponibilité, la stabilité ou encore les informations structurales de la biomolécule, sont à prendre en compte. Il est, en effet, primordial de pouvoir facilement synthétiser, ou se procurer, la bio-macromolécule pour réaliser les nombreux tests de conditions opératoires nécessaires. De plus, la structure doit être assez stable, vis-à-vis des conditions de réactions, afin de conserver l'efficacité catalytique ainsi que la sélectivité. De ce fait, le choix de la biomolécule est déterminant lors de la conception de MeAr.

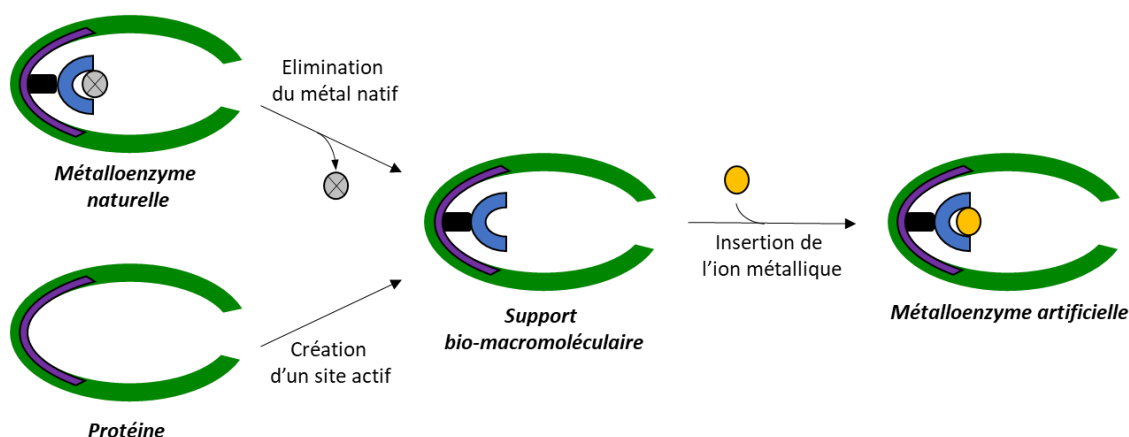
Il est possible de trouver dans la littérature de nombreuses études décrivant la conception de nouvelles MeAr à partir de supports protéiques, les métalloenzymes naturelles. Les stratégies de synthèses les plus courantes sont la substitution de l'ion métallique par un complexe catalytiquement actif<sup>12</sup> et la création de nouveaux sites catalytique par mutagénèse dirigée, génétique ou chimique (Figure 4).<sup>13</sup> Les ligations entre le complexe métallique et l'hôte biomoléculaire peuvent être covalentes, datives ou supramoléculaires.<sup>14</sup> Cependant chacune de ces méthodes nécessite une étude approfondie - par RMN, cristallographie et/ou modélisation moléculaire - de la structure de la protéine. Il est, en effet, nécessaire de pouvoir sélectivement modifier les sites catalytiques tout en observant les conséquences sur le repliement de la structure. Or, les protéines étant des macrostructures particulièrement complexes, elles doivent être manipulées dans des conditions bien définies afin de ne pas

<sup>12</sup> (a) Fernández-Gacio, A., Codina, A., Fastrez, J., Riant, O., Soumillion, P., *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1013-1016; (b) Okrasa, K., Kazlauskas, R. J., *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1587-1596; (c) Kaiser, E., Lawrence, D., *Science* **1984**, *226*, 505-511; (d) Jing, Q., Okrasa, K., Kazlauskas, R. J., *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1370-1376.

<sup>13</sup> Fujieda, N., Schätti, J., Stutfeld, E., Ohkubo, K., Maier, T., Fukuzumi, S., Ward, T. R., *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4060-4065.

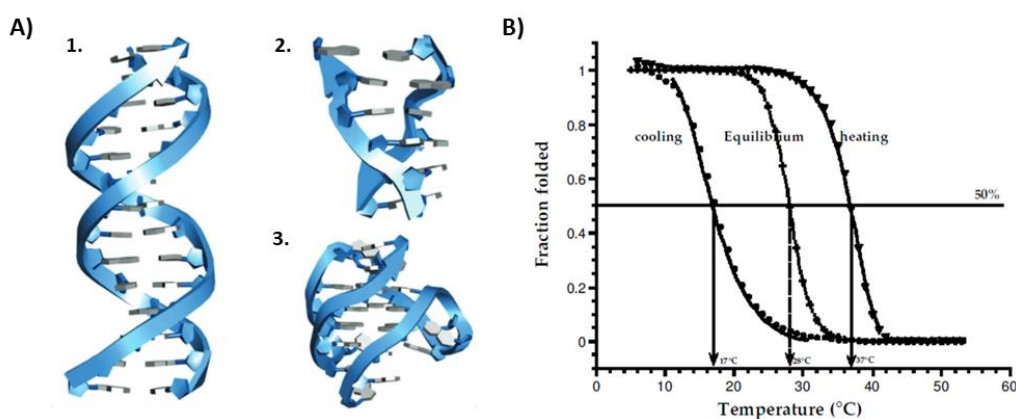
<sup>14</sup> (a) Cherrier, M. V., Girgenti, E., Amara, P., Iannello, M., Marchi-Delapierre, C., Fontecilla-Camps, J. C., Ménage, S., Cavazza, C., *J Biol Inorg Chem* **2012**, *17*, 817-829; (b) Marchi-Delapierre, C., Rondot, L., Cavazza, C., Ménage, S., *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 61-75; (c) Davis, H. J., Ward, T. R., *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 1120-1136.

dénaturer l'organisation de la 2<sup>nd</sup>e sphère de coordination, la dénaturation étant le plus souvent irréversible.<sup>15</sup>



**Figure 4** : Conception d'une métalloenzyme artificielle protéique par substitution de l'ion métallique ou par création d'un nouveau site catalytique. Figure inspirée du chapitre : *Preparation of Artificial Metalloenzymes* ; issu du livre : *Artificial Metalloenzymes and MetalloDNAzymes in Catalysis* (eds D. Montserrat, B. Jan-E. and P. Oscar).

Bien que l'ADN ne possède qu'une diversité chimique (*i.e.* quatre bases nucléiques) limitée par rapport aux protéines et enzymes, il a pu être montré qu'en présence d'un cofacteur métallique il pouvait catalyser des réactions. La seconde sphère de coordination est alors procurée par la structure tri-dimensionnelle de la molécule d'ADN (Figure 5A). De plus, les oligonucléotides étant accessibles par voie chimique, ils peuvent aisément être modifiés/adaptés, pour la conception de MeAr. Enfin, il a été montré que, contrairement aux protéines, les structures d'ADN sont capables de se restructurer, après dénaturation thermique (Figure 5B).<sup>16</sup>



**Figure 5** : (A) Représentation de différentes structures d'ADN : 1. ADN B ; 2. ADN Z ; 3. G-quadruplexe. Figure issue de la publication Yum, J. H., Park, S., Sugiyama, H., *Org. Biomol. Chem.* 2019. (B) Courbe de dénaturation et de renaturation d'une séquence d'ODN. Figure issue de la publication : Mergny, J.-L., Lacroix, L., *Oligonucleotides* 2003, 13, 515–537.

<sup>15</sup> Musil, M., Konegger, H., Hon, J., Bednar, D., Damborsky, J., *ACS Catal.* 2019, 9, 1033-1054.

<sup>16</sup> Mergny, J.-L., Lacroix, L., *Oligonucleotides* 2003, 13, 515-537.



Ainsi, lors de ces travaux de thèse, il a été décidé de se focaliser sur l'utilisation de structures d'acides nucléiques, plus particulièrement les G-quadruplexes (*vide infra*), comme supports biomoléculaires pour la conception de MeAr. Les interactions avec les complexes catalytiques sont alors principalement de type supramoléculaire.

### III. Les G-quadruplexes comme supports bio-macromoléculaires

#### III.1. Rappels sur les acides nucléiques

La structure des sels d'ADN (ADN B, Figure 5A 1.), plus tard identifiés comme étant le support de notre information génétique, a été découverte en 1953 par J. Watson et F. Crick.<sup>17</sup> Il ne faudra pas attendre bien longtemps pour que M. Wilkins<sup>18</sup> et R. Franklin<sup>19</sup> publient chacun une analyse par diffraction des rayons X de cristaux d'ADN, montrant que l'ADN est constitué de différentes bases azotées. Selon la nature de leur hétérocycle, il est possible de classer les bases en différentes catégories. Ainsi on nommera bases pyrimidiques les bases azotées dérivant de la pyrimidine et bases puriques celles provenant de la purine (Figure 6). On retrouve dans la première catégorie la cytosine, la thymine et l'uracile. Il est important de noter que l'uracile est absente de l'ADN eucaryote et donc caractéristique de l'ARN (Acide RiboNucléique). Dans la deuxième catégorie, on retrouve l'adénine, la guanine et l'hypoxanthine (I). Cette dernière est plus rare et seulement présente dans certains acides nucléiques tel les ARN de transfert (notés ARN<sub>t</sub>).

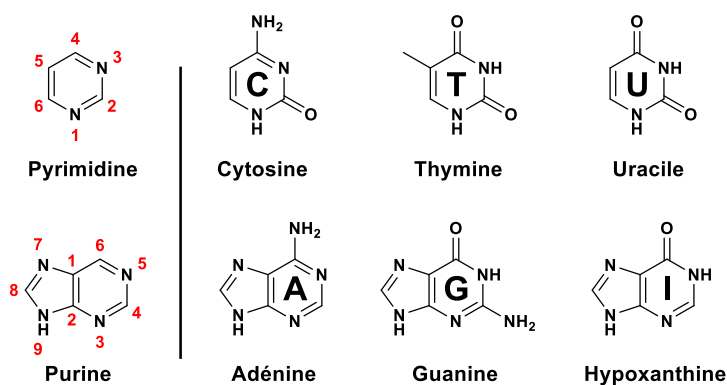


Figure 6 : Représentation des bases azotées.

L'enchaînement de plusieurs nucléotides, composés d'un résidu phosphate, d'un dérivé saccharidique (désoxyribose) et d'une base azotée hétérocyclique, est appelé oligo-désoxyribonucléotide (noté ODN) comme représenté sur la Figure 7.<sup>20</sup> On nomme alors, respectivement, cytidine (C), thymidine (T), uridine (U), adénosine (A) et guanosine (G) les nucléotides correspondant aux bases nucléiques présentées précédemment. Différentes structurations peuvent alors être adoptées par les brins d'ODN, selon la composition et la conformation de chacun des nucléotides qui les composent. Ces structures secondaires sont

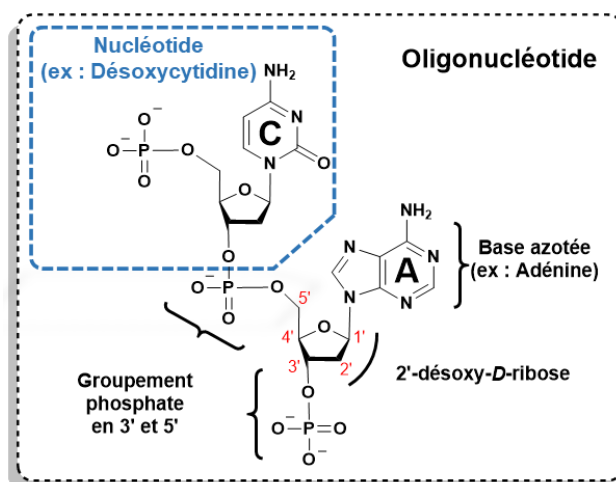
<sup>17</sup> Crick, W., *Nature* **1953**, *171*, 737-738.

<sup>18</sup> Wilkins, M., Hugh, Frederick, Stokes, A. R., Wilson, H. R., *Nature* **1953**, *171*, 738-740.

<sup>19</sup> Franklin, R. E., Gosling, R. G., *Nature* **1953**, *171*, 740-741.

<sup>20</sup> Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D., Williams, D. M., Eds., in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, RSC, Cambridge, **2007**, pp. 13-76.

le résultat d'empilement par «  $\pi$ -stacking » et d'interactions de type hydrogène entre les différentes nucléobases.



**Figure 7 :** Structure et exemple d'un oligonucléotide.

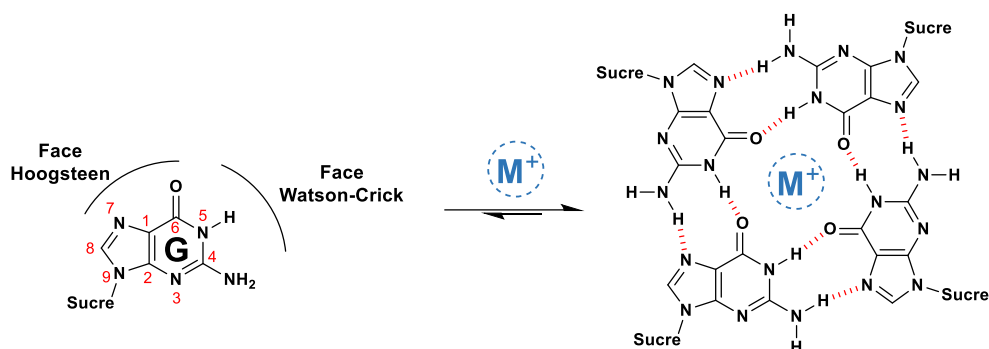
Parmi les nombreuses structures secondaires possibles, un intérêt particulier est alors porté sur des structures tétraplexes de guanosine, les G-quadruplexes, notamment pour leur implication dans les mécanismes de régulation au sein du génome humain.<sup>21</sup> Leur polymorphisme important en fait un choix particulièrement intéressant pour la conception de MeAr dans le but de réaliser des catalyses asymétriques.<sup>22</sup>

### III.2. Les G-quadruplexes

Les G-quadruplexes sont, comme leur nom l'indique, des tétraplexes de guanine qui doivent leur formation à la particularité de ces dernières. En effet, les guanines peuvent former au moins deux liaisons hydrogènes sur chacune de leurs faces, rendant ainsi possible la formation de tétrades apolaires. Les interactions se font donc par liaisons hydrogènes de la face donatrice Watson Crick vers la face Hoogsteen (Figure 8). La structure est le plus souvent stabilisée en présence d'un cation qui interagit avec les atomes d'oxygène O6 des guanines, et réduit donc les forces de répulsions électrostatiques.

<sup>21</sup>(a) Neidle, S., Parkinson, G. N., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 275–283; (b) Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., Prescott, D. M., *Nature* **1991**, *350*, 3.

<sup>22</sup> Yum, J. H., Park, S., Hiraga, R., Okamura, I., Notsu, S., Sugiyama, H., *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 2548-2553.



**Figure 8 :** Formation d'une tétrade de guanosines.

Afin de limiter les interactions avec le solvant et ainsi gagner en stabilité, les tétrades de guanosines peuvent s'associer par «  $\pi$ -stacking » formant ainsi une structure stable, polarisée par enrichissement en électrons de la partie aromatique tandis que les hydrogènes extérieurs en sont appauvris.<sup>23</sup> Les structures composées d'au moins deux tétrades de guanosines sont appelées G-quadruplexes. Elles peuvent être formées par un seul (intramoléculaire), deux (bimoléculaire) ou quatre ODNs (tétramoléculaire), comportant chacun plusieurs guanosines successives. En fonction de l'orientation des différents brins d'ODN, il est alors possible de définir plusieurs conformations ou topologies : parallèle, antiparallèle et hybride [3+1] (Figure 9). Les différents paramètres influant sur chacune des topologies sont discutés au chapitre II.

<sup>23</sup> Neidle, S., Balasubramanian, S., Eds., in *Quadruplex Nucleic Acids*, RCS, Cambridge, **2006**, pp. 1–30.

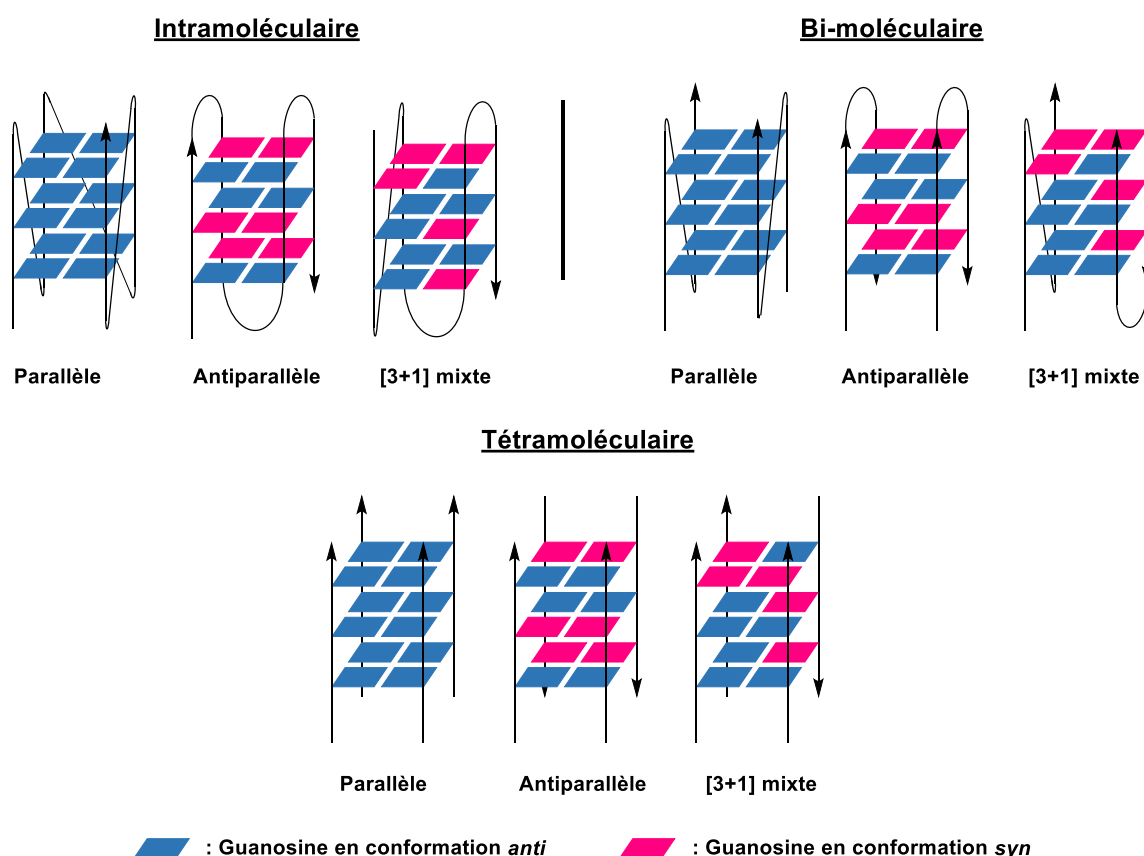


Figure 9 : Exemple de représentation de G-quadruplexes (A) Intramoléculaire, (B) bimoléculaire ou (C) tétramoléculaire.

### III.3. Utilisation de G-quadruplexes en catalyse

En 2005, l'équipe de G. Roelfes et B.L. Feringa a décrit pour la première fois l'utilisation d'ADN double brins comme auxiliaire chiral, pour une réaction de Diels-Alder, entre une azachalcones et le cyclopentadiène.<sup>24</sup> Depuis, de nombreux autres exemples de transformations énantiosélectives, telles que des réactions de Friedel & Craft,<sup>25</sup> des additions de Michael,<sup>26</sup> ou encore des cyclopropanations<sup>27</sup> ont été décrites. Par conséquent, le potentiel d'utilisation, en tant qu'auxiliaire chiral des autres structures pouvant être adoptées par les acides nucléiques, en particulier les G-quadruplexes (G4s), suscite un intérêt croissant.

#### III.3.1. Catalyse asymétrique

L'utilisation de G-quadruplexes avec du nitrate de cuivre(II),<sup>28</sup> ou des complexes de cuivre (II) de type bipyridine,<sup>29</sup> terpyridine,<sup>30</sup> ou encore de type porphyrine (noté TMPyP4, pour

<sup>24</sup> Roelfes, G., Feringa, B. L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3230–3232.

<sup>25</sup> (a) Boersma, A. J., Feringa, B. L., Roelfes, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3346–3348 ; (b) Park, S., Ikehata, K., Watabe, R., Hidaka, Y., Rajendran, A., Sugiyama, H., *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10398.

<sup>26</sup> (a) Li, Y., Wang, C., Jia, G., Lu, S., Li, C., *Tetrahedron* **2013**, *69*, 6585–6590 ; (b) Guo, J., Wang, D., Pantatosaki, E., Kuang, H., Papadopoulos, G. K., Tsapatsis, M., Kokkoli, E., *JACS Au* **2022**, *2*, 483–491.

<sup>27</sup> Rioz-Martínez, A., Oelerich, J., Ségaud, N., Roelfes, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14136–14140.

<sup>28</sup> Wang, C., Jia, G., Zhou, J., Li, Y., Liu, Y., Lu, S., Li, C., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9352–9355.

<sup>29</sup> Roe, S., Ritson, D. J., Garner, T., Searle, M., Moses, J. E., *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4309.

<sup>30</sup> Li, Y., Cheng, M., Hao, J., Wang, C., Jia, G., Li, C., *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5578–5585.

tétra-(N-méthyle-4-pyridyl)porphyrine),<sup>31</sup> lors de la catalyse asymétrique de réactions de type Diels-Alder, montre des caractéristiques intéressantes (Schéma 1). **L'efficacité de la catalyse, i.e. en termes de rendement et d'excès énantiomériques (noté ee), dépend fortement de la topologie du G-quadruplexe**, ainsi que de la nature du complexe métallique (Tableau 1).

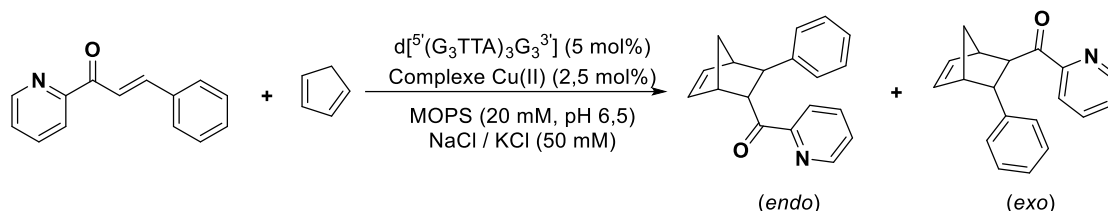


Schéma 1

En effet, on observe que lors de la réaction de Diels-Alder avec du nitrate de cuivre(II), les topologies parallèle et hybride [3+1] favorisent le même énantiomère, tandis que l'excès énantiomérique est inversé en présence de la topologie antiparallèle (Tableau 1, entrées 1-3). De la même manière, il semble que la nature de la topologie majoritairement adoptée par le G-quadruplexe puisse influencer sur l'efficacité de la catalyse. Des rendements et ee moins importants sont observés, en présence du complexe TMPyP4-Cu, avec la topologie hybride [3+1] par rapport à la topologie antiparallèle.

L'influence de la topologie du G4 sur les efficacités et les ee a été confirmée avec les réactions de Friedel & Craft<sup>32</sup> et les additions de Michael.<sup>33</sup>

**Tableau 1** : Influence de la topologie sur l'efficacité catalytique de la réaction de Diels-Alder, en présence de complexes de cuivre(II).

Entrée	Complexe catalytique	Conditions	Topologie de G-quadruplexe	Rendement (%)	e.e % (endo)
1	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	PEG (50 %wt)	Parallèle	97	47 <sup>28</sup>
2	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	50 mM KCl	Hybride [3+1]	97	44 <sup>28</sup>
3	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	50 mM NaCl	Antiparallèle	99	-74 <sup>28</sup>
4	TMPyP4-Cu	50 mM NaCl	Antiparallèle	97	58 <sup>31</sup>
5	TMPyP4-Cu	50 mM KCl	Hybride [3+1]	83	10 <sup>31</sup>
6	Terpyridine -Cu	50 mM NaCl	Antiparallèle	54	54 <sup>30</sup>
7	Terpyridine -Cu	50 mM KCl	Hybride [3+1]	48	49 <sup>30</sup>

Les réactions de catalyse ont été réalisées dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 6,5), en présence de 50 mM d'une solution saline. Le G-quadruplexe « HT21 » ( $d[5](GGG(TTAGGG)_3]3'$ ) est introduit avec une proportion de 5 mol% et le complexe de cuivre(II) avec une proportion de 2,5 mol%.

<sup>31</sup> Wilking, M., Hennecke, U., *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6940.

<sup>32</sup> Wang, C., Li, Y., Jia, G., Liu, Y., Lu, S., Li, C., *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6232.

<sup>33</sup> (a) Zhao, H., Shen, K., *Biotechnol. Prog.* **2016**, *32*, 891–898 ; (b) Dey, S., Jäschke, A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11279–11282.

### III.3.2. Catalyse d'oxydation

En 1998, Sen et ses collaborateurs ont décrit la première utilisation d'un G-quadruplexe, comme auxiliaire de catalyse, lors d'une réaction d'oxydation. Ainsi, il a pu être observé qu'en présence du G-quadruplexe et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comme oxydant, l'hémine, co-facteur naturel de la peroxydase, montre une plus grande activité oxydante que lorsqu'elle est isolée.<sup>34</sup> L'activité du complexe G-quadruplexe - hémine, que l'on nommera nucléo-hémine, a été testée pour des réactions d'oxydation en présence de peroxyde d'hydrogène. De très bons rendements ont pu être obtenus, notamment pour la réaction qui servira de référence pour cette thèse, la sulfoxydation du thioanisole avec 85 % de conversion (Schéma 2).

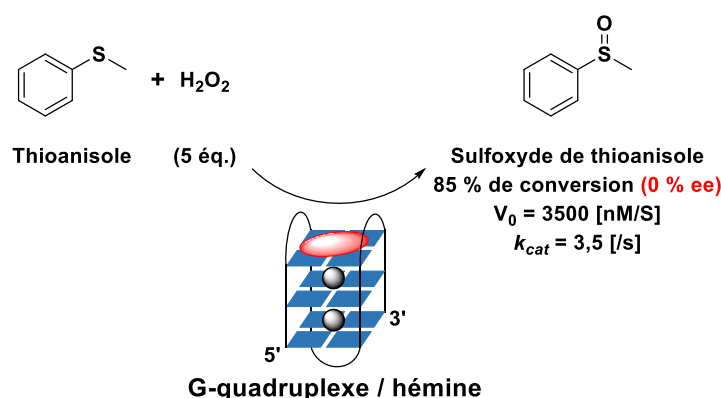


Schéma 2

Ce catalyseur a notamment pu être utilisé pour catalyser l'oxydation de substrats chromogènes pour des applications de biosenseurs,<sup>35</sup> en tant que mème de NADH-oxydase,<sup>36</sup> ou encore comme décontaminant d'eaux usées industrielles.<sup>37</sup> Il s'agit des premières utilisations de G-quadruplexes en catalyse. **Cependant, aucune induction asymétrique n'a pu être observée lors de ces différentes réactions.**

A notre connaissance, il n'existe, à ce jour, qu'une seule publication traitant d'une réaction d'oxydation asymétrique, en présence de G-quadruplexes. Can Li *et coll.* a, en effet, pu montrer qu'il est possible de réaliser la sulfoxydation asymétrique de dérivés de thioanisole en présence d'une séquence télomérique humaine. Cette publication est analysée et commentée au chapitre III.

## IV. Présentation du projet

Les G-quadruplexes peuvent adopter plusieurs topologies, selon les conditions d'utilisation en solution. Bien qu'il soit possible de déplacer l'équilibre vers une des conformations, il est important de comprendre qu'il existe constamment un équilibre entre chacune d'entre elles. Or, les résultats observés lors des différentes réactions de catalyse asymétrique, en présence

<sup>34</sup> Travascio, P., Li, Y., Sen, D., *Chem. Biol* **1998**, 5, 505-517.

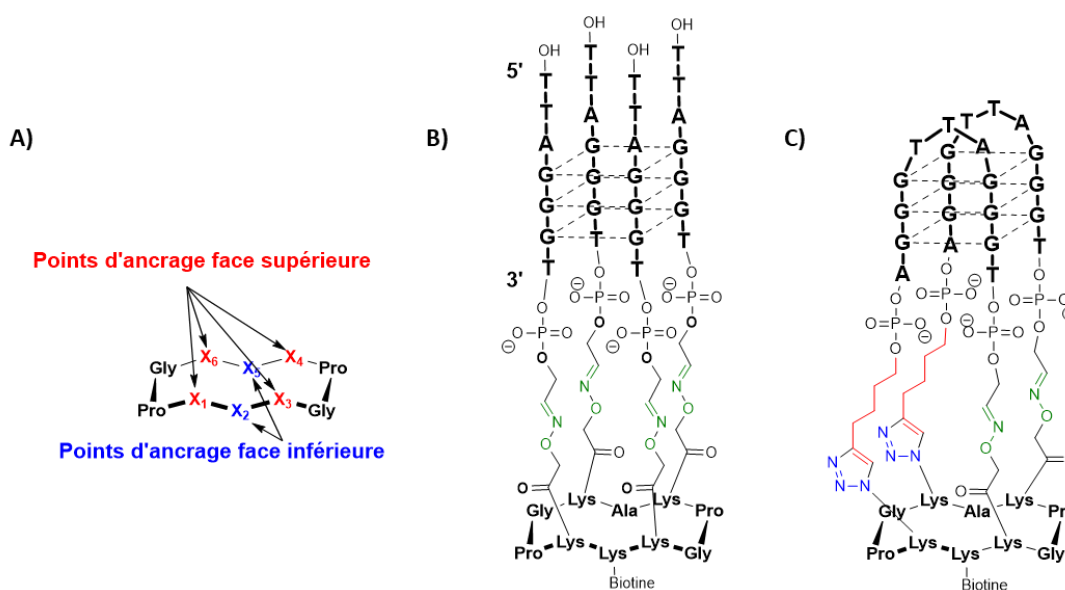
<sup>35</sup> Kosman, J., Juskowiak, B., *Anal. Chim. Acta* **2011**, 707, 7-17.

<sup>36</sup> Golub, E., Freeman, R., Willner, I., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 11710-11714.

<sup>37</sup> Guo, Y., Chen, J., Cheng, M., Monchaud, D., Zhou, J., Ju, H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 16636-16640.

de G-quadruplexes, témoignent de l'importance de la topologie dans le contrôle de l'énantiosélectivité. Ainsi, bien que le polymorphisme des G-quadruplexes offre une grande variété de conformations possibles pour l'élaboration de catalyseur chiraux, l'existence d'inductions asymétriques antagonistes, selon la topologie adoptée, représente un handicap non négligeable.

Dans ce contexte, la conception de mimes de G-quadruplexes à topologie définie, se révèle être une stratégie intéressante pour l'élaboration de catalyseur chiraux. Il a pu être montré, au sein du laboratoire I<sub>2</sub>BM, que l'utilisation d'un support cyclodécapeptide « RAFT » (Figure 10A) (pour Regioselectively Addressable Functionalized Template) permet de contraindre la conformation du G-quadruplexe, empêchant celle-ci de varier selon les conditions de réaction (Figure 10B et C). Des gains de stabilité importants sont aussi observés, par rapport aux structures non contraintes. L'utilisation de telles structures devrait alors permettre d'améliorer l'efficacité catalytique, et faciliter l'étude de l'influence de chaque topologie sur l'induction asymétrique, celle-ci étant contrainte. De plus, dans le but d'accroître le panel de réactifs disponibles lors des réactions de catalyse, il est supposé que le gain de stabilité de ces structures permette l'utilisation de différents solvants organiques lors des réactions de catalyse, sans perturber la topologie des G-quadruplexes.



**Figure 10** : (A) Représentation du support cyclodécapeptide « RAFT », ainsi que des différentes positions d'ancrage. (B) Mimes de G-quadruplexes contraints en topologie parallèle<sup>38</sup> et (C) antiparallèle.<sup>39</sup>

Ces travaux de thèse s'organisent donc en trois chapitres (Figure 11). La synthèse de mimes de G-quadruplexes contraints en topologies parallèle et antiparallèle est décrite dans le chapitre I. Les différentes techniques de bio-ligation sur le support cyclodécapeptide RAFT sont décrites et analysées. Plusieurs perspectives de nouvelles ligations, ainsi que de

<sup>38</sup> Murat, P., Bonnet, R., Van der Heyden, A., Spinelli, N., Labbé, P., Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.-P., Dumy, P., Defrancq, E., *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6106-6114.

<sup>39</sup> Bonnet, R., Lavergne, T., Gennaro, B., Spinelli, N., Defrancq, E., *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4850-4853.

structures, sont abordées en fin de chapitre. Le chapitre II est consacré à l'étude par dichroïsme circulaire de tous les édifices de G-quadruplexe synthétisés. Une étude thermodynamique des structures contraintes et libres, parallèles et antiparallèles, est faite afin de déterminer le gain de stabilité apporté par la contrainte. L'effet sur la topologie de la présence de solvants organiques, tel que l'acétonitrile, est discuté. Une partie bibliographique, en début de chapitre, explique la méthode d'analyse par dichroïsme circulaire pour les G-quadruplexes. Enfin, est abordée dans le chapitre III la réaction de sulfoxydation asymétrique en présence de G-quadruplexes. Les conditions de réaction sont, dans un premier temps, commentées, puis l'influence de chaque topologie du G-quadruplexe est discuté *via* l'utilisation des structures contraintes. Afin de déterminer l'apport de la contrainte, vis-à-vis de l'efficacité catalytique, *i.e.* des rendements et ee, chaque réaction est faite en présence des mimes contraints et des G-quadruplexes équivalents libres.

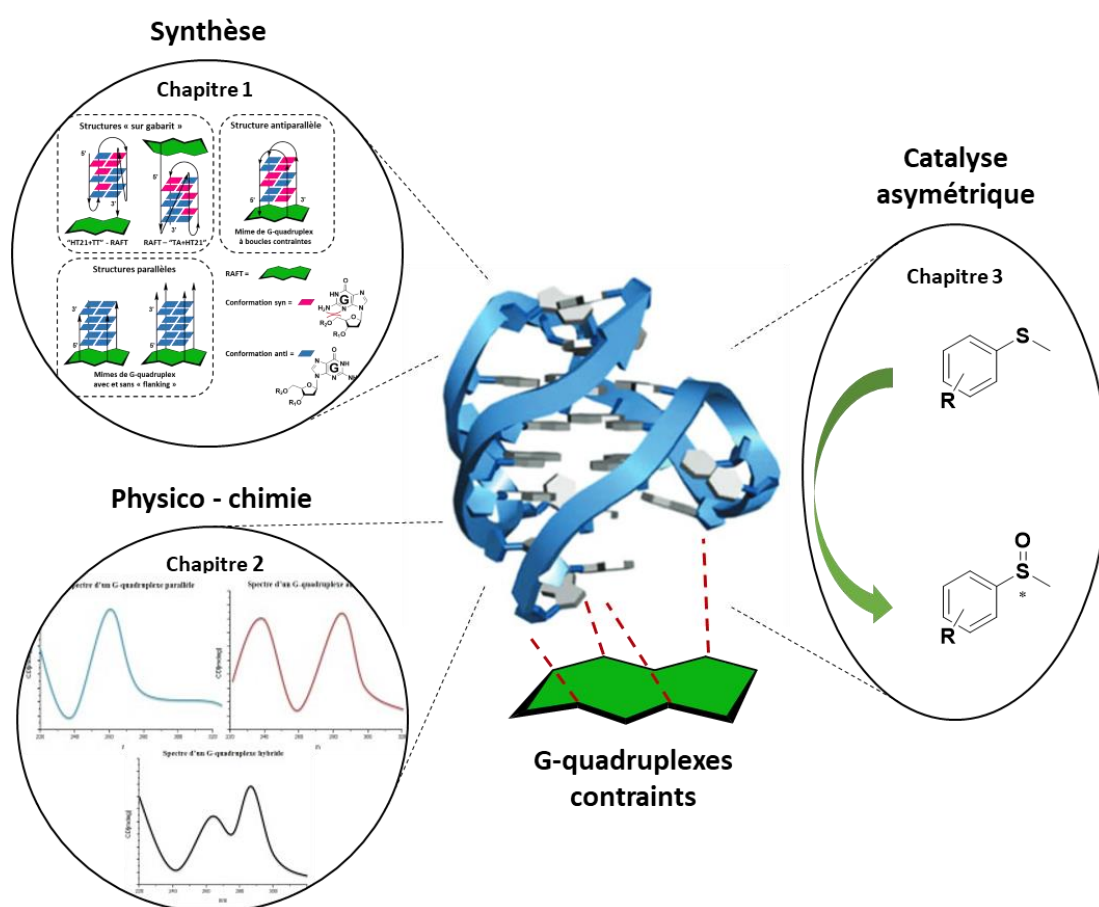


Figure 11 : Représentation des différents chapitres composant cette thèse.



---

# Chapitre I : Synthèse de G-quadruplexes contraints

---

## I. Introduction

Ce chapitre I est consacré à la description des synthèses qui ont pu être réalisées au cours de cette thèse. Une très large partie est consacrée à l'élaboration des structures contraintes de G-quadruplexes qui serviront lors des catalyses asymétriques. Ces structures ont été réalisées par bio-conjugaison de séquences d'oligo-désoxyribonucléotides (noté ODN) avec des gabarits peptidiques. On nomme ces derniers RAFT, pour « Regioselectively Adressable Functionalized Template ». Deux structures « sur gabarit », plusieurs mimes de G-quadruplexes contraints en topologie parallèle ainsi qu'en topologie antiparallèle ont pu être synthétisés, comme représentés sur la Figure 12. Les généralités sur la synthèse peptidique, la synthèse de brin d'ODN ainsi que sur les ligations bio-orthogonales sont abordées en début de chapitre.

Enfin, une plus petite partie de ce chapitre est consacrée à la synthèse du complexe de cuivre utilisé lors des réactions de sulfoxydation. Les différentes stratégies explorées dans l'optique d'un ancrage du complexe sur les mimes de G-quadruplexes sont brièvement abordées.

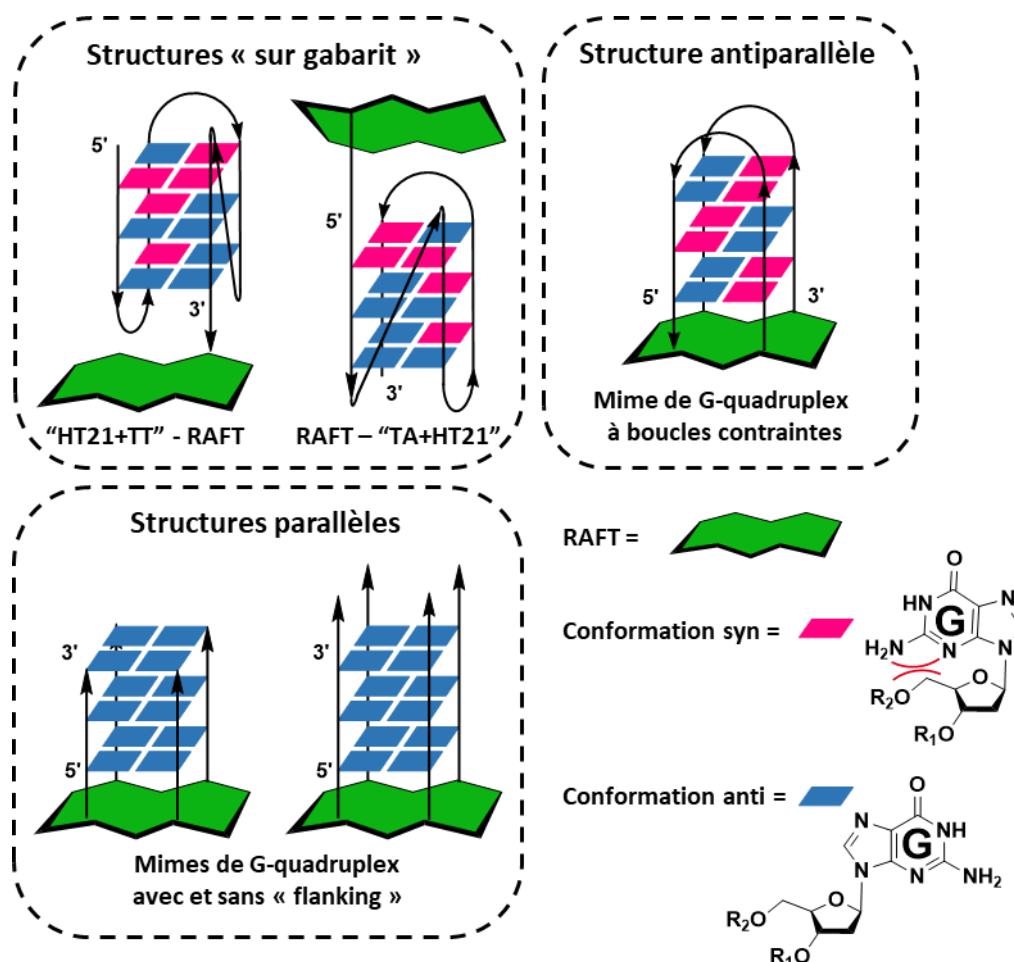


Figure 12: Représentation des mimes de G-quadruplexes.

### I.1. Généralités sur la synthèse peptidique

Toutes les synthèses peptidiques effectuées ont été réalisées sur phase solide (noté SPPS pour Synthèse Peptidique en Phase Solide) selon les principes décrits par R. B. Merrifield en 1960.<sup>40</sup> Cette méthode présente l'avantage de pouvoir facilement agrandir une séquence peptidique greffée sur une résine, en réalisant successivement des étapes de couplages peptidiques et de déprotections. L'élongation se fait dans le sens du C-terminal vers le N-terminal et chaque étape correspond à l'ajout d'un nouvel acide aminé, en présence d'un agent activateur et d'une base. Les excès de réactifs sont facilement éliminés par lavage après chaque étape, la séquence peptidique restant accrochée à la résine. Afin de garantir l'ajout d'un seul acide aminé par couplage, les fonctions amines en position  $\alpha$  sont protégées par un groupement protecteur. Après chaque couplage vient une étape de déprotection de l'amine en  $\alpha$  du dernier acide aminé ajouté, permettant le couplage suivant. Il est bien entendu nécessaire que les chaînes latérales réactives soient protégées par des groupements orthogonaux, compatibles avec les conditions de couplage et de déprotection utilisées. Une fois la séquence peptidique terminée, celle-ci est décrochée de la résine selon des conditions propres au type de résine utilisé. On obtient alors un peptide linéaire.

La stratégie utilisée au sein du laboratoire est la stratégie dites « Fmoc/tBu » (Fmoc : fluorénylméthoxycarbonyle/ tBu : *tert*-butyle). De ce fait, les acides aminés utilisés sont protégés en position  $\alpha$  par un groupement Fmoc qui peut être éliminé par  $\beta$ -élimination en présence de 10 % de pipéridine dans le *N,N*-diméthylformamide (DMF). Le plus souvent, les réactions sont effectuées en présence de l'agent de couplage benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) et de la base *N,N*-diisopropyléthylamine (DIPEA). Lors des synthèses peptidiques la résine 2-chlorotriptyle a été utilisée. Elle présente l'avantage de pouvoir réaliser l'étape de coupure en condition acide douce : avec 1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) ou avec un mélange acide acétique (AcOH)/ 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE). Ainsi, dans ces conditions, des groupements protecteurs orthogonaux essentiels à la conception des gabarits peptiques peuvent être conservés sur les chaînes latérales. Les RAFT, et les « building block » nécessaires à leur conception, sont décrits plus loin dans les parties correspondantes.

### I.2. Généralités sur la synthèse d'oligonucléotides

Il est possible de concevoir par voie chimique des séquences d'oligonucléotides de longueur et de séquence définies. Ces séquences peuvent être composées de nucléosides naturels ou non et diverses modifications peuvent être incorporées (fonction chimique, bras de nature variée, conformation glycosidique bloquée ...). Au laboratoire, la synthèse chimique est faite de manière automatisée sur phase solide par la méthode dites des « phosphoramidites ».<sup>41</sup> Durant cette thèse, toutes les séquences d'oligonucléotides utilisées ont été préparées au

---

<sup>40</sup> Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.

<sup>41</sup> Matteucci, M. D., Caruthers, M. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3185-3191.

synthétiseur automatique. On parle alors de SPOS (pour « Solid Phase Oligonucleotide Synthesis »).

Ainsi de la même manière que pour la synthèse peptique, la SPOS consiste en une élongation d'une séquence nucléotidique greffée sur support, les excès de réactifs étant éliminés par lavage. La fonction hydroxyle en position 5' étant plus réactive que celle en position 3', la synthèse se fait dans le sens 3' → 5'. Celle-ci peut être décomposée en quatre étapes distinctes, comme représenté sur le Schéma 3.

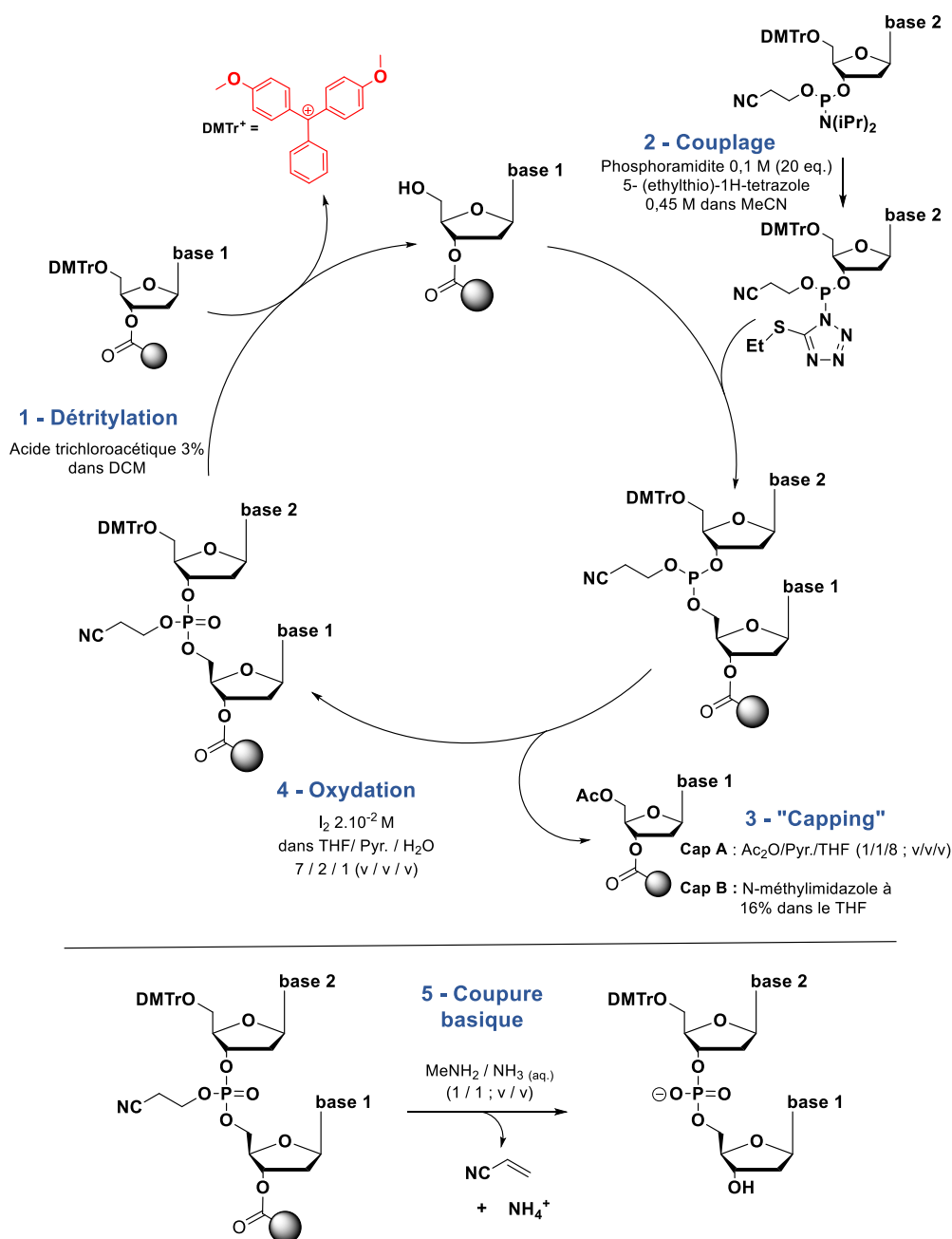


Schéma 3

La première étape est la déprotection de la fonction hydroxyle en position 5' du nucléoside. Celle-ci est faite en présence d'acide trichloroacétique à 2% dans le dichlorométhane (DCM)

et génère la formation du cation diméthoxytritylium (DMTr<sup>+</sup>), de couleur rouge. Il est ainsi aisé de contrôler l'efficacité de chaque cycle de couplage par dosage en spectroscopie du visible. Le dérivé phosphoramidite du nucléoside suivant est ensuite couplé sur la fonction hydroxyle libre en position 5', formant un lien phosphite triester. Cette seconde étape est faite en présence de 5-(éthylthio)-1H-tétrazole, un acide faible jouant le rôle d'activateur. Il est possible que l'étape de couplage ne soit pas totale et afin d'éviter la formation de séquences présentant des délétions, il est nécessaire de réaliser en avant dernière étape une étape dite de « capping ». Les fonctions hydroxyles qui n'auraient pas réagi sont alors acétylées en présence d'anhydride acétique (Ac<sub>2</sub>O) et rendues inactives pour le reste des couplages. Enfin, lors de la dernière étape du cycle de synthèse, la liaison phosphite triester est oxydée en présence de diiode et d'eau pour former une liaison stable phosphate triester. Un nouveau cycle de synthèse peut alors commencer.

Une fois la séquence d'oligonucléotides finie, celle-ci est coupée du support solide et les bases nucléiques sont déprotégées en présence d'un mélange ammoniacque/méthylamine (1/1 ; v/v) que l'on nommera « AMA ». Les séquences tronquées sont ensuite éliminées au cours d'une étape de purification en phase inverse sur cartouche Glen-Pak<sup>®</sup>. Cette méthode de synthèse est compatible avec la préparation d'oligonucléotides modifiés, en début, milieu ou fin de séquence. Les modifications en début de séquence, en position 3', sont introduites *via* l'utilisation de supports solides fonctionnalisés.

### I.3. Généralités sur les ligations bio-orthogonales

Comme il a pu être mentionné en introduction, les édifices contraints de G-quadruplexes sont obtenus à partir d'un châssis peptidique sur lequel différentes séquences d'oligonucléotides sont immobilisées, *via* des réactions dites de « chimie click ». Ce terme a été introduit pour la première fois par K.B. Sharpless, en 2001, et désigne des réactions de couplages rapides, simples et stéréospécifiques.<sup>42</sup> En 2003, C.R. Bertozzi définit la notion de chimie bio-orthogonale comme étant les réactions de « chimie click » orthogonales et compatibles avec les milieux biologiques.<sup>43</sup> Ces réactions doivent justifier d'une grande conversion et d'un large panel de substrats possibles. Enfin, les sous-produits doivent être inoffensifs vis-à-vis des biomolécules et des réactions.

Cependant, des critères supplémentaires doivent aussi être pris en compte lors de l'assemblage d'acides nucléiques structurés avec des bio-conjugués. L'encombrement stérique doit pouvoir être contrôlé et maîtrisé afin de ne pas affecter le repliement des ODN. Il est aussi primordial de pouvoir installer des espaceurs de longueurs connues et comparables pour ne pas perturber la structure de l'édifice. Enfin, dans le cas de l'utilisation de composés pouvant altérer la stabilité de la structure nucléique (cuivre, milieux acide ...), ou de cyclisations intramoléculaires, ces ligations doivent être stœchiométriques, rapides et efficaces.

---

<sup>42</sup> Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.

<sup>43</sup> Prescher, J. A., Bertozzi, C. R., *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.

Ce rapide rappel bibliographique n'a pas pour objectif de faire une liste exhaustive de toutes les ligations bio-orthogonales connues, mais seulement d'en présenter une sélection en insistant sur celles maîtrisées au sein du laboratoire.

- **La ligation éther d'oxime**

Il s'agit d'une réaction de condensation d'une fonction carbonyle avec une fonction oxyamine (Schéma 4). Cette réaction est particulièrement intéressante pour former des bio-conjugués car chimiosélective, rapide et compatible avec les milieux biologiques. Elle présente en plus l'avantage de ne former que de l'eau comme produit secondaire. Elle a d'abord été décrite par William P. Jencks<sup>44</sup> en 1959, mais c'est bien plus tard, en 1994, qu'elle a été utilisée pour la conception de protéines à haut poids moléculaire.<sup>45</sup>

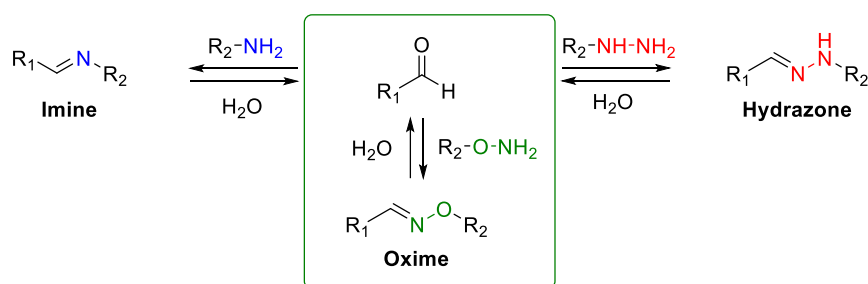


Schéma 4

Il a été montré que la ligation éther d'oxime est plus stable que les autres ligations issues de condensations de carbonyles, les imines et les hydrazones (Schéma 4).<sup>46</sup> En effet, la présence de l'effet inductif de l'atome d'oxygène en position  $\alpha$  de l'amine permet de stabiliser le lien éther d'oxime et de le rendre moins réactif vis-à-vis d'une hydrolyse. La réaction est catalysée à pH légèrement acide (4-5) et à une concentration de l'ordre du millimolaire. Ainsi, de par sa forte réactivité et sa stabilité (de pH 3 à 9), le lien éther d'oxime représente aujourd'hui une ligation largement utilisée pour la conception de biomolécules.

A titre d'exemple, au sein de l'équipe I<sub>2</sub>BM, la stratégie éther d'oxime a été utilisée lors de la conception de bio-structures multivalentes particulièrement sélectives des intégrines qui sont surexprimées dans les tumeurs.<sup>47</sup> Elle a aussi permis la synthèse d'un mime de G-quadruplexe contraint sur un gabarit cyclodécapeptide<sup>48</sup> (Figure 13).

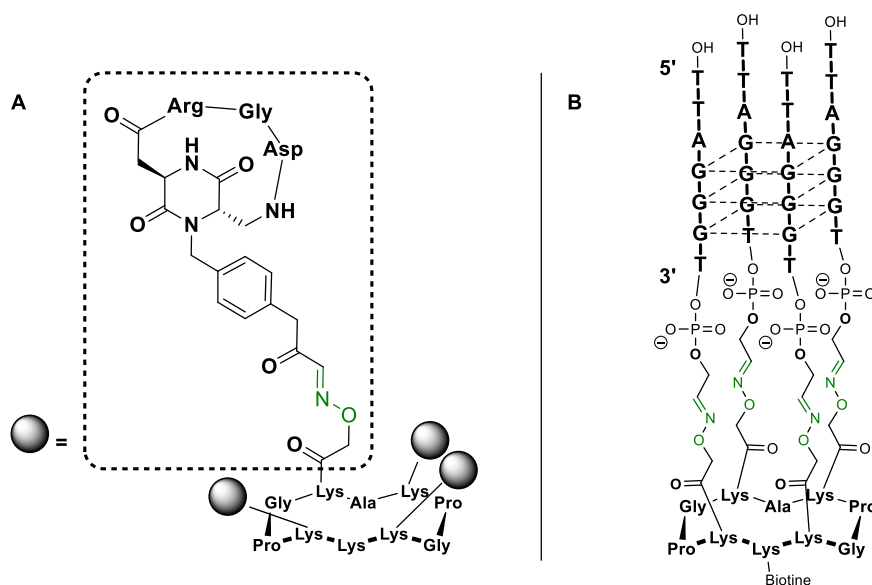
<sup>44</sup> Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.

<sup>45</sup> Rose, K., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.

<sup>46</sup> Kalia, J., Raines, R. T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523-7526.

<sup>47</sup> Pina, A., Kadri, M., Arosio, D., Dal Corso, A., Coll, J., Gennari, C., Boturyn, D., *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 7492-7496.

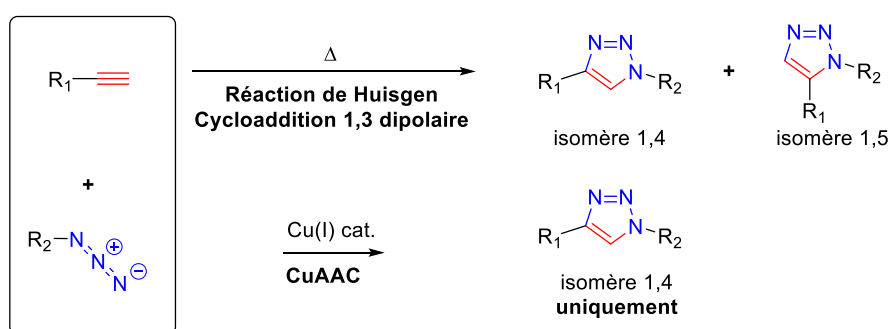
<sup>48</sup> Murat, P., Cressend, D., Spinelli, N., Van der Heyden, A., Labbé, P., Dumy, P., Defrancq, E., *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2588-2591.



**Figure 13** : Utilisation de la ligation éther d'oxime pour la conception : A) d'une bio-structure multivalente, B) d'un mimétique de G-quadruplexe contraint.

### • La ligation CuAAC

Il s'agit sûrement de la méthode de ligation bio-orthogonale la plus répandue et utilisée actuellement. La cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen a été comme son nom l'indique, développée par R. Huisgen en 1963.<sup>49</sup> Elle permet la formation d'un lien triazole en 1,4 ou 1,5 par cycloaddition [2+3] d'une fonction alcyne et d'une fonction azoture. Cependant, ce n'est qu'à partir de 2002 et les optimisations faites par les équipes de K.B. Sharpless<sup>50</sup> et M. Meldal<sup>51</sup> que cette ligation va être très largement utilisée. En effet, ils ont montré que l'utilisation du Cu(I) catalyse de façon significative la réaction et la rend régiosélective en 1,4. Cette réaction a, par la suite, été nommée CuAAC pour « Copper (I) Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition » (Schéma 5).



**Schéma 5**

En milieu aqueux et avec des séquences d'ODN, la réaction se fait, le plus souvent, en présence de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ), réduit *in-situ* en Cu(I) par de l'ascorbate de sodium. Afin de

<sup>49</sup> Huisgen, R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2, 565-598.

<sup>50</sup> Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.

<sup>51</sup> Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M., *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057-3064.

stabiliser le cuivre sous sa forme réduite, l'utilisation d'un ligand tel que le tris(benzyltriazolyméthyl)amine (THPTA) est utilisé. Ainsi, la CuAAC peut être réalisée avec de très bons rendements et dans des conditions douces : en milieu aqueux, à pH 7,4 et à température ambiante.

Cette ligation présente l'avantage de n'impliquer que des fonctions azoture et alcyne, absentes de la plupart des biomolécules naturelles, notamment des oligonucléotides. Ainsi, de par la facilité à introduire ces fonctions et la faible gêne stérique engendrée par le lien triazole, cette méthode de ligation représente un premier choix pour assembler nos ODN à un gabarit peptidique.

- **La ligation SPAAC**

Bien que la ligation CuAAC soit largement utilisée, la présence de cuivre peut parfois être un facteur limitant à son utilisation (toxicité par exemple). C'est donc dans ce sens que l'équipe de C.R. Bertozzi a développé une nouvelle méthode de cycloaddition sans cuivre.<sup>52</sup> On nomme cette ligation la SPAAC pour « Strain Promoted Alkyne Azide Cycloaddition ». Le principe, ici, est d'abaisser l'énergie d'activation en utilisant des alcynes contraints de type cyclooctyne, plus réactifs que les alcynes terminaux. Cette méthode de ligation, initialement lente et présentant une faible conversion, a été particulièrement étudiée et les rendements et cinétiques ont ainsi pu être significativement améliorés. Quelques exemples de cyclooctynes modifiés commerciaux sont présentés sur le Figure 14.

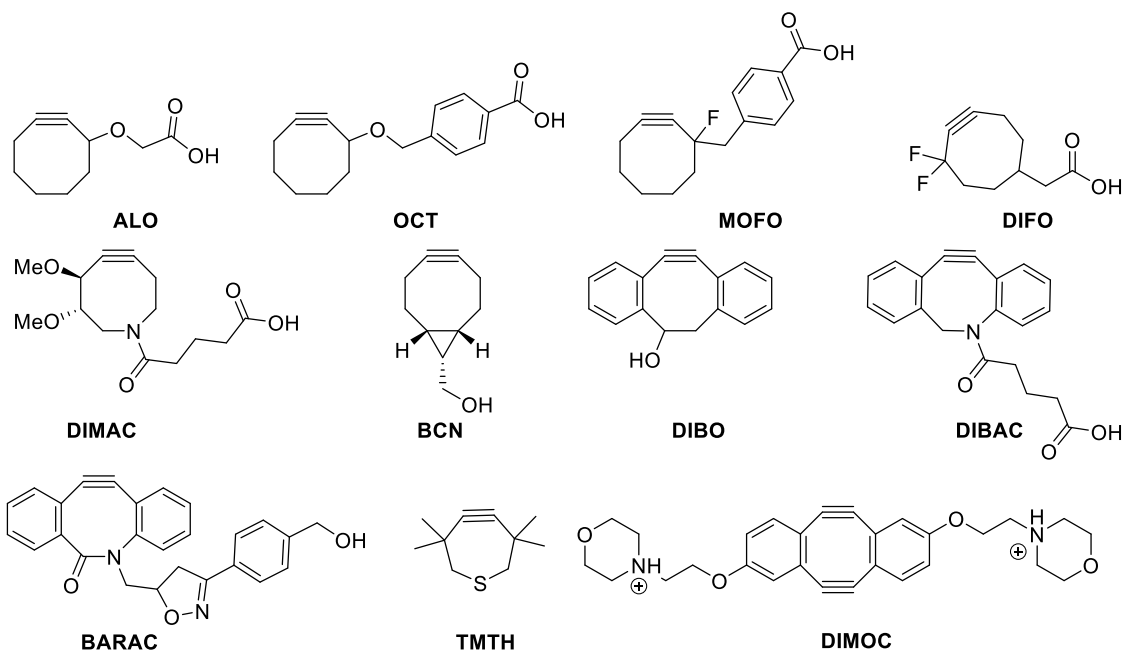


Figure 14: Exemple de cyclooctynes commerciaux.

<sup>52</sup> Agard, N. J., Prescher, J. A., Bertozzi, C. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15046-15047.





- **La ligation de Staudinger**

La ligation de Staudinger est une réaction d'addition-élimination entre une fonction azoture et une phosphine, le plus souvent un dérivé de triphénylphosphine. Cela permet la formation d'un lien amide stable (Schéma 6). De par la facilité de la mise en place de cette réaction - aucun autre réactif n'est requis - et de la biocompatibilité des fonctions mises en jeu, cette ligation est un moyen efficace pour associer différentes biomolécules. Cependant, nous n'avons pas choisi d'utiliser ce type de ligation car elle introduit la présence d'un ligand particulièrement volumineux et peu stable en conditions oxydantes. En effet, les phosphines s'oxydent facilement au contact de l'air.

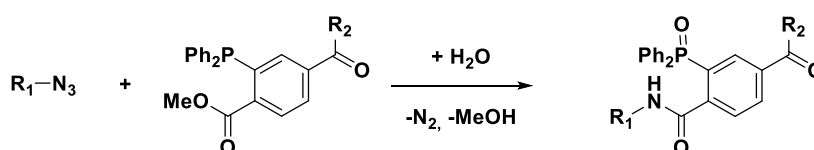


Schéma 6

- **La ligation squarate**

Cette ligation a été utilisée pour la première fois par l'équipe de Tietze, en 1991, pour bio-conjuguer un glycoside à une protéine (BSA).<sup>54</sup> Elle repose sur la formation séquentielle d'un lien énamine entre un dérivé éther d'énol d'acide squarique et deux fonctions nucléophiles de type amine ou thiol (Schéma 7). Le caractère séquentiel et sélectif de la réaction repose sur la différence de réactivité des composés diesters et le composé mono-amide intermédiaire. En effet, le composé mono-squaramide est stabilisé par délocalisation aromatique, abaissant son caractère électrophile. Ainsi, la première réaction d'amidation peut être faite à pH neutre, tandis que la deuxième nécessite des conditions plus basiques pour exacerber la nucléophilie du réactif. Il est intéressant de noter que dans ces conditions de réaction cette ligation est inerte vis-à-vis des alcools.

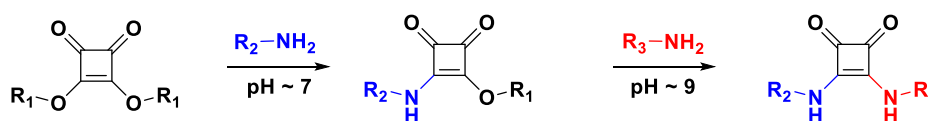


Schéma 7

Cette stratégie a été utilisée par l'équipe de M. Etheve-Quellejeu afin de bio-conjuguer de manière sélective des séquences d'ARN de transfert sur des formes natives de peptidoglycanes.<sup>55</sup> Cela a pu être réalisé avec une efficacité probante, malgré la présence de nombreuses autres fonctions telles que des fonctions phosphate, hydroxyle et carboxyle. La réalisation de cette conjugaison a ouvert une voie de synthèse vers d'éventuels inhibiteurs de

<sup>54</sup> Tietze, L. F., Schroeter, C., Gabius, S., Brinck, U., Goerlach-Graw, A., Gabius, H. J., *Bioconjug. Chem.* **1991**, 2, 148-153.

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

la FemX<sub>WV</sub>, une cible attractive pour le développement de nouveaux antibiotiques actifs contre les bactéries multi-résistantes. Plus récemment, l'équipe de T. Brown a montré que cette ligation est compatible avec l'utilisation d'ADN ou ARN polymérase et diversifie ainsi le type de ligations possibles lors de l'élaboration de bibliothèques d'ADN, par exemple.<sup>56</sup>

## II. Synthèse des structures « sur gabarit »

Dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer si la présence d'un châssis peptidique chiral peut avoir une influence sur l'énantiosélectivité de la catalyse. Pour cela, deux structures dites « sur gabarit » de type « RAFT – G-quadruplexe » ont été synthétisées. Afin de différencier les positions d'ancrage aux séquences d'ODN, on nomme RAFT – ODN (resp. ODN – RAFT), l'édifice lié en position 5' (resp. 3'). Les réactions de catalyse effectuées par Can Li ayant été principalement faites avec la séquence télomérique humaine « HT21 » ( $d[{}^5\text{GGG}(\text{TTAGGG})_3{}^3]$ ), il a été choisi de synthétiser les édifices RAFT - « TA + HT21 » (RAFT –  $d[{}^5\text{TAGGG}(\text{TTAGGG})_3{}^3]$ ) et « HT21 + TT » - RAFT ( $d[{}^5\text{GGG}(\text{TTAGGG})_3\text{TT}{}^3]$  – RAFT), comme présentés sur la Figure 16. De cette manière, il est possible de déterminer l'influence du RAFT par comparaison avec les résultats obtenus avec la séquence HT21.

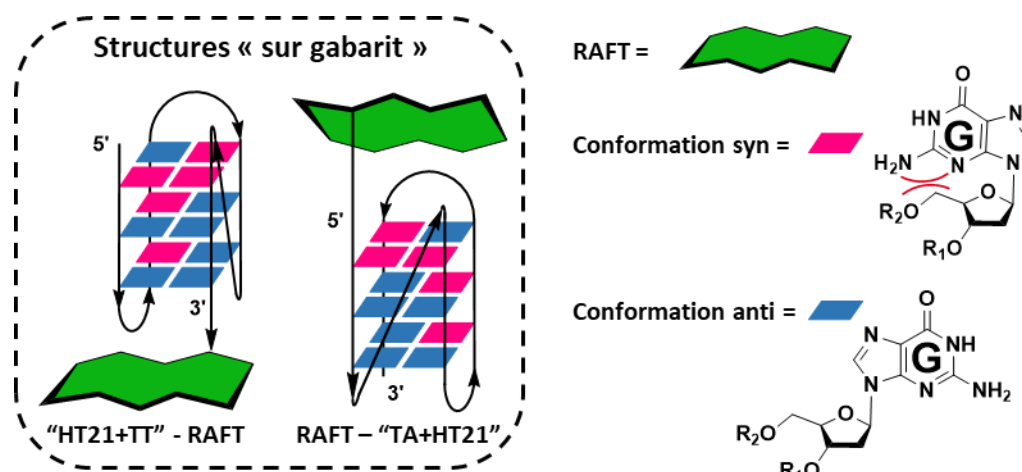


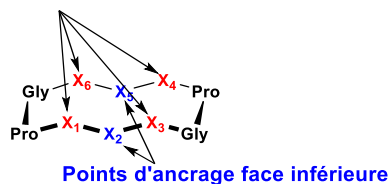
Figure 16: Représentation des structures "sur gabarits".

### II.1. Synthèse du gabarit peptidique

Dans l'optique de concevoir les structures « sur gabarit », il est dans un premier temps nécessaire de synthétiser un châssis peptidique pouvant être fonctionnalisé, afin de bio-conjuguer par la suite la séquence d'ODN. Il a alors été choisi de travailler avec un cyclodécapeptide comportant quatre acides aminés fonctionnalisables sur la face supérieure, et deux autres sur la face inférieure. Chacun de ces acides aminés peut servir de point d'ancrage, selon leur nature et les modifications apportées (Figure 17).

<sup>56</sup> Shivalingam, A., Taemaitree, L., El-Sagheer, A. H., Brown, T., *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 11513-11519.

Points d'ancrage face supérieure



**Figure 17:** Représentation d'un RAFT et des points d'ancrage possibles.  $X_i$  représente un acide aminé naturel ou modifié.

La ligation éther d'oxime étant connue et maîtrisée au sein du laboratoire, il a été choisi de synthétiser un cyclodécapeptide comportant une fonction oxyamine protégée sur la face supérieure. La synthèse de ce châssis peptidique étant faite par SPPS, il est possible d'incorporer l'acide aminé modifié au sein du gabarit selon deux stratégies : soit par post-fonctionnalisation de la chaîne latérale d'une lysine, soit par la synthèse de synthons de type « building block ». Comme nous souhaitons conserver une lysine libre sur la face inférieure du RAFT, dans l'optique d'une attache pour de la catalyse supportée, il a été choisi de privilégier la stratégie de « building block ». Cela évite ainsi la nécessité d'une protection orthogonale entre les deux lysines. Une lysine fonctionnalisée **3** a alors été synthétisée selon la stratégie présentée Schéma 8.

Il a été montré dans la littérature que pour la synthèse du synthon **3**, il est préférable de protéger la fonction oxyamine par un groupement 1-éthoxyéthylidène (Eei) plutôt que par le groupement *tert*-butoxycarbonyle (Boc). En effet, lorsque la fonction oxyamine est protégée par un groupement Boc, elle conserve une certaine réactivité et des ramifications secondaires peuvent alors être observées lors des couplages peptidiques.<sup>57</sup> De plus, le groupement protecteur Eei présente aussi l'avantage de pouvoir être éliminé en conditions acides plus douces. La première étape de la synthèse est une substitution nucléophile de l'éthyl-*N*-hydroxyacétimide sur l'acide iodoacétique. Le composé **1** ainsi formé est ensuite activé par un groupe *N*-hydroxysuccinimide (NHS), en présence de l'agent de couplage *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). L'ester actif **2** est alors obtenu avec un rendement global de 80 %. Enfin, le synthon **3** désiré est obtenu après fonctionnalisation d'une lysine, la fonction amine principale étant protégée (par un groupement protecteur de type Fmoc). Cette dernière étape est considérée comme quantitative.

<sup>57</sup> Foillard, S., Rasmussen, M. O., Razkin, J., Boturyn, D., Dumy, P., *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.

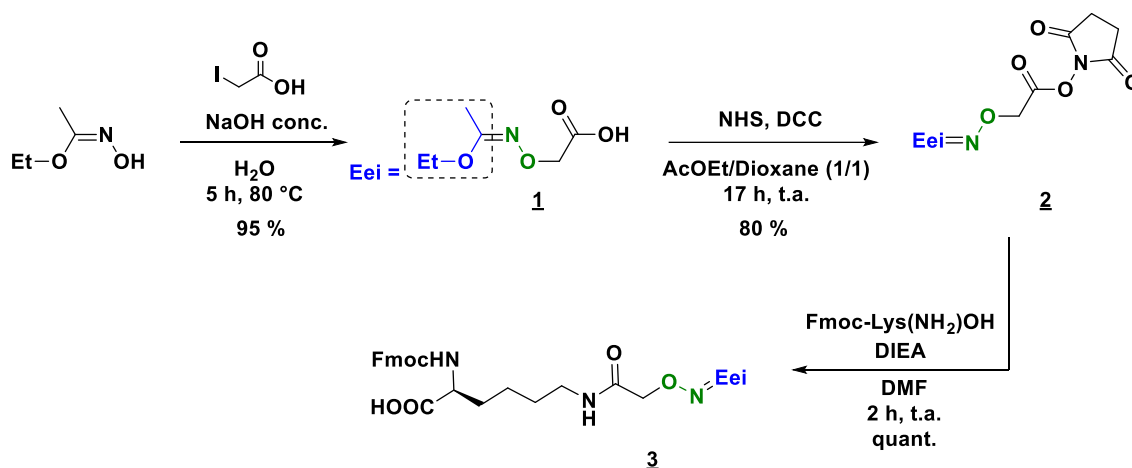


Schéma 8

Le synthon **3** est ensuite engagé dans la synthèse par SPPS du peptide linéaire **4** selon la stratégie Fmoc/tBu, en présence de la résine 2-chlorotrityle (Figure 18). En fin d'élongation du peptide, celui-ci est détaché en conditions acides douces, *i.e.* en présence d'acide acétique, compatibles avec la résine utilisée et le groupement protecteur Eei. En effet, ce dernier est particulièrement sensible en milieu acide et ne résiste pas aux conditions usuelles de décrochage, soit 1 % de TFA. Enfin, la cyclisation du peptide linéaire est réalisée en milieu dilué à  $0,5 \cdot 10^{-4}$  M, dans le DMF, en présence de la base DIPEA et de l'agent de couplage PyBOP. Il est important de noter que la cyclisation est réalisée sur une glycine en position C-terminale afin d'éviter tout risque de racémisation par formation d'oxazolone. Le châssis peptidique **5** est alors obtenu après purification par RP-HPLC (pour « Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography ») avec un rendement global de 70 %.

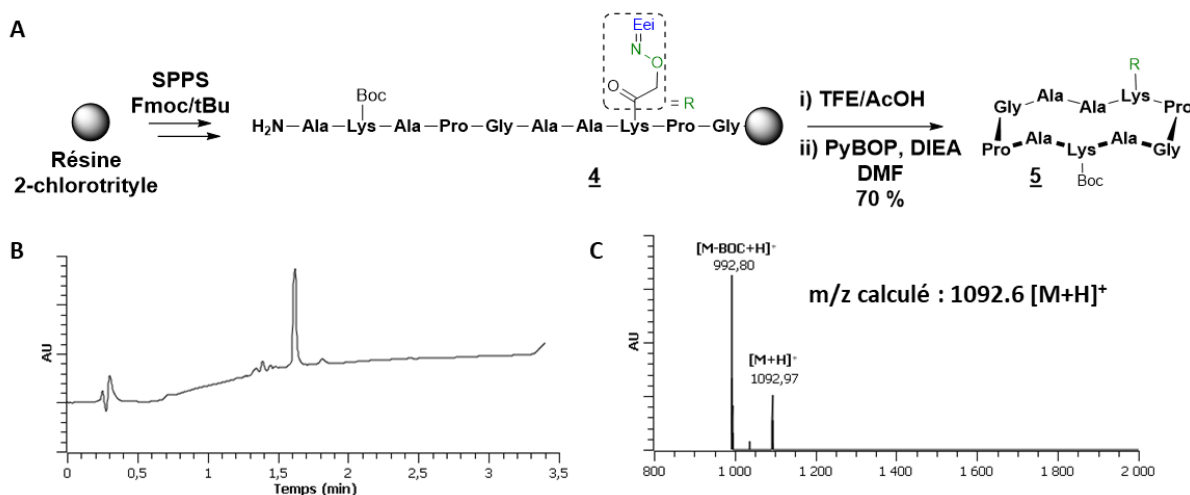


Figure 18: (A) Synthèse, (B) chromatogramme RP-UPLC (pour Reverse Phase Ultra high Pressure Liquid Chromatography) et (C) caractérisation UPLC-MS (260 nm) du RAFT **5**.

## II.2. Synthèse des oligonucléotides modifiés

Les séquences d'oligonucléotides ont été synthétisées par SPOS. Afin de pouvoir les associer au RAFT *via* la ligation éther d'oxime, il est nécessaire d'incorporer une fonction aldéhyde.

Pour cela, deux stratégies ont été retenues, selon que la modification soit introduite à l'extrémité 5' ou 3'. Ces structures étant des édifices de contrôle qui se veulent le plus simple possible, il a été décidé de ne pas incorporer de modification en milieu de séquence. De plus, des acides nucléiques supplémentaires sont ajoutés au niveau de ces modifications afin de ne pas perturber le repliement des G-quadruplexes. Ainsi les séquences nucléiques « TA » et « TT » ont été respectivement ajoutées en position 5' et 3', par rapport à la séquence télomérique humaine « HT21 » ( $d[{}^5\text{GGG}(\text{TTAGGG})_3{}^3\text{T}]$ ), utilisée comme séquence référente dans les publications de catalyse oxydante en présence d'ODN. Le choix de ces acides nucléiques a été fait de façon à conserver le même motif répétitif,  $(\text{GGGTTA})_n$  avec  $n \in \mathbb{N}$ , que la séquence naturelle. Enfin, il est important de noter que les G-quadruplexes télomériques « HT21 » **6** ainsi que « HT21 + TT » **7** et « TA + HT21 » **8** ont aussi été synthétisés pour servir de contrôles vis-à-vis des édifices « sur gabarit ». Il est à noter que la même nomenclature que pour les édifices « RAFT - G-quadruplexe » est adoptée, *i.e.* les acides nucléiques sont indiqués en préfixe (resp. suffixe) de la séquence « HT21 » lorsqu'ils sont ajoutés en position 5' (resp. 3').

### II.2.1. Insertion de la fonction carbonyle en position 3'

La séquence **10** « HT21 + TTx » ( $d[{}^5\text{GGG}(\text{TTAGGG})_3\text{TTx}{}^3]$ , x = aldéhyde) a été obtenue en utilisant une résine 3' - glycéryle CPG, comme présenté sur le Schéma 9. Celle-ci permet d'obtenir une extrémité 3'-diol une fois la séquence détachée du support. Après purification sur cartouche Glen-Pak®, la séquence **9** est obtenue avec un rendement de 39 %. La fonction aldéhyde est générée par coupure oxydante quantitative du diol en présence de *méta*-périodate de sodium. Les sels, ainsi que le formaldéhyde généré lors de la réaction d'oxydation, sont éliminés sur une cartouche d'exclusion stérique NAP-25 (noté CES). La séquence **10** fonctionnalisée est analysée par RP-UPLC/MS.

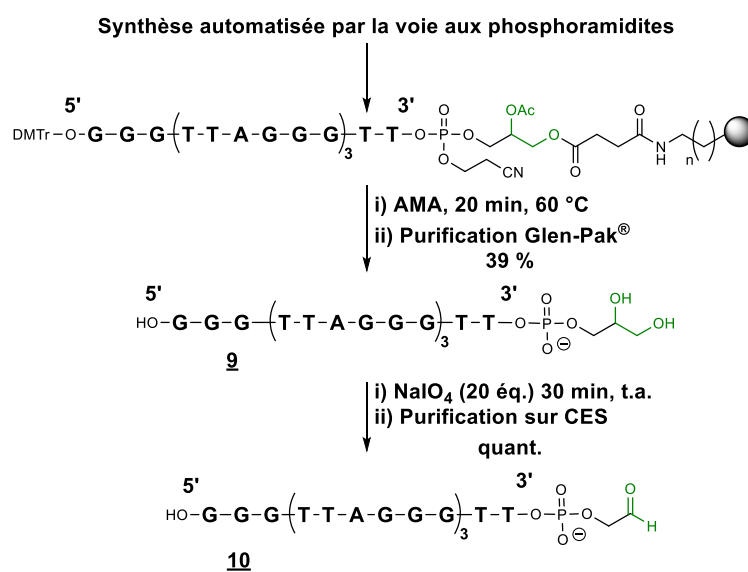
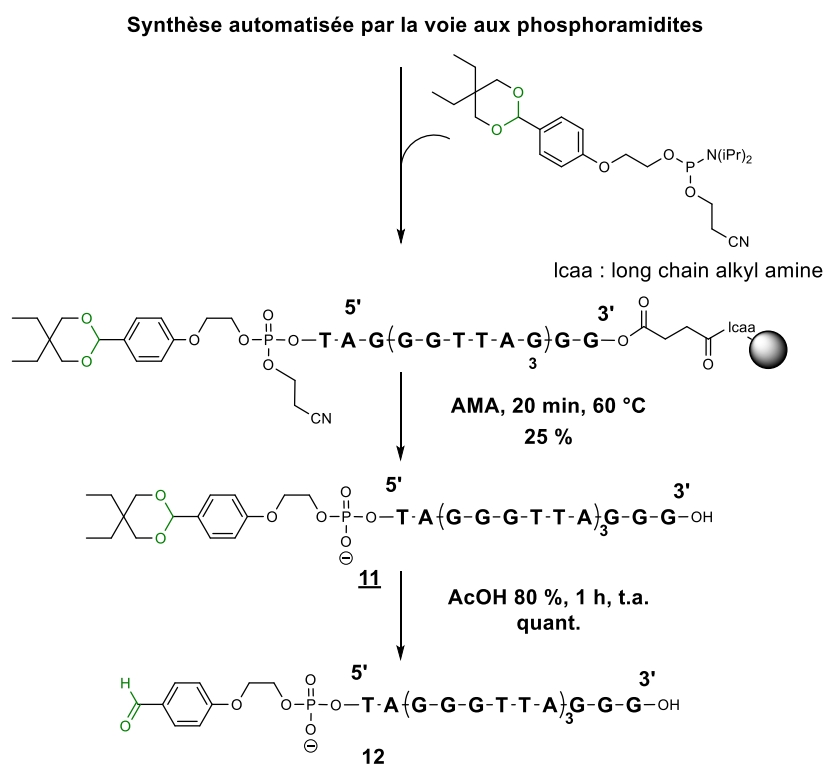


Schéma 9

### II.2.2. Insertion de la fonction carbonyle en position 5'

La séquence **12** « xTA + HT21 » ( $[d[5'xTAGGG(TTAGGG)_3]_3]$ , x = aldéhyde) a été obtenue en introduisant en fin d'élongation un phosphoramidite modifié par un groupement benzaldéhyde protégé sous forme d'acétal, comme présenté sur le Schéma 10. Après séparation du support de la séquence **11**, le benzaldéhyde est déprotégé par une solution d'acide acétique à 80 % afin d'obtenir la séquence **12** avec un rendement global de 25 %. La fonctionnalisation en fin de séquence présente l'avantage de ne nécessiter aucune purification post-synthèse. En effet, comme la fonction carbonyle est la dernière à être incorporée, seules les séquences complètes sont fonctionnalisées. Celles tronquées se retrouvent donc inactives vis-à-vis de la ligation éther d'oxime.



**Schéma 10**

### II.3. Bio-conjugaison des ODN et du châssis

La lysine sur la face inférieure du RAFT **5** est déprotégée, en même temps que la fonction oxyamine, en présence de 50 % de TFA dans l'eau. Après précipitation et plusieurs lavages dans de l'éther diéthylique froid, l'intermédiaire **13** est obtenu sous forme d'une poudre blanche (Schéma 11). Celle-ci est directement mise en présence de la séquence d'ODN modifiée souhaitée, dans une solution de tampon d'acétate d'ammonium (pH 4,5), afin de réaliser la ligation éther d'oxime. Les réactions sont suivies par RP-UPLC/MS et les produits **14** et **15** sont purifiés en HPLC préparative pour des rendements respectifs de 75 % et de 95 % (Schéma 11).

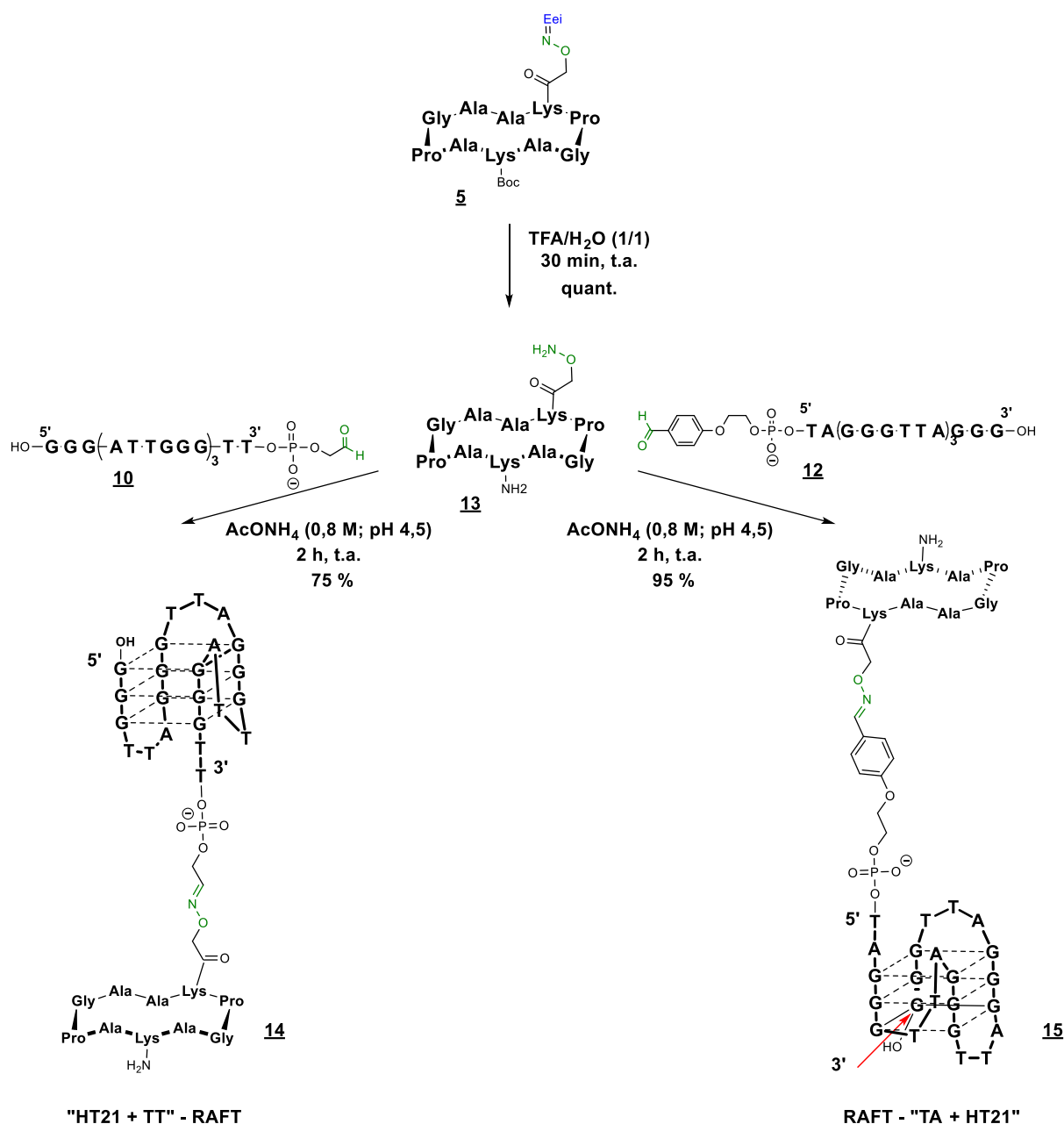


Schéma 11

Les analyses par UPLC-MS montrent que les produits obtenus, après purification par RP-HPLC préparative, sont relativement propres. En effet, on observe sur les chromatogrammes A et B, présentés sur la Figure 19, des puretés UV respectives de 90 % et 70 %. Les spectres de masse C et D témoignent bien que les structures observées correspondent aux produits attendus. Cependant, on constate sur les chromatogrammes la présence de sous-produits au pied des pics majoritaires, correspondants aux séquences des ODN non liés au châssis peptidique. Ainsi, il est possible que la liaison éther d'oxime ait été en partie hydrolysée, expliquant alors la présence en faibles proportions de séquences non liées.



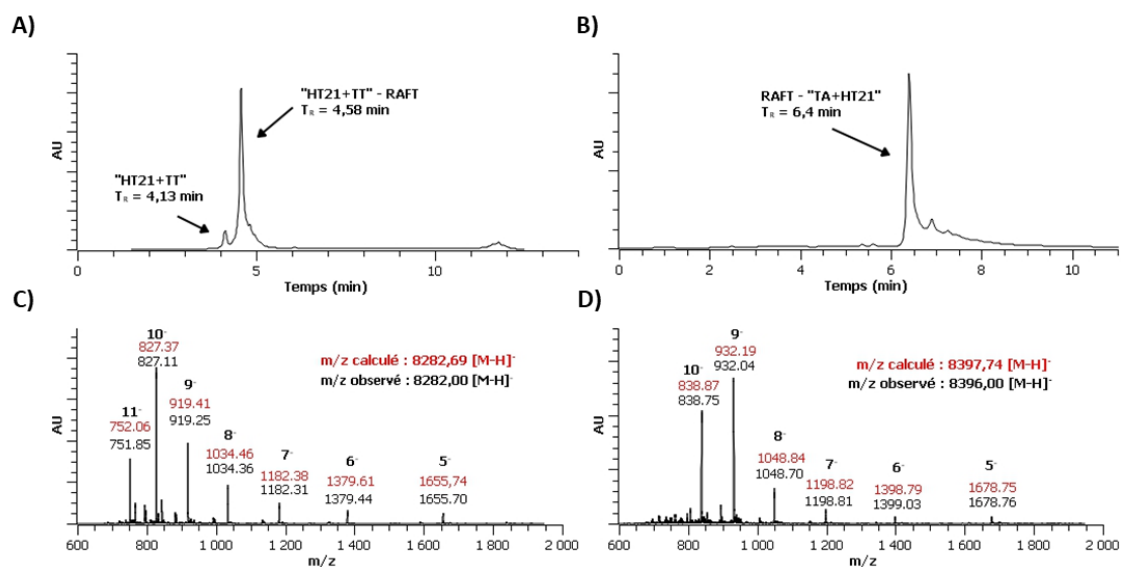
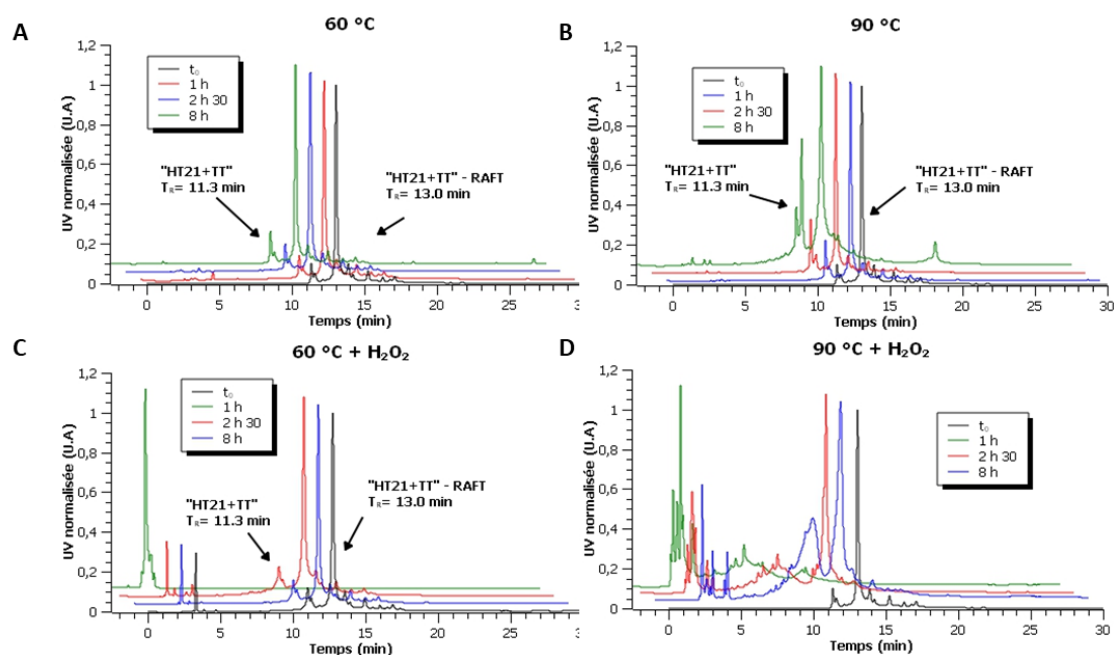


Figure 19: Chromatogrammes et spectres de masses obtenus par UPLC-MS (260 nm) pour les produits **14** (A, C) et **15** (B, D).

#### II.4. Etude de la stabilité de la liaison éther d'oxime

L'objectif de cette thèse étant de concevoir des entités catalytiques chirales les plus stables possible, des études quant à la stabilité de la ligation éther d'oxime ont été réalisées. Ainsi, la structure **14** « HT21 + TT » - RAFT a été incubée à pH 7,0, à 60 °C et 90 °C, dans une solution de tampon MOPS (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique), selon les mêmes conditions que celles utilisées lors de la catalyse. L'évolution de la ligation en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), espèce oxydante utilisée lors des réactions de sulfoxydation, a aussi été étudiée. L'évolution de la structure a été suivie par HPLC et les chromatogrammes obtenus sont présentés sur la Figure 20.

Dans un premier temps, on constate que la ligation éther d'oxime semble relativement stable, après 8 h d'incubation, et ce même à une température élevée de 90 °C. En effet, on observe respectivement à 60 °C et 90 °C (Figure 20 A et B), par intégration des pics UV, 6 % et 23 % d'hydrolyse en absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une rapide dégradation de la structure est observée à 90 °C (Figure 20 C), mais seulement après 8 h à 60 °C (Figure 20 D). Ces résultats témoignent alors d'une stabilité que nous jugeons suffisante pour l'élaboration des premiers mimes contraints de G-quadruplexes et leur utilisation en catalyse lors d'essais préliminaires. Il est important de noter que les conditions testées ici sont drastiques par rapport à celles utilisées lors des catalyses, puisque celles-ci sont majoritairement conduites à 15 °C. Néanmoins, à la vue de l'hydrolyse observée à haute température, il peut être intéressant de développer/utiliser de nouvelles ligations encore plus robustes. En effet, cela peut présager aussi d'une instabilité de la liaison éther d'oxime au cours du temps et notamment lors du recyclage du catalyseur.

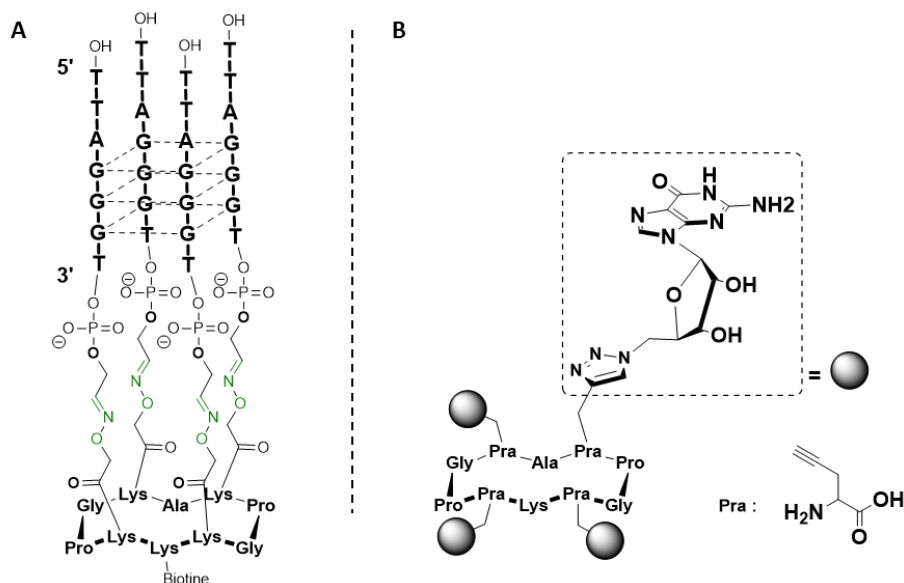


**Figure 20** : Suivi par HPLC (260 nm) de l'évolution de la structure **14** « HT21+TT » - RAFT à (A) 60 °C et (B) 90 °C. Les suivis sont aussi réalisés en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C et D).

### III. Synthèse de G-quadruplexes contraints parallèles

Afin de rapidement obtenir des mimes de G-quadruplexes contraints, il a été décidé, dans un premier temps, de se concentrer sur la topologie parallèle. Il s'agit en effet de la structure contrainte la plus simple à concevoir car un seul type de ligation est nécessaire, les quatre brins riches en guanosine étant tous orientés dans le même sens. Un premier édifice contraint en topologie parallèle a été obtenu par P. Murat en 2008 au sein du laboratoire (Figure 21 A).<sup>48</sup> La ligation éther d'oxime avait alors été adoptée pour la synthèse de cet édifice. Cependant, dans l'optique de concevoir des édifices les plus stables possible, nous faisons le choix de privilégier une autre stratégie de synthèse, *via* l'utilisation de la ligation CuAAC. Comme il a été dit en introduction de ce chapitre, cette ligation maîtrisée au sein du laboratoire I<sub>2</sub>BM est particulièrement stable et compatible avec les ODN. De plus, une première étude sur la synthèse d'une tétrade de guanosines faites par P. Murat en 2011 semble montrer une stabilisation de la structure par «  $\pi$ -stacking » entre les triazoles et les bases nucléiques (Figure 21 B).<sup>58</sup>

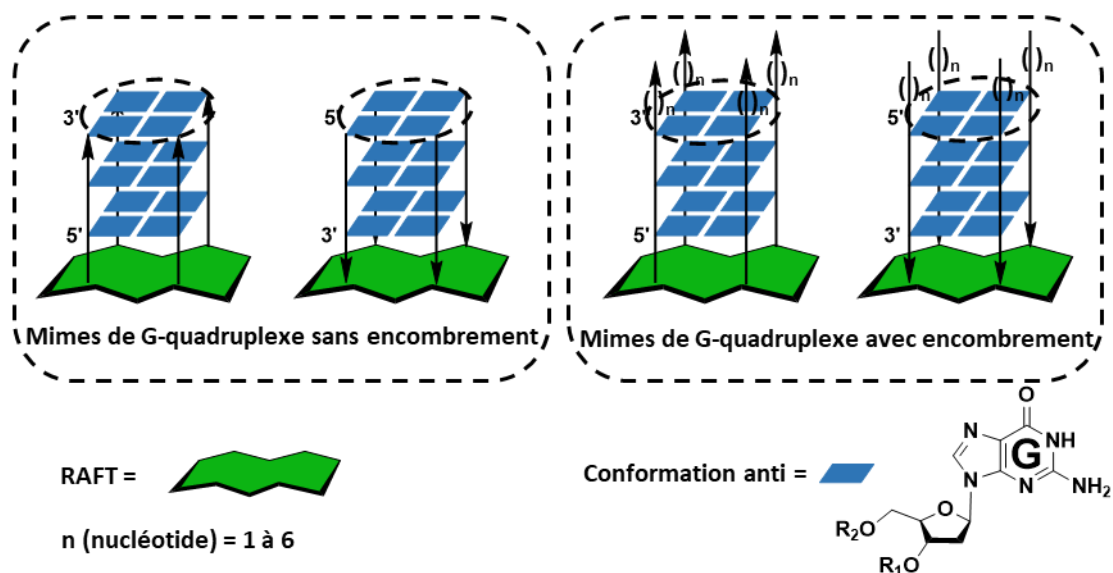
<sup>58</sup> Murat, P., Gennaro, B., Garcia, J., Spinelli, N., Dumy, P., Defrancq, E., *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5791-5795.



**Figure 21** : (A) Mîme d'un G-quadruplexe parallèle<sup>48</sup> et (B) structure RAFT-tétrade de guanosines via des ligations triazole. N.B. : Pra correspond à l'acide aminé modifié L-propargyl-glycine.<sup>58</sup>

Les synthèses de dix structures contraintes en topologie parallèle sont décrites dans cette partie. Il a été choisi de faire varier la composition ainsi que la longueur des chaînes de nucléotides, appelé « flanking », présentes au niveau des tétrades extérieures (Figure 22). L'objectif est alors de comprendre et de déterminer leur incidence respective sur les topologies adoptées et sur l'induction asymétrique lors de la réaction de sulfoxydation. Les différents résultats sont, respectivement, discutés dans les chapitres II et III.

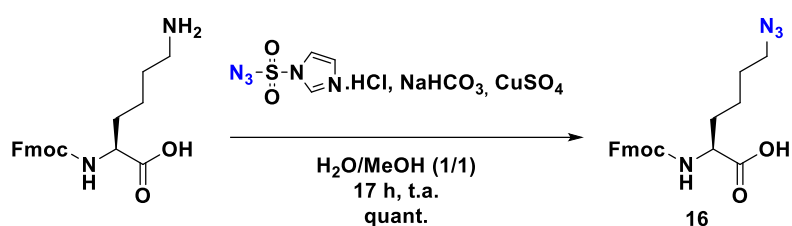
### Structures parallèles



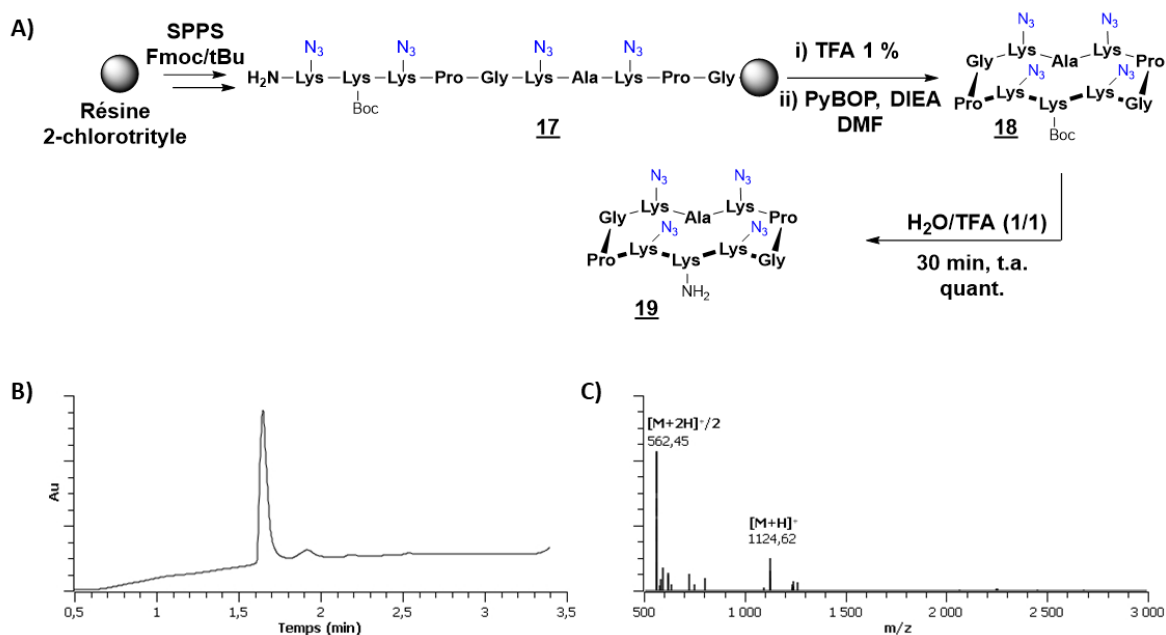
**Figure 22** : Représentation des édifices de G-quadruplexes contraints parallèles avec et sans encombrement au niveau d'une tétrade extérieure.

### III.1. Insertion des fonctions azotures et synthèse du gabarit peptidique

De la même manière que pour le RAFT **5**, il est nécessaire d'introduire des fonctions azotures afin de réaliser les ligations triazoles avec les séquences d'ODN. Pour les mêmes raisons qu'évoquées précédemment, celles-ci sont introduites selon la stratégie de « building block ». Ainsi le synthon Fmoc-azidonorleucine **16** est obtenu par réaction d'azidation entre le chlorhydrate d'imidazole-1-sulfurylazoture (ISAHC) et une Fmoc-lysine. La réaction est faite en 17 h, en milieu basique dans un mélange eau (H<sub>2</sub>O)/méthanol (MeOH)(1/1 ; v/v) et en présence d'un catalyseur de cuivre. Après traitement, le produit est obtenu avec un rendement quantitatif et une pureté suffisante pour être utilisé lors de la synthèse peptidique (Schéma 12).



Le RAFT **18**, fonctionnalisé sur la face supérieure par quatre fonctions azotures, est alors obtenu après cyclisation du peptide linéaire **17**, synthétisé par SPPS avec la résine 2-chlorotriyle selon la stratégie Fmoc/tBu. La voie de synthèse étant exactement la même que pour le gabarit **5**, celle-ci n'est pas commentée. Le produit **19** est caractérisé par UPLC-MS après déprotection, de la lysine présente sur la face inférieure, et purification (Figure 23).



**Figure 23:** (A) Schéma de synthèse, (B) chromatogramme RP-UPLC (214 nm) et (C) caractérisation UPLC-MS du RAFT **19**.

### III.2. Synthèse des oligonucléotides modifiés

Différentes séquences d'ODN comportant des modifications alcynes ont été synthétisées par SPOS. De la même manière que pour la modification carbonyle présentée dans la partie II.2, les fonctions alcynes peuvent être introduites aux extrémités 5' et 3'. Pour plusieurs raisons, la majorité des brins synthétisés ont été modifiés en position 5'. En effet, comme expliqué précédemment, une modification en fin de séquence permet de s'affranchir d'une étape de purification post-synthèse. De plus, il a été montré dans la littérature que la face 3' présente des propriétés plus importantes pour la catalyse que la face 5'.<sup>59</sup> Enfin, dans un souci de conserver l'enchaînement naturel du motif (TTAGGG)<sub>n</sub>,  $n \in \mathbb{N}$ , il a été choisi de placer en position 5' une adénosine. Plusieurs études ont montré que la formation d'une tétrade d'adénosines<sup>60</sup> en position 5' permet d'accroître de façon significative la stabilité des structures tétramoléculaires de G-quadruplexes.<sup>61</sup>

Néanmoins, un brin modifié en position 3' a aussi été synthétisé afin de vérifier ce phénomène. Notons que les séquences équivalentes **20**<sub>a-i</sub>, sans fonctionnalisation, ont également été synthétisées et serviront de contrôle vis-à-vis des édifices contraints.

#### III.2.1. Insertion d'une fonction alcyne en position 5'

La fonction alcyne a été introduite en fin d'élongation par l'ajout d'un phosphoramidite modifié par un groupement hexynyle comme présenté sur le Schéma 13. Les brins d'ODN **21**<sub>a-i</sub> ont été obtenus, avec des rendements compris entre 56 % et 83 %. L'ensemble des brins sont analysés par UPLC-MS après séparation du support et considérés comme suffisamment purs pour être directement engagés dans les réactions de ligations.

Synthèse automatisée par la voie aux phosphoramidites

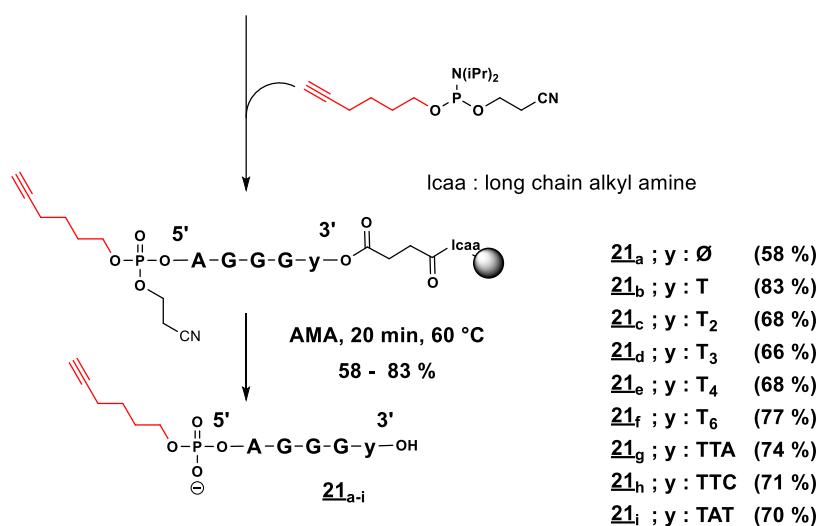


Schéma 13

<sup>59</sup> Virgilio, A., Esposito, V., Lejault, P., Monchaud, D., Galeone, A., *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *151*, 976-983.

<sup>60</sup> Patel, P., *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3836-3843.

<sup>61</sup> Mergny, J.-L., *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 81-94.

### III.2.2. Insertion d'une fonction alcyne en position 3'

Concernant la fonctionnalisation alcyne en position 3', celle-ci est introduite *via* l'utilisation du support commercial « 3' alcyne-modifier Serinol CPG », comme présenté sur le Schéma 14. En fin de synthèse, le brin d'ODN **22** est détaché du support puis purifié sur une cartouche Glen-Pak® avec un rendement de 53 %.

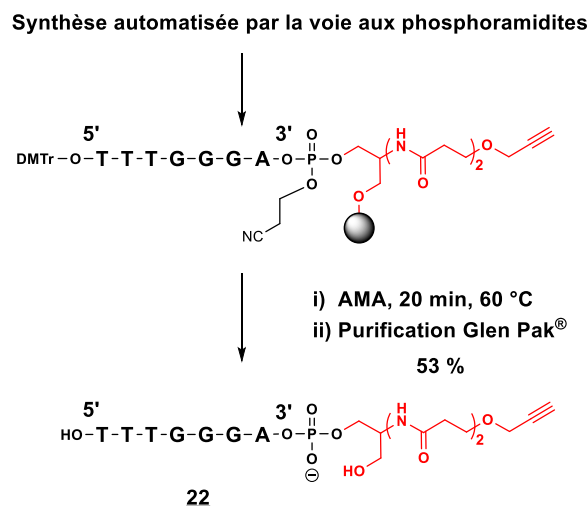


Schéma 14

### III.3. Bio-conjugaison des ODN et du châssis

La ligation de CuAAC entre les ODN modifiés et le châssis **19** est faite dans une solution de tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) (100 mM, pH 7,4), à température ambiante, en présence de sulfate de cuivre (2 éq. / alcyne), d'ascorbate de sodium (40 éq. / alcyne) et de THPTA (20 éq. / alcyne) (Schéma 15). L'ascorbate de sodium est introduit afin de réduire la forme Cu(II) du sulfate de cuivre en Cu(I), forme catalytique de la réaction. Afin de stabiliser le cuivre sous son degré d'oxydation +I, le ligand tridentate THPTA est ajouté au milieu réactionnel et de ce fait,<sup>62</sup> protège les brins d'ODN d'éventuelles dégradations par du Cu(II).<sup>63</sup> Il est intéressant de noter que les conditions de ligation sont identiques pour les ODN modifiés en position 5' et 3'. Cependant, des conversions moins importantes sont observées lors de la ligation avec la séquence modifiée en position 3'.

<sup>62</sup> Sigman, D. S., Graham, D. R., D'Aurora, V., Stern, A. M., *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 12269-12272.

<sup>63</sup> Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C., Finn, M. G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9879-9883.

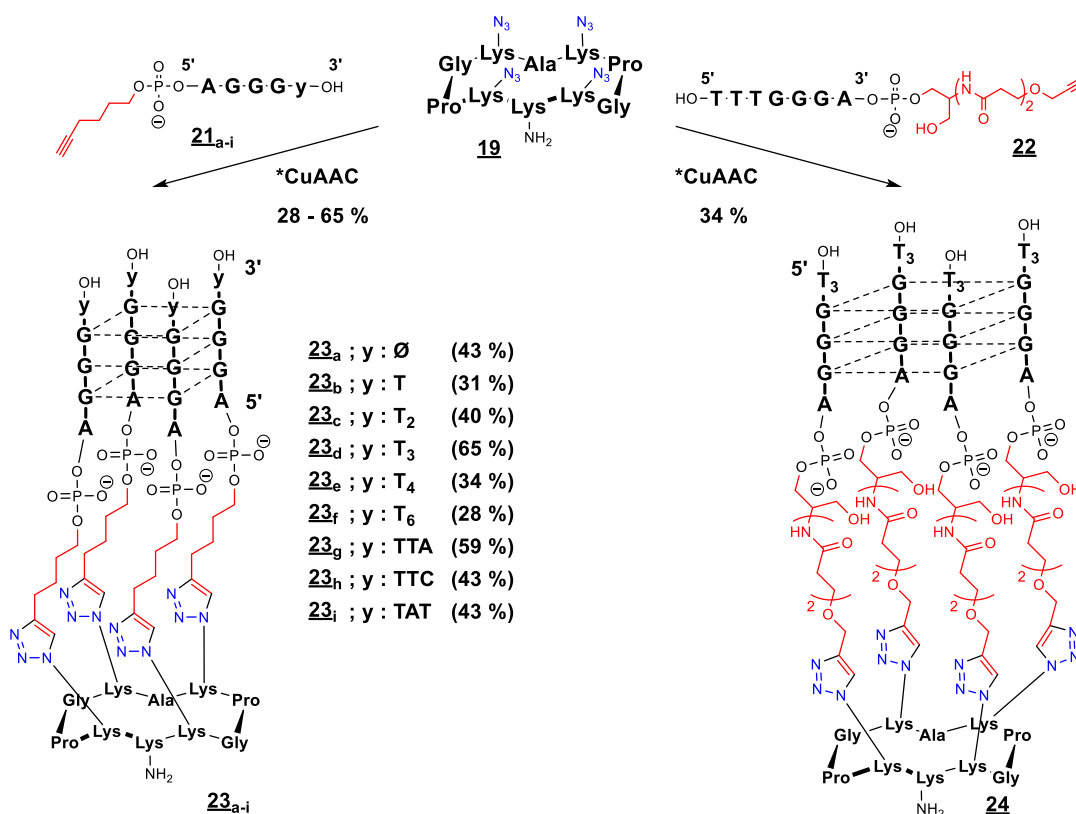


Schéma 15

La réaction est suivie par RP-UPLC/MS et, en fin de réaction, le cuivre est piégé par un large excès d'EDTA (50 éq. / alcyne), puis éliminé sur une colonne d'exclusion stérique. Après purification par RP-HPLC-préparative, les différents édifices contraint,  $23_{a-i}$  et  $24$ , sont obtenus avec des rendements modérés compris entre 28 % et 65 %. Néanmoins, les chromatogrammes HPLC montrent que les structures obtenues sont pures. Un exemple de caractérisation de la structure  $23_d$  est présenté Figure 24.

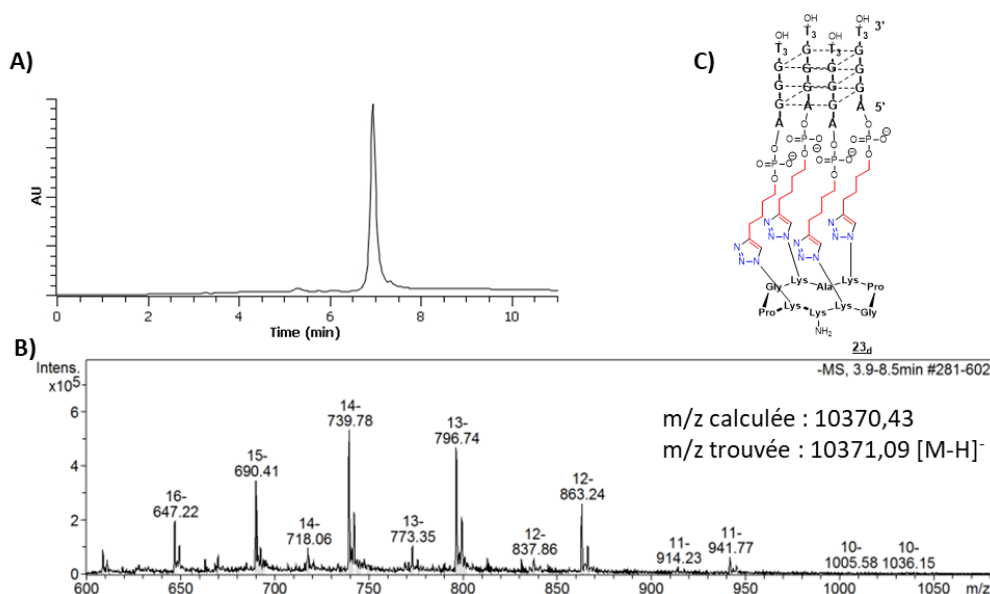


Figure 24: (A) Chromatogramme RP-UPLC (260 nm) et (B) caractérisation par ESI-MS de (C) la structure  $23_d$ .

#### IV. Synthèse de G-quadruplexes contraints antiparallèles

Dans l'optique de pouvoir déterminer le rôle de chaque topologie de G-quadruplexe lors de la catalyse asymétrique de sulfoxydation, il est primordial de disposer aussi d'un édifice contraint en topologie antiparallèle. Des premiers mimes antiparallèles de G-quadruplexes à boucles contraintes ont été décrits par R. Bonnet au sein du laboratoire I<sub>2</sub>BM (Figure 25).<sup>38</sup> La stratégie adoptée avait alors été d'associer deux brins d'ODN fonctionnalisés aux extrémités par des ligations éther d'oxime et CuAAC.

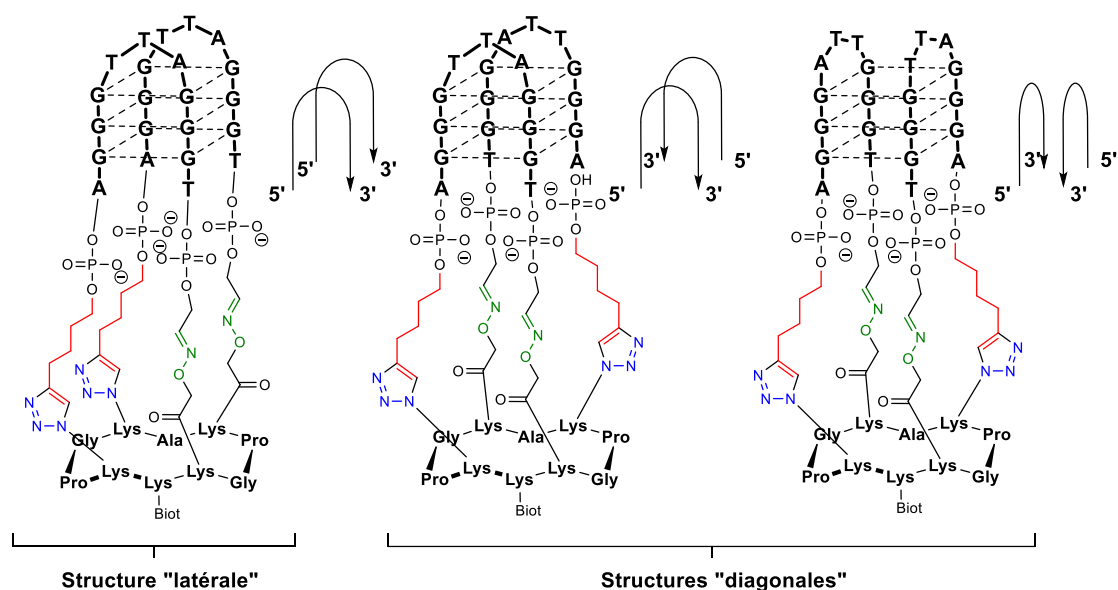


Figure 25 : Structures antiparallèles contraintes synthétisées par R. Bonnet.<sup>38</sup>

Dans cette partie, nous présentons brièvement la synthèse de l'un de ces édifices. Il est à noter que des structures naturelles non-contraintes, connues pour adopter des topologies antiparallèles dans les conditions de catalyse utilisées, ont également été synthétisées. Puis, dans un souci de diversifier au maximum les structures, plusieurs perspectives de nouvelles stratégies sont évoquées.

##### IV.1. Synthèse de G-quadruplexes de contrôle

Dans un souci de comparaison et de contrôle vis-à-vis des structures contraintes, il est important de disposer de G-quadruplexes dit « naturels » pouvant adopter les mêmes topologies que les édifices contraints. De ce fait, il est alors possible d'essayer de déterminer l'influence de chaque élément du G-quadruplexe (contraintes, natures et longueurs des boucles, tailles des sillons, etc ...) sur l'induction asymétrique lors des catalyses. C'est donc dans cette optique que la séquence **24** « HT21 + T » ( $d[5'GGG(TTAGGG)_3T3']$ ) (Figure 26A) et un aptamère à thrombine **25** « TBA » ( $d[5'GGTTGGTGTGGTTGG3']$ ) ont été synthétisés par SPOS (Figure 26B). Ce dernier est particulièrement documenté dans la littérature et adopte une topologie antiparallèle dite de type « chaise ». <sup>64</sup> La séquence « HT21 + T » adopte quant à elle

<sup>64</sup> Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J. A., Feigon, J., *PNAS* **1993**, *90*, 3745-3749.



une topologie antiparallèle de type panier, mais seulement composée de deux tétrades de guanosines.<sup>65</sup>

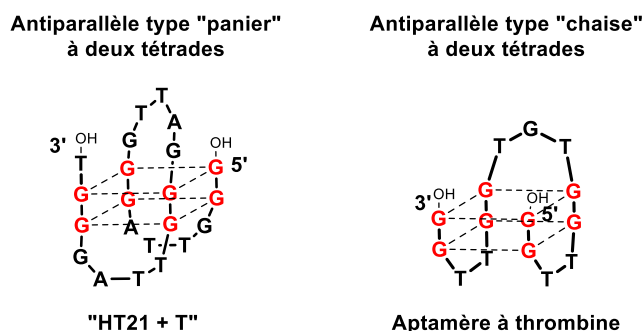


Figure 26 : Représentation schématique (A) du G-quadruplexe « HT21 + T » et (B) de l'aptamère à thrombine.

## IV.2. Stratégie de synthèse de l'édifice contraint

### IV.2.1. Synthèse du gabarit peptidique

Selon la même logique que les stratégies présentées précédemment, le RAFT **27** fonctionnalisé sur la face supérieure par deux fonctions oxyamines protégées et deux fonctions azotures, a été synthétisé (Schéma 16). Celui est obtenu après cyclisation du peptide linéaire **26**. Une lysine est laissée libre sur la face inférieure en vue d'un éventuel ancrage sur un support fixe. L'incorporation des fonctions azoture et oxyamine protégées est faite selon les stratégies de « building block » présentées précédemment.

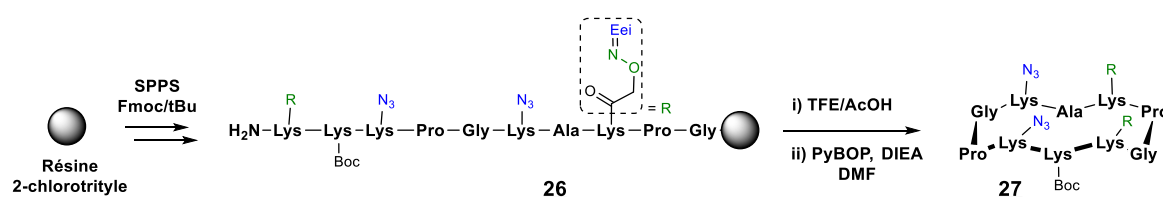


Schéma 16

Dans le but de concevoir des modèles simples pour l'étude en catalyse asymétrique, il est choisi de synthétiser un RAFT dit « latéral » plutôt qu'un RAFT dit « diagonal ». En effet, dans le cas d'un gabarit « diagonal » deux structures différentes peuvent être obtenues comme présenté sur le Figure 25. Bien que la topologie adoptée par le G-quadruplexe contraint soit la même, cela introduit un paramètre supplémentaire qu'il peut être difficile de contrôler et ainsi compliquer l'étape de séparation/purification de ces composés. Il est aussi intéressant de noter que contraindre les extrémités 3' (respectivement 5') des deux brins d'ODN, du même côté du RAFT, et non en diagonale, induit une topologie antiparallèle de type « panier » (cf. Figure 26 A).

<sup>65</sup> Lim, K. W., Amrane, S., Bouaziz, S., Xu, W., Mu, Y., Patel, D. J., Luu, K. N., Phan, A. T., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4301-4309.

#### IV.2.2. Synthèse des oligonucléotides modifiés

Dans le but d'ancrer les brins d'ODN au support peptidique, il est nécessaire d'introduire des modifications alcyne et carbonyle aux extrémités. Il a été choisi de manière arbitraire de fonctionnaliser les séquences d'ODN en position 3' par un groupement aldéhyde, et en position 5' par une fonction alcyne. Ainsi, la séquence modifiée ( $d[{}^5xAGGGTTAGGGT{}^3y]$ ,  $x = \text{alcyne}$  et  $y = \text{aldéhyde}$ ) a été préparée par SPOS (Schéma 17). Dans la même logique que les travaux antérieurs, le motif naturel de la séquence télomérique humaine est conservé. Après séparation du support, la séquence d'ODN **28** est obtenue avec un rendement de 57 % et analysée par RP-UPLC/MS. La fonction carbonyle est générée par coupure oxydante du diol en position 3' de la séquence, en présence de *mé*ta-périodate de sodium. La réaction est considérée comme quantitative et la séquence **29** est analysée par UPLC-MS après passage sur chromatographie à exclusion stérique.

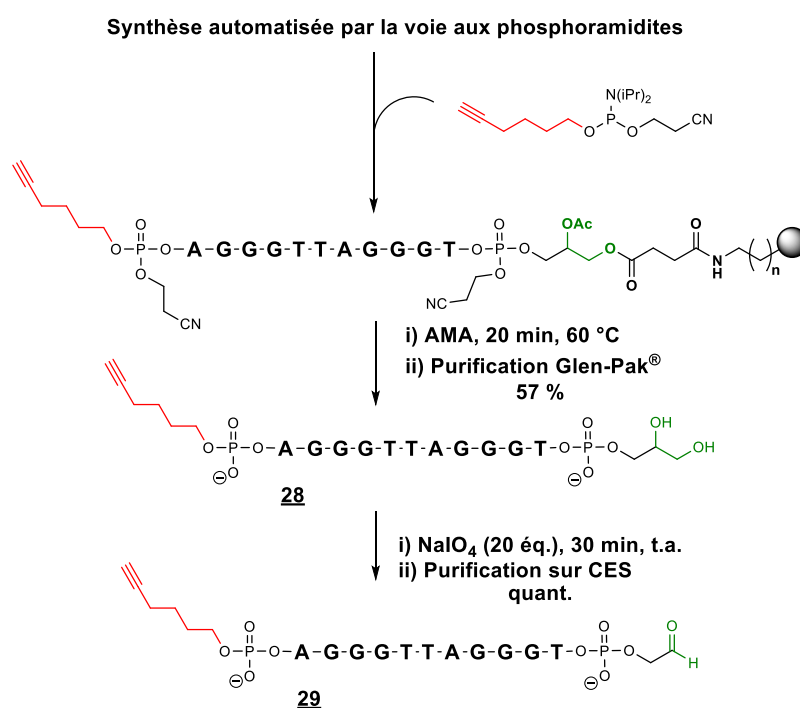


Schéma 17

#### IV.3. Bio-conjugaison des ODN et châssis et observations

Dans un premier temps il a été choisi de greffer les brins d'ODN riches en guanosine via une ligation éther d'oxime. La première étape consiste alors à déprotéger les fonctions oxyamine du RAFT **27** en présence d'un mélange  $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$  (1 :1) pendant 30 min à température ambiante. La ligation éther d'oxime est ensuite réalisée dans les conditions usuelles, avec le RAFT **30** et la séquence **29**. L'avancement de la réaction est suivi par UPLC-MS. La structure intermédiaire **31** est obtenue, après purification par RP-HPLC, avec un rendement de 29 % (Schéma 18).

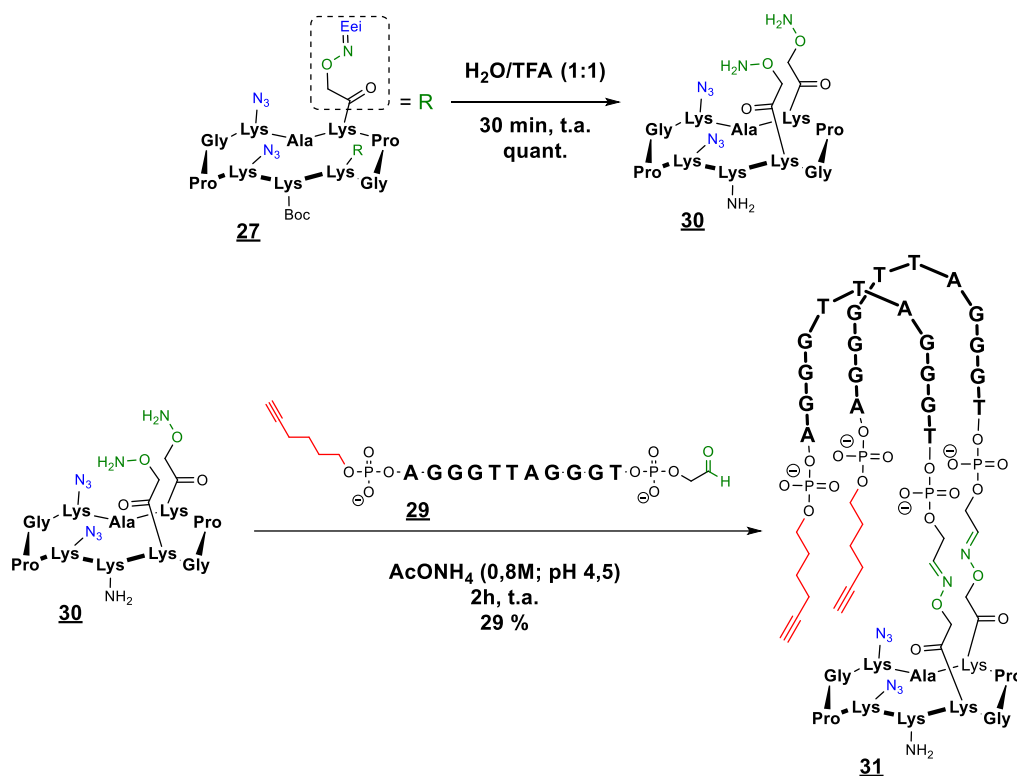


Schéma 18

La seconde et dernière étape consiste donc à contraindre la structure en position antiparallèle *via* une ligation de type CuAAC. Afin de faciliter la réaction, l'intermédiaire **30** est préorganisé en topologie antiparallèle dans une solution aqueuse de NaCl (Schéma 19). La réaction CuAAC est réalisée dans les conditions décrites dans la partie II.3 et est suivie par UPLC/MS.

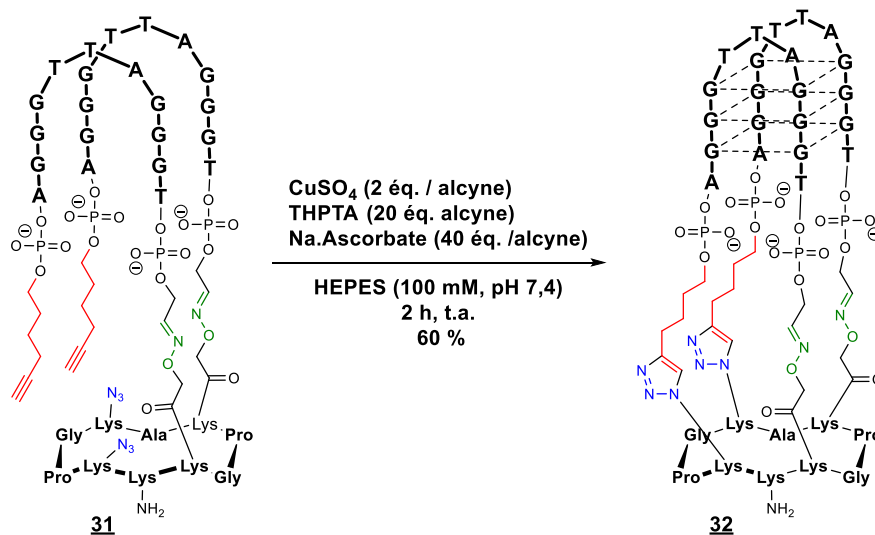
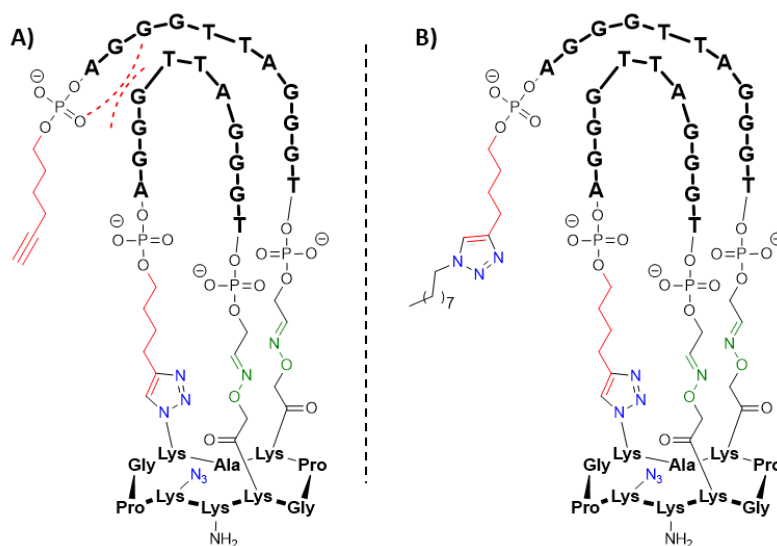


Schéma 19

La principale difficulté lors de cette seconde étape est le fait qu'il n'y ait pas de changement de masse entre l'édifice intermédiaire **31** et le produit final **32**. Ainsi, seule une légère variation du temps de rétention en UPLC peut témoigner de la formation de la structure. Malheureusement, aucun changement significatif de temps de rétention n'a été observé lors

de la réaction dans nos conditions. La stratégie envisagée a alors été d'introduire en cours de réaction du 1-azidononane, une longue chaîne carbonée apolaire susceptible de réagir avec les fonctions hexynyles résiduelles non couplées des ODN. De cette manière, il devrait être possible d'identifier et de séparer le produit final des structures non complètement contraintes, comme représenté sur la Figure 27. Aucune variation du temps de rétention et/ou de masse n'a pu être observée durant cette synthèse, ainsi, l'hypothèse d'une conversion totale est alors faite à ce stade et sera discutée au chapitre II.



**Figure 27** : Représentation (A) de la structure intermédiaire susceptible de bloquer la réaction et (B) de la structure potentielle après réaction avec le 1-azidononane.

#### IV.4. Perspectives

Dans l'optique de concevoir des mimes de G-quadruplexes les plus stables possible, il a été choisi d'explorer d'autres types de liaison afin de remplacer le lien éther d'oxime. En effet, bien que ce dernier soit globalement stable dans les conditions de catalyse, celui-ci semble s'hydrolyser partiellement au cours du temps. Le couplage de type peptidique représente alors une alternative intéressante, puisque stable et déjà décrit dans la littérature comme étant compatible avec les ODN. Cependant, il semble que cette liaison nécessite l'introduction d'un très large excès d'un des composés pour observer la formation du lien amide.<sup>66</sup> Or, nous souhaitons construire un édifice antiparallèle à boucles contraintes, impliquant ainsi que la liaison puisse être réalisée en conditions stœchiométriques. L'objectif est donc double : synthétiser un nouvel édifice antiparallèle, à priori plus stable, et réussir une liaison amide en conditions équimolaires.

Pour cela, le châssis peptidique **34** a été obtenu après cyclisation du peptide linéaire **33**, synthétisé par SPPS avec la résine 2-chlorotrityle, comme présenté sur le Schéma 20. Il présente sur la face supérieure deux fonctions azotures et deux fonctions carboxyles protégées. Ces dernières sont incorporées en remplaçant les synthons **3**, fonctionnalisés avec

<sup>66</sup> Li, Y., Gabriele, E., Samain, F., Favalli, N., Sladojevich, F., Scheuermann, J., Neri, D., *ACS Comb Sci* **2016**, *18*, 438-443.

des oxyamines protégées, par des acides glutamiques. Pour les mêmes raisons qu'évoquées précédemment, il a été choisi de privilégier un châssis peptidique dit « latéral ». Enfin, il est intéressant de noter l'absence de lysine sur la face inférieure dans le but d'éviter tout couplage intramoléculaire, de type peptidique, lors de l'étape de ligation avec les séquences d'ODN.

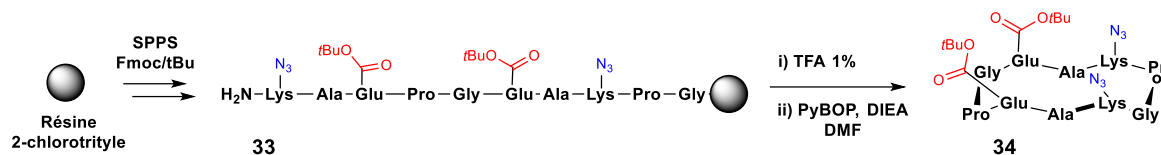


Schéma 20

Selon la même stratégie que pour les synthèses précédentes, le brin **35**, respectivement modifié aux extrémités 5' et 3' par des fonctions hexynyle et amine, est synthétisé par SPOS (Schéma 21). Afin de conserver des espaceurs de longueurs équivalentes de chaque côté des ligations, il a été choisi d'introduire les fonctions amines en position 3' *via* le support « 3'-PT-amino-modifier C6 CPG ».

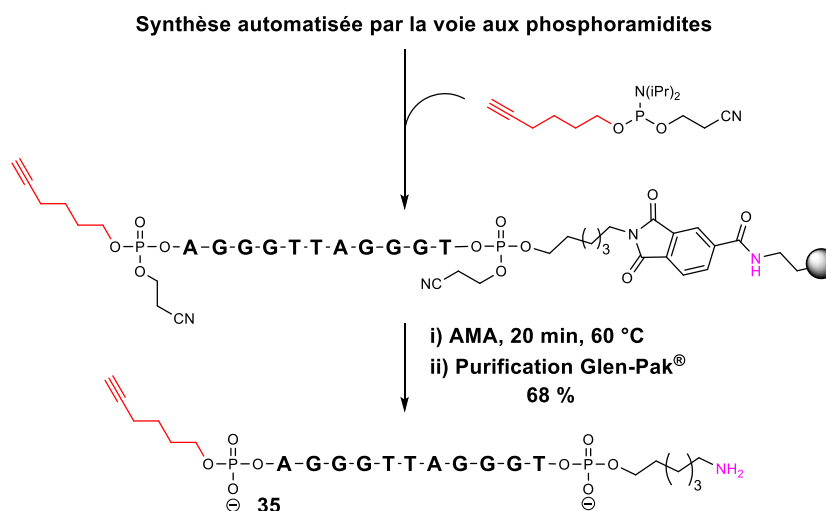
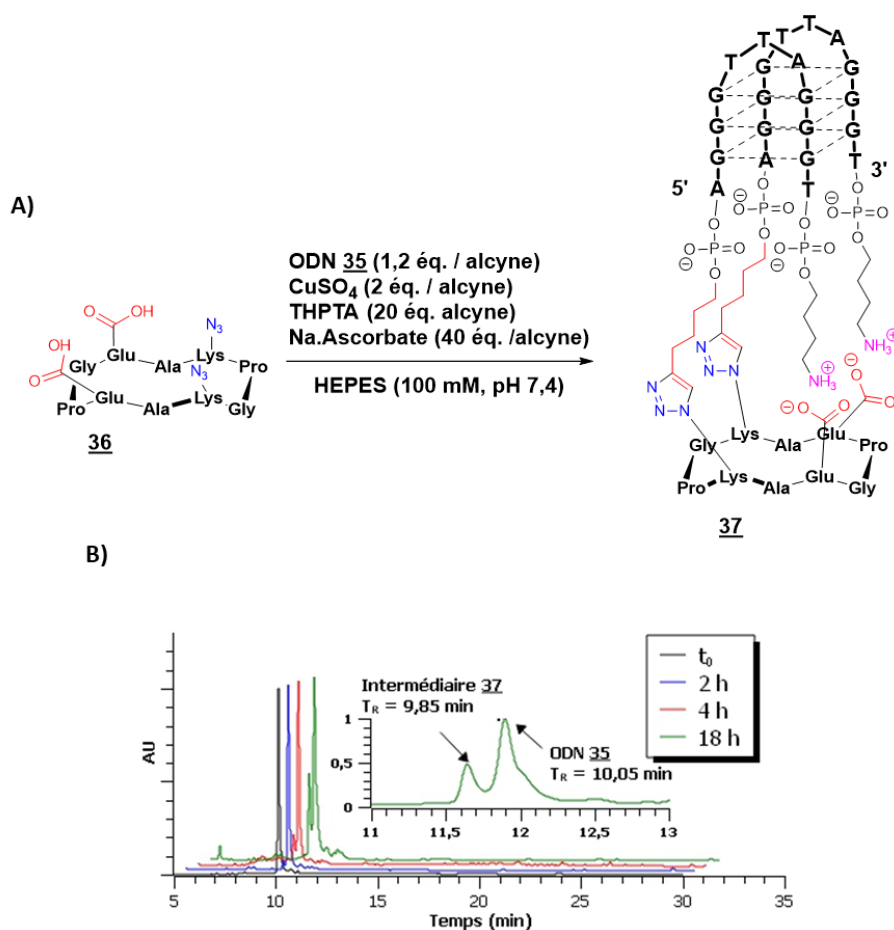


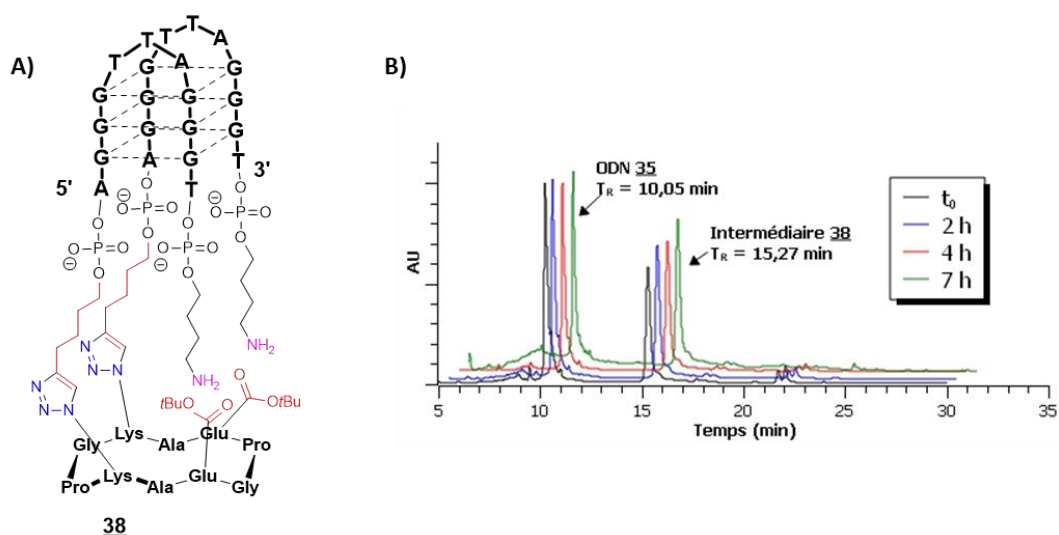
Schéma 21

Avant de coupler les séquences d'ODN, les fonctions carboxyles présentes sur le RAFT **34** sont déprotégées en milieu acide, puis le châssis **36** est purifié par RP-HPLC. Il a été choisi, dans un premier temps, de greffer les séquences d'ODN *via* la ligation triazole. L'idée étant de pouvoir par la suite conditionner la structure intermédiaire **37**, représentée sur la Figure 28A, en topologie antiparallèle en présence de NaCl. La proximité des fonctions ammonium et carboxylate, à pH neutre, ainsi que la formation du G-quadruplexe, devrait par la suite faciliter la ligation de type amide. Cependant, dans les conditions usuelles de ligations CuAAC, une très faible conversion est observée. De plus, la séquence d'ODN et le produit intermédiaire présentent des temps de rétention particulièrement proches (Figure 28B). Il est alors difficile de les isoler et de purifier le produit souhaité.



**Figure 28:** (A) Synthèse de l'intermédiaire **37** via une ligation CuAAC entre l'ODN **35** et le RAFT **36** et (B) chromatogramme du suivi HPLC de de la réaction.

Afin d'accroître le temps de rétention de l'édifice intermédiaire, et donc de faciliter l'étape de purification, il a été choisi de ne pas déprotéger les fonctions carboxyle en amont de l'étape de ligation CuAAC. Ainsi, en conservant les groupements protecteurs *tert*-butyle, le produit intermédiaire devrait être bien plus hydrophobe que la séquence d'ODN. De plus, nous faisons l'hypothèse que la faible conversion observée est potentiellement due à des répulsions électrostatiques entre les groupements phosphates des brins d'ADN et les fonctions carboxylates. Afin d'essayer de limiter cela, il a été choisi de remplacer la solution de tampon HEPES pour une solution de tampon acétate de triéthylammonium (TEAA) concentrée, susceptible de mieux écranter les charges des groupements phosphates. Enfin, les quantités de cuivre et d'ascorbate de sodium sont augmentées pour accélérer la réaction. Dans ces nouvelles conditions, on observe une conversion significative de 48 % en **38** après 7 h de réaction (Figure 29).

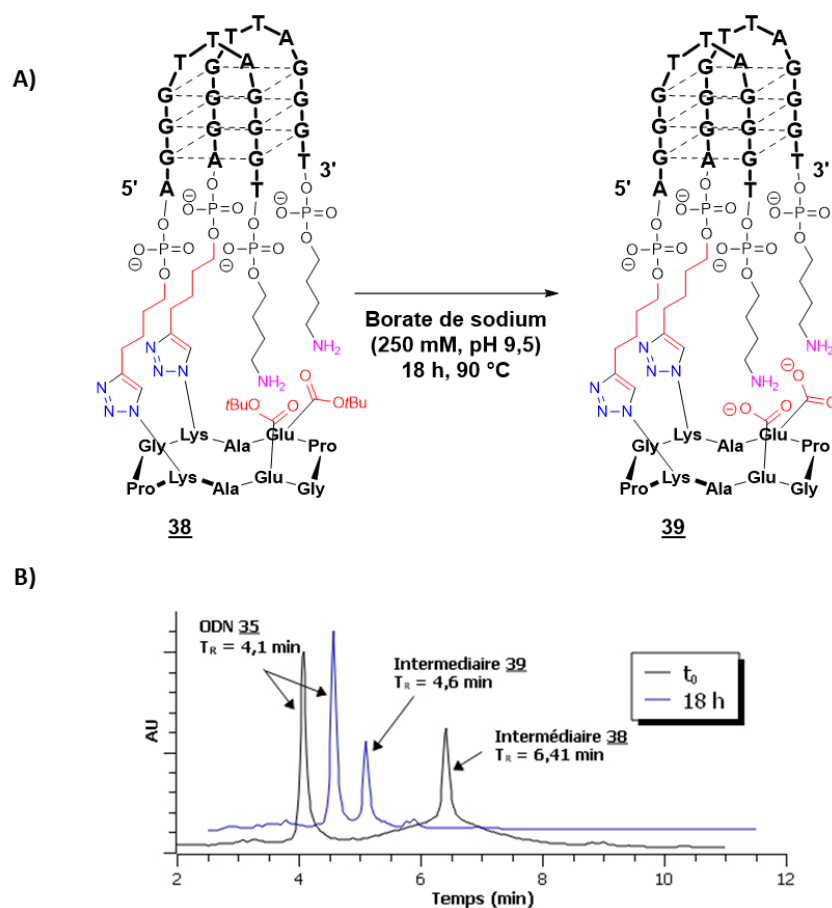


**Figure 29:** Représentation (A) de l'intermédiaire **38** et (B) chromatogramme du suivi HPLC de la ligation CuAAC.

Les sels ainsi que les excès en réactifs sont éliminés après passage sur chromatographie par exclusion stérique. La ligation amide n'étant pas favorisée en conditions stœchiométriques, le brut réactionnel est directement engagé dans l'étape suivante. Il est important de noter que toutes les réactions de couplages effectuées sont réalisées sur des quantités de l'ordre de la dizaine de nanomoles. Ainsi il est judicieux d'éviter, lorsque cela est possible, une étape de purification pour limiter les pertes éventuelles de produit.

Avant l'étape de couplage de type peptidique, il est nécessaire de déprotéger les fonctions carboxyliques. Les séquences d'ODN n'étant pas compatibles avec les conditions acides usuelles de déprotection des groupements *t*Bu, la déprotection est faite par thermolyse en conditions basiques. Le brut réactionnel est alors incubé à 90 °C, en présence d'une solution de tampon borate de sodium à pH 9,5 (Figure 30A). Ces conditions ont été décrites dans la littérature comme étant compatibles avec les ODN.<sup>67</sup> On observe sur la Figure 30B que la majorité des fonctions carboxyliques sont déprotégées, après 18 h d'incubation. De plus, aucune dégradation des structures **38** et **39** n'est observée dans ces conditions. En effet, la fraction relative de l'aire calculée sous le pic UV du brins d'ODN reste la même tout au long de la déprotection.

<sup>67</sup> Ratnayake, A. S., Flanagan, M. E., Foley, T. L., Smith, J. D., Johnson, J. G., Bellenger, J., Montgomery, J. I., Paegel, B. M., *ACS Comb. Sci.* **2019**, *21*, 650-655.



**Figure 30:** (A) Déprotection des fonctions carboxyles en milieu basique et (B) évolution des chromatogrammes en UPLC-MS.

Plusieurs conditions de réactions ont par la suite été testées pour la ligation amide, afin de contraindre la structure du G-quadruplexe en topologie antiparallèle. Celles-ci sont résumées dans le Tableau 2. Malheureusement, malgré les nombreuses modulations faites : solution de tampon, agent de couplage, températures *etc...* aucune formation de lien amide n'a pu être observée. Il semble donc que la proximité des fonctions amine et carboxylate ne soit pas suffisante pour faciliter la ligation amide.



**Tableau 2 :** Conditions explorées pour la ligation amide sur l'intermédiaire **38**.

Conditions	Activateur	Agent de couplage	Base	Solution de tampon
A	EDC.HCl <sup>a</sup> (300 éq.)	HOAt <sup>b</sup> (60 éq.)	DIPEA (300 éq.)	(1), (2) ou (3) 40 % DMSO
B	EDC.HCl <sup>a</sup> (300 éq.)	HOAt <sup>b</sup> (60 éq.)	DIPEA (300 éq.)	(1), (2) ou (3) 40 % DMF
C	EDC.HCl <sup>a</sup> (300 éq.)	/	DIPEA (300 éq.)	(1), (2) ou (3) 100 % H <sub>2</sub> O
D	EDC.HCl <sup>a</sup> (300 éq.)	NHS (60 éq.)	DIPEA (300 éq.)	(1), (2) ou (3) 100 % H <sub>2</sub> O

Les équivalents sont exprimés par rapport aux fonctions amines. Solution tampon : (1) solution de tampon borate de sodium (150 mM, pH 9,5) ; (2) solution de tampon MOPS (50 mM, pH 8,0) et (3) solution de tampon HEPES (50 mM, pH 8,0). N.B. : <sup>a</sup>EDC.HCl = 1-ethyl-3-carbodiimide hydrochloride ; <sup>b</sup> HOAt = 1-hydroxy-7-azabenzotriazole.

Cette thèse n'ayant pas pour vocation de mettre au point de nouvelles méthodologies de ligations, aucune investigation supplémentaire n'a été menée. Cependant, la ligation squarate représente une perspective et une alternative intéressante au couplage de type peptidique. En effet, comme il a été dit en introduction de ce chapitre, la ligation squarate est décrite dans la littérature comme une ligation biocompatible avec les ODN et susceptible de fonctionner en conditions quasi-stœchiométriques. De plus, il est intéressant de noter que les conditions décrites pour la « seconde » ligation amide correspondent parfaitement aux conditions de déprotection en milieu basique des groupements *t*Bu. Il serait alors intéressant d'observer si la réaction de ligation est susceptible d'être réalisée *in-situ* lors de l'étape de la déprotection des fonctions carboxyles.

## V. Les catalyseurs

Il a été décrit, dans la littérature, différents types de complexes susceptibles de réaliser des catalyses asymétriques en présence de brins d'ODN. Ainsi, en fonction de la nature des ligands utilisés, plusieurs modes d'interaction avec la structure d'ODN peuvent être observés. Par exemple, les complexes plans tétradentates de type porphyrine,<sup>68</sup> salen<sup>69</sup> ou encore tridentates de type terpyridine,<sup>30,70</sup> ont été largement décrits comme pouvant interagir par «  $\pi$ -stacking » avec les tétrades extérieures de guanines. Il semble même que leur interaction stabilise fortement l'ensemble de la structure. Cependant, il existe encore une certaine incertitude concernant les complexes bidentates, tels que les bipyridines (bipy), et leur type d'interaction avec les G-quadruplexes. En effet, bien que certaines études aient démontré leur interaction au sein des sillons de l'ADN double brins, il n'existe, à notre connaissance, aucune

<sup>68</sup> (a) Canale, T. D., Sen, D., *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects* **2017**, *1861*, 1455-1462; (b) Cao, Y., Ding, P., Yang, L., Li, W., Luo, Y., Wang, J., Pei, R., *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 6896-6906; (c) Chen, J., Zhang, Y., Cheng, M., Guo, Y., Šponer, J., Monchaud, D., Mergny, J.-L., Ju, H., Zhou, J., *ACS Catal.* **2018**, *8*, 11352-11361.

<sup>69</sup> Ali, A., Kamra, M., Roy, S., Muniyappa, K., Bhattacharya, S., *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 341-352.

<sup>70</sup> Bertrand, H., Monchaud, D., De Cian, A., Guillot, R., Mergny, J.-L., Teulade-Fichou, M.-P., *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2555.

preuve directe ayant pu mettre en évidence leur mode d'interaction avec les G-quadruplexes.<sup>71</sup>

Ainsi, en début de cette partie, des complexes de salen de manganèse, susceptibles d'interagir par «  $\pi$ -stacking » avec la tétrade extérieure, sont brièvement présentés. Il est important de noter que ces complexes ont été synthétisés en amont de cette thèse. Puis, la synthèse du complexe de cuivre, majoritairement utilisé lors des catalyses de sulfoxydation, est abordée. Enfin, différentes stratégies de ligations du complexe de cuivre aux édifices de G-quadruplexes sont présentées.

### V.1. Salen de manganèse

Au sein de l'équipe BioCE plusieurs complexes de salen de manganèse ont été synthétisés lors de thèses précédentes, en vue de réaliser des catalyses d'oxydation, en présence d'enzymes artificielles.<sup>72</sup> Dans l'optique d'étudier différents types de catalyseurs, nous avons choisi d'étudier les complexes de salen représentés sur la Figure 31.

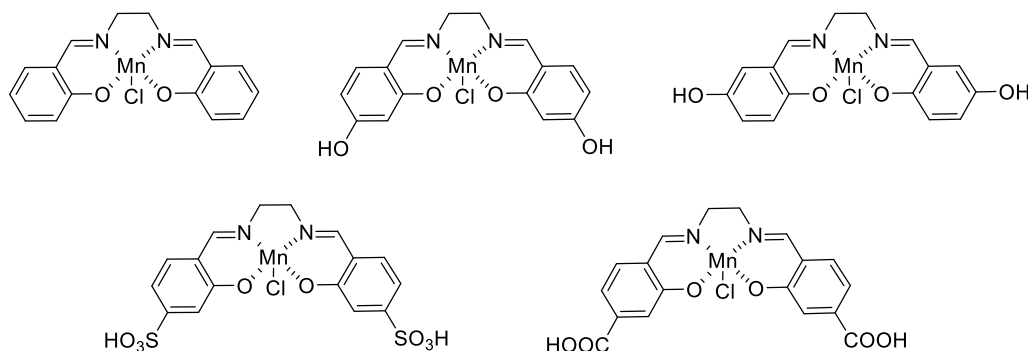


Figure 31 : Représentation des complexes de salen de manganèse.

De par la conformation plane de ces complexes, nous nous attendons à des interactions par superposition au niveau des tétrades extérieures. Il sera intéressant alors, dans le chapitre III, de déterminer, dans un premier temps, l'efficacité catalytique de tels complexes, et si la tétrade extérieure des G-quadruplexes est une zone d'interaction pertinente pour induire de l'asymétrie.

### V.2. Synthèse du complexe de cuivre

Comme nous avons pu le dire en introduction de cette partie, il existe toujours une incertitude quant aux interactions entre les complexes de type bipy et les G-quadruplexes. Les constantes de dissociation, noté  $K_d$ , semblent trop importantes pour pouvoir être mesurées par UV.<sup>73</sup> Néanmoins, parmi les nombreux ligands étudiés en catalyse asymétrique avec des DNAzyme, la littérature semble identifier le ligand 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine (*dmbipy*), comme un des

<sup>71</sup> Draksharapu, A., Boersma, A. J., Browne, W. R., Roelfes, G., *Dalton Trans.* **2015**, 44, 3656-3663.

<sup>72</sup> Lopez, S., De nouveaux biocatalyseurs hétérogènes pour des réactions d'oxydation : des cristaux de métalloenzymes artificielles, Thèse, Université Grenoble Alpes, **2018**.

<sup>73</sup> (a) Cheng, M., Li, Y., Zhou, J., Jia, G., Lu, S.-M., Yang, Y., Li, C., *Chem. Commun.* **2016**, 52, 9644-9647; (b) Cheng, Y., Cheng, M., Hao, J., Jia, G., Li, C., *ChemBioChem* **2018**, 19, 2233-2240.

plus prometteurs.<sup>74</sup> Ces observations sont aussi confirmées par les travaux de Can Li lors de l'utilisation de G-quadruplexes en catalyse de sulfoxydation asymétriques. Il semble même que la présence des groupements méthyles en position 4 et 4' soit essentielle à l'induction asymétrique. En effet, en présence du ligand 2,2'-bipyridine (bipy) ou du ligand 4,4'-diméthoxy-2,2'-bipyridine, les inductions asymétriques observées sont soit nulles, soit bien plus modestes.

Le complexe de cuivre  $Cu^{II}mbipy(NO_3)_2$  a ainsi été synthétisé en mélangeant 0,4 équivalents de nitrate de cuivre(II) avec la 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine. Le précipité ainsi obtenu est purifié par recristallisation par diffusion, dans de l'éthanol, en présence d'acétate d'éthyle (AcOEt).<sup>75</sup> Après deux jours, le complexe **40** est obtenu sous forme de cristaux bleus foncés, avec un rendement de 20 %. Les analyses par spectrométrie de masse et spectroscopie UV confirment bien la présence majoritaire du composé attendu (Schéma 22).

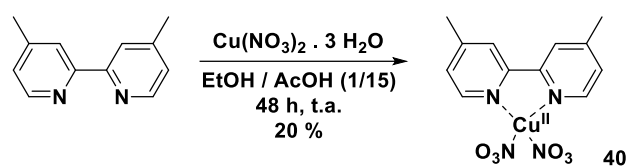


Schéma 22

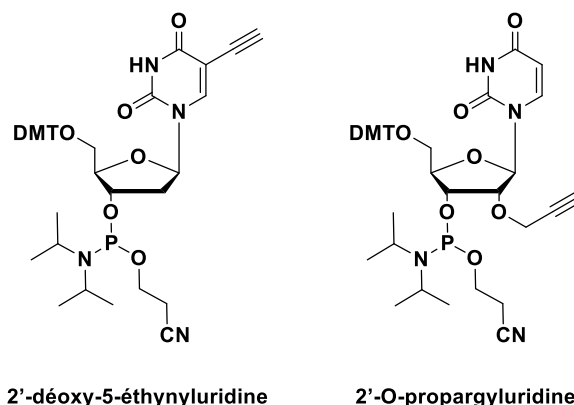
### V.3. Stratégies de ligations covalentes du complexe de cuivre aux structures contraintes

Plusieurs études ont montré que lier de façon covalente l'entité catalytique à la molécule d'ADN permet d'observer une plus grande efficacité catalytique ainsi qu'une meilleure induction asymétrique.<sup>31b</sup> La catalyse asymétrique, par l'entité [ADN – complexe catalytique], est, en effet, favorisée au détriment de la catalyse par le complexe seul, achiral, en suspension dans la solution. De plus, de la même manière que pour les métalloenzymes artificielles, en positionnant directement le complexe catalytique au niveau des zones d'intérêts, il est possible d'optimiser l'efficacité de la catalyse.

La majorité des exemples de ligations covalentes décrites dans la littérature sont des ligations de type CuAAC ou de type Sonogashira. Elles impliquent le plus souvent l'utilisation d'acides nucléiques modifiés, tel que les dérivés de phosphoramidite 2'-déoxy-5-éthynyluridine ou encore le dérivé 2'-O-propargyluridine, présentés sur la Figure 32.

<sup>74</sup> Mansot, J., Aubert, S., Duchemin, N., Vasseur, J.-J., Arseniyadis, S., Smietana, M., *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 2875-2881.

<sup>75</sup> Roelfes, G., Boersma, A. J., Feringa, B. L., *Chem. I Commun.* **2006**, 635.

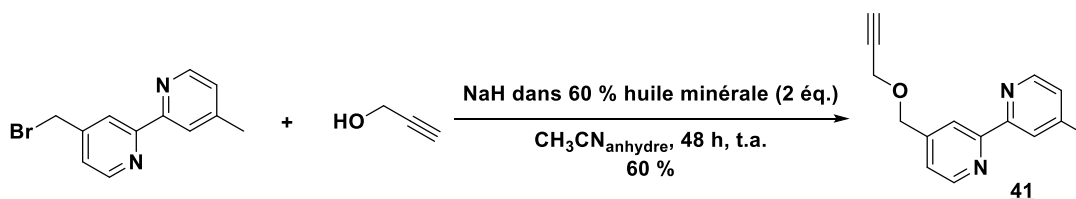


**Figure 32** : Représentation des phosphoramidites 2'-déoxy-5-éthynyluridine (gauche) et 2'-O-propargyluridine (droite).

Cependant, nous souhaitons, dans un premier temps, concevoir des édifices simples qui serviront de preuve de concept. Pour cela, deux points d'ancrages ont alors été identifiés : soit en bout de séquence d'ODN, soit au niveau d'une des lysines fonctionnalisées sur la face supérieure du RAFT. Une fonctionnalisation en bout de chaîne, plutôt qu'en milieu de séquence, est en effet plus simple à mettre en place et implique des coûts moins importants de modification.

### V.3.1. Synthèse d'une bipyridine de cuivre comportant un bras alcyne

Afin de pouvoir réaliser une ligation CuAAC, le ligand **41** a été synthétisé par réaction de Williamson entre la 4-(bromométhyl)-4'-méthyl-2,2'-bipyridine et l'alcool propargylique, en présence d'hydru de sodium dans de l'acétonitrile anhydre (Schéma 23). Après 48 h de réaction, le produit souhaité est obtenu avec un rendement de 60 %, sous forme d'une fine poudre orange. L'analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) confirme bien la présence du produit souhaité.



**Schéma 23**

Il a été choisi de directement engager le brut réactionnel dans les réactions de ligation avec les édifices modifiés. En effet, seule la bipyridine fonctionnalisée **41** est susceptible de réagir lors du couplage CuAAC.

### V.3.2. Synthèse d'une structure « sur gabarit » modifiée et bio-conjugaison

Dans le but de valoriser l'utilisation d'un RAFT, nous avons souhaité y lier de façon covalente la molécule **41**. L'objectif est de concevoir un modèle simple permettant d'observer l'apport éventuel d'un ancrage covalent du complexe, dans un environnement proche du G-quadruplexe. Pour cela, la structure « HT21 + TT » - RAFT **44**, comportant une fonction

azoture sur la face supérieure du châssis peptidique, a été conçue. Celle-ci est synthétisée à partir du RAFT **43**, obtenu après déprotection en condition acide des fonctions oxyamines du RAFT **42**, synthétisé par SPPS. L'ODN **10** (« HT21 + TTx », x = aldéhyde) est ensuite lié *via* une ligation éther d'oxime (Schéma 24). Les conditions de réaction sont identiques à celles décrites précédemment. La structure intermédiaire **44** est alors obtenue, après purification par RP-HPLC, avec un rendement de 50 %.

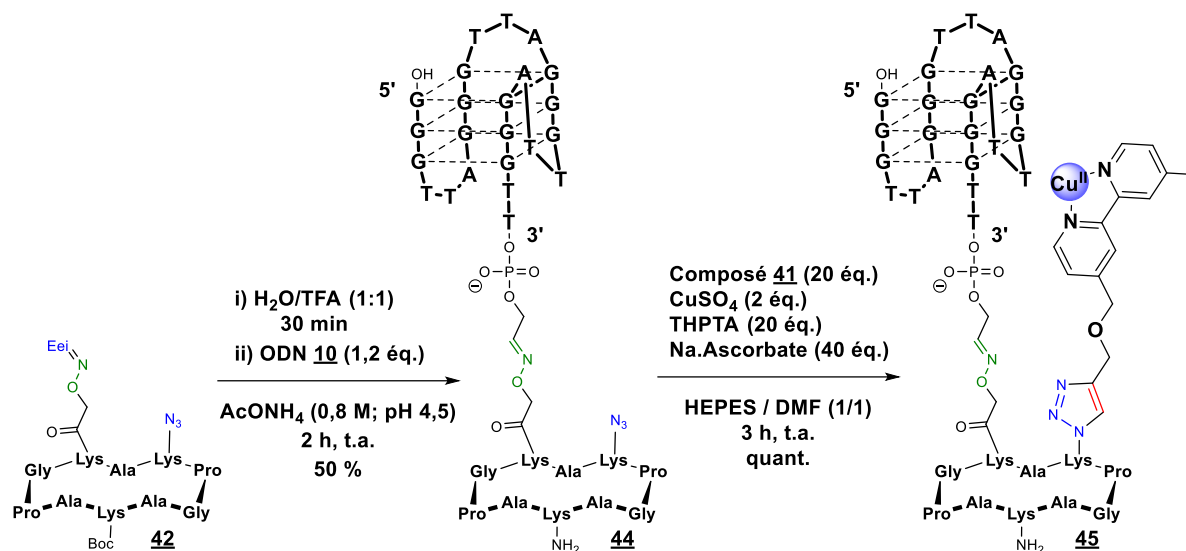


Schéma 24

La seconde et dernière étape consiste alors à ancrer par CuAAC la bipy **41** sur l'édifice intermédiaire **44**. La réaction est faite dans les conditions usuelles présentées précédemment, avec néanmoins, pour des raisons de solubilité du dérivé bipyridine, 50 % de DMF. On observe par UPLC-MS, après 3 h de réaction, une conversion totale. Cependant, pour des raisons encore non expliquées, des dégradations importantes, de l'ordre de 50 %, sont observées après purification par RP-HPLC. En effet, on constate une coupure de la ligation éther d'oxime et ainsi la séparation du brins « HT21 + TT » du châssis peptidique. Malheureusement, par manque de temps, cette stratégie de couplage n'a pas pu être optimisée et la structure **45** n'a pas encore été engagée dans des essais en catalyse.

Néanmoins, il est possible d'imaginer comme perspective d'optimisation de lier directement, *via* une ligation CuAAC, la bipy **41** lors de la synthèse par SPPS du RAFT. De ce fait, les excès de réactifs peuvent être facilement éliminés par filtration. De plus, cette stratégie présente l'avantage de n'impliquer que des ligations triazoles, plus stables que la ligation éther d'oxime. Enfin, une fois le RAFT fonctionnalisé avec le complexe bipy synthétisé, la séquence d'ODN peut être ancrée par ligation CuAAC.

### V.3.3. Synthèse d'un édifice contraint parallèle modifié et bio-conjugaison

Une autre stratégie de synthèse a été envisagée, avec cette fois-ci, une ligation covalente au niveau des brins d'ODN. L'idée étant de fonctionnaliser les extrémités 3' des structures contraintes parallèles. On espère alors lier le complexe de cuivre au plus proche des zones pertinentes du G-quadruplexe.

#### V.3.3.1. Ligation triazole

Une première possibilité de lier le complexe bipy **41** aux séquences d'ODN est l'utilisation d'une ligation triazole. Pour cela, les brins d'ODN **46<sub>a-b</sub>** sont synthétisés par SPOS. Les fonctions alcyne et amine sont respectivement introduites aux extrémités 5' et 3' *via* l'utilisation d'un phosphoramidite modifié par un groupement hexynyle et d'une résine 3'-PT-amino-modifier C3 ou C6. Il est intéressant de noter que nous avons fait le choix d'introduire deux longueurs différentes d'espaceur, C3 et C6, au niveau des fonctions amines. Ainsi, l'influence de la longueur de l'espaceur introduit pourra être étudiée lors des essais en catalyse. Après séparation du support, les produits sont, respectivement, obtenus avec des rendements de 50 % et 79 %. Les brins d'ODN étant fonctionnalisés en position 5', ils sont directement engagés dans une réaction de ligation CuAAC avec le RAFT **18** afin d'obtenir les structures contraintes parallèles **47<sub>a-b</sub>** (Schéma 25).

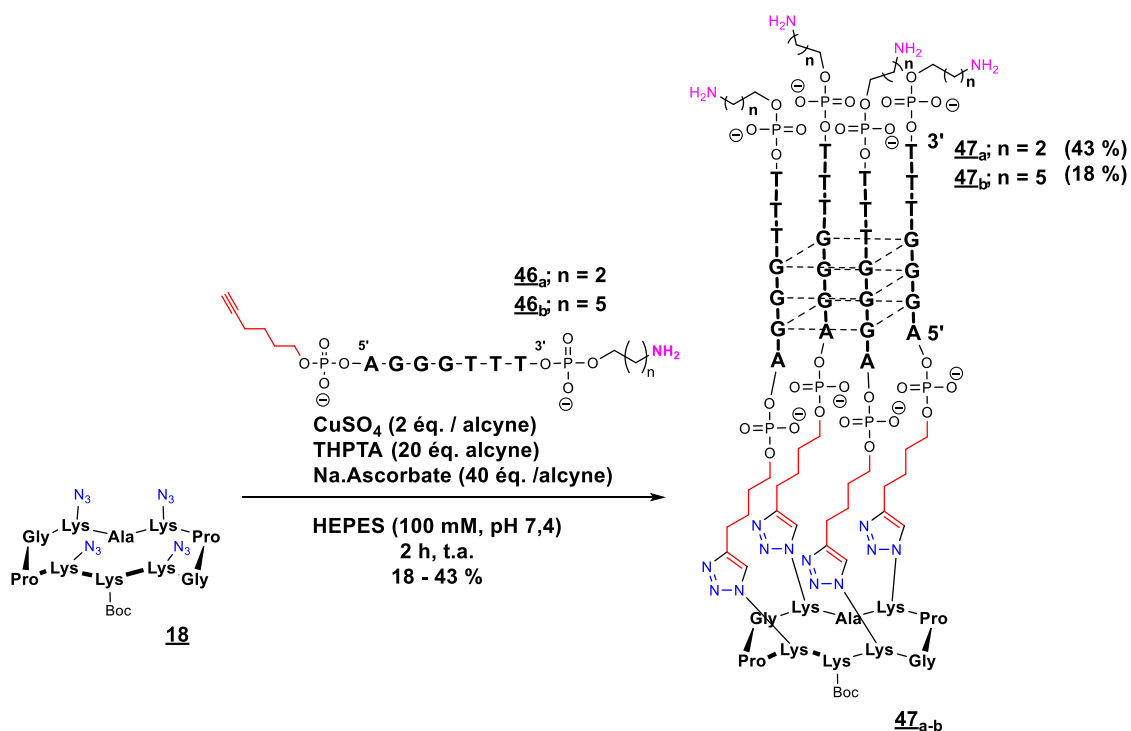


Schéma 25

Dans le but de réaliser la ligation CuAAC, il est nécessaire de transformer les fonctions amines, présentes en bout de chaîne, en fonction azoture. De ce fait, afin d'être sélectif des groupements amine présents sur les séquences d'ODN, nous avons fait le choix de conserver



réductrice avec la 4-(bromométhyl)-4'-méthyl-2,2'-bipyridine, soit une ligation CuAAC avec la bipyridine **41**, avant de séparer les séquences d'ODN du support. De cette manière, les séquences liées au complexe seraient facilement purifiées par filtration, ces dernières pouvant être par la suite ancrées sur un support peptidique, soit par CuAAC, soit par ligation éther d'oxime. L'amination réductrice présente l'avantage de n'impliquer aucune modification de la 4-(bromométhyl)-4'-méthyl-2,2'-bipyridine commerciale, par rapport à la stratégie CuAAC, bien que cette stratégie n'ait pas encore été optimisée au sein de l'équipe I<sub>2</sub>BM.

### V.3.3.2. Ligation éther d'oxime

A la vue des difficultés rencontrées lors des tentatives de ligation par CuAAC, il a été choisi d'explorer la stratégie *via* la ligation éther d'oxime. Elle présente, de plus, l'avantage, par rapport à la ligation CuAAC, d'être rapide et de ne pas impliquer la présence d'atomes de cuivre. En effet, il est envisageable que les difficultés rencontrées, lors de la ligation CuAAC, soient en parties dues à la présence du cuivre, susceptible d'être chélaté par le ligand **41**. Le ligand **50** (Schéma 27), comportant une fonction oxyamine protégée, est synthétisé selon les conditions usuelles présentées pour la synthèse de l'ester actif **2** au Schéma 8 (partie II.1). On obtient alors après traitement le produit d'intérêt sous forme d'une huile jaune, avec un rendement de 50 %. La structure est confirmée par RMN <sup>1</sup>H COSY.

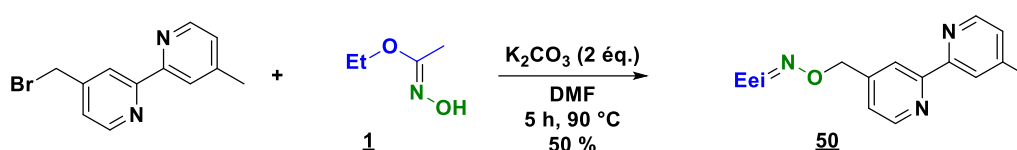


Schéma 27

Par manque de temps, seule la stratégie d'ancrage au niveau des brins d'ODN modifiés a été explorée. La séquence **51**, respectivement fonctionnalisée en position 5' et 3' par des groupements hexynyle et aldéhyde, a été obtenue selon les conditions de synthèse usuelles, avec un rendement de 65 %. La déprotection de la fonction oxyamine, présente sur le ligand **50**, se faisant à pH acide, il est dans un premier temps nécessaire de lier les brins d'ODN à la bipy. La séquence d'ODN **51** étant fonctionnalisée en position terminale 5', celle-ci est directement engagée dans la réaction de ligation éther d'oxime, en présence d'une solution de tampon acétate d'ammonium (pH 4,5), avec le ligand **50** (Schéma 28).

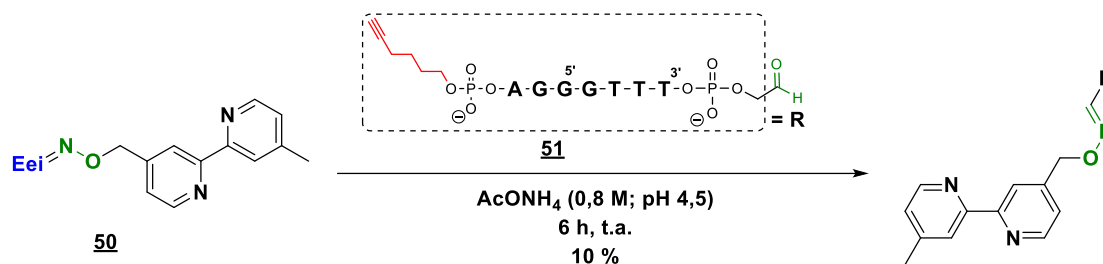


Schéma 28



Malheureusement, une conversion de seulement 10 % est observée et les quantités engagées lors de la ligation ne sont pas suffisantes pour l'étape d'ancrage sur le RAFT **19**. Il est ainsi nécessaire de procéder à des optimisations de la réaction de ligation éther d'oxime entre le brin **51** et le complexe **50** pour envisager l'ancrage par réaction CuAAC sur le RAFT **19**.

Néanmoins, il semble que la stratégie, proposée précédemment, de fonctionnalisation par ligation CuAAC sur support solide, soit la plus prometteuse. En effet, le principal intérêt de la ligation éther d'oxime réside dans la rapidité de la ligation ainsi que dans sa simplicité de mise en place. Or, seulement 10 % de conversion ont pu être observés lors de la ligation avec le brin **51**, témoignant que la réaction ne semble pas être favorable. Par comparaison, une ligation sur support solide permettrait de travailler avec un excès important du ligand **41**, facilitant la ligation avec le brin d'ODN, puis de purifier par filtration le produit souhaité.

## VI. Conclusion sur la synthèse de G-quadruplexes contraints

Dans ce chapitre, nous avons pu voir qu'il est possible d'utiliser des châssis peptidiques fonctionnalisés (RAFT) afin de contraindre des séquences d'ODN selon des topologies bien définies. Les réactions d'ancrage ont été faites selon des réaction bio-orthogonales sélectives, à savoir les ligations éther d'oxime et la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen catalysée par le Cu(I) (CuAAC).

Ainsi deux structures « sur gabarit », « HT21 + TT » - RAFT **14** et RAFT – « TA + HT21 » **15**, ont été synthétisées. Les ancrages d'un RAFT, aux positions respectives 3' et 5' des séquences d'ODN, devraient permettre de déterminer l'incidence de celui-ci sur la topologie adoptée et l'énantiosélectivité de la réaction de sulfoxydation. Les séquences libres, *i.e.* sans présence de RAFT, « HT21 + TT » **7** et « TA + HT21 » **8**, ainsi que la séquence télomérique humaine « HT21 » **6**, serviront alors de contrôles.

Dans le but de déterminer l'influence de chacune des topologies de G-quadruplexes en catalyse asymétrique de sulfoxydation, différentes structures contraintes ont été conçues. Ainsi, **dix édifices contraints en topologie parallèle ont été synthétisés**, neuf selon des ligations CuAAC en position 5' des brins d'ODN et une structure selon une ligations CuAAC en position 3'. La ligation CuAAC, jugée plus stable, a été préférée à la ligation éther d'oxime. Plusieurs paramètres, tels que la composition et la longueur du « flanking » au niveau des tétrades extérieures, ont été explorés. L'utilisation d'un châssis peptidique a aussi permis d'obtenir **un mime de G-quadruplexe contraint en topologie antiparallèle de type « panier »**. Afin de pouvoir observer l'apport de la contrainte, due à la présence du RAFT, des séquences d'ODN libres, *i.e.* sans modification, ont également été synthétisées. Les résultats obtenus pourront alors être comparées aux structures contraintes lors de l'analyse par dichroïsme circulaire (*cf.* chapitre II) et de la catalyse de sulfoxydation de dérivés du thioanisole (*cf.* chapitre III).

Une approche *via* l'utilisation d'une ligation amide a également été explorée dans le but de concevoir de nouveaux mimes, supposés plus stables, de G-quadruplexes contraints en

topologie antiparallèle. Malheureusement, cela s'est montré à ce jour infructueux, malgré les nombreuses modulations effectuées. L'utilisation de la ligation squarate a pu alors être proposée en perspective pour la formation de ce lien amide.

Enfin, dans le but d'optimiser les inductions asymétriques lors des réactions catalytiques, la possibilité d'**ancrer de façon covalente le ligand *dmbipy*** a été étudiée. Pour cela, **deux édifices parallèles, comportant des fonctions amines en position 5', et un édifice de type « sur gabarit », comportant un fonction azoture sur la face supérieure du RAFT, ont été synthétisés.** Ainsi, deux approches ont été étudiées, avec soit un ancrage au niveau de l'une des extrémités des séquences d'ODN, soit un ancrage au niveau du châssis. Malheureusement, aucune des deux voies ne se sont à ce jour montrées concluantes. Plusieurs voies d'optimisation *via* des ligations lors des synthèses supportées ont alors été proposées.

---

## Chapitre II : Etudes des topologies de G-quadruplexes

---

Les G-quadruplexes offrent un polymorphisme de repliement dépendant de nombreux paramètres tels que la composition de la séquence d'acide nucléique ou encore des conditions salines du milieu. Ce chapitre II est ainsi consacré à l'étude des conformations adoptées par les structures, contraintes et libres, synthétisées lors du chapitre précédent. Il est, en effet, important de déterminer les topologies adoptées par les structures libres, et de confirmer celles des édifices contraints, dans le but de comprendre le rôle de la topologie dans le contrôle de l'énantiosélectivité des réactions de catalyse.

En début de chapitre, le principe du dichroïsme circulaire, son utilisation pour l'étude de G-quadruplexes ainsi que les principaux paramètres pouvant influencer sur les topologies adoptées, sont introduits. Les résultats obtenus pour l'ensemble des structures synthétisées sont ensuite analysés et commentés. Dans un premier temps, une brève analyse est faite sur les séquences de thymidine servant de contrôle négatif. Le polymorphisme des séquences télomériques ainsi que l'étude de la présence du RAFT sont ensuite abordés. La topologie parallèle des structures tétramoléculaires est par la suite confirmée par dichroïsme circulaire et l'apport de la contrainte est discutée, notamment *via* une analyse thermodynamique. Enfin, la structure contrainte en topologie antiparallèle est analysée et les résultats sont comparés à ceux des séquences libres de références.

## I. Introduction

Il existe de nombreuses méthodes d'analyses disponibles pour étudier les conformations adoptées par les G-quadruplexes, telles que la RMN, la cristallographie ou encore la modélisation moléculaire, pour ne citer qu'elles. Cependant, ces méthodes sont soit longues à mettre en place, soit nécessitent l'analyse de nombreuses données. L'objectif de cette thèse étant dans un premier temps de concevoir des modèles simples de catalyseurs asymétriques, il est choisi de privilégier le dichroïsme circulaire. Il s'agit, en effet, de la méthode la plus répandue et utilisée pour l'analyse de telles structures.

### I.1. Le dichroïsme circulaire

#### I.1.1. Principe

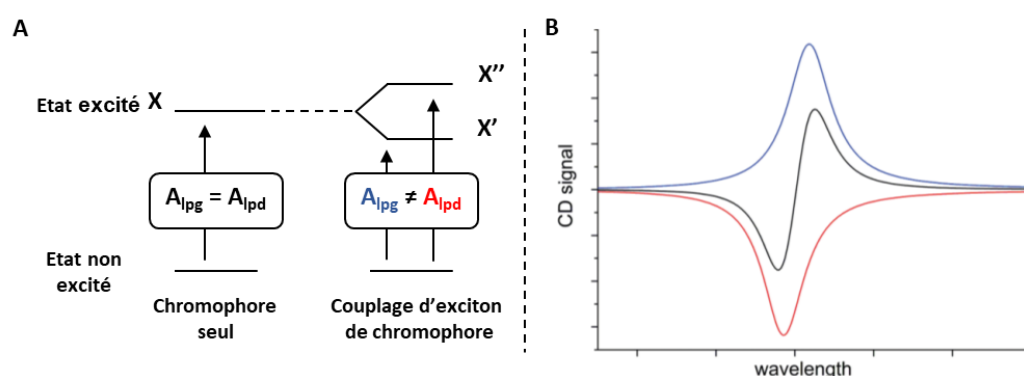
Le dichroïsme circulaire (noté DC) a été développé dans les années 1960 afin de pouvoir étudier des systèmes de cétones stéroïdienne et des complexes octaédriques ayant des moments électriques de transitions accessibles aux instruments de l'époque.<sup>76</sup> Cette méthode a par la suite été généralisée à l'étude de systèmes bien plus complexes tels que des biomolécules. Elle présente l'avantage d'être non destructrice, de nécessiter peu de produit et d'offrir un accès facile et rapide à la structure secondaire de l'espèce étudiée.

Son principe repose sur une différence d'absorption pour une espèce chirale, entre une lumière polarisée circulaire gauche et une lumière polarisée circulaire droite, en absence de

---

<sup>76</sup> Gottarelli, G., Lena, S., Masiero, S., Pieraccini, S., Spada, G. P., *Chirality* **2008**, 20, 471-485.

champ magnétique.<sup>77</sup> On définit alors le dichroïsme circulaire par  $\Delta A = A_{lpg} - A_{lpd}$ , avec  $A_{lpg}$  et  $A_{lpd}$  les absorbances respectives de lumière polarisée circulaire gauche et circulaire droite. Ce phénomène est appelé l'effet Cotton.<sup>78</sup> Pour comprendre l'origine de celui-ci, il est important de rappeler que lors de l'absorption d'un photon par une molécule, on observe le passage d'un état non excité à un état excité. Cela est rendu possible lorsque la longueur d'onde  $\lambda$  du photon correspond à l'énergie de transition entre ces deux états (pour rappel :  $E \sim \lambda^{-1}$ ). Or, lorsque des chromophores se retrouvent dans un environnement proche, l'excitation électronique n'est plus seulement localisée sur le chromophore seul mais délocalisée sur l'ensemble de ceux-ci. Ainsi de nouveaux états d'excitation, issus d'une combinaison linéaire des états d'excitations originaux, peuvent être atteints. On parle alors d'un phénomène de couplage d'exciton.<sup>79</sup> Or, lorsque l'ensemble des chromophores est chiral, l'absorption d'un photon entraîne la formation de couplages d'exciton asymétrique. Des états d'excitation  $X'$  et  $X''$ , d'énergies associées différentes, peuvent alors être atteints, selon que la lumière soit polarisée circulaire gauche ou circulaire droite (Figure 33A). Cela se traduit ainsi par des absorbances  $A_{lpg}$  et  $A_{lpd}$  différentes, entraînant alors la formation de pics en DC dans les régions de leurs transitions électroniques (Figure 33B). Notons qu'un échange d'électron n'est pas nécessaire entre les chromophores pour observer ce phénomène, seulement un échange d'énergie d'excitation.



**Figure 33:** A) Couplage d'exciton selon une lumière polarisée circulaire gauche (lpg) ou circulaire droite (lpd). B) Effet Cotton résultant pour une molécule chirale par différence d'absorbance  $\Delta A = A_{lpg} - A_{lpd}$ , avec  $A_{lpg}$  et  $A_{lpd}$  les absorbances respectives de lumière polarisée gauche et droite.

### 1.1.2. Application aux G-quadruplexes

Les guanines ont, dans le domaine de l'UV-Vis, deux bandes d'absorptions à 279 et 250 nm, correspondant aux transitions  $\pi-\pi^*$ .<sup>80</sup> Les deux transitions sont respectivement caractérisées par un axe de polarisation court et long, comme représenté sur la Figure 34A. La bande d'absorption à 279 nm étant faible en énergie, on ne considère pour la suite que la bande

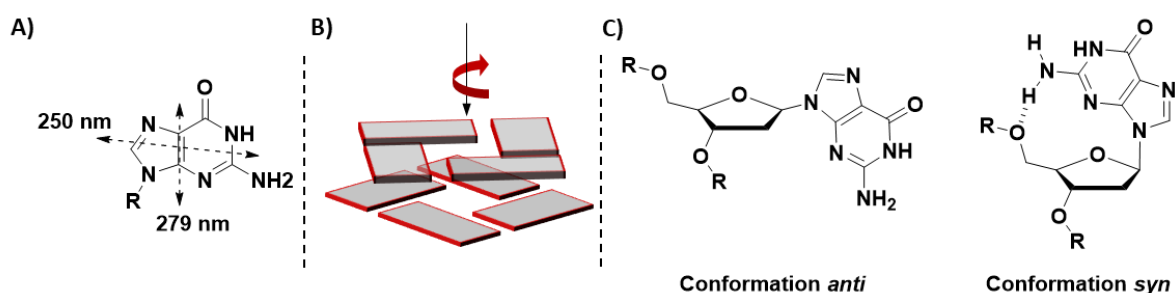
<sup>77</sup> Fasman, G. D., Ed. , *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Springer US, Boston, MA, 1996.

<sup>78</sup> Telfer, S. G., McLean, T. M., Waterland, M. R., *Dalton Trans.* **2011**, 40, 3097.

<sup>79</sup> Kasha, M., Rawls, H. R., Ashraf El-Bayoumi, M., *Pure Appl. Chem.* **1965**, 11, 371-392.

<sup>80</sup> (a) Chaires, J. B., Graves, D., Eds. , *Quadruplex Nucleic Acids*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2013**; (b) Clark, L. B., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 5265-5270.

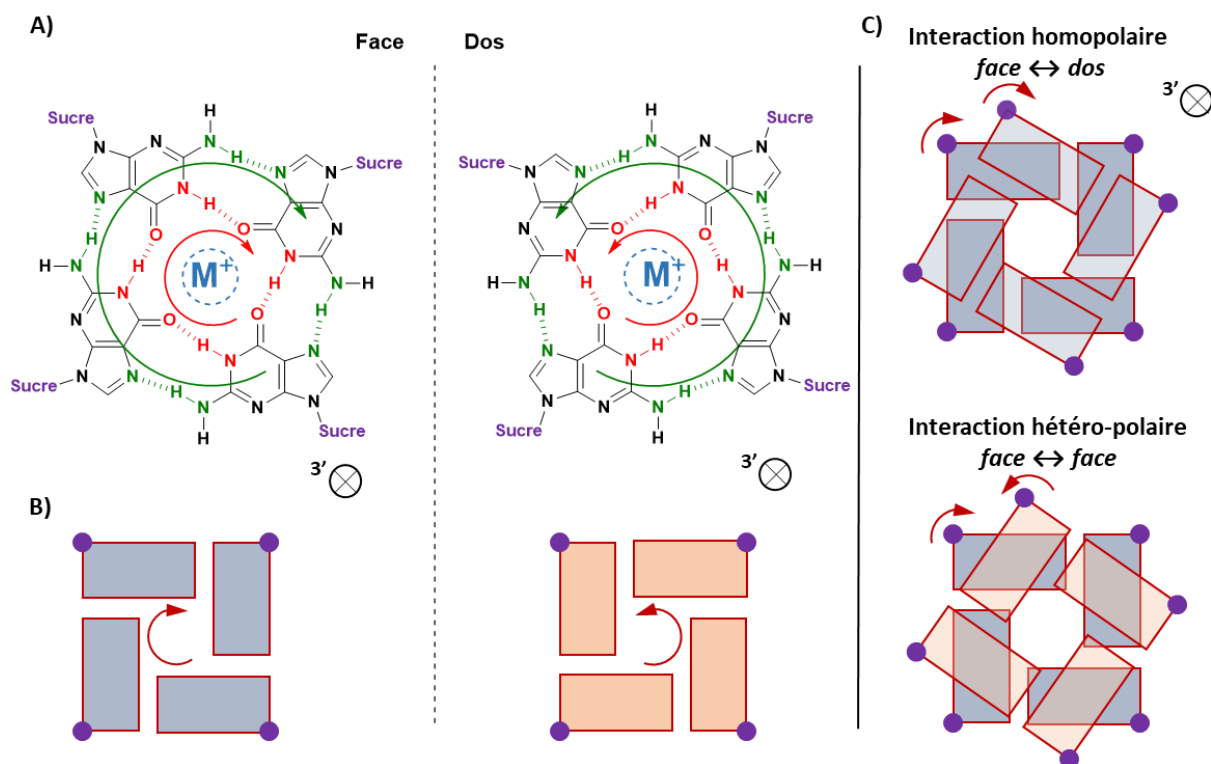
d'absorption à 250 nm. Du fait de la structure hélicoïdale droite des G-quadruplexes, les tétrades de guanosines sont superposées de façon asymétrique (Figure 34B), permettant alors d'observer un signal en dichroïsme circulaire.



**Figure 34:** (A) Orientation des moments de transition électriques d'une guanine et (B) superposition chirale de deux tétrades successives. (C) Représentation des angles glycosidiques *syn* et *anti* de la guanosine.

Il a ainsi pu être montré que le signal des G-quadruplexes en DC dépend de l'orientation des tétrades entre elles.<sup>81</sup> En effet, il est possible de définir deux côtés diastéréoisotopiques des tétrades de guanosines : le côté dit « face » et le côté dit « dos ». On appelle le côté dit « face » le côté présentant dans la tétrade les liaisons hydrogènes, *i.e.* du proton vers l'oxygène, dans le sens des aiguilles d'une montre (Figure 35A), et inversement pour le côté dit « dos » (Figure 35B). Notons que l'orientation entre deux tétrades successives dépend de l'orientation des angles glycosidique (Figure 34C). Ainsi, lors d'un passage entre deux guanosines successives, d'une conformation *syn* à une conformation *anti*, on observe une interaction hétéro-polaire de type *face* ↔ *face* ou *dos* ↔ *dos*. A l'inverse, une même configuration d'angle glycosidique conduit à une interaction homopolaire de type *face* ↔ *dos* ou *dos* ↔ *face* (Figure 35C).

<sup>81</sup> Gray, D. M., Wen, J.-D., Gray, C. W., Repges, R., Repges, C., Raabe, G., Fleischhauer, J., *Chirality* **2008**, *20*, 431-440.



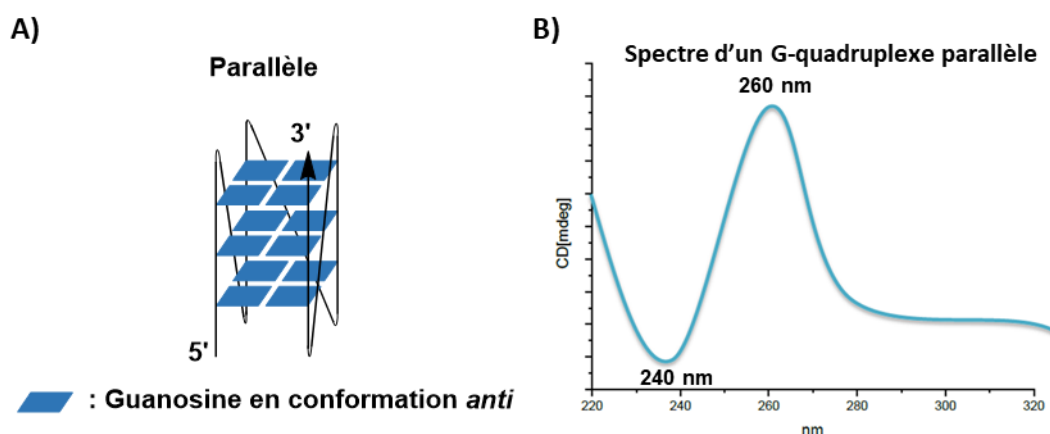
**Figure 35 :** (A, B) Représentation des côtés « face » et « dos » des tétrades de guanosines et (C) des interactions homopolaire et hétéro-polaire. Les schémas sont représentés selon la direction 5' vers 3'. Les guanosines sont représentées par des rectangles de couleur.

Il est alors important de comprendre que les informations fournies par le dichroïsme circulaire dépendent de l'orientation des tétrades entre elles et non directement de l'orientation des brins d'ODN. Il existe ainsi, dans une minorité de cas, des structures où le spectre observé ne correspond pas à la véritable topologie adoptée. La plupart du temps, l'analyse des G-quadruplexes par DC permet de facilement et rapidement avoir accès à la topologie majoritairement adoptée, chacune d'entre elle possédant un spectre qui lui est caractéristique. Notons que ces signatures en DC sont souvent corroborées par des études structurales RMN ou cristallographiques.

#### 1.1.2.1. Cas des G-quadruplexes parallèles

Dans le cas des G-quadruplexes parallèles, tous les brins sont par définition orientés dans le même sens et donc aucune inversion de conformation glycosidique sur les guanosines successives n'est observée (Figure 36A). De ce fait, seules des interactions homopolaire sont possibles et on observe alors, d'après la littérature, un couplage dit « positif » autour de la bande d'absorption à 250 nm. Cela se caractérise par un maximum à 260 nm et un minimum à 240 nm (Figure 36B).<sup>82</sup>

<sup>82</sup> Masiero, S., Trotta, R., Pieraccini, S., De Tito, S., Perone, R., Randazzo, A., Spada, G. P., *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2683.

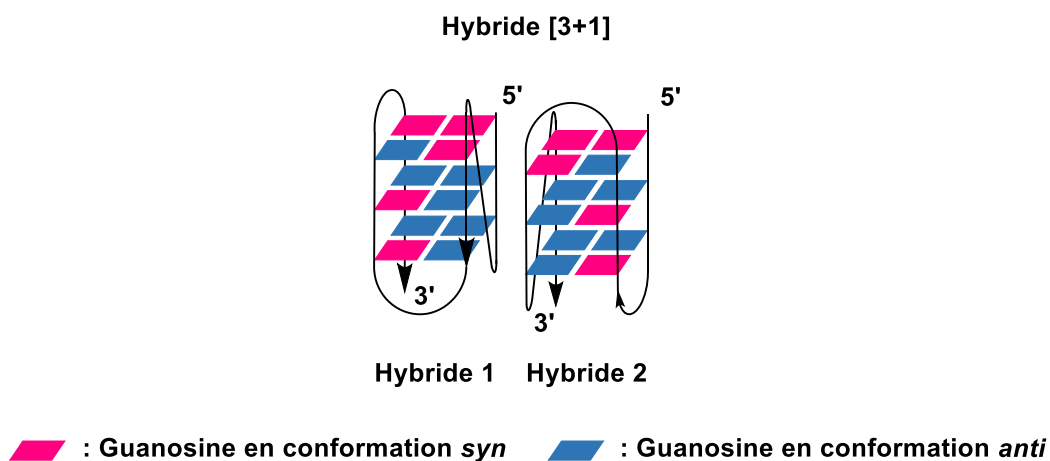


**Figure 36** : Présentation (A) d'un G-quadruplexe parallèle et (B) de son spectre en dichroïsme circulaire.

Il est intéressant de noter que pour des raisons d'encombrement stérique, les angles glycosidiques sont préférentiellement en conformation *anti*, entraînant une meilleure stabilisation thermodynamique de la structure.<sup>83</sup>

#### 1.1.2.2. Cas des G-quadruplexes hybrides [3+1]

Par définition des G-quadruplexes en topologie hybride, trois brins sont orientés dans le sens inverse du quatrième et dernier brin (Figure 37). Des inversions de conformation glycosidique sont alors observées entre des guanosines successives, entraînant ainsi des interactions hétéro-polaires entre tétrades : comprendre orientation *face* ↔ *face* ou *dos* ↔ *dos*.



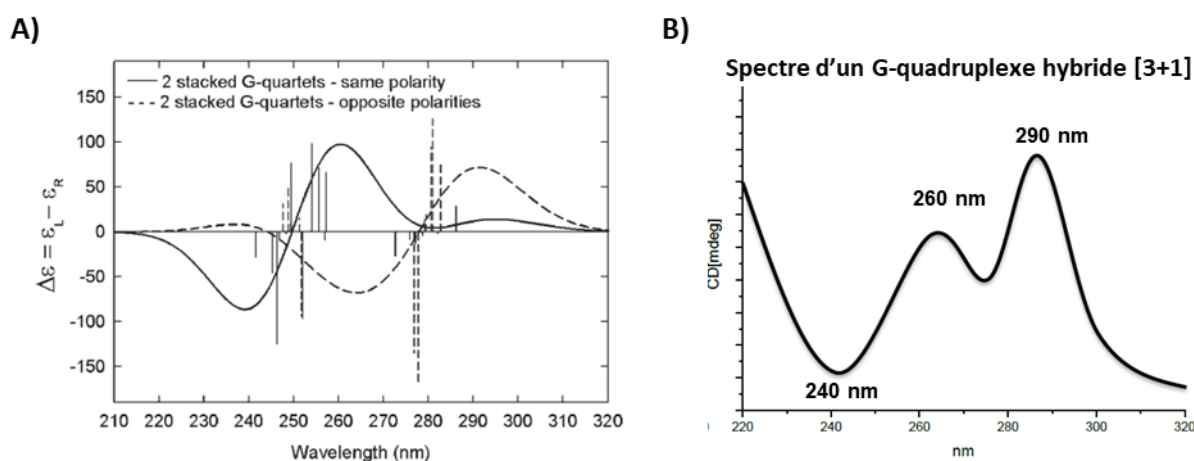
**Figure 37** : Présentation de G-quadruplexes en conformation hybride [3+1].

Cette perturbation de la structure a pour conséquence de modifier les couplages d'excitations autour de la longueur d'onde 250 nm et induit alors la présence d'une bande à 290 nm. La littérature s'accorde, en effet, sur le fait que cette bande d'absorption est le résultat de la présence d'une inversion de polarité au sein du G-quadruplexe. Cela semble avoir été confirmé par des calculs théoriques, utilisant l'approximation d'une approche dipôle-dipôle et

<sup>83</sup> Šponer, J., Mládek, A., Špačková, N., Cang, X., Cheatham, T. E., Grimme, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9785-9796.



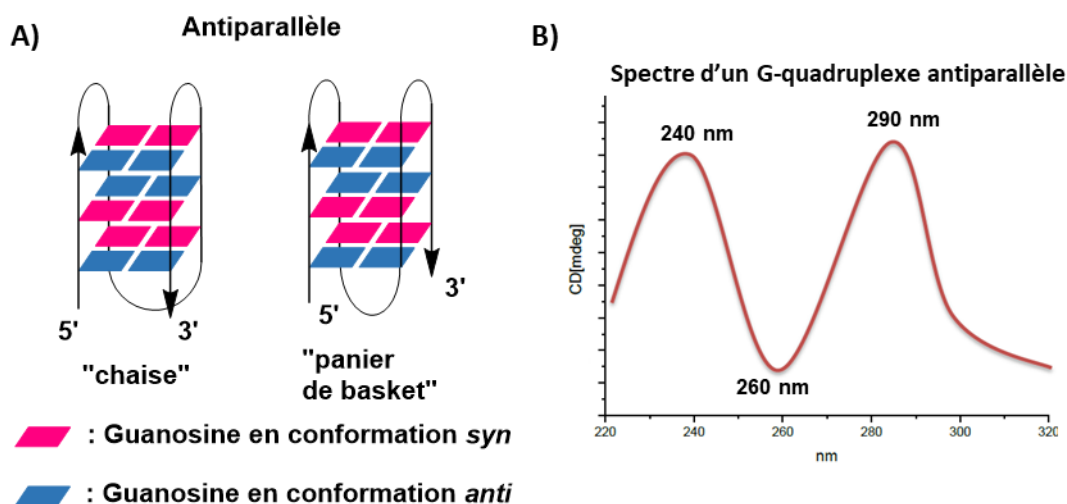
les énergies connues de transitions  $\pi$ - $\pi^*$  des guanines (Figure 38A).<sup>81</sup> Dans le cas d'une topologie hybride [3+1], on observe alors des interactions hétéro-polaires mais aussi homopolaires, entre tétrades successives. De ce fait, un couplage d'exciton dit « positif », autour de 250 nm, est toujours observé, mais de plus faible intensité que pour les topologies parallèles car moins d'interactions homopolaires sont présentes. La présence d'au moins une interaction hétéro-polaire justifie alors l'apparition d'une bande d'absorption à 290 nm (Figure 38B).



**Figure 38:** (A) Spectres de DC issus de calculs théoriques, entre deux tétrades en interaction homopolaire et hétéro-polaire et (B) spectre observé en dichroïsme circulaire pour une topologie hybride [3+1]. La figure A est extraite de la publication : *Chirality* 2008, 20, 431-440.<sup>81</sup>

### 1.1.2.3. Cas des G-quadruplexes antiparallèles

Dans le cas des G-quadruplexes ayant une topologie antiparallèle, deux brins sont orientés dans le sens opposés des deux autres brins. Cette conformation de repliement entraîne alors des inversions d'angles glycosidiques sur chacune des guanosines successives (Figure 39A). Cela se caractérise par une forte bande d'absorption à 290 nm, due aux interactions hétéro-polaires entre chacune des tétrades. De plus, comme aucune interaction homopolaire n'est présente, un couplage dit « négatif » est cette fois-ci observé autour de la longueur d'onde 250 nm, se caractérisant par un minimum à 260 nm et un maximum à 240 nm (Figure 39B).



**Figure 39 :** (A) Présentation de G-quadruplexes antiparallèles et (B) du spectre en dichroïsme circulaire.

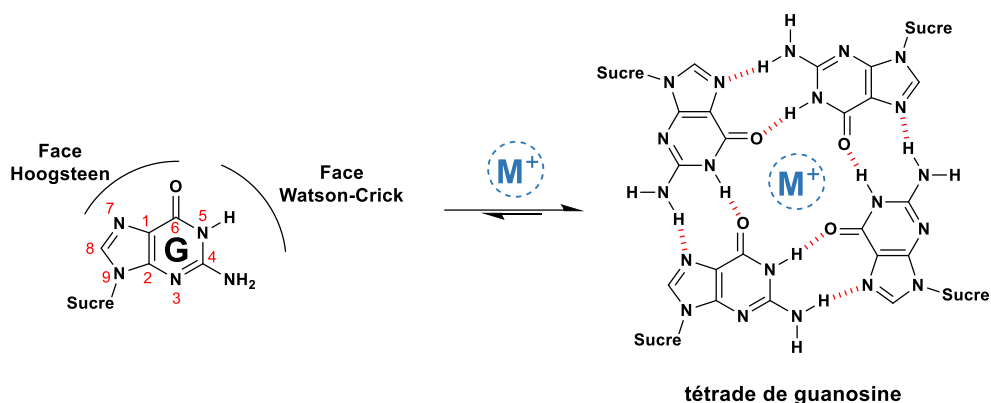
## 1.2. Le polymorphisme des G-quadruplexes

Comme nous venons de le voir, le dichroïsme circulaire est une méthode efficace pour rapidement avoir une information sur la topologie adoptée par un G-quadruplexe. Cependant, il est aussi primordial de comprendre les origines de ce polymorphisme. Pour cela sont présentés dans cette partie les principaux paramètres connus influant sur le repliement des brins riches en guanosines.

### 1.2.1. Influence de la nature des cations

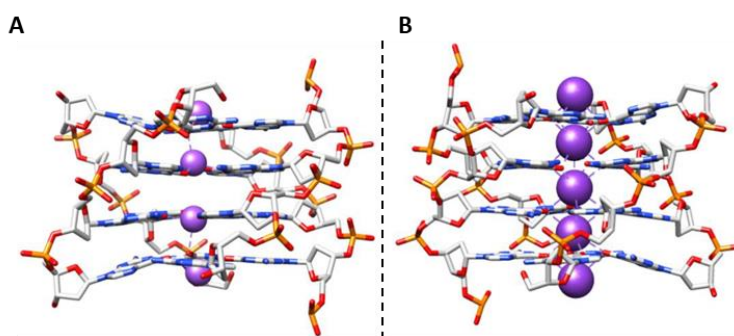
La présence de cations est, de manière générale, importante pour la stabilité des biomolécules, notamment pour les structures polyanions d'acide nucléiques. Mais, cela est d'autant plus vrai pour la formation de G-quadruplexes. Leur présence permet, en effet, de stabiliser les tétrades de guanosines, en diminuant la répulsion électrostatique entre les atomes d'oxygène O6, et ainsi faciliter leur empilement par «  $\pi$ -stacking ». L'équipe de C. Bailey a pu montrer en 1993 que les tétrades de guanosines sont stabilisées en présence de cations selon l'ordre de stabilité suivant :  $K^+ > Na^+, Rb^+ > Cs^+ > Li^+$ .<sup>84</sup> Historiquement, ce classement est dû à la taille respective des cations. Le rayon atomique pouvant être, par exemple, soit trop important ( $Cs^+$ ) soit trop faible ( $Li^+$ ) pour interagir avec les atomes d'oxygène O6 d'une tétrade (Figure 40).

<sup>84</sup> Hardin, C. C., Watson, T., Corregan, M., Bailey, C., *Biochemistry* **1992**, 31, 833-841.



**Figure 40** : Stabilisation d'une tétrade de guanosines en présence d'un cation.

Concernant le sodium  $\text{Na}^+$ , celui-ci se place au sein de la cavité électroégative de la tétrade. Il stabilise ainsi les quatre atomes d'oxygène O6 des guanines sans perturber la superposition des tétrades (Figure 41A). Le potassium  $\text{K}^+$ , quant à lui plus volumineux, se situe entre deux tétrades successives et coordine ainsi huit atomes d'oxygène, stabilisant fortement l'édifice (Figure 41B).

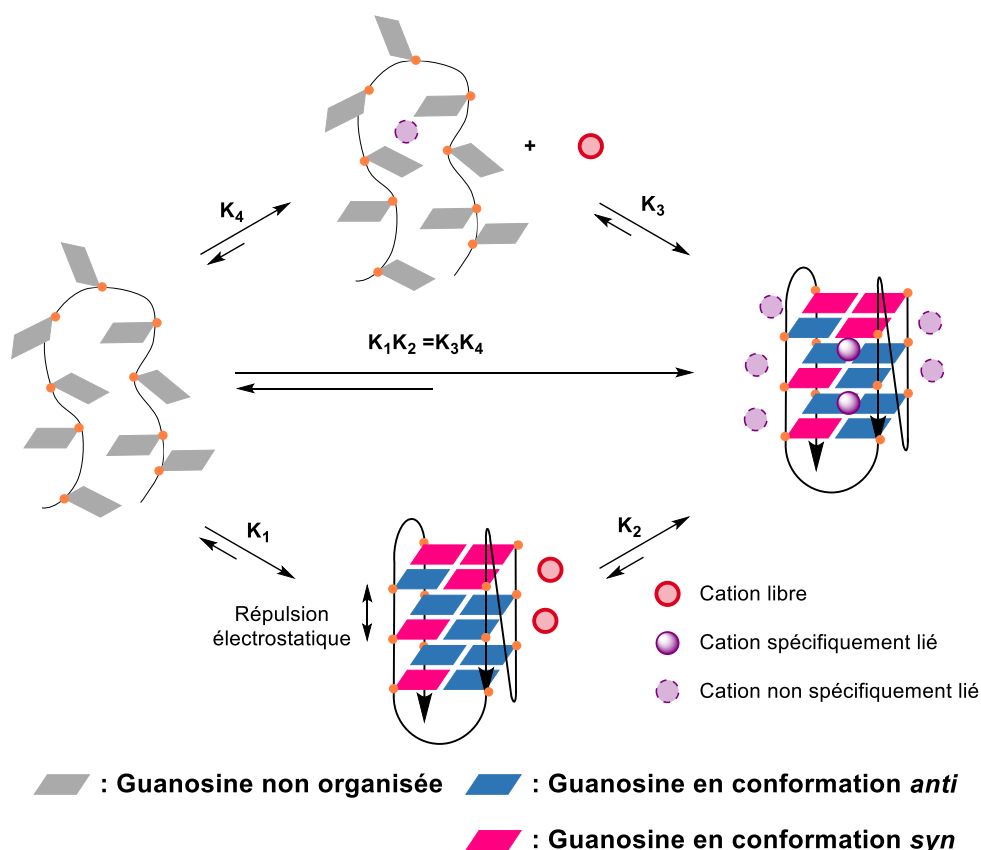


**Figure 41** : Dispositions des cations  $\text{Na}^+$  (A) et  $\text{K}^+$  (B) au sein des tétrades de guanosines représentées en bleu.

Cependant, d'autres paramètres doivent aussi être pris en considération. En effet, les équipes de Gray et Chaires ont, par exemple, montré qu'en présence d'une concentration de KCl supérieure à 2,5 mM, il est possible d'observer 6 à 8 cations supplémentaires par structure, en plus des deux attendus dans les cavités.<sup>85</sup> Ces résultats ont été observés, par titrage en DC et suivi par fluorescence, avec la séquence télomérique humaine « A + HT21 » ( $d[5'AGGG(TTAGGG)_33']$ ). Une séquence T<sub>22</sub>, ne possédant que des thymidines et n'adoptant aucune conformation structurée, a été utilisée comme témoin négatif. Cette observation met donc en avant l'importance de la nature du cation pour stabiliser et favoriser le repliement des brins d'ADN riches en guanosines. Notons que leur présence, non spécifique, permet aussi d'assurer une force ionique suffisante pour diminuer les répulsions électrostatiques des groupements phosphates, stabilisant ainsi la structure. Il est alors envisageable de décomposer le repliement des G-quadruplexes selon plusieurs équilibres, comme représenté

<sup>85</sup> Gray, R. D., Chaires, J. B., *Biophys. Chem.* **2011**, 159, 205–209.

sur la Figure 42.<sup>86</sup> Ainsi, par exemple, en présence de lithium  $\text{Li}^+$ , un cation non spécifique des tétrades de guanosines, la proportion en G-quadruplexe devrait être moins importante qu'avec les cations  $\text{K}^+$  ou  $\text{Na}^+$ .



**Figure 42** : Divers équilibres impliqués dans le repliement des G-quadruplexes. Figure inspirée du chapitre : *Role of Alkali Metal Ions in G-quadruplex Nucleic Acid Structure and stability*, issu du livre *The Alkali Metal Ions: Their Role for Life* (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel).<sup>86</sup>

De manière générale, il est admis qu'en présence de potassium  $\text{K}^+$  on observe une stabilisation de la structure plus importante qu'en présence de sodium  $\text{Na}^+$ . En effet, le coefficient de solvation du potassium est moins important et donc le potassium oligomériser beaucoup plus les G-quadruplexes que le sodium. Cependant, il existe certains cas où le sodium est plus stabilisant que le potassium. En effet, de plus petite taille, il peut avoir accès à des cavités électro négatives au sein de boucles ou de sillons non disponibles pour le potassium. Il est important de noter que, bien qu'il existe des tendances, les topologies adoptées sont à traiter au cas par cas.

En prenant en compte ces différents paramètres, il est compréhensible que selon la nature des cations, différentes topologies puissent être adoptées. Par exemple, il a pu être observé, par RMN et dichroïsme circulaire, que la séquence télomériques humaine « A + HT21 » ( $d[{}^5\text{AGGG}(\text{TTAGGG})_3{}^3]$ ) présente des conformations glycosidiques différentes selon qu'elle

<sup>86</sup> Largy, E., Mergny, J.-L., Gabelica, V., in *The Alkali Metal Ions: Their Role for Life* (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel), Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 203–258.

est en présence de  $K^+$  ou de  $Na^+$ .<sup>87</sup> En présence de sodium  $Na^+$  la structure majoritaire observée est antiparallèle de type « panier de basket » (Figure 39A). En revanche, en présence de potassium  $K^+$ , une topologie hybride [3+1] est majoritairement observée.<sup>88</sup>

### 1.2.2. Influence de l'hydratation des G-quadruplexes

Nous avons pu voir que la solvatation des cations joue un rôle important dans la formation et la stabilité des G-quadruplexes. Cela a pu être confirmé lors de l'utilisation de solutions « encombrées », dans le but de mieux comprendre le comportement de ces édifices en milieu intracellulaire. Pour cela différents polymères, neutre ou poly-chargés, ont été utilisés. Ainsi en présence de  $Na^+$  et de 40 % de polyéthylène glycol (noté PEG) une transition de la topologie antiparallèle vers la topologie parallèle, plus compacte, a pu être observée pour la séquence télomérique *Oxytricha nova* ( $d[{}^5G_4T_4G_4{}^3]$ ). En revanche, en présence de poly-cations encombrants (putrescine, spermine ou cadavérine) aucune transition n'a pu être observée.<sup>89</sup> Il semble alors que cette transition de conformation ne soit pas due à un encombrement stérique, comme initialement pensé, mais bien due à un effet de déshydratation du G-quadruplexe. Les poly-cations étant plus solvatés que le PEG, de charge neutre, ils n'influent pas sur la solvatation des guanines. Des études menées par M. C. Miller et M. Vorlickova ont aussi montré que l'utilisation de solvants organiques, tels que l'acétonitrile<sup>90</sup> ou l'éthanol,<sup>91</sup> induisent une transition de conformation vers la topologie parallèle lorsqu'ils sont ajoutés en proportion suffisante : de l'ordre de 40-50 %. Ces études, faites par RMN et dichroïsme circulaire, traduisent d'autant plus l'importance de l'effet d'une déshydratation sur les topologies adoptées par le G-quadruplexe. En effet, aucune gêne stérique n'est introduite dans ces exemples-là.

De plus, via une technique de stress osmotique jouant sur l'activité de l'eau, il a pu être confirmé que les G-quadruplexes sont plus stables en milieu déshydraté.<sup>80a</sup> Dans un premier temps, la proportion importante de cycle aromatique des acides nucléiques, peut expliquer cette observation. Enfin, il existe toujours un équilibre entre la formation de G-quartet (tétrade de guanines) et la solvatation des guanines. En déshydratant le milieu, l'équilibre est tout simplement déplacé dans le sens des liaisons hydrogènes intra tétrade et donc la formation d'un G-quadruplexe.<sup>92</sup> On observe alors une transition vers la topologie parallèle, topologie généralement la plus compacte et offrant le moins de site de solvatation possible. Un exemple pour la structure « A + HT21 » est présenté Figure 43.

---

<sup>87</sup> Balagurumoorthy, P., Brahmachari, S. K., *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 21858-21869.

<sup>88</sup> Ambrus, A., Chen, D., Dai, J., Bialis, T., Jones, R. A., Yang, D., *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 2723-2735.

<sup>89</sup> Zhou, J., Wei, C., Jia, G., Wang, X., Tang, Q., Feng, Z., Li, C., *Biophys. Chem.* **2008**, 136, 124-127.

<sup>90</sup> Miller, M. C., Buscaglia, R., Chaires, J. B., Lane, A. N., Trent, J. O., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 17105-17107.

<sup>91</sup> Vorlíčková, M., Bednářová, K., Kypr, J., *Biopolymers* **2006**, 82, 253-260.

<sup>92</sup> Fonseca Guerra, C., Zijlstra, H., Paragi, G., Bickelhaupt, F. M., *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 12612-12622.



quelques bases azotées peut entraîner, dans les mêmes conditions d'utilisation, des topologies différentes. Prenons pour exemple les deux séquences suivantes : « A + HT21 + TT » ( $d[{}^5\text{AG}_3(\text{TTAGGG})_3\text{TT}{}^3]$ ) et « TT + HT21 + A » ( $d[{}^5\text{TTG}_3(\text{TTAGGG})_3\text{A}{}^3]$ ), de longueurs et de compositions en acides nucléiques identiques, mais adoptant deux topologies différentes. La première séquence est décrite dans la littérature comme pouvant adopter une topologie dite « hybride 2 » en présence de potassium.<sup>96</sup> Cette topologie se caractérise par deux boucles latérales suivies d'une boucle externe (Figure 44A). Une étude RMN a permis de montrer que la présence des nucléotides « T<sub>23</sub>T<sub>24</sub> », en position 3', sont responsables de cette conformation. En effet, les nucléotides T<sub>6</sub>, A<sub>7</sub> et T<sub>23</sub> sont impliqués dans la formation d'un triplex T : A : T, particulièrement stabilisant. Bien que la thymidine T<sub>24</sub> ne soit pas impliquée dans le triplex, il semble que sa présence en facilite la formation. En cas d'absence de ces thymidines en position 3', la formation du triplex T : A : T n'est plus possible. Une autre conformation est alors observée par RMN : la topologie « hybride 1 ». Celle-ci se caractérise par la présence d'une boucle externe suivie de deux boucle latérales (Figure 44B). Dans le cas de la séquence « TT + HT21 + A », la présence d'une thymidine en position 5' semble stabiliser cette conformation par interaction entre les nucléotides T<sub>1</sub> et A<sub>20</sub>.

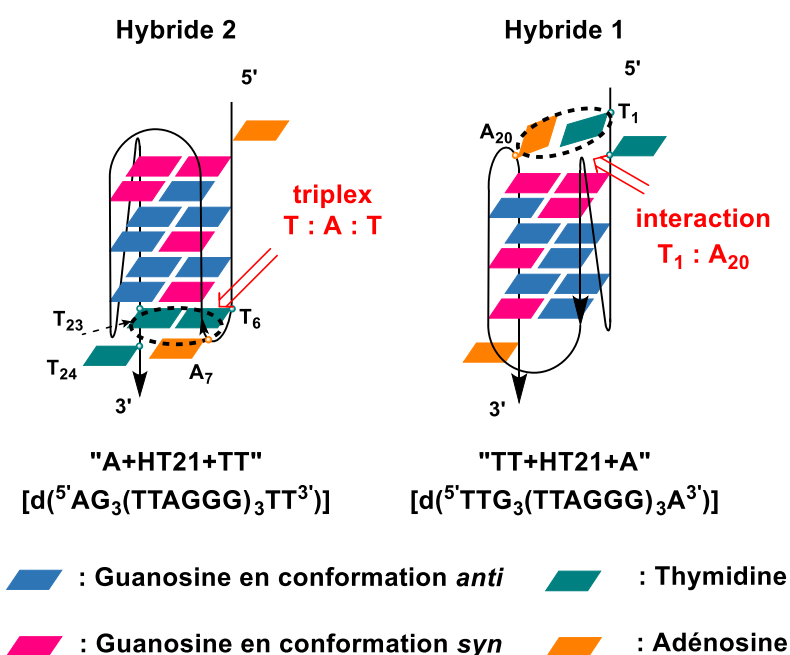


Figure 44 : Représentation des conformation hybride 2 (A) et hybride 1 (B).

Ces deux exemples illustrent parfaitement que de petites modifications au sein des séquences de nucléotides peuvent entraîner d'importants changements.

### I.3. Conditions d'analyses utilisées en dichroïsme circulaire

La nature des cations, la composition des co-solvants ainsi que la nature des séquences des brins d'ODN sont autant de paramètres à prendre en compte pour déterminer les topologies des G-quadruplexes. Or, selon la conformation majoritairement adoptée par le

<sup>96</sup> Dai, J., Carver, M., PUNCHIHEWA, C., Jones, R. A., Yang, D., *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4927-4940.

G-quadruplexe, l'induction asymétrique en catalyse peut être complètement différente. C'est donc pourquoi nous faisons le choix d'analyser par dichroïsme circulaire, dans les mêmes conditions que celles utilisées lors des catalyses, les structures des G-quadruplexes synthétisés.

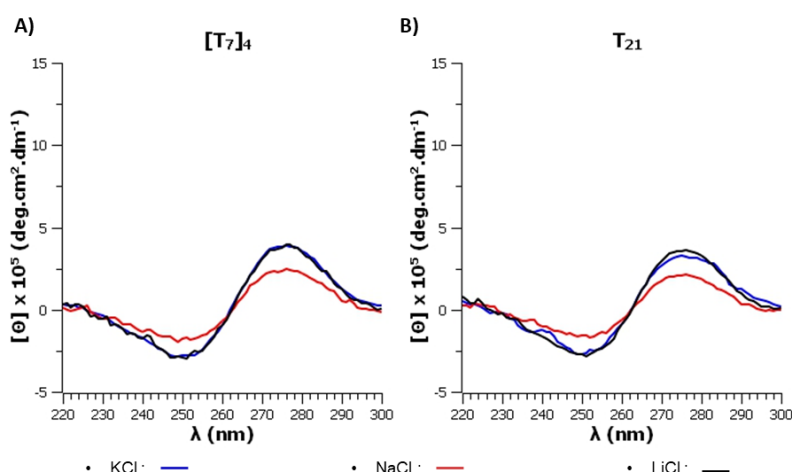
Les analyses sont ainsi faites dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0), en présence de KCl, NaCl ou LiCl, ce dernier ne participant pas à la formation des G-quadruplexes. Afin de favoriser la topologie thermodynamiquement stable dans ces conditions, les échantillons sont dénaturés par chauffage puis laissés revenir à température ambiante. L'effet d'un ajout d'une plus grande proportion en acétonitrile est aussi étudié, après 5 h d'incubation, le temps correspondant à une réaction de catalyse. Notons que la présence d'acétonitrile est primordiale pour solubiliser les substrats thioéthers. Toutes les analyses ont été faites en présence d'une concentration de 10  $\mu$ M en G-quadruplexe, concentration utilisée par Can Li dans la publication de référence lors des réactions de catalyse. Cependant, il a été choisi de normaliser les spectres par la concentration en G-quadruplexes, mesurée lors des suivis en DC.



## II. Etude des séquences de contrôles négatifs poly dT

Différentes séquences de thymidines que nous appellerons « poly dT » ont été synthétisées afin de servir de contrôles négatifs durant les catalyses. En effet, ces séquences ne comportent aucune guanosine et par conséquent ne peuvent pas former de G-quadruplexes. De plus, dans les rares publications traitant de séquences « poly dT », elles sont décrites comme des séquences n'adoptant aucune conformation particulière.<sup>85,97</sup>

Il a alors été choisi de synthétiser deux séquences monobrins différentes, une séquence  $T_{21}$ , longue de 21 thymidines, et une séquence courte  $T_7$ , longue de 7 thymidines. De cette manière, nous pouvons avoir des contrôles négatifs pour les structures monobrins (HT21 et dérivés) ainsi que pour les édifices tétramoléculaires tels que les G-quadruplexes parallèles. Bien que les « poly dT » ne puissent former de G-quadruplexes, il est tout de même intéressant de déterminer par DC si elles sont toutefois capables d'adopter une organisation chirale. Les analyses sont faites dans les mêmes conditions que celles utilisées lors des catalyses (Figure 45). Notons que bien que les séquences « poly dT » ne peuvent s'organiser entre elles, il est choisi de considérer la séquence  $T_7$  comme une structure tétramoléculaire  $[T_7]_4$ , afin de pouvoir comparer, dans les mêmes concentrations, les résultats aux séquences tétramoléculaires d'ODN.



**Figure 45** : Comparaison des spectres en DC des séquences de contrôle (A)  $[T_7]_4$  et (B)  $T_{21}$ , en présence de KCl, NaCl ou de LiCl. Les analyses sont faites en présence de 10  $\mu$ M de  $T_{21}$  et  $[T_7]_4$  et l'intensité est exprimée en ellipticité molaire.

On constate alors un effet Cotton en dichroïsme circulaire, se traduisant par un couplage positif autour de la longueur d'onde de 261 nm, proche du maximum d'absorbance de la thymine. Au vu de la structure des thymidines et de la littérature, il est peu probable que cela soit dû à une organisation ordonnée de la séquence. En effet, bien que des tétrades de thymidines aient pu être observées, cela reste des cas isolés. Il est alors possible de faire l'hypothèse que ces spectres en DC soient principalement dus à un empilement entre les

<sup>97</sup> Li, Q., Zhao, J., Liu, L., Jonchhe, S., Rizzuto, F. J., Mandal, S., He, H., Wei, S., Sleiman, H. F., Mao, H., Mao, C., *Nat. Mater.* **2020**, *19*, 1012–1018.

acides nucléiques, entraînant des couplages de type homopolaire. La structure globale des séquences devrait être soit globulaire soit de type « random coil ».

### III. Etude des séquences télomérique et de l'incidence du RAFT

Lors des travaux de Can Li sur la catalyse de sulfoxydation asymétrique de dérivés du thioanisole, les meilleurs résultats ont été obtenus en présence de la séquence télomérique humaine « HT21 » ( $d[5'GGG(TTAGGG)_33']$ ). De par l'absence de stabilisation par « flanking » au niveau des tétrades extérieures, cette séquence est décrite, dans la littérature, comme étant très certainement une des séquences de G-quadruplexes la plus polymorphe. Ainsi, dans cette partie, nous présentons les analyses par DC de la séquence télomérique « HT21 », ainsi que de deux séquences analogues « TA + HT21 » et « HT21 + TT ». L'influence de la présence du RAFT, en position 5' ou 3', est ensuite discutée en comparant les résultats obtenus avec les structures « sur gabarits : RAFT - « HT21 + TT » et « TA + HT21 » - RAFT.

#### III.1. Séquence télomérique « HT21 »

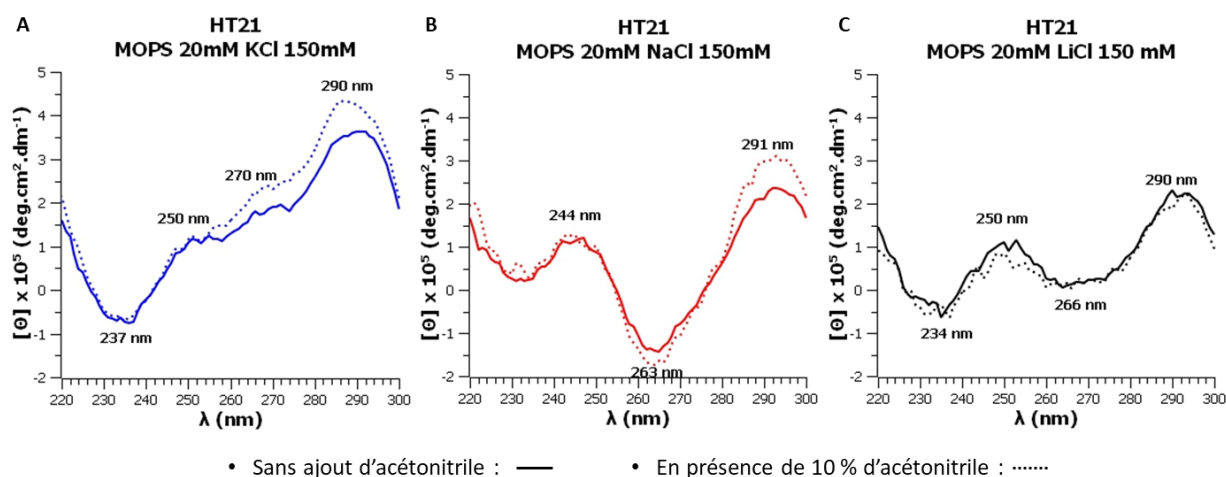
##### III.1.1. Analyse par dichroïsme circulaire

La séquence « HT21 » a été étudiée par dichroïsme circulaire, dans les mêmes conditions que celles utilisées lors des réactions de sulfoxydation. De manière arbitraire, il a été décidé de fixer à 10  $\mu$ M la concentration en G-quadruplexe, correspondant à la plus faible concentration étudiée en catalyse.

Les analyses montrent des topologies différentes en fonction de la nature du cation présent, confirmant le polymorphisme de cette séquence (Figure 46). Ainsi, en présence de potassium, le spectre en DC présente une signature de topologie hybride [3+1] (Figure 46A). Cela se caractérise par un couplage qui semble positif autour de 250 nm, *i.e.* avec un minimum vers 240 nm et un maximum autour de 260 nm. La présence de la bande à 290 nm confirme bien la présence d'au moins un couplage hétéro-polaire entre deux tétrades successives. Cependant, comme il a pu être dit, la séquence « HT21 » est particulièrement polymorphe et bien que la topologie adoptée en présence de potassium soit encore discutée, la littérature semble montrer la coexistence de différentes conformations.<sup>98</sup> En effet, des études RMN ont montré la présence de structures hybrides [3+1], ainsi qu'antiparallèles à deux tétrades, en présence de potassium. Cela explique alors potentiellement la présence d'une bande particulièrement large et peu intense autour de 260 nm. Concernant le spectre en présence de sodium, celui-ci est caractéristique d'une conformation antiparallèle, en accord avec la littérature (Figure 46B).<sup>98b</sup> Il a même pu être montré par RMN que cette conformation est de type « panier ».

---

<sup>98</sup> (a) Gaynutdinov, T. I., Neumann, R. D., Panyutin, I. G., *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4079-4087; (b) Renčiuk, D., Kejnovská, I., Školáková, P., Bednářová, K., Motlová, J., Vorlíčková, M., *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 6625-6634.



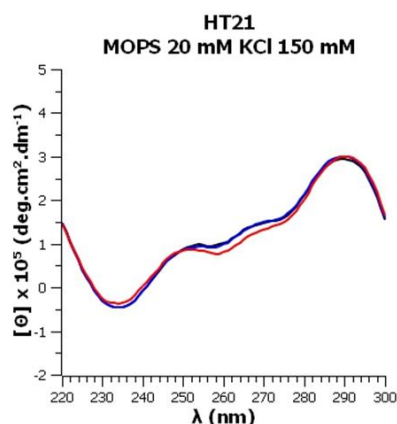
**Figure 46** : Spectres en DC de la séquence "HT21" en présence de KCl (A), de NaCl (B) ou de LiCl (C). L'effet de l'ajout de 10 % d'acétonitrile est observé après 5 h. N.B. :  $[G\text{-quadruplexe}] = 10 \mu\text{M}$  et l'intensité est exprimée en ellipticité molaire.

Il est fortement probable que la topologie majoritairement adoptée en présence de LiCl soit de nature antiparallèle à deux tétrades (Figure 46C). En effet, les pics caractéristiques à 235 nm, 250 nm et 290 nm traduisent la présence de couplages hétéro-polaires. Cependant, bien que l'intensité relative à 260 nm soit moins importante qu'en présence de potassium, le couplage dit « négatif » n'est pas aussi marqué que ce qu'on pourrait attendre dans le cas d'une topologie antiparallèle à trois tétrades. De manière générale, on observe des spectres plus intenses en présence de  $\text{K}^+$  ou de  $\text{Na}^+$  qu'en présence de  $\text{Li}^+$ . Cela est en accord avec l'hypothèse faite sur le repliement des G-quadruplexes selon plusieurs équilibres, comme présenté sur la Figure 42.

Concernant l'ajout de 10 % d'acétonitrile, on n'observe aucun changement significatif de conformation, et ce même 5 h après ajout. Il est alors envisageable que les proportions de solvant organique introduites ne soient pas assez importantes pour induire un changement de conformation. En revanche, des intensités plus importantes sont constatées en présence d'acétonitrile, pour les cations  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$ . Cela traduit très certainement une déshydratation du milieu, favorisant ainsi l'oligomérisation du brin d'ODN. Le lithium n'étant pas spécifique des tétrades, aucun changement n'est observé.

### III.1.2. Comportement en conditions de catalyse

Nous avons souhaité observer si la topologie de la séquence « HT21 » est susceptible de varier lors de la réaction de sulfoxydation. Pour cela, le spectre en DC est enregistré dans les conditions de réaction de catalyse, *i.e.* en présence du complexe  $\text{Cu}^{\text{II}}\text{mbipy}$  ( $50 \mu\text{M}$ ) et de peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $75 \mu\text{M}$ ) (Figure 47). Les différents composés sont introduits dans les mêmes proportions que lors de la catalyse.



- HT21 : —
- HT21 + Cudmbipy : —
- HT21 + Cudmbipy + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 h) : —

**Figure 47** : Influence de la présence de l'ajout du complexe Cudmbipy et de l'oxydant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur le spectre DC du G-quadruplexe « HT21 », dans une solution de tampon MOPS (20 mM) et KCl (150 mM). N.B. : [G-quadruplexe] = 10 μM et l'intensité est exprimée en ellipticité molaire.

On constate alors qu'il n'y a aucune variation significative du spectre en DC, témoignant ainsi que le G-quadruplexe est stable dans ces conditions de catalyse et que la topologie de l'édifice reste inchangée tout au long de la réaction.

### III.1.3. Stabilité thermodynamique

Il est aussi intéressant de connaître la stabilité de la structure en fonction de la température. En effet, plus la structure est stable et plus les conditions de catalyse peuvent être variées tout en garantissant la topologie adoptée. Les températures de transition (noté T<sub>m</sub>) ont été déterminées, dans la littérature, dans différentes solutions tampons, en présence de potassium ou de sodium. Les résultats sont résumés dans le Tableau 3.

**Tableau 3** : Résumé des T<sub>m</sub> (°C) observés, dans la littérature, pour la séquence "HT21".

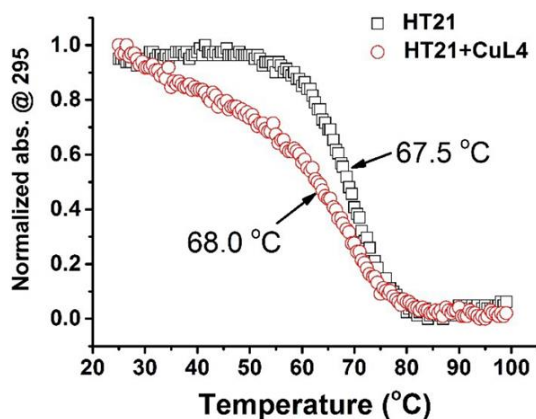
Séquence	Solution tampon (pH 7,0)	Cations	T <sub>m</sub> (°C)
« HT21 »	10 mM cacodylate <sup>99</sup>	Na <sup>+</sup> (100 mM)	58
	10 mM cacodylate <sup>99</sup>	K <sup>+</sup> (100 mM)	65
	20 mM MOPS <sup>73a</sup>	K <sup>+</sup> (150 mM)	67,5
	20 mM MOPS <sup>73a</sup>	K <sup>+</sup> (150 mM) + ajout de Cudmbipy (50μM)	68

Les mesures des valeurs de T<sub>m</sub> (°C) ont été réalisées avec une concentration de 5 μM en « HT21 ».

On observe, dans un premier temps, une meilleure stabilité du G-quadruplexe en présence de potassium qu'en présence de sodium. Ensuite, on constate que plus la concentration en potassium est importante, plus le G-quadruplexe est stabilisé, ce qui se traduit par une valeur de T<sub>m</sub> plus importante. Enfin, il est intéressant de noter que l'ajout du complexe Cudmbipy n'influe pas de manière significative sur la stabilité de « HT21 », en présence de potassium. A l'inverse, le suivi par spectroscopie UV, en fonction de la température, semble montrer une

<sup>99</sup> Mergny, J.-L., Phan, A.-T., Lacroix, L., *FEBS Letters* **1998**, 435, 74-78.

légère déstabilisation globale de l'édifice, se caractérisant par une pente de transition plus douce (Figure 48).



**Figure 48** : Suivi UV de la dénaturation de la séquence "HT21" en présence et absence de CuL4. Le suivi est fait à 295 nm, dans 20 mM d'une solution de tampon MOPS, en présence de 150 mM de potassium, à pH 7,0. Figure extraite de la publication : *Chemical Communications* 2016, 52, 9644–9647. *Erreur ! Signet non défini.*

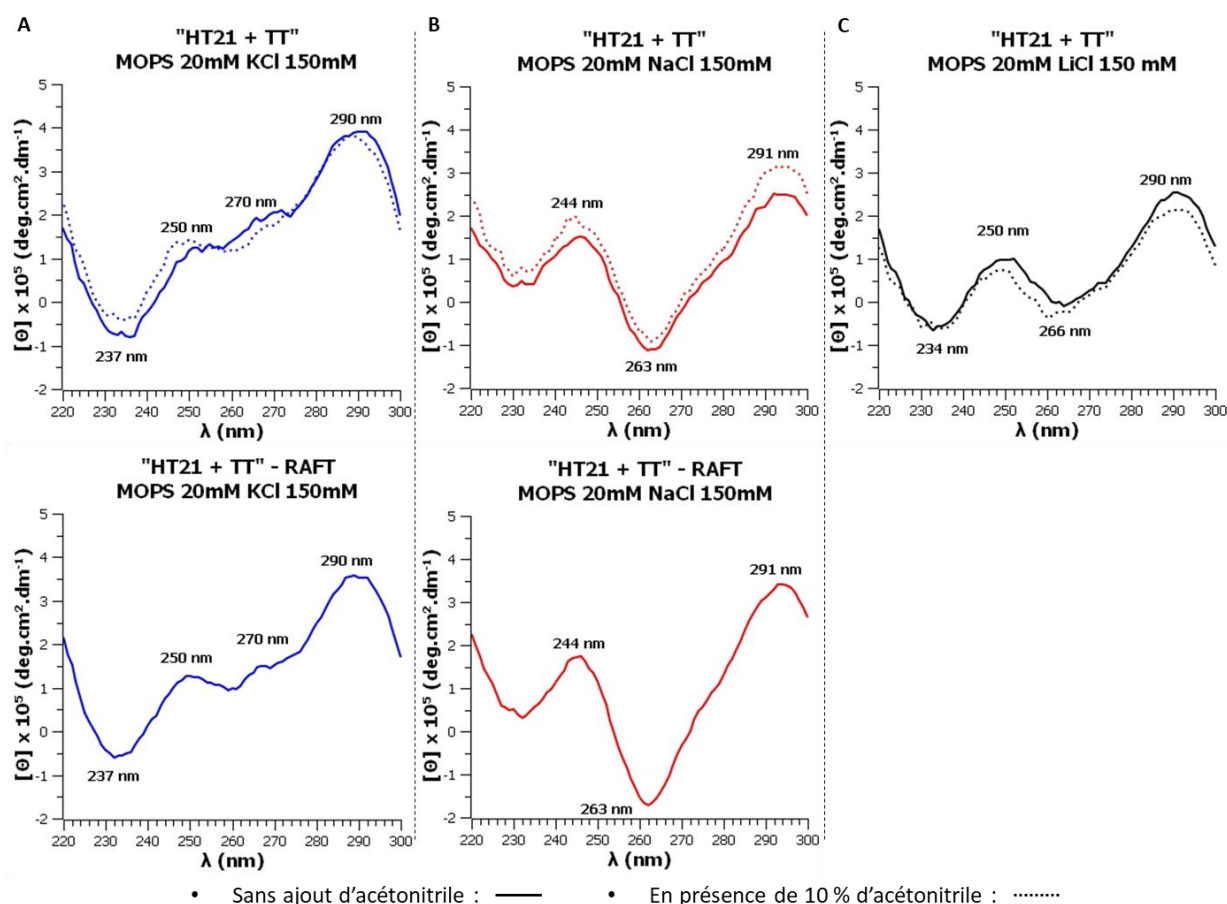
### III.2. Incidence du RAFT

Pour rappels, deux structures dites « sur gabarit » ont été synthétisées afin de déterminer l'incidence que pourrait avoir la présence d'un RAFT sur la topologie et les résultats en catalyse. Pour cela, les deux points d'ancrage en position 3' et 5' sont analysés.

#### III.2.1. Présence du RAFT en position 3' : « HT21 + TT » et « HT21 + TT » - RAFT

Pour analyser l'influence du RAFT en position 3', nous avons dans un premier temps, choisi la séquence « HT21 + TT » ( $d[{}^5\text{GGG}(\text{TTAGGG})_3\text{TT}{}^3]$ ) car celle-ci est proche de la séquence télomérique humaine « HT21 ». Il est intéressant d'observer que la présence du RAFT en position 3' ne semble pas modifier le repliement du G-quadruplexe (Figure 49).

En présence de sodium, on observe bien la signature d'un spectre caractéristique d'une topologie antiparallèle (Figure 49B). En revanche, en présence de potassium, le spectre en DC semble encore montrer la présence d'un mélange de conformation (Figure 49A). En effet, il est très similaire à celui observé pour la séquence « HT21 », et il est alors probable que les topologies observées soient de type hybride [3+1] et de type antiparallèle à deux tétrades. Cela se traduit encore une fois par une bande large autour de 260 nm. Cependant, il est possible d'imaginer que la structure hybride soit préférentiellement de type hybride 2. Les thymidines  $T_{22}$  et  $T_{23}$  stabilisant la conformation comme présenté sur la (Figure 44A). Bien que l'on n'observe pas majoritairement une structure hybride 2, ce résultat est très intéressant. En effet, il nous conforte dans l'idée de pouvoir comparer les résultats en catalyse avec « HT21 ». En présence de LiCl, une plus faible proportion de G-quadruplexe est observée, l'analyse n'ayant pas été faite avec la structure « HT21 + TT » - RAFT.



**Figure 49** : Comparaison des spectres en DC en présence de KCl (A), de NaCl (B) et de LiCl (C) pour la séquence "HT21+TT" avec et sans RAFT. N.B. : [G-quadruplexe] = 10  $\mu$ M et l'intensité est exprimée en ellipticité molaire.

Il est intéressant de noter que l'ajout de 10 % d'acétonitrile n'induit pas de changement de conformation pour la séquence libre, la structure « HT21 + TT » - RAFT n'ayant pas été étudiée.

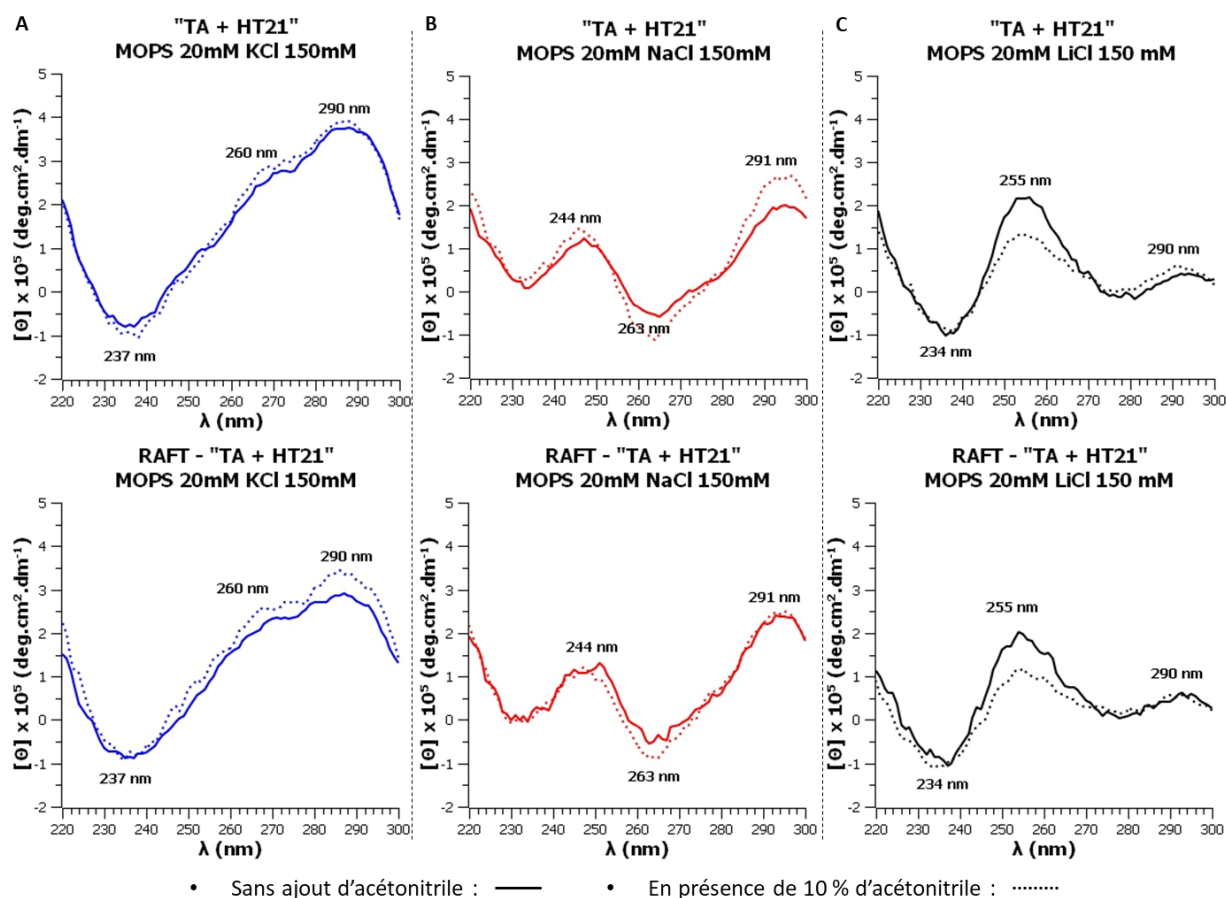
### III.2.2. Présence du RAFT en position 5' : « TA + HT21 » et RAFT - « TA + HT21 »

La séquence « TA + HT21 » ( $d[5' \text{TAGGG}(\text{TTAGGG})_3 3']$ ) a été choisie pour étudier l'incidence de la présence du RAFT en position 5'. Cette séquence télomérique est décrite dans la littérature comme adoptant une conformation hybride 1, principalement due à l'absence de thymidines en position 3'.

En présence de potassium, on observe bien la signature d'un spectre de topologie hybride 1 comme présenté dans la littérature. Cela se caractérise par une bande très large et intense autour de 260 nm (Figure 50A). On observe en présence de sodium, un spectre caractéristique d'une topologie antiparallèle (Figure 50B). Cependant, il a pu être montré par RMN, que la structure adopte la même conformation qu'en présence de potassium, à savoir une topologie hybride 1.<sup>100</sup> En revanche, aucune explication claire n'est donnée quant à la différence significative entre les deux spectres de DC. Il est envisageable que cela soit due à un

<sup>100</sup> Wang, Z.-F., Li, M.-H., Hsu, S.-T. D., Chang, T.-C., *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, 4723-4733.

réarrangement du « flanking » vis-à-vis des tétrades extérieures, entraînant la présence de couplages hétéro-polaires.



**Figure 50** : Comparaison des spectres DC en présence de KCl, NaCl et de LiCl pour la séquence "TA + HT21" avec et sans RAFT. N.B. : [G-quadruplexe] = 10 μM et l'intensité est exprimée en ellipticité molaire.

Concernant le spectre obtenu en présence de LiCl, il est particulièrement surprenant de constater que celui-ci présente les caractéristiques d'une topologie parallèle (Figure 50C). En effet, la topologie parallèle correspond à la conformation la plus compacte et donc la moins solvatée. Or les cations  $\text{Li}^+$  sont connus comme étant non spécifiques des tétrades de guanosines. Par conséquent, la solvatation des guanosines devrait être thermodynamiquement favorisée, limitant les interactions de Hoogsteen intra-tétrade.<sup>92</sup> Ainsi, on s'attend plutôt à observer la conformation la moins compacte possible du fait de cette hydratation. A ce jour, aucune explication n'a été trouvée dans la littérature. On constate tout de même que les proportions de G-quadruplexes formées sont moins importantes qu'en présence de sodium ou de potassium. On observe aussi que la présence du RAFT, en position 5', ne semble toujours pas toucher la topologie adoptée.

Enfin, l'ajout d'acétonitrile, en présence de NaCl, semble favoriser la structuration du G-quadruplexe pour la séquence libre ; aucune incidence significative n'étant observée pour l'édifice RAFT - « TA + HT21 ». Il est alors possible qu'en présence de sodium, la présence du

RAFT limite les effets de la déshydratation. Aucun changement significatif n'est observé en présence de potassium.

### III.3. Bilan sur les G-quadruplexes télomériques et l'incidence du RAFT

Nous avons pu voir dans cette partie que selon les conditions salines utilisées, les différentes séquences télomériques « HT21 », « HT21 + TT » et « TA + HT21 » adoptent des topologies différentes. Sachant que des ee différents peuvent être observés selon la nature de la topologie du G-quadruplexe, cela témoigne de l'importance d'analyser et de déterminer en amont les conformations des structures synthétisées. Notons tout de même que certains spectres en DC ne correspondent pas à la topologie réellement adoptée. Il est alors important de garder un regard critique vis-à-vis de ces analyses et si possible confirmer les observations par RMN ou cristallographie.

## IV. Etude des structures parallèles

La conformation parallèle est connue pour être la plus stable parmi les topologies de G-quadruplexes. En effet, il s'agit, le plus souvent, de la conformation la plus compacte, *i.e.* offrant le moins de surface d'hydratation possible, stabilisant, de ce fait, les liaisons hydrogènes au sein des tétrades de guanosines.

Pour l'étude de cette topologie, il a été décidé de conserver le motif naturel,  $(GGGTTA)_n$  avec  $n \in \mathbb{N}$ , de la séquence télomérique humaine, afin de seulement faire varier la topologie de la structure par rapport aux autres G-quadruplexes étudiés. Pour cela, il a alors été choisi de travailler avec des structures tétramoléculaires, structures connues pour uniquement adopter des conformations parallèles. Pour rappel, les séquences télomérique humaines unimoléculaires n'adoptent des topologies parallèles qu'en présence de certaines conditions, que nous préférons éviter, comme l'ajout de PEG, par exemple. L'influence de la topologie sur l'énantiosélectivité de la réaction de sulfoxydation étudiée sera ainsi plus facile à déterminer. Enfin, l'utilisation d'une structure tétramoléculaire devrait aussi nous permettre de confirmer, ou non, l'intérêt de travailler avec des édifices contraints. En effet, bien que les G-quadruplexes tétramoléculaires soient généralement très stables, ils présentent aussi des cinétiques d'association particulièrement lentes.<sup>37,101</sup> La présence d'une contrainte, bloquant les brins d'ODN dans un espace proche, devrait permettre d'observer une cinétique de formation plus rapide.

---

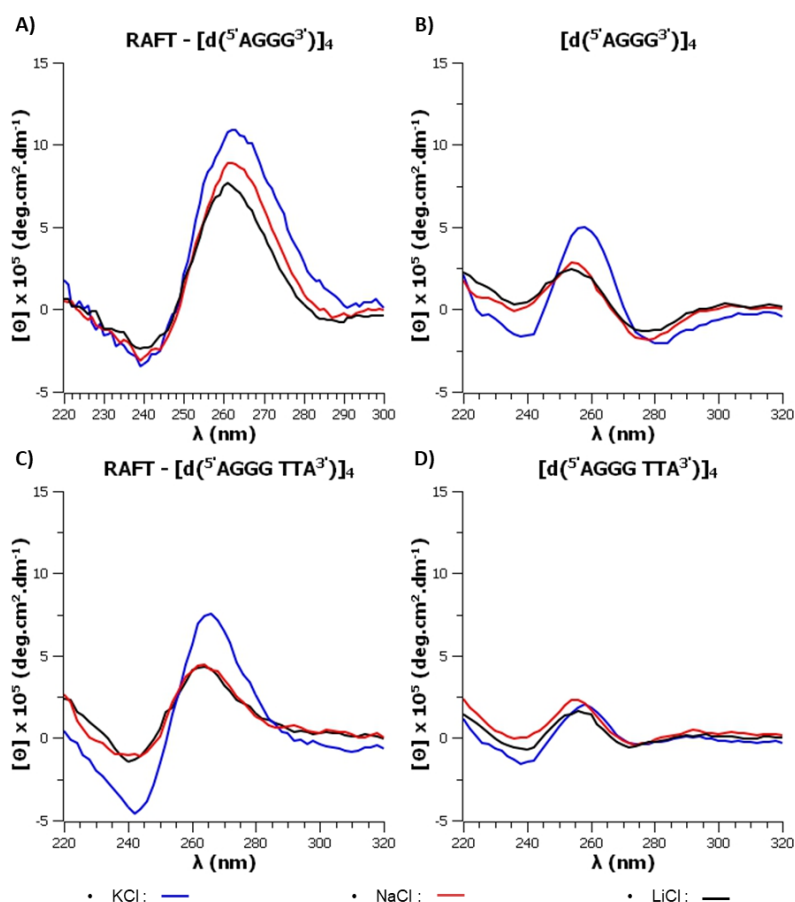
<sup>101</sup> (a) Bardin, C., Leroy, J. L., *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 477-488; (b) Tran, P. L. T., De Cian, A., Gros, J., Moriyama, R., Mergny, J.-L., in *Quadruplex Nucleic Acids* (Eds.: J.B. Chaires, D. Graves), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2012**, pp. 243–273.



IV.1. Structures télomériques contrainte et libre :  $[d(5'AGGG3')]_4$  et  $[d(5'AGGGTTA3')]_4$

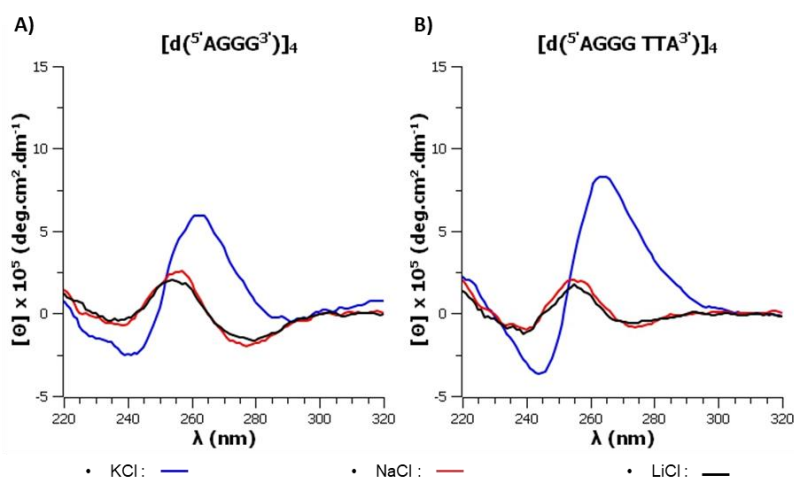
Dans un premier temps, les séquences télomériques  $[d(5'AGGG3')]_4$  et  $[d(5'AGGGTTA3')]_4$ , ainsi que les édifices contraints correspondants, sont étudiés afin de confirmer les topologies parallèles pour ces structures tétramoléculaires. De plus, nous souhaitons déterminer l'influence de la présence de « flanking », en l'occurrence ici de composition « TTA », sur le spectre de dichroïsme circulaire. Notons que contrairement aux G-quadruplexes parallèles monobrins, les structures tétra-brins ne comportent pas de boucles externes et par conséquent le « flanking » ajouté est libre de tout mouvement. Les analyses en DC ont été faites dans les conditions de catalyse, à savoir dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0) et en présence de KCl, NaCl ou LiCl (150 mM). Chaque échantillon a préalablement été conditionné à 90 °C pendant 5 min puis laissé refroidir sur 24 h avant analyse.

Dans un premier temps, on constate que les spectres en DC présentent les caractéristiques d'une topologie parallèle, à savoir un maximum à 260 nm et un minimum à 240 nm. Néanmoins, on observe des intensités pour les édifices contraints (Figure 51A et C), à  $\lambda = 260$  nm, bien plus importantes que pour les structures libres (Figure 51B et D). Il est ainsi peu probable que les séquences libres soient significativement structurées en G-quadruplexe. Or, rappelons que tous les échantillons ont été analysés dans les mêmes conditions, avec une concentration de 10  $\mu$ M en G-quadruplexe, concentration d'utilisation présentée par Can Li pour ses catalyses. Cependant, comme nous avons pu le dire précédemment, les structures tétramoléculaires ont des cinétiques de formation particulièrement lentes. Ainsi, selon les travaux de J.L. Mergny sur ce type de structure, avec une concentration de 10  $\mu$ M en G-quadruplexe, il faudrait attendre une centaine de jours pour observer la structuration de 50 % de l'échantillon.<sup>101b</sup> Il est donc particulièrement intéressant de constater, à faible concentration et sur un court laps de temps, une formation significative de G-quadruplexe parallèle pour les édifices contraints. De plus, des essais supplémentaires avec les édifices contraints ont par la suite montré qu'il est possible d'observer la même structuration de G-quadruplexe parallèle, sans conditionnement préalable. Ces résultats témoignent alors d'un apport significatif de la contrainte vis-à-vis de la cinétique de formation des G-quadruplexes.



**Figure 51** : Spectres en DC, dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0) en présence de KCl, NaCl et LiCl, des séquences, avec ou sans RAFT,  $[d(5'AGGG3')]_4$  (A, B) et  $[d(5'AGGGTTA3')]_4$  (C,D). N.B. :  $[G\text{-quadruplexe}] = 10 \mu\text{M}$  et l'intensité est exprimée en ellipticité molaire.

Toutefois, dans le but de confirmer l'hypothèse d'une cinétique lente pour les G-quadruplexes libres, à  $10 \mu\text{M}$ , il a été choisi de les conditionner avec une concentration de  $250 \mu\text{M}$  en G-quadruplexe, *i.e.* une concentration de  $1 \text{ mM}$  en brin d'ODN. Dans ces nouvelles conditions, toujours selon les travaux de J.L. Mergny, le temps nécessaire à la formation de 50 % de G-quadruplexe est de l'ordre de la dizaine de seconde, et de 24 h pour 90 %. Afin de conserver les mêmes concentrations de G-quadruplexe en DC, entre les séquences libres et contraintes, les échantillons sont dilués à  $10 \mu\text{M}$  avant analyse. On constate alors, dans ces nouvelles conditions, la formation d'un G-quadruplexe parallèle en présence de KCl (Figure 52). Les intensités observées sont proches de celles affichées par les édifices contraints RAFT -  $[d(5'AGGG3')]_4$  (Figure 51A) et RAFT -  $[d(5'AGGGTTA3')]_4$  (Figure 51C) confirmant alors que la contrainte de ces édifices permet une structuration bien plus rapide que pour les séquences libres.



**Figure 52** : Spectres en DC, dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0) en présence de KCl, NaCl et LiCl, des séquences  $[d(5'AGGG3')]_4$  (A) et  $[d(5'AGGG TTA3')]_4$  (B). N.B. : les G-quadruplexes ont été préalablement conditionnés à 250  $\mu$ M, puis dilués à 10  $\mu$ M avant analyse. Les intensités sont exprimées en ellipticité molaire.

Il est, de plus, particulièrement intéressant d'observer que ces édifices contraints sont capables d'adopter des topologies parallèles en présence de NaCl et de LiCl, tandis que les séquences libres sont très peu, voire non-structurées. Pour rappel, les ions sodium  $Na^+$  se plaçant au sein même des tétrades de guanosines, déstabilisent l'édifice global, par rapport au potassium  $K^+$ . Les ions lithium  $Li^+$ , quant à eux, sont considérés comme trop petit pour significativement stabiliser les tétrades de guanosines.

Enfin, concernant la présence du « flanking », il semble que celui-ci ralentisse la cinétique de formation du G-quadruplexe. En effet, on observe après conditionnement à 10  $\mu$ M, une intensité significative à 260 nm pour la séquence  $[d(5'AGGG3')]_4$  (Figure 51B) tandis qu'aucune structuration n'est visible pour la séquence  $[d(5'AGGG TTA3')]_4$  (Figure 51D). Or, lorsque les structures libres sont conditionnées à 250  $\mu$ M, la séquence  $[d(5'AGGG TTA3')]_4$  présente cette fois-ci une intensité plus importante (Figure 52), témoignant de la nécessité d'une concentration plus importante en G-quadruplexe pour observer la structuration.

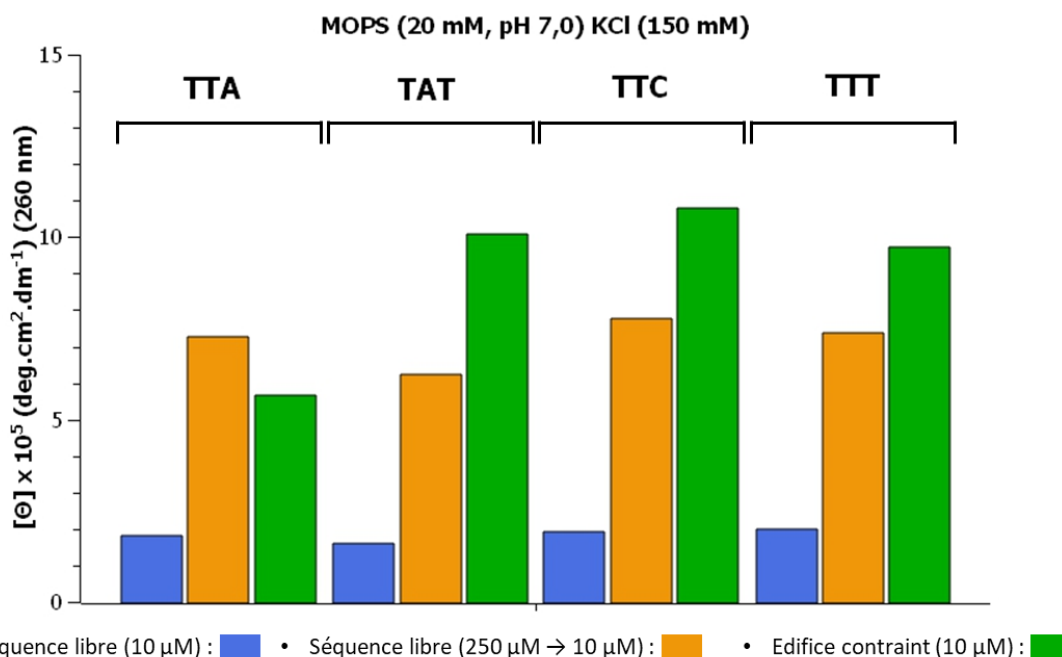
#### IV.2. Modulation de la composition du « flanking »

##### IV.2.1. Structuration en G-quadruplexe

Nous avons pu voir que les séquences libres et contraintes sont capables de former des G-quadruplexes parallèles dans les conditions de catalyse. La présence de « flanking » ne semble, de plus, pas perturber de façon significative les spectres en DC. Les différentes séquences comportant des modulations de « flanking » sont maintenant analysées, afin de confirmer les topologies parallèles. Dans un souci de synthèse des résultats obtenus, seules les intensités à 260 nm, longueur d'onde caractéristique d'une topologie parallèle, sont reportées ici. Les spectres de DC sont si besoins disponibles en annexes. Dans un premier temps, les résultats obtenus en présence de KCl, sont présentés sur la (Figure 53).

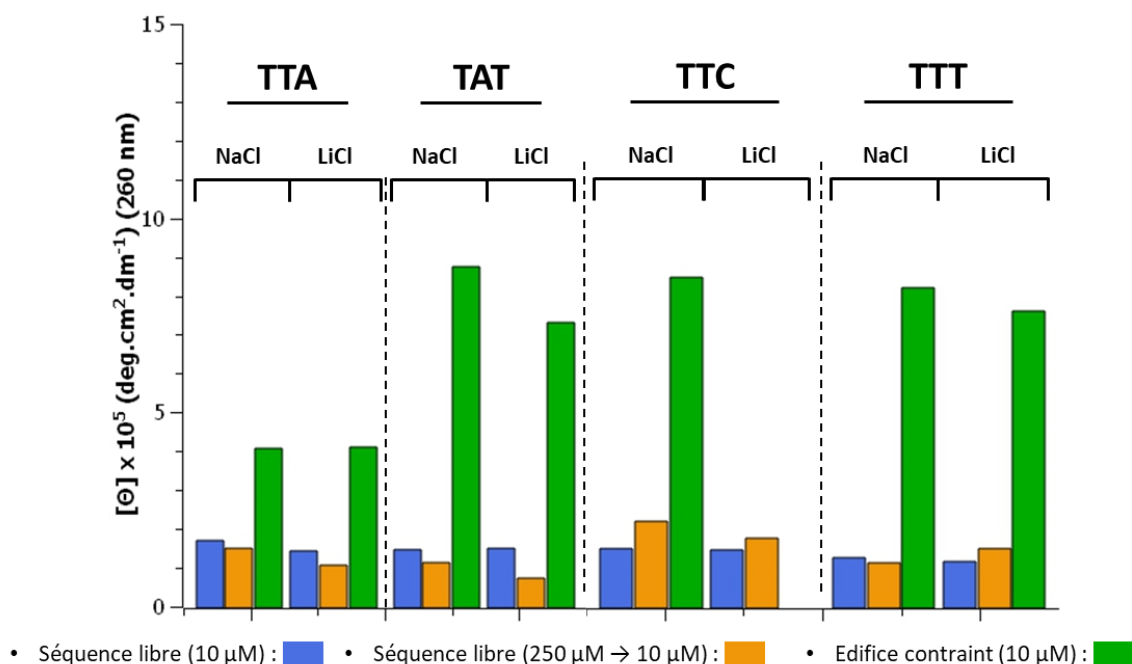
De la même manière que pour les structures tétramoléculaire télomériques, on constate qu'il est nécessaire de conditionner les séquences libres, avec une concentration de 250  $\mu$ M en

G-quadruplexe, pour observer la formation des structures parallèles. Il est aussi intéressant de voir que les édifices contraints, sans avoir été préalablement conditionnés, présentent systématiquement des intensités plus importantes que les séquences libres. Cela témoigne alors de l'apport de la contrainte sur les édifices de G-quadruplexes, ceux-ci étant capable de se structurer avec une cinétique beaucoup plus rapide que les séquences libres, à des concentrations bien plus faibles.



**Figure 53** : Ellipticités molaires observées, à  $\lambda = 260 \text{ nm}$ , sur les spectres en DC des séquences libres et contraintes, en présence de KCl, selon la composition du flanking. N.B. :  $[\text{G-quadruplexe}] = 10 \mu\text{M}$ .

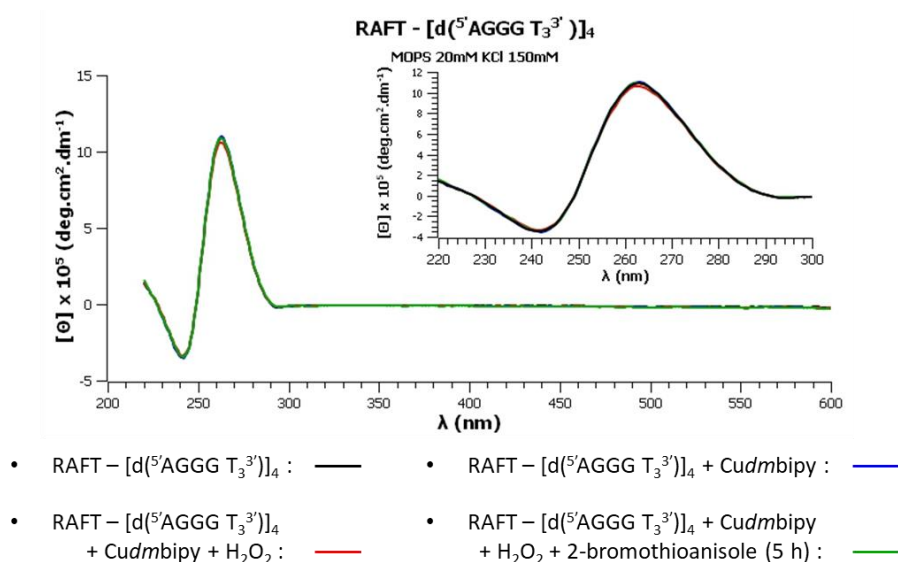
Les analyses ont également été faites en présence des sels NaCl et LiCl (Figure 54). Notons que la structure contrainte parallèle RAFT -  $[\text{d}^{5'}\text{AGGGTTC}^{3'}]_4$  n'a pas été analysée en présence de LiCl par manque de matière. On observe encore une fois de très faibles structurations en G-quadruplexe pour les séquences libres, et indépendamment de la concentration de conditionnement. En revanche, il est possible d'observer des intensités, pour les édifices contraints, du même ordre de grandeur qu'en présence de KCl, témoignant encore une fois de l'intérêt de contraindre les structures.



**Figure 54** : Ellipticités molaires observées, à  $\lambda = 260 \text{ nm}$ , sur les spectres en DC des séquences libres et contraintes, en présence de NaCl et LiCl, selon la composition du flanking. N.B. :  $[\text{G-quadruplexe}] = 10 \mu\text{M}$ .

#### IV.2.2. Comportement de la structure contrainte, en condition de catalyse

Nous avons souhaité observer le comportement de la structure RAFT -  $[\text{d}^{(5'}\text{AGGG T}_3^{3'})]_4$  en condition de catalyse, *i.e.* en présence du complexe de cuivre  $\text{Cu}(\text{dmbipy})$ , de l'oxydant  $\text{H}_2\text{O}_2$  ainsi qu'un thioéther, le 2-bromothioanisole. Chaque composant a été introduit selon les quantités utilisées en catalyse. Le suivi a été réalisé par DC, à la température de 15 °C, température de catalyse (Figure 55).



**Figure 55** : Suivi par DC d'une réaction de catalyse, en présence de l'édifice RAFT -  $[\text{d}^{(5'}\text{AGGG T}_3^{3'})]_4$ , dans la solution de tampon MOPS 20 mM, KCl 150 mM, en présence de KCl (150 mM), à 15 °C. N.B. :  $[\text{G-quadruplexe}] = 10 \mu\text{M}$  et l'intensité est exprimée en ellipticité molaire.

Le spectre de DC a été enregistré sur la plage 220 – 600 nm, afin d’observer d’éventuelle induction asymétrique vis à vis du complexe *Cudmbipy*. Cependant, aucun signal n’est observé dans la zone d’absorbance du cuivre, 320 nm, ou du ligand 4,4-diméthyl-2,2-dipyridyl (*dmbipy*), 297 et 307 nm. Ainsi, de la même manière que pour la séquence « HT21 », il ne semble pas possible de mettre en évidence une interaction entre le complexe *Cudmbipy* et la structure contrainte parallèle. Enfin, notons qu’aucune détérioration de la topologie parallèle n’est observée.

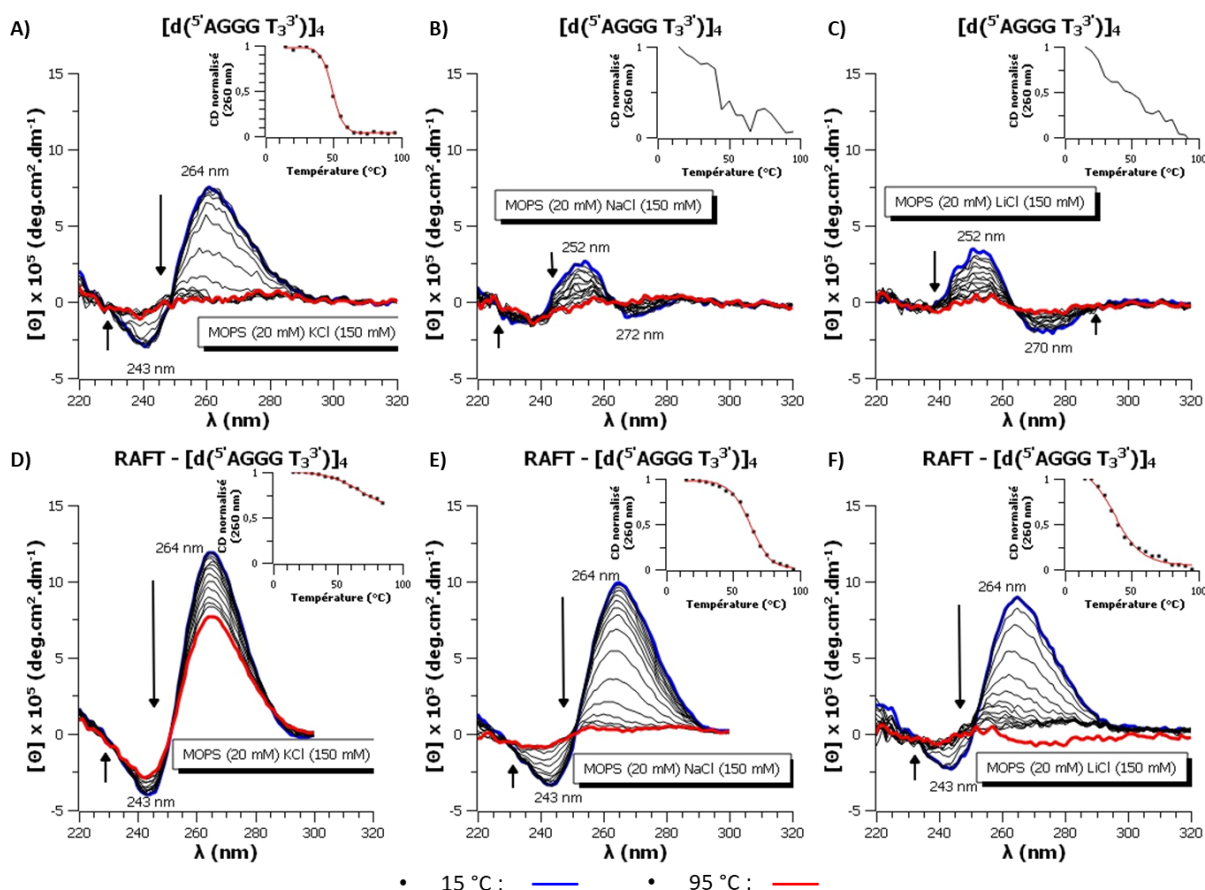
#### IV.2.3. Stabilité

Dans le but d’observer si les structures contraintes présentent une plus grande stabilité que les G-quadruplexes tétramoléculaires non contraints, les températures de fusion ont été mesurées pour la séquence  $[d(5'AGGG T_3^{3'})]_4$  et la structure RAFT -  $[d(5'AGGG T_3^{3'})]_4$ . Les analyses ont été faites de 15 °C à 95 °C, dans la solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0) et en présence des différents sels KCl, NaCl et LiCl. Notons ici que la solution de tampon MOPS est décrite dans la littérature comme non adaptée à l’étude des températures de transition.<sup>102</sup> En effet, il semble que son pH puisse varier d’une à deux unités en fonction de la température. Cependant, l’objectif ici n’étant pas de déterminer le  $T_m$  exact de chacune des structures, mais bien d’avoir une idée de leur stabilité dans les conditions de catalyse, la solution de tampon MOPS a été conservée comme solution d’analyse.

Les spectres obtenus sont présentés sur la Figure 56. Il est particulièrement intéressant d’observer que l’édifice contraint est significativement plus stable que la séquence non contrainte. En effet, en présence de KCl, la séquence  $[d(5'AGGG T_3^{3'})]_4$  possède un  $T_m$  de 49 °C (Figure 56A), tandis que la structure RAFT -  $[d(5'AGGG T_3^{3'})]_4$  n’a pu être dénaturée (Figure 56C). En présence de NaCl et de LiCl, par comparaison avec le séquence libre (Figure 56B et C), seul l’édifice contraint présente une structuration en G-quadruplexe parallèle avec, respectivement, des  $T_m$  de 63 °C (Figure 56D) et 37 °C (Figure 56E). Ces résultats démontrent alors que non seulement la présence du RAFT permet d’accroître la cinétique de formation du G-quadruplexe, mais aussi de fortement stabiliser l’édifice.

---

<sup>102</sup> Mergny, J.-L., Lacroix, L., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* **2009**, 37, 17.1.1-17.1.15.



**Figure 56** : Courbes de dénaturation, des structures respectives  $[d(5'AGGG T_3^{3'})]_4$  et RAFT -  $[d(5'AGGG T_3^{3'})]_4$ , réalisées dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0), en présence de KCl (A,D), de NaCl (B,E) et LiCl (C,F). Les analyses ont été faites avec des concentrations en G-quadruplexe de 10  $\mu$ M, sur une plage de température de 15 à 95 °C.

### IV.3. Modulation de la longueur du « flanking »

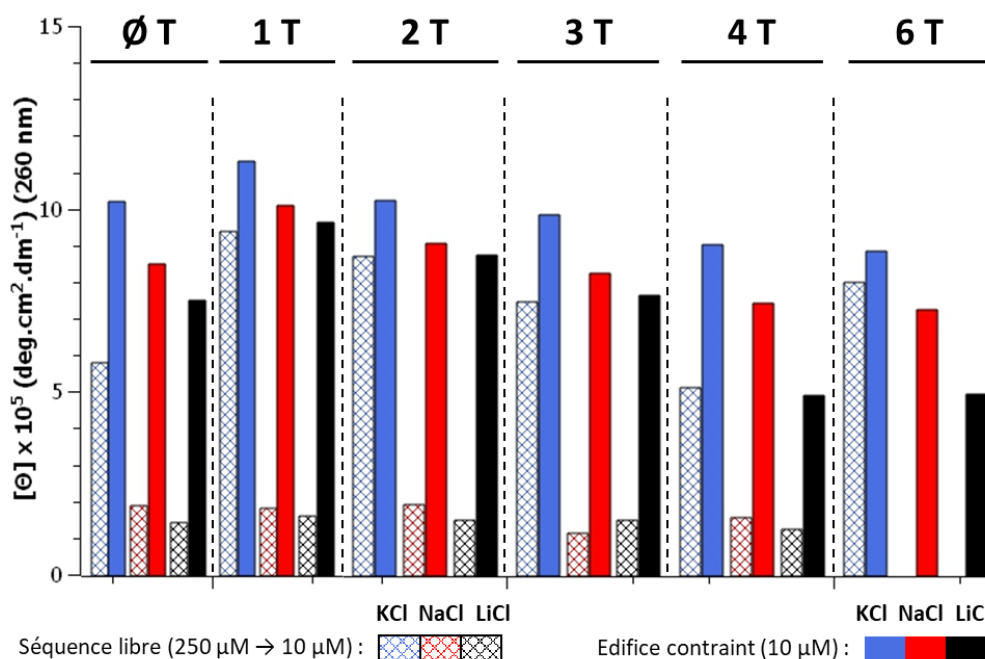
Il a pu être observé que la présence du RAFT, contraignant la structure du G-quadruplexe parallèle, permet d'observer une cinétique de formation, ainsi qu'une stabilité, plus importante que pour les séquences libres, et ce quel que soit la nature des sels en présence. Il est maintenant intéressant d'observer le comportement en dichroïsme circulaire des structures comportant un « flanking » plus ou moins important.

#### IV.3.1. Structuration en G-quadruplexe

L'étude a été uniquement menée sur une composition de thymidine pour le « flanking » des G-quadruplexes. Les séquences  $[d(5'AGGG T_n^{3'})]_4$  et RAFT -  $[d(5'AGGG T_n^{3'})]_4$ , avec  $n \in [0; 6]$ , ont ainsi été analysées par dichroïsme circulaire. De la même manière que pour les études précédentes, il est choisi de ne représenter que les intensités à 260 nm, chacune des structures exhibant un spectre conforme aux caractéristiques d'une topologie parallèle. Les spectres DC sont disponibles en annexe.

Les mêmes observations que précédemment, concernant la structuration en G-quadruplexes, pour les édifices contraints et libres, peuvent alors être faites, selon la nature du sel en

présence (Figure 57). Les séquences libres sont ainsi capables de former des G-quadruplexes parallèles seulement en présence de potassium, tandis que les édifices contraints adoptent une topologie parallèle, indépendamment des conditions. Il est intéressant d'observer que les intensités pour les G-quadruplexes contraints sont plus importantes que celles affichées par les séquences non contraintes. Enfin, notons qu'il semble que plus la longueur du « flanking » est importante, et plus l'intensité à 260 nm diminue. Il est alors envisageable que plus le « flanking » est important, moins la structure globale est stable, cela se traduisant alors par une intensité plus faible aux alentours de 260 nm.



**Figure 57** : Ellipticités molaires observées, à  $\lambda = 260$  nm, sur les spectres en DC des séquences libres et contraintes, en présence de KCl, NaCl et LiCl, selon la longueur du flanking. N.B. : [G-quadruplexe] = 10  $\mu$ M.

#### IV.3.2. Stabilité

Dans le but de déterminer si la présence d'un « long flanking » est susceptible d'affecter la stabilité des G-quadruplexes tétramoléculaires, contraints et libres, les températures de dénaturation ont été déterminées pour les séquences  $[d(5'AGGG T_n 3')]_4$  et RAFT -  $[d(5'AGGG T_n 3')]_4$ , avec  $n \in \{1; 3; 6\}$ . Ces séquences ont été choisies afin d'avoir un panel de structure représentatif des différentes longueurs de « flanking » étudiées. Les différents spectres obtenus sont disponibles en annexe de cette thèse et les  $T_m$  (°C) mesurés sont résumés dans le Tableau 4.

On constate alors que les valeurs des  $T_m$  (°C) des édifices contraints sont significativement plus importantes que les séquences libres. Cela confirme ainsi un gain de stabilité du fait de la présence du RAFT. A titre d'exemple, on observe en présence de KCl un  $\Delta T_m > 50$  °C en faveur des structures contraintes. Les séquences libres étant relativement peu structurées en présence de NaCl et de LiCl, les  $T_m$  n'ont pas pu être déterminés de façon précise. En revanche, on peut voir que les structures contraintes présentent toujours des valeurs de  $T_m$



importantes en présence de NaCl et LiCl. Enfin, on constate que plus le nombre de thymidine augmente, moins la valeur de  $T_m$  (°C) est importante. Cela montre ainsi que plus le flanking est important, moins la structure globale, contrainte ou libre, est stable. Ce résultat était prévisible, puisque plus le « flanking » est conséquent, plus on introduit de l'entropie dans le système thermodynamique, se traduisant alors par une plus grande instabilité.

**Tableau 4** : Récapitulatif des températures de transition ( $T_m$ ) pour les G-quadruplexes libres et contraints, en fonction de la longueur du « flanking ».

Nombre de thymidine	Séquences libres			Edifice contraint		
	1	3	3	1	2	3
Sel	Tm (°C)					
KCl	53	49	41	> 95	> 95	92
NaCl	/	/	/	79	63	48
LiCl	/	/	/	59	37	33

La température a été variée de 15 à 95 °C et les échantillons analysés avec une concentration en G-quadruplexe de 10  $\mu$ M.

#### IV.3.3. Constantes thermodynamiques

L'utilisation des courbes de dénaturation des différents édifices a permis de déterminer les constantes thermodynamiques. Ainsi, à partir de la relation de Van't Hoff  $\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ , il est possible d'en déduire que  $\ln(K) = \frac{\Delta H^\circ}{R} \times \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$ . Les paramètres  $K$ ,  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  représentent respectivement la constante d'équilibre, l'enthalpie libre, l'enthalpie et l'entropie lors de la formation de l'édifice.  $T$  représente la température et  $R$  la constante de Boltzmann. En traçant la fonction  $\ln(K) = f\left(\frac{1}{T}\right)$ ,  $\Delta H^\circ$  peut alors être déduit de la pente de la droite tandis que  $\Delta S^\circ$  est obtenu à partir de l'ordonnée à l'origine. Il est possible de déterminer  $K$  à partir des différentes courbes de dénaturation des structures contraintes ou libres. Ainsi, dans le cas des édifices contraints, un modèle intramoléculaire a été appliqué, permettant de mesurer la constante d'équilibre de formation du G-quadruplexe selon l'équation  $K = \frac{\theta}{(1-\theta)}$ , où  $\theta$  représente la fraction de G-quadruplexe formée. Celle-ci a été déterminée à partir des courbes de dénaturation, en considérant que l'ensemble des G-quadruplexes sont formés à basse température. Notons qu'on observe bien que la formation du G-quadruplexe, pour les édifices contraints, est indépendante de la concentration en brins d'ODN, expliquant alors la structuration à faible concentration observée.

Dans le cas des structures tétramoléculaires libres, la constante d'équilibre de formation est déterminée de la façon suivante :  $K = \frac{\theta \times C_0}{((1-\theta)C_0)^4}$ , avec  $C_0$  la concentration, en mol/L, des brins d'ODN. Les analyses ayant été faites dans les mêmes conditions, il est possible de comparer les constantes thermodynamiques. Les différentes valeurs sont présentées dans le Tableau 5.

**Tableau 5** : Récapitulatif des constantes thermodynamiques, pour les structures  $d(5'AGGG Tn3')_4$  et RAFT  $[d(5'AGGG Tn3')]_4$ , avec  $n \in \{1 ; 3 ; 6\}$ .

Séquences	Sel	Tm (°C)	$\Delta H^\circ$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^\circ$ (cal.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	$\Delta G^\circ$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )
$[d(5'AGGG T3')]_4$	KCl	53	-128	-330	-30
	NaCl*		-37	-54	--54
	LiCl*		-24	-12	-20
RAFT - $[d(5'AGGG T3')]_4$	KCl	> 95	-12	-30	-2,5
	NaCl	79	-10	-27	-1,8
	LiCl	59	-33	-100	-3
$[d(5'AGGG T33')]_4$	KCl	49	-119	-307	-27
	NaCl*		-15	-13	-19
	LiCl*		-29	-27	-21
RAFT - $[d(5'AGGG T33')]_4$	KCl	> 95	-12	-33	-2,4
	NaCl	63	-30	-89	-3,3
	LiCl	37	-12	-38	-0,35
$[d(5'AGGG T63')]_4$	KCl	41	-100	-261	-22
	NaCl*		n.d	n.d	n.d
	LiCl*		n.d	n.d	n.d
RAFT - $[d(5'AGGG T63')]_4$	KCl	92	-8	-22	-1,6
	NaCl	48	-7	-19	-1,5
	LiCl	33	-40	-131	-1,3

Ces constantes ont été déterminées à partir des courbes de dénaturation réalisées, de 15 °C à 95 °C, dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0) et en présence de KCl, NaCl et LiCl (150 mM). N.B. :  $[G\text{-quadruplexe}] = 10 \mu\text{M}$ . \*Les valeurs thermodynamiques des structures libres sont données à titre indicatif.

Plusieurs conclusions peuvent être déduites de ces résultats. La comparaison des constantes thermodynamiques des différentes structures, selon la nature du sel en présence, semble indiquer que les motifs contraints et libres ne présentent pas les mêmes comportements. En effet, on constate que pour les séquences libres, la formation des G-quadruplexes semble être favorisée par gain enthalpique. Cela est alors en accord avec une stabilisation de la structure par formation de liaisons hydrogènes, au sein des tétrades de guanosines. Ainsi, on constate bien qu'en présence de potassium, les guanosines sont bien moins solvatées qu'en présence de sodium ou de lithium, en accord avec la littérature. Concernant les édifices contraints, la formation des G-quadruplexes semble être favorisée par gain entropique. Cela est très certainement dû à la pré-organisation de la structure, facilitant ainsi la formation du G-quadruplexe.

#### IV.4. Conclusion sur l'analyse des structures parallèles

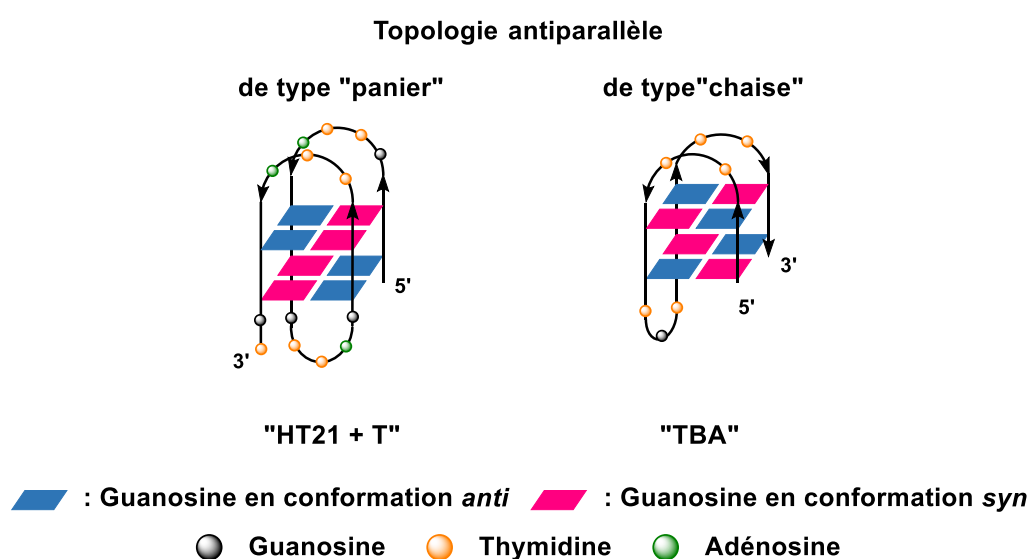
Nous avons pu voir dans cette partie que les structures tétramoléculaires adoptent bien une topologie parallèle, dans les conditions de catalyse, à savoir dans la solution de tampon MOPS, en présence de KCl. Il a pu être constaté que la présence du RAFT, pour contraindre la structure des G-quadruplexes, permet d'accroître de façon significative la cinétique de

formation du G-quadruplexe, ainsi que la stabilité globale de l'édifice, indépendamment de la nature des sels en présence. Enfin, nous avons pu constater que la structure contrainte RAFT – [d(5'AGGG T<sub>3</sub>3')]<sub>4</sub> ne semble pas être dégradée lors d'une réaction de sulfoxydation.

## V. Etudes des structures antiparallèles

Les topologies antiparallèles sont des topologies souvent observées pour les G-quadruplexes. Il s'agit, en effet, de la topologie majoritairement adoptée pour les séquences télomériques humaine, en présence de sodium. Cependant, nous avons pu constater que cette conformation peut aussi être adoptée en présence de KCl ou de LiCl (*cf.* « HT21 »), le plus souvent en équilibre avec plusieurs autres topologies. Dans le but de concevoir des catalyseurs chiraux à partir d'oligonucléotides contraints, nous souhaitons pouvoir conserver cette topologie antiparallèle, indépendamment des conditions du milieu. C'est dans cet objectif que la structure **32**, avec deux boucles latérales contraintes, a été synthétisée.

Les séquences « HT21 + T » (d[5'G<sub>3</sub>(TTAGGG)<sub>3</sub>T<sup>3'</sup>]) et « TBA » (d[5'G<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>TGTG<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>3']) sont décrites dans la littérature comme des séquences pouvant adopter des topologies antiparallèles, indépendamment de la salinité du milieu. De plus, chacune d'entre elle adopte une conformation différente, la première étant de type « panier » (Figure 58A) tandis que la seconde est de type « chaise » (Figure 58B). Il peut ainsi être intéressant de comparer les spectres en DC des deux structures, bien que de composition différente.



**Figure 58** : Représentation des topologies antiparallèles, de type « panier » (A) et de type « chaise » (B).

### V.1. « HT21 + T » : un G-quadruplexe antiparallèle de type « panier »

La séquence « HT21 + T » est une séquence particulière. Elle est décrite comme adoptant, en présence de KCl, une topologie antiparallèle de type « panier » à deux tétrades, et présente pourtant un spectre en DC caractéristique d'une topologie hybride [3+1] (Figure 59A).<sup>65</sup> Cela a été montré par RMN, dans les mêmes conditions salines que celles que nous utilisons, mais en présence d'une solution de tampon de phosphate de potassium. Les mêmes observations ont également été faites avec les séquences « HT21 » et « HT21 + TT ».

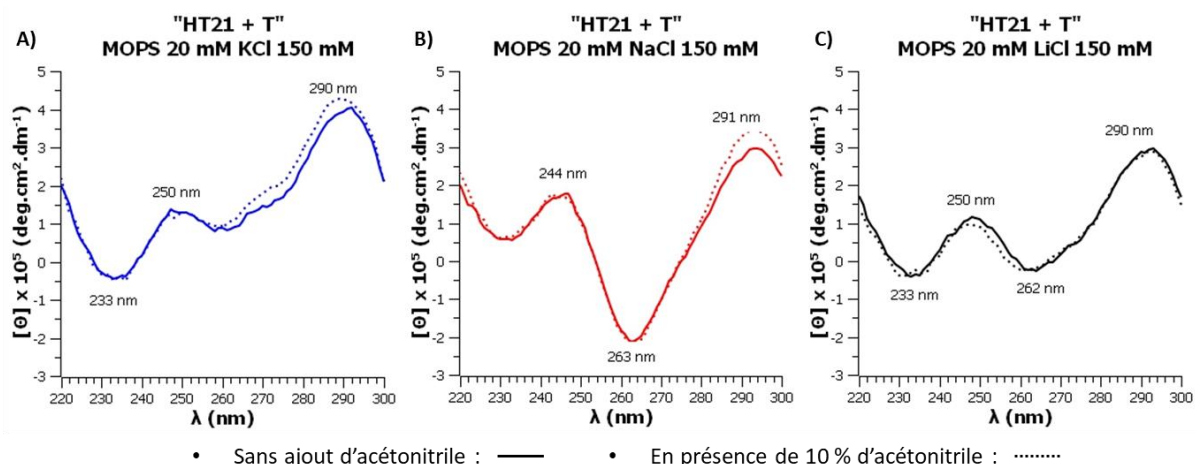


Figure 59 : Comparaison des spectres DC en présence de KCl, NaCl et de LiCl pour la séquence "HT21+T".

Il est possible d'expliquer le spectre obtenu en présence de potassium par l'existence de résidus - guanosines, thymidines ou encore adénosines - au niveau des boucles pouvant se superposer aux tétrades de guanosines extérieures (Figure 60).<sup>80a</sup> Ainsi, il est possible d'observer une triade de guanosines (en vert) se superposer sur la face inférieure et une triade A : A : G (en jaune et vert) sur la tétrade de guanosines supérieure. La présence de ces deux triades entraîne alors, par exemple, la succession d'angles glycosidiques *syn* : *anti* : *anti* pour les guanosines G<sub>1</sub> : G<sub>2</sub> : G<sub>3</sub>. De ce fait, on observe la présence d'au moins un couplage homopolaire, caractéristique d'une topologie hybride et non plus d'une conformation antiparallèle. Pour rappel, un couplage homopolaire est observé lorsque les angles glycosidiques sont conservés entre deux guanosines successives. Cela explique alors le spectre observé, malgré la topologie antiparallèle à deux tétrades, confirmée par RMN.

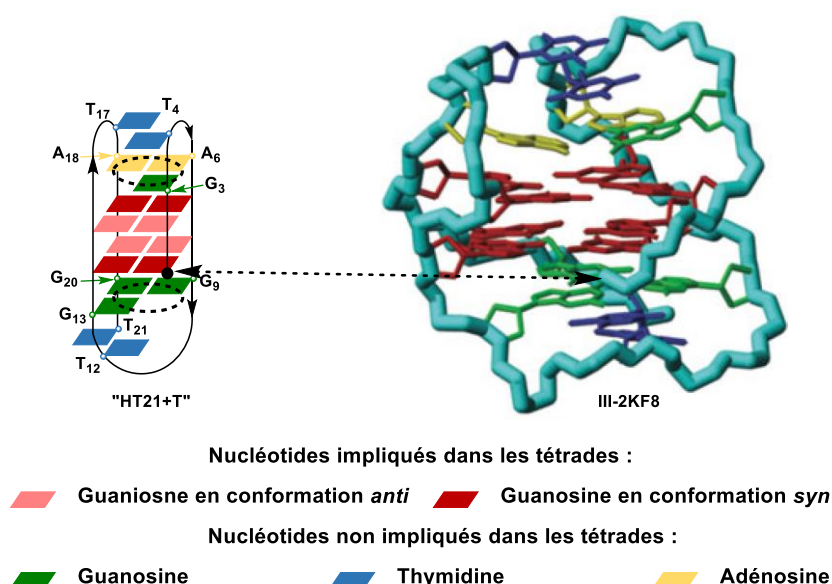
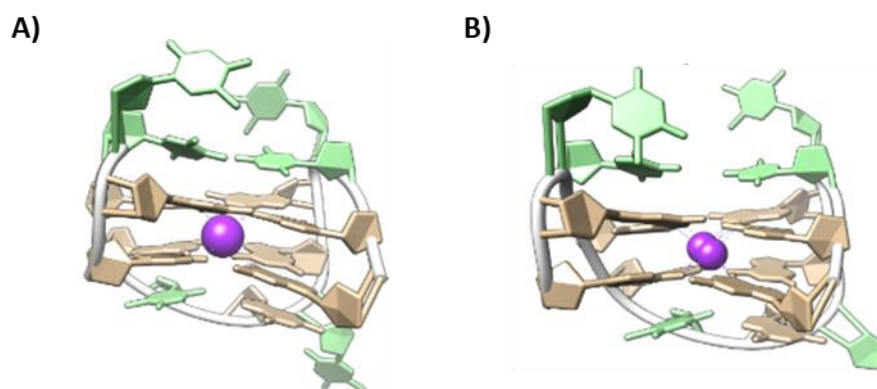


Figure 60 : Représentation schématique (A) et structure PDB (B) de « HT21+T ». La position 5' est indiquée par un cercle noir. Tous les nucléotides ne participant pas aux tétrades de guanosines sont en conformation *anti*.

En présence de LiCl, la topologie est toujours antiparallèle à deux tétrades. Cependant les cations  $\text{Li}^+$  étant de taille trop faible pour stabiliser de façon efficace les tétrades de guanosines, le G-quadruplexe est moins structuré. Cela se traduit alors par de plus faibles interactions entre les tétrades de guanosines et les résidus, d'où une intensité moins importante à 260 nm (Figure 59C). En présence de sodium, le spectre est bien caractéristique d'une topologie antiparallèle, cette fois ci à trois tétrades (Figure 59B).

#### V.2. L'aptamère « TBA » : un G-quadruplexe antiparallèle de type « chaise »

La séquence « TBA : Thrombin Binding Aptamer » longue de 15 acides nucléiques est une séquence particulièrement décrite dans la littérature. Il s'agit, en effet, de la séquence d'un aptamère pouvant se lier de façon sélective à la thrombine humaine et ainsi inhiber ses fonctions clés dans la coagulation.<sup>64</sup> Des structures cristallines de la séquence TBA liée à l' $\alpha$ -thrombine, en présence de potassium et de sodium, ont pu être obtenues par l'équipe de R. Krauss.<sup>103</sup> Ces structures cristallines montrent alors que la séquence « TBA » adopte une topologie antiparallèle de type « chaise » dans les deux solutions salines (Figure 61). Il a notamment pu être montré que la structure la plus stable et rigide est obtenue en présence de potassium, celui-ci se plaçant entre les deux tétrades de guanosines et stabilisant fortement les atomes d'oxygène O6 (Figure 61A). En revanche, on observe que le sodium occupe deux sites de coordination alternatifs proches de l'une des deux tétrades (Figure 61B). Cela confère alors une plus grande plasticité à l'aptamère, se caractérisant par une baisse globale de la stabilité de la structure.

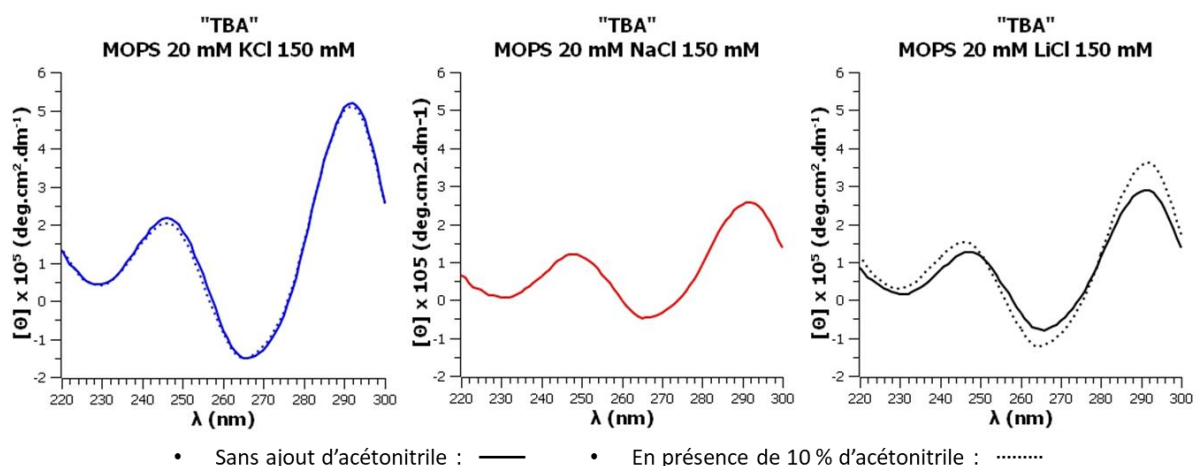


**Figure 61** : Structures des cristaux de « TBA » en présence de  $\text{K}^+$  (A ; PDB ID : 4DII) ou en présence de  $\text{Na}^+$  (B ; PDB ID : 4DIH). Les cations sont représentés en violet. Les guanosines et thymidines sont représentées, respectivement, en beige et en vert. Le squelette phosphate est représenté en blanc.

Ces observations sont en accord avec les spectres que nous avons pu obtenir par DC (Figure 62). On observe, en effet, indépendamment de la nature des cations testés, la signature d'une topologie antiparallèle. Il est intéressant de noter que la bande à 290 nm semble plus intense que pour la séquence « HT21 + T ». Il est possible que cela soit dû au fait que, dans la conformation de type « panier », il n'y a pas de boucle diagonale recouvrant les

<sup>103</sup> Russo Krauss, I., Merlino, A., Randazzo, A., Novellino, E., Mazzarella, L., Sica, F., *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 8119-8128.

tétrades de guanosines. Ainsi, contrairement à la séquence « HT21 + T », les chances de superpositions homopolaires entre les tétrades et les résidus issus des boucles sont plus limitées. La présence d'acétonitrile ne semble pas avoir d'incidence sur la topologie.

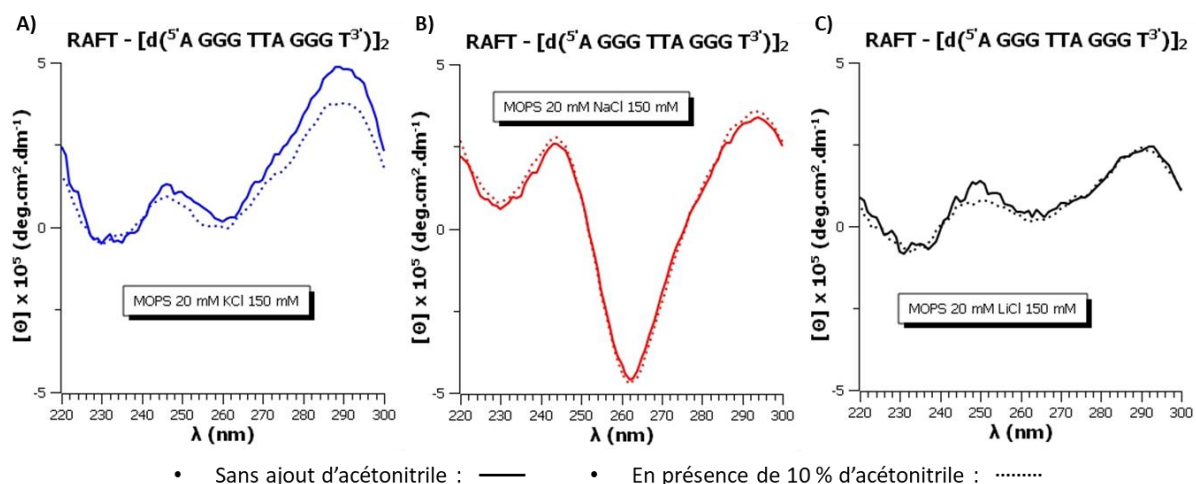


**Figure 62** : Spectres en DC de la séquence "TBA" en présence de potassium (A), de sodium (B) ou de lithium (C). L'effet, après 5 h, de l'ajout de 10 % d'acétonitrile est aussi étudié.

### V.3. Structure antiparallèle contrainte

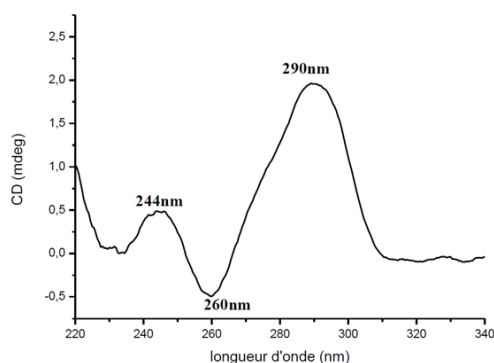
Il est bon de rappeler que l'édifice contraint antiparallèle possède deux boucles latérales contraintes et aucune boucle diagonale. De ce fait, on s'attend plutôt à un spectre de DC comparable à la séquence « TBA », malgré que la structure contrainte **32** est de type « panier », similaire à la séquence « HT21 + T ».

On observe que le spectre obtenu en présence de sodium est bien celui d'une topologie antiparallèle, avec un minimum à 260 nm et deux maxima à 290 et 240 nm (Figure 63B). En revanche, en présence de KCl et de LiCl, les spectres de DC sont plus sujets à interprétation, puisqu'aucun minimum à 240 nm n'est clairement identifiable (Figure 63A et C). L'ajout d'acétonitrile ne semble pas avoir d'influence sur la topologie de la structure contrainte.



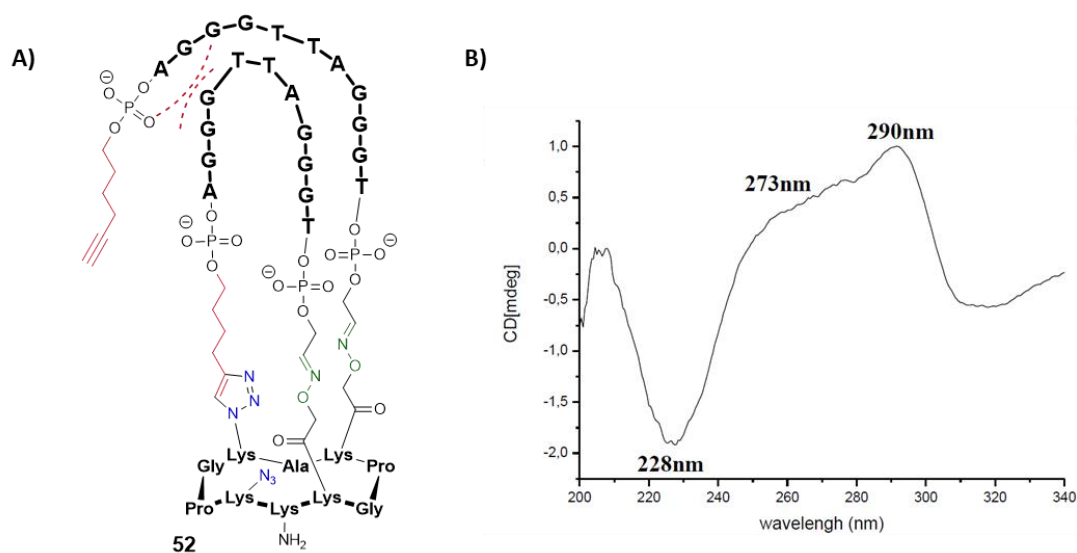
**Figure 63** : Spectres en DC de la structure contrainte antiparallèle en présence de KCl, NaCl ou de LiCl. L'effet, après 5 h, de l'ajout de 10 % d'acétonitrile est aussi étudié.

Cependant, en comparant les spectres obtenus par R. Bonnet sur la même structure contrainte, en présence de potassium, on constate que nous obtenons le même profil (Figure 64).<sup>39</sup> Cela nous conforte alors dans l'idée que la structure synthétisée correspond bien à l'édifice contraint antiparallèle souhaité. Il est alors possible que la faible intensité relative du minimum à 260 nm soit le résultat d'une coordination du cation  $K^+$  entre la tétrade supérieure et une des boucles contraintes. Dans le cas de cette hypothèse, on serait alors dans la même configuration que ce qui a pu être observé pour la conformation antiparallèle à deux tétrades.



**Figure 64** : Spectre en DC obtenu par R. Bonnet, pour la structure antiparallèle contrainte, dans une solution de tampon Tris.HCl (10 mM, pH 7,4), en présence de KCl. La figure est extraite de la publication : *Chem. Commun.* **2015**, 51, 4850–4853.<sup>39</sup>

De plus, on observe que si on avait obtenu la structure non contrainte **52** (Figure 65A), un spectre caractéristique d'une topologie hybride aurait été obtenu, en présence de potassium. Une signature de topologie hybride 1 est effectivement observée par R. Bonnet, en présence de potassium, pour l'édifice **52** (Figure 65B).



**Figure 65** : Spectre en dichroïsme circulaire obtenue par R. Bonnet pour la structure contrainte antiparallèle en présence de KCl (A). Présentation du spectre DC de la structure non contrainte (C) en présence de potassium (B).

Au vu de ces différentes observations, on peut donc conclure que l'édifice contraint en topologie antiparallèle correspond bien à la structure souhaitée. Il serait néanmoins

intéressant à l'avenir de réaliser une étude RMN de l'édifice afin de mieux comprendre le repliement du G-quadruplexe.

#### V.4. Stabilité des structures

Les températures de transition de la structure contrainte ont été déterminées à partir de courbes de dénaturation, dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0) en présence de KCl et NaCl (cf. Annexe). Les valeurs de  $T_m$  (°C) obtenus sont alors comparées aux valeurs issues de la littérature, ainsi que des résultats de R. Bonnet, pour les structures libres et contraintes.

**Tableau 6** : Récapitulatif des  $T_m$  (°C) mesurés pour les différentes structures antiparallèles.

Séquence	Solution tampon	Cations	$T_m$ (°C)
« HT21+T »	20 mM de potassium phosphate (pH = 7)	K <sup>+</sup> (20 mM)	57 <sup>65</sup>
		Na <sup>+</sup> (20 mM)	/
« TBA »	25 mM M-phosphate <sup>a</sup> (pH = 7,1)	K <sup>+</sup> (100 mM)	53 <sup>103</sup>
		Na <sup>+</sup> (100 mM)	24 <sup>Erreur ! Signet non défini.</sup>
Structure contrainte antiparallèle <b>32</b>	10 mM de Tris.HCl (pH = 7,4)	K <sup>+</sup> (100 mM)	83 <sup>39</sup>
		Na <sup>+</sup> (100 mM)	82 <sup>39</sup>
	20 mM MOPS (pH = 7,0)	K <sup>+</sup> (150 mM)	80
		Na <sup>+</sup> (150 mM)	71

Les valeurs de  $T_m$  (°C) sont déterminées à partir de la valeur de l'ellipticité molaire, mesurée en DC, à 290 nm.  
<sup>a</sup> M correspond soit au cation K<sup>+</sup>, soit au cation Na<sup>+</sup>.

Bien que les conditions salines, ainsi que la nature de la solution tampon, soient différentes, on constate un gain important de stabilité de l'édifice contraint, par rapport aux structures libres. En effet, on observe, en présence de potassium, un  $\Delta T_m$  de +26 °C par rapport à « HT21 + T » et de +30 °C par rapport à la séquence « TBA ». Un gain  $\Delta T_m$  de + 47 °C est observé en présence de NaCl. De la même manière que pour les structures contraintes parallèles, ces différentes observations confirment alors le gain de stabilité apporté par la présence du RAFT.

Dans un second temps, on observe que le  $T_m$  mesuré pour la structure **32**, dans la solution de tampon MOPS en présence de potassium, présente un  $T_m$  de 80 °C, similaire à celui observé par R. Bonnet. Cela conforte alors le fait que l'édifice **32** synthétisé est bien contraint. En présence de sodium, il est possible d'observer un  $\Delta T_m$  de -11 °C, entre la structure synthétisée par R. Bonnet et celle synthétisée lors de cette thèse. Cela est très certainement dû à l'utilisation d'une solution de tampon MOPS, pour rappel connue pour avoir un pH dépendant de la température d'analyse.

#### V.5. Bilan sur la topologie antiparallèle

Nous avons pu confirmer, dans cette partie, que les structures libres « HT21 + T » et « TBA » adoptent bien des topologies antiparallèles en présence de potassium. Bien que les spectres en DC de la structure contrainte soient sujets à interprétations, l'étude des courbes de



dénaturation ainsi que la comparaison avec les spectres obtenus par R. Bonnet, nous permettent de conclure que la structure est bien contrainte dans la topologie souhaitée. Des études par RMN et/ou modélisation seraient intéressantes pour comprendre l'organisation de la structure.

## VI. Conclusion sur l'étude par dichroïsme circulaire

Nous avons pu voir, dans ce chapitre, que les structures de G-quadruplexes sont particulièrement polymorphes, selon la composition des séquences et les conditions d'utilisation. Ainsi, dans ce sens, le dichroïsme circulaire représente une méthode d'analyse particulièrement efficace, permettant de facilement accéder aux topologies des G-quadruplexes dans des conditions données.

Il a ainsi pu être observé que la présence du RAFT ne semble pas perturber la topologie adoptée par chaque G-quadruplexe et qu'une proportion d'acétonitrile, de l'ordre de 10 %, peut être ajoutée sans modifier les topologies. Cela représente un résultat très intéressant dans l'optique d'accroître la proportion en solvant organique afin d'élargir le panel de réactifs disponibles pour les réactions de catalyse.

Concernant les structures contraintes, nous avons pu montrer que la présence du RAFT permet de significativement accroître la stabilité de l'édifice, vis-à-vis des séquences libres. Il a, de plus, pu être observé pour les structures parallèles, une stabilisation par gain entropique, se caractérisant par une cinétique de formation bien plus importante que pour les structures libres. Enfin, la topologie antiparallèle, pour l'édifice **32** a pu être confirmée par comparaison avec les spectres obtenus par R. Bonnet, ainsi que par les valeurs calculées de  $T_m$ , en présence de KCl et NaCl.

En termes de perspectives, l'analyse par RMN ou par modélisation, « docking », des différentes structures contraintes permettrait de confirmer les différentes topologies adoptées mais aussi de comprendre l'organisation de celles-ci. De cette manière, il serait possible de déterminer l'agencement des « flanking » vis-à-vis des G-quadruplexes, et donc de comprendre leur rôle dans le contrôle de l'induction asymétrique en catalyse de sulfoxydation.

---

## Chapitre III : Sulfoxydation asymétrique en présence de G-quadruplexes

---

Le chapitre III est consacré à l'étude des résultats de catalyse obtenus en présence des différentes structures de G-quadruplexes présentées au chapitre II. Ainsi, une première partie de ce chapitre décrit l'adaptation et l'optimisation des conditions décrites par Can Li, pour la sulfoxydation de dérivés du thioanisole. Par la suite, l'incidence du RAFT ainsi que son positionnement, vis-à-vis du G-quadruplexe, sont étudiés. Pour cela, les résultats de catalyse des structures libres, séquences analogues de « HT21 », sont comparés à ceux obtenus en présence des structures « sur gabarit ». Enfin, les différentes structures contraintes, parallèles et antiparallèles, sont engagées dans les réactions de sulfoxydation afin de déterminer l'influence de chaque topologie sur l'induction asymétrique. Il est important de noter que plusieurs paramètres – proportion en G-quadruplexe, solvant organique - sont explorés pour chaque topologie. Pour chacune de ces études, les rendements et excès énantiomériques ont été déterminés par HPLC chirale, *via* l'utilisation de droites d'étalonnage.

Les publications de référence sur la sulfoxydation asymétrique en présence de G-quadruplexes sont décrites et analysées en introduction.

## I. Introduction

En 1998, Sen et ses collaborateurs ont rapporté que des séquences d'ADN simples brins, riches en guanosines, sont susceptibles d'interagir avec l'hémine, cofacteur naturel de la peroxydase. Ces complexes présentent alors, en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), une activité de type peroxydase plus importante que lorsque l'hémine est utilisée seule.<sup>34</sup> Il s'agit ainsi de la première utilisation d'un G4 en catalyse, de surcroît dans une réaction d'oxydation. Bien que les réactions d'oxydation soient les premières réactions de catalyse à être décrites en présence d'un G4, aucune induction asymétrique n'a été observée. Il faut, en effet, attendre 2016 pour que Can Li et ses collaborateurs décrivent la première réaction de sulfoxydation énantiosélective, en présence d'un G4 (Schéma 29).<sup>73a</sup> Il s'agit, à notre connaissance, de l'unique exemple dans la littérature et cette réaction servira de référence tout au long de ce chapitre.

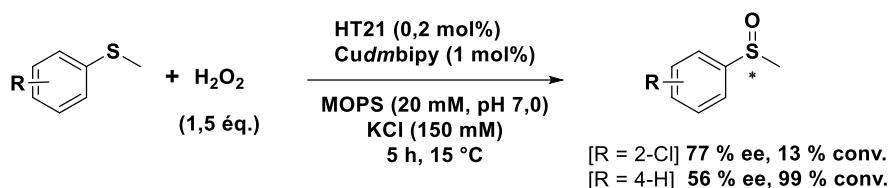


Schéma 29

### I.1. Mise en place de la réaction de sulfoxydation

#### I.1.1. Complexe de cuivre

Lors de ses travaux, Can Li a testé plusieurs complexes non chiraux de cuivre (II), de type phénanthroline ou bipyridine, pour la sulfoxydation asymétrique de dérivés du thioanisole en présence du G-quadruplexe « HT21 ». Les catalyses sont alors faites dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0) dans laquelle du KCl (150 mM) a été ajouté pour stabiliser le G-quadruplexe. Dans ces conditions, Can Li a alors montré que les meilleurs résultats étaient

obtenus en présence du ligand *dmbipy*, après 5 h de réaction à 15 °C (Tableau 7). Notons que le G-quadruplexe ainsi que le complexe de cuivre sont introduits en quantité catalytique, respectivement 0,2 mol% et 1 mol%. Enfin, aucune formation de sulfone (résultante d'une suroxydation) n'est observée par l'auteur.

**Tableau 7** : Récapitulatif des résultats de sulfoxydation du thioanisole obtenus en présence du complexe *Cudmbipy*.

Système catalytique	Conversion (%)	Excès énantiomérique (%)
/ (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> seul)	3	0
« HT21 » seul	3	0
<i>Cudmbipy</i> seul	95	0
« HT21 » - <i>Cudmbipy</i>	99	56

On observe alors que l'induction asymétrique n'est possible qu'en présence du complexe supramoléculaire [« HT21 » – *Cudmbipy*], « HT21 » seul n'ayant pas de propriétés catalytiques. Le complexe de cuivre, quant à lui, a bien une activité catalytique mais n'induit aucune asymétrie lors de la réaction.

#### 1.1.2. Résultats obtenus

Bien que la majeure partie des discussions soient faites sur le thioanisole, thioéther de référence dans la publication, l'auteur a aussi cherché à diversifier le panel de substrats en réalisant les sulfoxydations de thioéthers de type aryle, benzyle ou encore de type pyridine alkyle, par exemple (Figure 66). On observe alors que la présence d'un groupement électroattracteur en position *ortho* semble faciliter l'induction asymétrique. Un ee de 77 % est en effet observé pour le composé **54**, avec néanmoins une conversion de seulement 13 %. Enfin, il est important de noter que seules les conversions sont indiquées par l'auteur, aucun calcul de rendement n'est présenté dans la publication. Pour rappel, la conversion indique la proportion de réactif consommé, tandis que le rendement désigne le rapport entre la quantité de produit obtenue et la quantité maximale qui serait obtenue si la réaction était totale.

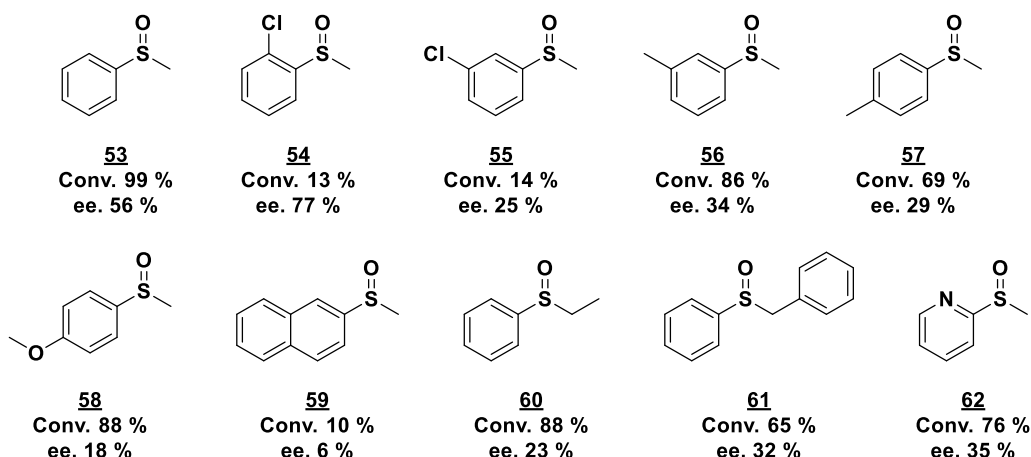


Figure 66 : Résultats de la sulfoxydation asymétrique de dérivés du thioanisole, en présence de "HT21" et de Cudmbipy.

## 1.2. Détermination des zones d'interactions

Afin de comprendre le mécanisme de transfert de chiralité du G-quadruplexe vers le substrat, et donc de déterminer les zones d'interactions effectives, Can Li présente plusieurs études menées sur la composition des boucles ou la nature des séquences d'oligonucléotides.

### 1.2.1. Influence de la nature du G-quadruplexe

#### 1.2.1.1. Topologie et « flanking »

L'auteur étudie, dans un premier temps, l'influence de la topologie majoritairement adoptée par le G-quadruplexe sur l'énantiosélectivité. Pour cela, il fait le choix de travailler avec des séquences proches de celle de « HT21 », mais ayant des topologies bien définies en présence de potassium. Rappelons, en effet, que la séquence « HT21 » est décrite comme particulièrement polymorphe en présence de KCl, de par l'absence de flanking au niveau des tétrades extérieures, stabilisant la structure.<sup>98b,104</sup> De plus, Can Li fait aussi le choix d'étudier une séquence mutée « cgmHT21 » afin de déterminer l'importance de la structure hélicoïdale du G-quadruplexe dans l'induction asymétrique. Dans cette séquence, la guanosine G<sub>14</sub>, impliquée dans la formation de la tétrade centrale de l'édifice, a été remplacée par une thymidine, empêchant alors la formation des liaisons de Hoogsteen. Cela se traduit par une perturbation globale de la structure de l'édifice, et donc une non-structuration du G-quadruplexe.<sup>105</sup> Les différentes topologies adoptées par les séquences analogues de « HT21 », ainsi que les conversions et ee observés lors de la sulfoxydation du thioanisole, sont résumés dans le Tableau 8.

On constate, dans un premier temps, que la structuration hélicoïdale du G-quadruplexe est primordiale dans l'induction asymétrique. En effet, un mélange racémique, ainsi qu'une conversion de seulement 51 %, sont observés en présence de la séquence mutée « cgmHT21 ». Cela témoigne donc de l'importance de conserver l'intégrité de la structure du

<sup>104</sup> Dai, J., Carver, M., Yang, D., *Biochimie* **2008**, *90*, 1172–1183.

<sup>105</sup> Lee, J. Y., Kim, D. S., *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3625–3634.

G-quadruplexe lors de la réaction de sulfoxydation. Ensuite, Can Li observe que les meilleurs résultats, parmi les topologies explorées en présence de KCl, sont obtenus avec la conformation antiparallèle « HT21 + T », avec 93 % de conversion et 35 % ee. Ce résultat peut être surprenant, puisqu'aucune induction asymétrique n'a été observée pour la topology antiparallèle « HT21 », en présence de NaCl (Tableau 8, entrée 2). Il est alors envisageable qu'en présence de NaCl la structure ne soit pas assez stable, expliquant ainsi le mélange racémique observé. La topology parallèle, quant à elle, ne semble pas adaptée à cette réaction, puisqu'aucune induction asymétrique n'est observée lors de la catalyse, en présence du G-quadruplexe d'ARN « rHT21 ».

**Tableau 8 :** Influence de la nature de la séquence d'ODN sur la conversion et l'énantiosélectivité de la réaction de sulfoxydation en présence de potassium.

Entrée	Nom	Séquence (5' → 3')	Topology en présence de KCl (150 mM)	Conversion (%)	e.e (%)
1	HT21	G <sub>3</sub> (TTA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Parallèle, antiparallèle, hybride <sup>86</sup>	99	56
2	HT21 <sup>a</sup>	G <sub>3</sub> (TTA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Antiparallèle	9	< 5
3	cgmHT21 <sup>b</sup>	(G <sub>3</sub> TTA) <sub>2</sub> G <sub>1</sub> TTA G <sub>3</sub>	Séquence instable <sup>105</sup>	51	< 5
4	A + HT21	AG <sub>3</sub> (TTA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Hybride 1 et 2 <sup>Erreur ! Signet non défini.</sup>	74	14
5	TA + HT21	TAG <sub>3</sub> (TTA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Hybride 1 <sup>96</sup>	90	26
6	TA + HT21 + TT	TAG <sub>3</sub> (TTA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> TT	Hybride 2 <sup>65</sup>	59	19
7	HT21 + T	G <sub>3</sub> (TTA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> T	Antiparallèle <sup>65</sup>	93	35
8	HT21 + TT	G <sub>3</sub> (TTA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> TT	Hybride 2, antiparallèle <sup>65</sup>	96	26
9	rHT21 <sup>c</sup>	g <sub>3</sub> (uua g <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Parallèle	70	0

La réaction est faite à 15°C, dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0), en présence de 150 mM de KCl.  
<sup>a</sup> Réaction de sulfoxydation faite en présence de NaCl (150 mM) à la place du KCl ; <sup>b</sup> mutation de la guanosine centrale G<sub>14</sub> en thymidine T<sub>14</sub> ; <sup>c</sup> G-quadruplexe d'ARN, u = uridine.

### 1.2.1.2. Composition des boucles

De la même manière que pour les topologies, Can Li a aussi fait le choix d'étudier plusieurs séquences de G-quadruplexes, de même longueur que la séquence référence « HT21 », mais de composition de boucles différentes (Tableau 9). On constate alors que selon la composition de la boucle, notamment l'ordre des acides nucléiques T et A, des différences notables d'efficacité catalytique et d'énantiosélectivité sont observées. En effet, on constate que lorsque l'on modifie une adénosine par une thymidine, pour le flanking « AAA », on observe soit une augmentation de l'ee, soit une diminution en fonction de la position de la thymine. De même, la modification d'une thymidine par une adénosine, pour la composition « TTT », entraîne des variations de l'ee en fonction de la position de l'adénosine. Les rendements de réactions varient aussi en fonction des modifications et de la position de celle-ci au sein de la boucle.

**Tableau 9** : Influence de la nature de la boucle du G-quadruplexe sur la conversion et l'énantiosélectivité de la réaction en présence de potassium.

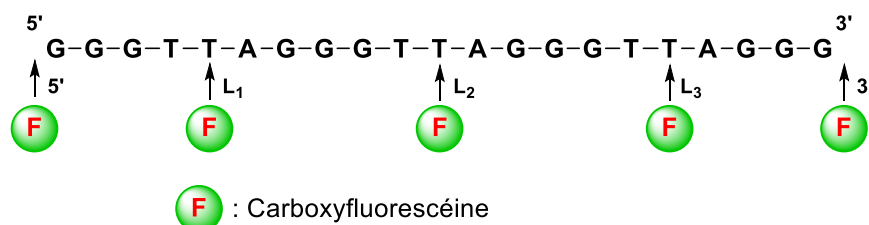
Nom	Séquence (5' → 3')	Conversion (%)	ee (%)
HT21-AAA	G <sub>3</sub> (AAA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	27	23
HT21-TAA	G <sub>3</sub> (TAA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	34	37
HT21-ATA	G <sub>3</sub> (ATA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	50	15
HT21-AAT	G <sub>3</sub> (AAT G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	88	15
HT21-TTT	G <sub>3</sub> (TTT G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	88	39
HT21	G <sub>3</sub> (TTA G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	99	56
HT21-TAT	G <sub>3</sub> (TAT G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	44	10
HT21-ATT	G <sub>3</sub> (ATT G <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	61	29

La réaction est faite à 15°C, dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0), en présence de 150 mM de KCl.

A la vue de ces résultats, l'auteur conclut que les zones d'intérêt pour l'induction asymétrique se situent aux niveaux des tétrades extérieures et/ou des boucles du G-quadruplexe. Il est néanmoins important de préciser que lors de cette étude, les topologies adoptées par les différentes séquences n'ont pas été décrites et ne semblent pas avoir été prises en compte par l'auteur.

### 1.2.2. Détermination des zones d'interactions par fluorescence

Les techniques d'analyses par spectroscopie UV/Vis ou par dichroïsme circulaire n'étant pas assez sensibles pour mettre en évidence une interaction entre le G-quadruplexe et le complexe de cuivre, une étude par fluorescence a été faite par Can Li. Il s'agit, en effet, d'une méthode particulièrement adaptée pour mettre en évidence des interactions faibles entre de petites molécules et des structures d'ADN. De ce fait, les extrémités 5' et 3', ainsi que chacune des boucles de la séquence « HT21 », ont été marquées *via* l'utilisation du fluorophore carboxyfluorescéine (FAM), comme représenté sur la Figure 67.<sup>73b</sup> Les boucles sont indiquées par la notation L<sub>i</sub>, i étant la position de la boucle au sein de la séquence, dans le sens 5' → 3'. La fluorescence étant modifiée par l'approche du complexe de cuivre ou du thioanisole, il est alors possible de déterminer si une interaction a lieu au niveau de l'un de ces 5 sites. En effet, Can Li observe qu'en présence du complexe de cuivre, l'émission par fluorescence se trouve réduite, tandis qu'en présence de thioanisole celle-ci augmente.

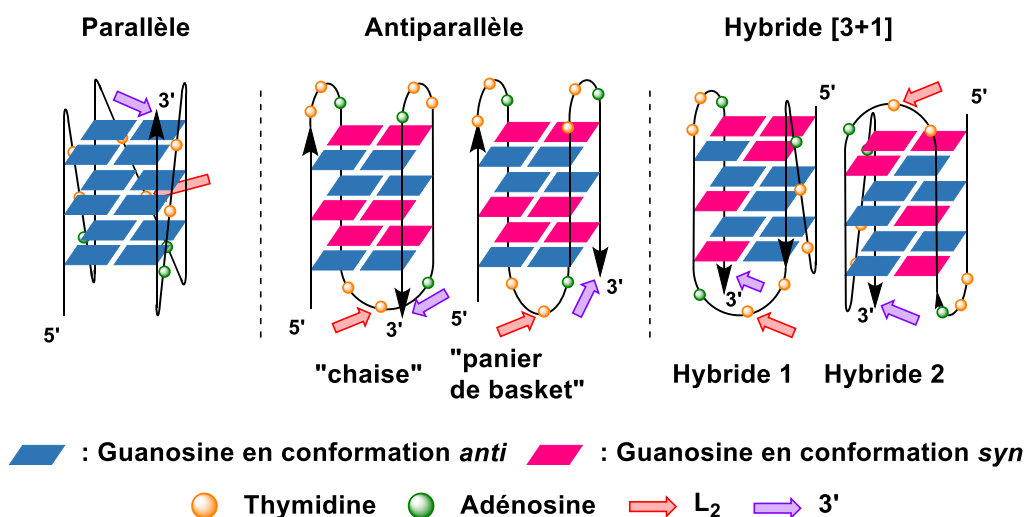


**Figure 67** : Marquage individuel de la séquence "HT21" par le fluorophore FAM au niveau de 5 sites spécifiques.

L'auteur constate, dans un premier temps, que le complexe Cu<sup>II</sup>mbipy n'interagit pas de façon spécifique avec le G-quadruplexe « HT21 ». De plus, les constantes apparentes de dissociation,

de l'ordre de la dizaine de  $\mu\text{M}$ , mesurées par fluorescence, témoignent d'une affinité particulièrement modeste. Ces résultats expliquent alors en partie les excès énantiomériques modérés observés lors des réactions de sulfoxydation, une faible interaction favorisant la catalyse par le complexe de cuivre seul. A titre indicatif, les mêmes observations ont pu être faites par l'équipe de A. Jäschke lors d'une addition de Michael asymétrique en présence de G-quadruplexes.<sup>33b</sup> En effet, l'auteur indique qu'il est nécessaire de lier de façon covalente le complexe  $\text{Cu}dmbipy$  pour observer une induction asymétrique lors de la réaction. Lorsque le complexe est en suspension dans la solution, un mélange racémique est obtenu. Can Li constate, en revanche, qu'en absence de complexe de cuivre, le substrat thioanisole interagit, quant à lui, de manière spécifique au niveau de la tétrade 3' et de la boucle  $L_2$  (Figure 68). De plus, lorsque le complexe  $\text{Cu}dmbipy$  est conjointement ajouté au thioanisole, l'auteur observe, aux niveaux de ces deux sites, une diminution de la fluorescence proportionnelle à la quantité de thioanisole ajoutée, et non une augmentation comme dans le cas d'un ajout du substrat seul. Cela montre alors que le thioanisole et le complexe  $\text{Cu}dmbipy$  interagissent de manière préférentielle au niveau de la face 3' et de la boucle  $L_2$ .

Grâce à ces études par fluorescence, Can Li a ainsi pu mettre en évidence différentes zones d'interactions entre le complexe  $\text{Cu}dmbipy$ , le substrat thioanisole et le G-quadruplexe « HT21 ». Les différentes zones d'intérêt sont représentées sur la Figure 68 ci-dessous, en fonction de la topologie adoptée par le G-quadruplexe :

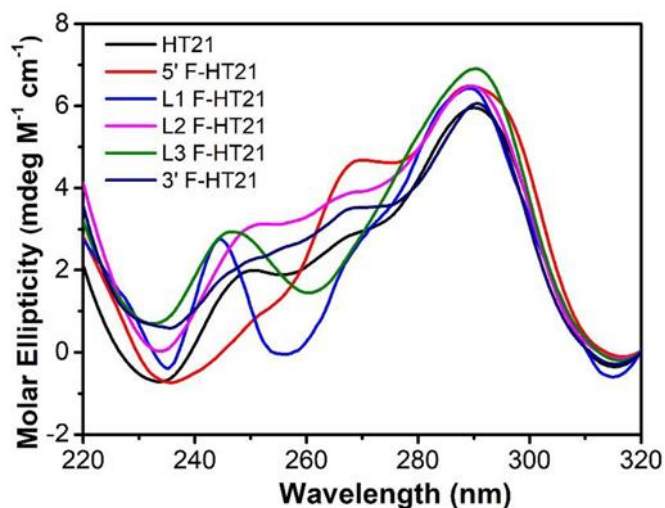


**Figure 68** : Illustration des différentes topologies pouvant être adoptées par le G-quadruplexe "HT21" en présence de potassium. Les positions  $L_2$  et 3', sites actifs potentiels de catalyse du système  $\text{Cu}dmbipy$ /"HT21", sont désignées par des flèches. Figure inspirée de la publication : *ChemBioChem* **2018**, 19, 2233–2240. *Erreur ! Signet non défini.*

A la vue de ces observations, et en comparant les différentes tailles de sillons des structures de G-quadruplexes, l'auteur conclut que les sites actifs induisant l'énantiosélectivité de la réaction se situent au niveau des sillons de taille moyenne (*i.e.* 10,2 Å). Cependant, il est important de conserver un regard critique vis-à-vis de ces résultats et notamment sur l'incidence de la présence du fluorophore FAM sur la topologie adoptée par « HT21 ». En effet,



au vu des spectres de DC présentés en partie expérimentale de la publication, cette affirmation reste discutable (Figure 69). On observe, par exemple, que lorsque le groupement FAM est présent en position 5', le spectre de DC est relativement comparable à celui d'une topologie hybride 1, tandis que lorsqu'il est présent au niveau de la boucle L<sub>1</sub>, une signature caractéristique d'une topologie antiparallèle est observée.



**Figure 69** : Spectres en DC des structures de HT21 modifiées et non-modifiées, obtenus par l'équipe de Can Li, dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0) et de KCl (150 mM) à 20 °C. Les intensités du DC sont normalisées en fonction du dichroïsme circulaire molaire  $\Delta\epsilon = \theta / (32980 \times c \times l)$ , avec  $\theta$  l'ellipticité en milli-degré,  $c$  la concentration en mol/L et  $l$  le chemin optique en cm. Figure extraite de la publication : *ChemBioChem* **2018**, 19, 2233–2240. *Erreur ! Signet non défini.*

### I.3. Bilan sur la publication de Can Li

Can Li a ainsi pu montrer qu'il est possible de réaliser la sulfoxydation asymétrique de dérivés du thioanisole, en présence de G-quadruplexes et de complexe de cuivre di-azotés. La présence du G-quadruplexe, de par sa structure hélicoïdale, est déterminante pour l'induction asymétrique, démontrant alors l'importance de s'assurer de la stabilité de l'édifice lors de la réaction. Les différentes énantiosélectivités observées, selon la topologie ou modifications faites par l'auteur au niveau des tétrades et/ou boucles, attestent de la complexité du mécanisme d'induction asymétrique de cette réaction. Néanmoins, une étude par fluorescence a permis d'identifier plusieurs sites potentiels d'interactions, responsables de l'induction asymétrique. Cette étude semble, en effet, montrer que les sites d'interactions effectifs se localisent aux niveaux de l'extrémité 3' et de la boucle L<sub>2</sub>. Enfin, dans le but d'optimiser les conditions de réaction, plusieurs paramètres ont été explorés par l'auteur, les conditions optimales étant résumées dans le Tableau 10. Notons que la présence d'acétonitrile est primordiale pour solubiliser les dérivés du thioanisole.

**Tableau 10** : Conditions optimales et protocole d'extraction, pour la réaction de sulfoxydation du thioanisole.

Paramètre	Condition
Concentration en substrat	5 mM
Proportion acétonitrile	1 %
Cudmbipy	50 $\mu$ M (50 nmol, 1 mol%)
« HT21 »	10 $\mu$ M (10 nmol, 0,2 mol%)
Solution tampon	MOPS (20 mM, pH 7,0, 1 mL), KCl (150 mM)
Température(°C) / temps de réaction (h)	15 °C / 15 h
<b>Condition d'extraction et analyse</b>	Extraction : 3 x 1 mL (éther diéthylique) Concentration sous vide, analyse HPLC chirale

Cependant, devant ces résultats, quelques points restent encore hypothétiques et discutables. En effet, nous avons pu voir que l'auteur fait le choix de ne présenter que des résultats de conversion, sans déterminer les rendements réels en sulfoxyde. De plus, bien que l'étude par fluorescence ait fourni de nombreuses informations essentielles quant à la compréhension des sites d'interactions effectifs lors de la catalyse asymétrique, il est néanmoins nécessaire de nuancer les conclusions tirées. En effet, de la même manière que pour l'étude de l'influence de la composition des boucles, l'auteur ne semble pas avoir pris en compte les topologies adoptées par les G-quadruplexes. Or, de nombreuses études montrent que celles-ci jouent un rôle primordial dans le contrôle de l'énantiosélectivité de la catalyse.<sup>28,31,106</sup> Ces différentes observations nous poussent donc à étudier l'influence de la topologie sur l'efficacité et l'énantiosélectivité de cette réaction.

## II. Adaptation des travaux de Can Li

Dans un premier temps, nous avons souhaité reproduire les travaux de la publication afin de nous assurer de la bonne maîtrise des différentes étapes et traitements lors de la réaction de sulfoxydation. Plusieurs paramètres ont été explorés, en plus de ceux présentés par l'auteur, afin d'adapter les conditions de réactions aux conditions usuelles du laboratoire. Les excès énantiomériques ont été déterminés par HPLC chirale selon l'ordre d'élution des énantiomères. De ce fait lors d'une réaction de catalyse, si un ee positif (resp. négatif) est observé cela signifie que le premier énantiomère par ordre d'élution (resp. second) est favorisé. Notons que nous avons fait le choix de mettre en place des droites d'étalonnage pour les produits d'oxydation, afin de pouvoir calculer de façon reproductible les rendements des réactions, notion qui nous paraît plus pertinente que la conversion des substrats, pour évaluer l'efficacité de la réaction.

<sup>106</sup> Yum, J. H., Park, S., Sugiyama, H., *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 9547-9561.

## II.1. Reproduction des travaux de la publication

## II.1.1. Sulfoxydation du thioanisole

Dans un premier temps, il a été choisi de travailler sur la sulfoxydation du thioanisole, thioéther de référence utilisée par Can Li. La réaction a été faite dans les mêmes conditions optimales présentées par l'auteur (Tableau 10) et les résultats obtenus, après 5 h de réaction à 15 °C, sont résumés et comparés dans le Tableau 11 ci-dessous :

**Tableau 11** : Comparaison des résultats obtenus lors de la sulfoxydation du thioanisole dans les conditions optimales déterminées par Can Li.

Entrée	Système catalytique	Conversion (%)	Rendement (%)	ee (%)
Référence <sup>73a</sup>	/	3	?	0
	« HT21 »	3	?	0
	Cudmbipy	95	?	0
	« HT21 » + Cudmbipy	99	?	56
Essais	/	34	7	0
	« HT21 » + Cudmbipy	84	66	19
	Thioanisole incubé seul <sup>a</sup>	23	/	/

La sulfoxydation du thioanisole (5 mM) est réalisée en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7,5 mM), de « HT21 » (10 μM, 0,2 mol%) et de Cudmbipy (50 μM, 1 mol%), dans une solution de tampon de MOPS (20 mM, pH 7,0, 1 mL), en présence de KCl (150 mM), à 15 °C pendant 5 h. <sup>a</sup> Seul le substrat thioanisole est introduit dans la solution de tampon. Aucun catalyseur ni agent oxydant n'est ajouté.

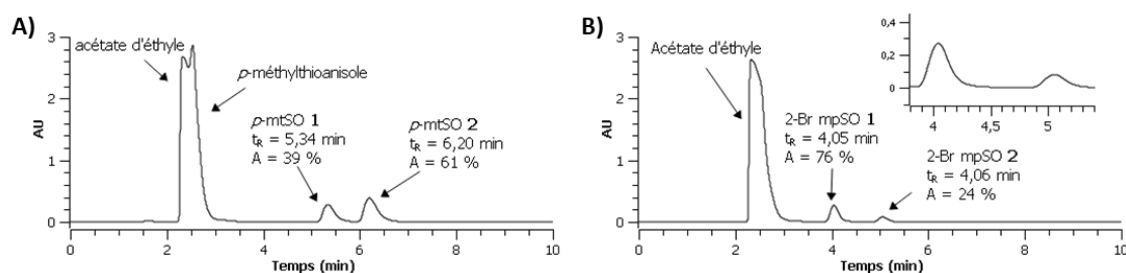
On constate un écart significatif entre les conversions observées pour le thioanisole et les rendements en sulfoxyde. Cela semble provenir d'une perte en thioanisole qui ne serait pas transformé en sulfoxyde. Comme aucun produit de suroxydation n'est observé lors de ces essais, nous avons émis l'hypothèse qu'une partie du thioanisole s'était évaporé lors de la réaction de sulfoxydation. Cette hypothèse est confortée par le fait qu'une conversion de 34 % soit observée pour la réaction de contrôle, tandis que l'auteur présente seulement 3 % de conversion. Afin de pouvoir vérifier cette hypothèse, le thioanisole est incubé seul, *i.e.* sans présence de catalyseur ni d'agent oxydant, et on observe alors une évaporation de l'ordre de 23 %, au bout de 5 h. Enfin, seul un excès énantiomérique de 19 % est observé en présence du G-quadruplexe « HT21 » et du complexe Cudmbipy, tandis que la publication présente un excès de 56 %.

## II.1.2. Changements de références et des conditions de réaction

Ces différentes observations sur l'évaporation du thioanisole, ainsi que l'impossibilité de reproduire les excès énantiomériques présentés dans la publication de référence, nous incitent alors à travailler avec d'autres dérivés du thioanisole. Nous avons ainsi fait le choix de travailler avec le 2-bromothioanisole et le *p*-méthylthioanisole, moins volatiles que le thioanisole.

De plus, face au manque de reproductibilité des résultats obtenus avec le thioanisole, il a été décidé de s'affranchir de l'étape de concentration sous vide, après extraction des produits

d'oxydation (*cf.* condition d'extraction et analyse, Tableau 10). En effet, cette étape a été considérée comme contraignante et non reproductible : il est difficile de reproduire exactement les mêmes conditions d'évaporation d'une réaction à une autre. Ainsi, il a été choisi de réaliser la réaction dans un volume de 100  $\mu$ L, plutôt que de 1 mL. Les conditions de réactions déterminées par Can Li sont conservées, mais toutes les quantités de réactifs sont ainsi divisées par un facteur 10. Les produits d'oxydation et les éventuels substrats résiduels sont alors extraits *via* l'utilisation d'acétate d'éthyle, qui présente l'avantage d'être moins volatile que l'éther diéthylique. Il est ainsi possible d'analyser le mélange par HPLC chirale directement après extraction, sans concentration par évaporation (Figure 70).



**Figure 70** : Chromatogramme RP-HPLC chirale (230 nm) de la réaction de sulfoxydation du *p*-méthylthioanisole (A) et du 2-bromothioanisole (B), en présence de « HT21 » et de *Cudmbipy*.

Les quantités extraites sont suffisantes pour pouvoir être analysées sans ambiguïté par HPLC chirale (Figure 70). La quantité de produit d'oxydation a été obtenue par l'utilisation préalable d'une droite d'étalonnage et comparée par rapport au substrat introduit au préalable afin d'estimer le rendement.

Les résultats obtenus dans ces nouvelles conditions sont présentés et comparés aux résultats de Can Li, dans le Tableau 12 ci-dessous :

**Tableau 12** : Comparaison des résultats obtenus, pour les réactions de sulfoxydation du 2-bromothioanisole et du *p*-méthylthioanisole, dans les conditions "100  $\mu$ L" et dans les conditions de la publication de référence.

	Système catalytique	Expérimentales (100 $\mu$ L)		Littérature (1 mL)	
		Rendement (%)	ee (%)	Conversion (%)	ee (%)
<i>p</i> -méthylthioanisole	/	3 ( $\pm$ 1)	0 ( $\pm$ 0)	<i>N.R</i> <sup>a</sup>	<i>N.R</i> <sup>a</sup>
	Cudmbipy	41 ( $\pm$ 2)	0 ( $\pm$ 0)	<i>N.R</i> <sup>a</sup>	<i>N.R</i> <sup>a</sup>
	« HT21 » + Cudmbipy	45	22	69	26
2-bromothioanisole	/	0	0	<i>N.R</i> <sup>a</sup>	<i>N.R</i> <sup>a</sup>
	Cudmbipy	6 ( $\pm$ 1)	0 ( $\pm$ 0)	<i>N.R</i> <sup>a</sup>	<i>N.R</i> <sup>a</sup>
	« HT21 » + Cudmbipy	10 ( $\pm$ 2)	-45 ( $\pm$ 6)	13 <sup>b</sup>	-77 <sup>b</sup>

Les excès énantiomériques sont calculés selon l'ordre d'élution en HPLC chirale, selon le calcul  $ee = \frac{e_2 - e_1}{e_1 + e_2}$ .

<sup>a</sup> *N.R* = non renseigné ; <sup>b</sup> Résultat pour le 2-chlorothioanisole.

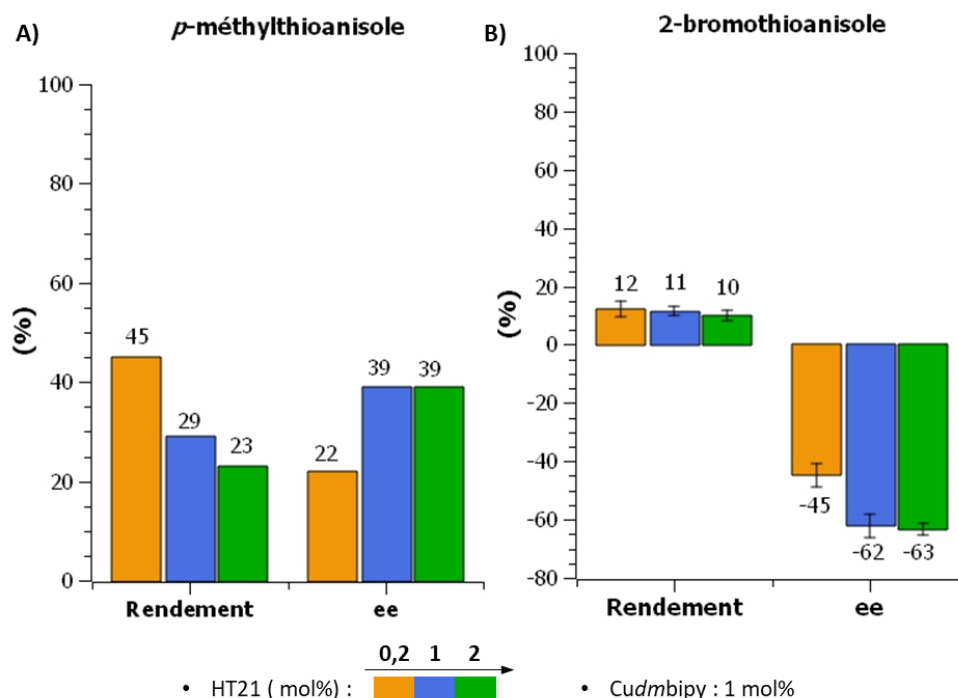
Même si plusieurs données ne sont pas renseignées par l'auteur, on observe tout de même que les rendements et les excès énantiomériques obtenus sont similaires à ceux de la littérature. On constate, néanmoins, une induction asymétrique moins importante pour le composé 2-bromothioanisole par rapport au substrat 2-chlorothioanisole. Il est tout à fait envisageable que cela soit dû à un effet moins électroattracteur de l'atome de brome par rapport à l'atome de chlore. De ce fait, l'atome de soufre étant plus désactivé pour le composé 2-chlorothioanisole, il est possible que la réaction de sulfoxydation soit plus lente, favorisant alors l'induction asymétrique. Néanmoins, les résultats obtenus dans les conditions « 100  $\mu$ L » nous confortent dans l'idée de continuer avec ces nouvelles conditions.

## II.2. Variation de la proportion en G-quadruplexe

Lors de ses recherches, Can Li a cherché à optimiser la proportion de complexe de cuivre par rapport à la quantité de G-quadruplexe. Pour cela, la quantité de « HT21 » a été fixée à 0,2 mol% et les résultats obtenus par Can Li montrent qu'une proportion de 1 mol% en Cudmbipy est le meilleur compromis entre efficacité catalytique et énantiosélectivité. Pour rappel, le complexe de cuivre seul n'induit aucune asymétrie. Cependant, lors de cette étude, seul un excès du complexe Cudmbipy par rapport à « HT21 » a été exploré.

Grâce aux nouvelles conditions nous pouvons envisager d'explorer cette fois-ci un excès de G-quadruplexe par rapport au complexe de cuivre, tout en consommant des quantités de matière « raisonnables ». L'objectif étant de déplacer l'équilibre vers la formation du complexe supramoléculaire [« HT21 » - Cudmbipy], afin de potentiellement favoriser la catalyse asymétrique. Il a alors été choisi de conserver la proportion en Cudmbipy à 1 mol%

(5 nmol, 50  $\mu$ M) et de faire varier la quantité du G-quadruplexe « HT21 » de 0,2 mol% à 2 mol% (1 – 10 nmol, 10 – 100  $\mu$ M). Les résultats alors obtenus sont présentés sur la Figure 71.



**Figure 71** : Modulation de la proportion en « HT21 » pour la sulfoxydation asymétrique A) du *p*-méthylthioanisole et B) du 2-bromothioanisole, en condition « 100  $\mu$ L ». N.B. : 1) la proportion en Cudmbipy est fixée à 1 mol% ; 2) l'ee est mesuré en HPLC chirale.

On observe, pour les deux substrats, que plus la proportion de G-quadruplexe est grande, vis-à-vis du complexe Cudmbipy, plus les excès énantiomériques sont importants, mais au détriment des rendements de sulfoxydation. Il est alors envisageable que la catalyse asymétrique, par le complexe supramoléculaire, ait une cinétique plus lente que la catalyse par le complexe de cuivre seul. Cela est aussi très certainement dû à la non spécificité du complexe Cudmbipy vis-à-vis de « HT21 », limitant alors la cinétique, puisque seulement deux sites semblent effectifs.<sup>73b</sup> A la vue de ces résultats, il a été choisi de fixer les proportions de G-quadruplexe et de Cudmbipy à 1 mol%, comme les proportions optimales pour l'induction asymétrique.

Il est intéressant d'observer que, contrairement à Can Li, nous travaillons alors en présence d'un ratio G-quadruplexe : Cudmbipy de 1 : 1, et non de 1 : 5. En effet, bien que le ratio 1 : 1 n'ait pas été retenu par l'auteur, car de faible rendement et excès énantiomérique avaient été observés, celui-ci n'a été étudié que dans des proportions de 0,2 mol%. Il est alors tout à fait envisageable que la proportion en catalyseur n'ait pas été suffisante pour assurer la catalyse et donc l'induction asymétrique.

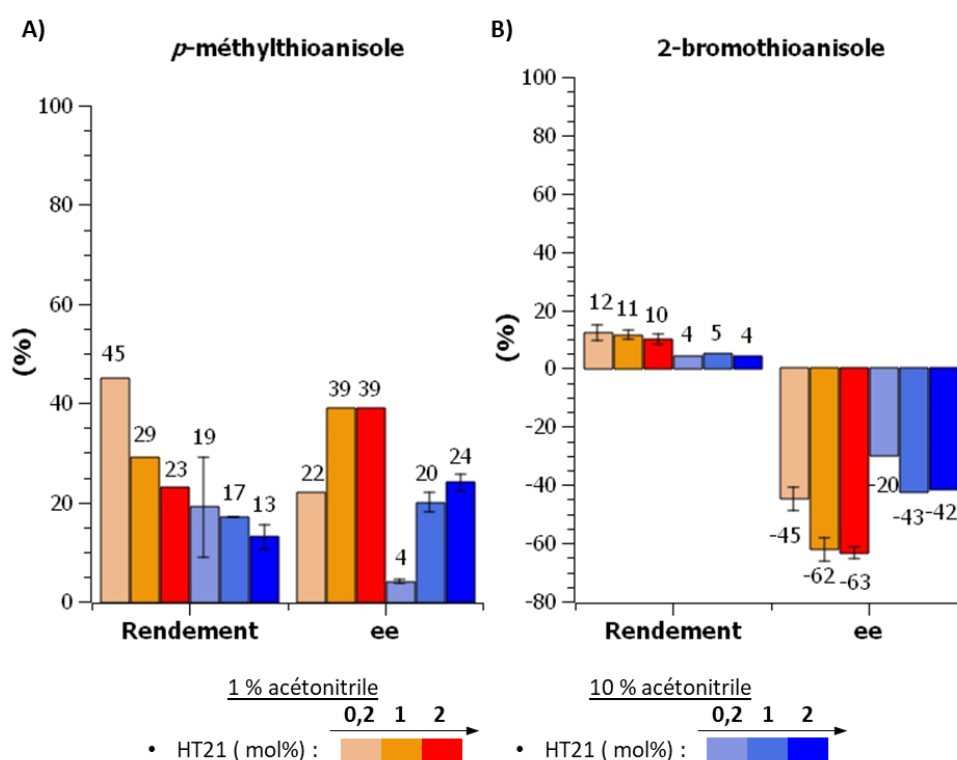
### II.3. Variation de la proportion en solvant organique

Dans l'optique d'élargir au maximum le panel de substrats potentiels pour la réaction de sulfoxydation, nous avons essayé d'augmenter la proportion de solvant organique afin d'avoir

une meilleure solubilisation des substrats et produits. Dans un premier temps, seule la proportion en acétonitrile est augmentée, puis différents solvants organiques sont testés.

### II.3.1. En présence de 10 % d'acétonitrile

Il a pu être observé, comme décrit dans le chapitre II, que l'ajout d'acétonitrile, après conditionnement des G-quadruplexes, n'a pas d'incidence sur la topologie majoritairement adoptée. Il a ainsi été décidé de réaliser des premiers essais de sulfoxydation en présence de 10 % d'acétonitrile, *i.e.* avec une proportion dix fois plus importante que dans les conditions usuelles. Dans le cas où la proportion en acétonitrile ait une influence sur l'induction asymétrique, toutes les proportions en « HT21 », préalablement testées en présence de 1 % d'acétonitrile, ont été étudiées. La proportion en *Cudmbipy* est quant à elle toujours fixée à 1 mol%. Les résultats sont représentés sur la Figure 72.



**Figure 72 :** Sulfoxydation asymétrique A) du *p*-méthylthioanisole et B) du 2-bromothioanisole, en présence de 1 % et 10 % d'acétonitrile. N.B. : 1) la proportion en *Cudmbipy* est fixée à 1 mol% ; 2) l'*ee* est calculé en fonction de l'ordre d'éluion des produits en HPLC chirale.

On constate alors qu'en présence de 10 % d'acétonitrile, les rendements ainsi que les excès énantiomériques sont moins importants que ceux observés en présence de 1 % d'acétonitrile. Il est alors envisageable que cela soit dû à des problèmes de solubilité du complexe de cuivre dans le solvant organique. Les quantités de réactifs impliquées étant minimales, aucune précipitation n'est observée lors de la catalyse. Cependant, nous pouvons constater, dans le Tableau 13, que les rendements observés en présence de *Cudmbipy*, et en absence de « HT21 », ne semblent pas être influencés par la proportion en acétonitrile.

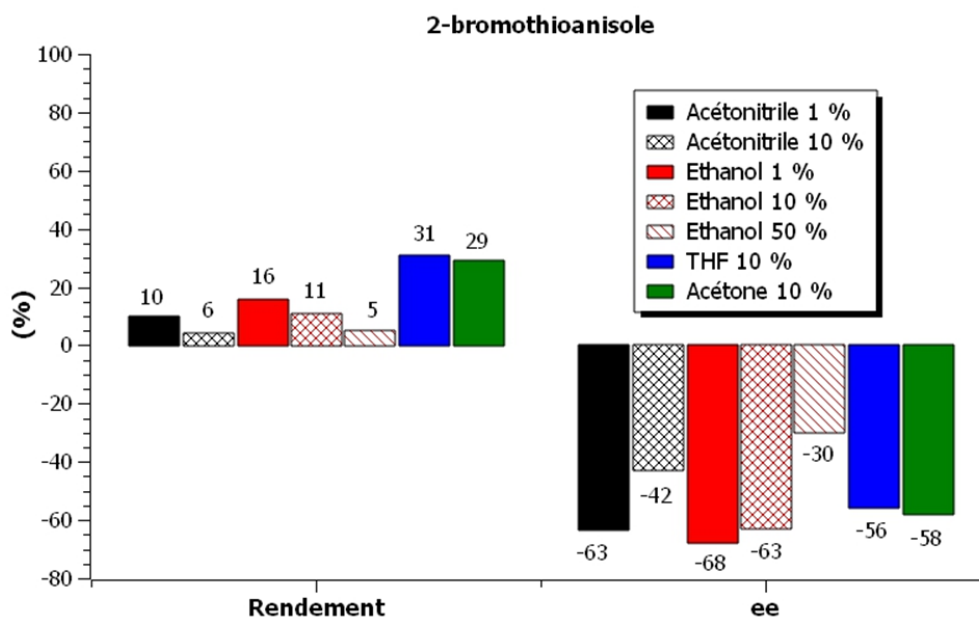
**Tableau 13** : Comparaison des rendements observés, pour les substrats *p*-méthylthioanisole et 2-bromothioanisole, en présence de 1 % et 10 % d'acétonitrile et de 1 mol% de Cudmbipy.

Proportion acétonitrile	<i>p</i> -méthyl-thioanisole		2-bromothioanisole	
	1 %	10 %	1 %	10 %
Cudmbipy seul	43 % (± 2)	40 % (± 3)	6 % (± 1)	5 % (± 1)

Nous faisons alors l'hypothèse que la proportion en solvant organique joue un rôle prépondérant dans les interactions entre le substrat et le G-quadruplexe. Il est, en effet, important de rappeler que les dérivés du thioanisole sont des composés organiques, peu soluble en phase aqueuse. De ce fait, plus la proportion de solvant organique est importante, plus les interactions avec l'ensemble catalytique risquent d'être limitées.

### II.3.2. Variation de la nature du solvant organique

Au vu des résultats obtenus en présence de 10 % d'acétonitrile et de l'hypothèse faite sur une probable compétition de lipophilie entre le solvant organique et la/les zone(s) d'interaction(s) des G-quadruplexes, il a été choisi de faire varier la nature des solvants organiques. Rappelons que la présence de ces solvants est essentielle à la solubilisation des substrats. Plusieurs solvants polaires, protiques ou aprotiques, miscibles en phase aqueuse ont ainsi été étudiés. Afin de limiter le nombre d'essai, seul le substrat 2-bromothioanisole ainsi que la proportion à 2 mol% en G-quadruplexe, ont été testés. Les résultats sont présentés sur la Figure 73.

**Figure 73** : Influence de la nature du solvant organique sur la sulfoxydation du 2-bromothioanisole, en présence de « HT21 » et de Cudmbipy.

Dans un premier temps, on constate qu'en présence de solvant comme le THF (tétrahydrofurane) et l'acétone, avec une proportion de 10 %, les rendements en sulfoxyde sont cinq fois plus importants qu'en présence d'acétonitrile, dans les mêmes conditions. De plus, on observe un gain conséquent d'énantiosélectivité par rapport à celui affiché en présence de 10 % d'acétonitrile. De la même manière, il est intéressant d'observer que l'on



obtient de très bons résultats en présence d'éthanol avec, respectivement, des rendements de 16 % et 11 %, en présence de 10 % et 1 % d'éthanol. Les excès énantiomériques restent sensiblement les mêmes avec, respectivement, 63 % et 68 %. En revanche, lorsque la réaction de sulfoxydation est faite en présence de 50 % d'éthanol, une diminution importante est observée, à la fois pour l'efficacité catalytique que pour l'induction asymétrique.

On constate alors que les meilleurs résultats ont été obtenus avec les solvants les moins polaires, de la gamme explorée (Tableau 14). Cependant, ces observations ayant été faites en fin de thèse, seule la structure « HT21 » a pu être testée. **Des études complémentaires sont encore nécessaires pour comprendre tous les phénomènes mis en jeux.**

**Tableau 14** : Comparaison des mesures de solubilité différentielle  $\log P$  ainsi que des constantes diélectriques  $\epsilon$  des différents solvants testés

Solvant	Eau	Acétonitrile	EtOH	Acétone	THF
Log P	-1,38	-0,34	-0,30	-0,23	0,46
$\epsilon$	80,1	37,5	24,5	20,7	7,58

#### II.4. Bilan sur la reproduction des travaux de Can Li

Dans l'objectif de reproduire les conditions de Can Li, plusieurs paramètres ont été identifiés comme limitants la reproductibilité des résultats de sulfoxydation. Afin de pouvoir adapter les réactions de catalyse aux conditions usuelles du laboratoire, nous avons choisi de faire les modifications suivantes au sein du protocole :

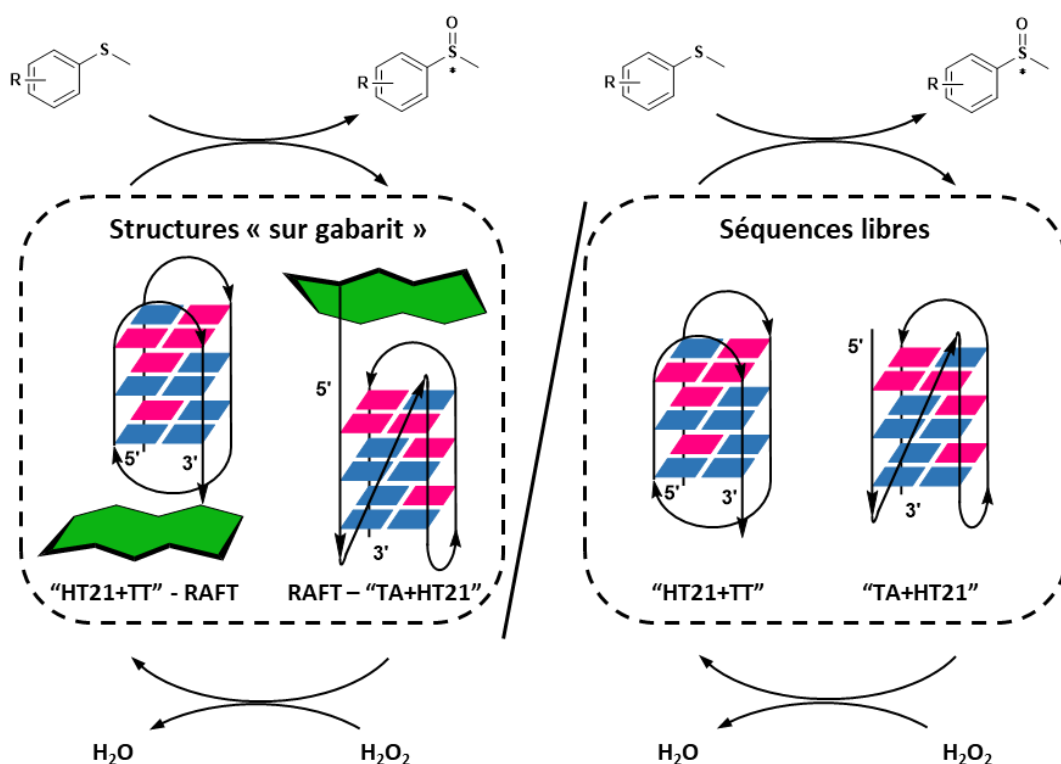
- Le thioanisole, substrat de référence de la publication, est remplacé par le *p*-méthylthioanisole et le 2-bromothioanisole, moins volatiles.
- Afin de s'affranchir de l'étape de concentration sous vide (cf. Tableau 10), les réactions de sulfoxydation sont faites dans un volume de 100  $\mu\text{L}$  au lieu de 1 mL. Les extractions des produits de sulfoxydation, et résidus de substrat, sont alors faites *via* l'utilisation d'acétate d'éthyle, directement injecté en HPLC chirale.

De plus, l'utilisation de ces nouvelles conditions « 100  $\mu\text{L}$  » nous a permis d'explorer des proportions en G-quadruplexe plus adaptées, avec notamment un excès de celui-ci par rapport au complexe de cuivre. Cela n'a pas été étudié par Can Li, certainement dû aux quantités nécessaires de G-quadruplexe, pour les conditions « 1 mL ». Ainsi, un nouveau ratio optimal 1 :1, avec respectivement, une proportion de 1 mol% en G-quadruplexe et en *Cudmbipy*, a ainsi pu être défini, permettant alors une plus grande énantiosélectivité de la réaction. Enfin, une étude préliminaire, sur la nature et la proportion du solvant organique, semble montrer l'importance de la lipophilie dans le contrôle de l'énantiosélectivité de la réaction. Nous avons alors fait l'hypothèse qu'il existe une compétition hydrophobe, entre le solvant et le G-quadruplexe, vis-à-vis de l'interaction avec le substrat. Cependant, il s'agit encore de résultats préliminaires et des études complémentaires doivent être menées pour comprendre tous les phénomènes mis en jeux.

### III. Influence de la présence du châssis peptidique

Avant d'analyser les réactions de sulfoxydation asymétrique en présence des structures contraintes, il est nécessaire de déterminer si la présence du châssis peptidique est susceptible d'avoir une incidence sur l'induction asymétrique. Rappelons qu'il a pu être observé par dichroïsme circulaire, comme décrit au chapitre II, que celui-ci n'avait aucune incidence sur la topologie majoritairement adoptée par le G-quadruplexe.

Des premiers essais de catalyse en présence du RAFT sont présentés en début de partie. Dans un second temps, après un bref rappel des zones d'interaction potentielles au niveau du G-quadruplexe, les résultats de sulfoxydation, en présence des structures « sur gabarit » et des structures libres, sont comparés et commentés (Figure 74). De ce fait, l'influence de la présence ainsi que de la localisation du RAFT sur l'asymétrie de la réaction peut être déterminée.



**Figure 74** : Comparaison des catalyses de sulfoxydation asymétrique, en présence des structures « sur gabarit » (à gauche) ou des séquences « libres » (à droite).

#### III.1. Incidence du RAFT seul

Dans un premier temps, il est important de déterminer si le RAFT, macromolécule chirale, est susceptible d'induire une asymétrie lors de la réaction de sulfoxydation. Ainsi des premiers essais avec le RAFT **5** (cf. Chapitre I, partie II.1), en présence et absence de *Cudmbipy*, ont été réalisés dans les conditions de réaction présentées précédemment. Pour rappel, le RAFT **5** correspond au RAFT utilisé, avant déprotection de la fonction oxyamine, pour la synthèse des structures « sur gabarit ». Les résultats obtenus, pour les deux substrats de référence, sont présentés dans le Tableau 15. Afin de se placer dans les meilleures conditions déterminées

précédemment, le RAFT et le G-quadruplexe « HT21 » sont introduits avec des proportions respectives de 1 mol%.

**Tableau 15** : Présentation des résultats de catalyse en présence du RAFT, avec ou sans Cudmbipy, pour les substrats *p*-méthylthioanisole et 2-bromothioanisole, dans les conditions usuelles de sulfoxydation.

	<i>p</i> -méthylthioanisole		2-bromothioanisole	
	Rendement (%)	ee (%)	Rendement (%)	ee (%)
<b>Blanc</b>	3 (± 2)	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
<b>RAFT <u>5</u> seul</b>	4 (± 0)	0 (± 0)	n.d <sup>a</sup>	n.d <sup>a</sup>
<b>RAFT <u>5</u> + Cudmbipy</b>	47 (± 7)	0 (± 0)	3 (± 0)	0 (± 0)
<b>Cudmbipy</b>	43 (± 1)	0 (± 0)	6 (± 2)	0 (± 0)

<sup>a</sup>n.d = non déterminé. N.B : les réactions de sulfoxydation ont été faites en triplicate et les incertitudes calculées selon la méthode de l'erreur standard.

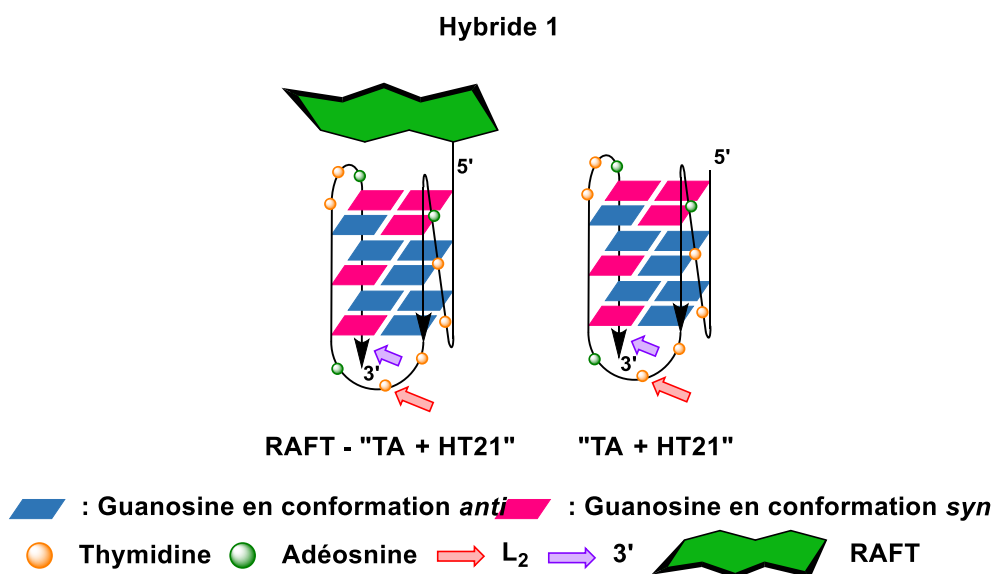
On constate alors que la présence du RAFT, en absence de G-quadruplexe, n'induit aucune asymétrie lors de la sulfoxydation des substrats de référence et ne perturbe pas l'efficacité catalytique de la réaction.

### III.2. Incidence du RAFT en présence de G-quadruplexe

Nous souhaitons maintenant déterminer si le châssis peptidique, en présence de G-quadruplexe, est susceptible d'avoir une influence sur la catalyse. Afin de se placer au plus proche du modèle des structures contraintes, nous avons choisi d'ancrer directement le RAFT à une des extrémités, 5' ou 3', du G-quadruplexe. Pour rappel, la face 3' et la boucle L<sub>2</sub>, ont été identifiées par Can Li comme les positions d'interactions préférentielles du substrat thioanisole. Ainsi, selon la position d'ancrage, le RAFT est soit proche, soit loin des zones d'interactions. Nous faisons, bien entendu, l'hypothèse que les deux substrats d'étude, le *p*-méthylthioanisole et le 2-bromothioanisole, adoptent le même comportement que le thioanisole vis-à-vis de la réactivité avec le G-quadruplexe.

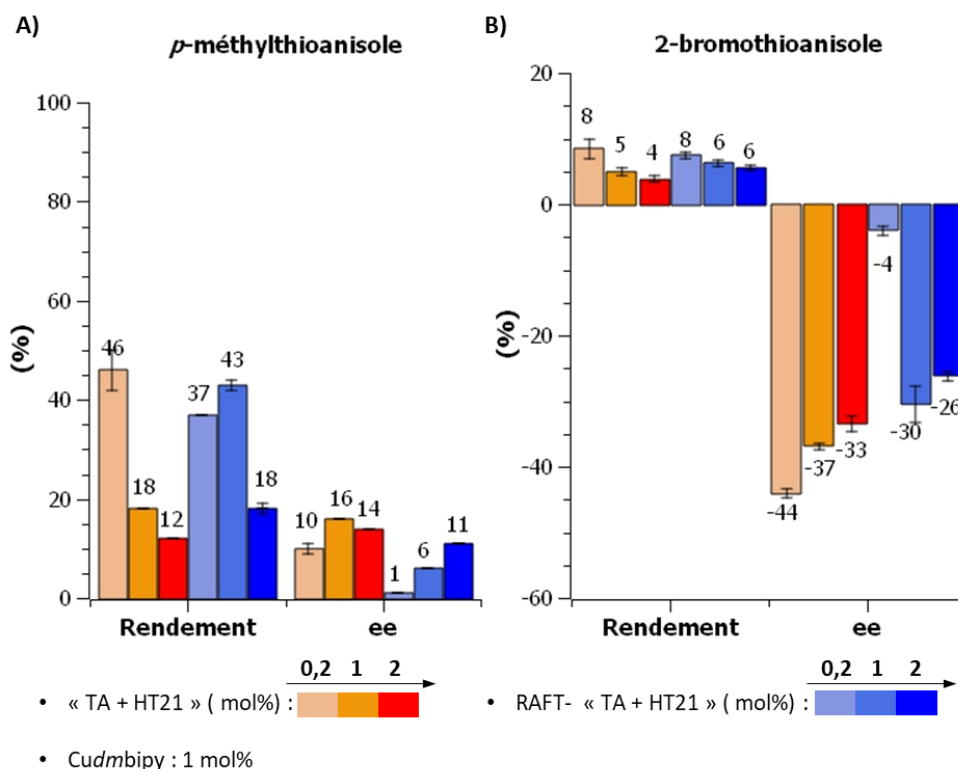
#### III.2.1. Incidence du RAFT lorsque positionné loin des zones d'interactions

Dans un premier temps, nous souhaitons déterminer l'influence potentielle de la présence du RAFT lorsque celui-ci se situe loin de la face 3' et de la boucle L<sub>2</sub>. Pour cela, nous travaillons avec la séquence libre « TA + HT21 » et la structure « sur gabarit » RAFT - « TA + HT21 ». Comme représenté sur la Figure 75, une topologie hybride 1 est adoptée pour ces deux séquences. De plus, le RAFT étant ancré à l'extrémité 5', celui-ci se situe à l'opposé des zones d'intérêts identifiées par Can Li. Les réactions de sulfoxydation sont alors faites dans les conditions usuelles, en présences des deux édifices. De la même manière que pour la séquence « HT21 », nous faisons le choix de faire varier la proportion en G-quadruplexe, tout en conservant 1 mol% pour le complexe de cuivre.



**Figure 75** : Zones d'interactions identifiées pour la topologies hybride 1. Les flèches représentent les zones d'interactions, au niveau de la boucle L<sub>2</sub> et de la tétrade 3'.

En absence de RAFT, on observe une diminution des rendements lorsque la proportion en G-quadruplexe augmente (Figure 76). Cela semble donc aller dans le sens d'une cinétique de réaction plus lente, en présence de l'entité supramoléculaire [G-quadruplexe - Cudmbipy]. La même observation a pu être faite, en partie II.2, lors des réactions avec la séquence « HT21 ». En revanche, tandis que pour le *p*-méthylthioanisole (Figure 76A) on constate un excès énantiomérique constant en fonction de la concentration croissante de G-quadruplexe, une diminution de l'énantiosélectivité est observée pour le 2-bromothioanisole (Figure 76B). A la vue de cette première observation, il est alors envisageable que les deux substrats d'étude présentent des sites d'interactions et/ou des affinités différentes avec la séquence « TA + HT21 ». Notons aussi que des rendements et des excès énantiomériques moins importants sont obtenus, par rapport à la séquence « HT21 ». En effet, pour rappel, des excès énantiomériques respectifs de 39 % et de -62 % avaient été observés pour les substrats *p*-méthylthioanisole et 2-bromothioanisole, en présence de 1 mol% de G-quadruplexe et de Cudmbipy. La même observation est faite par Can Li lors de ses recherches (Tableau 8, page 102).



**Figure 76** : Comparaison des résultats de catalyse en fonction de la proportion en G-quadruplexe, pour les substrats A) *p*-méthylthioanisole et B) 2-bromothioanisole, en présence des structures "TA +HT21" et de RAFT - "TA + HT21". N.B. : la proportion en Cudmbipy est fixée à 1 mol%.

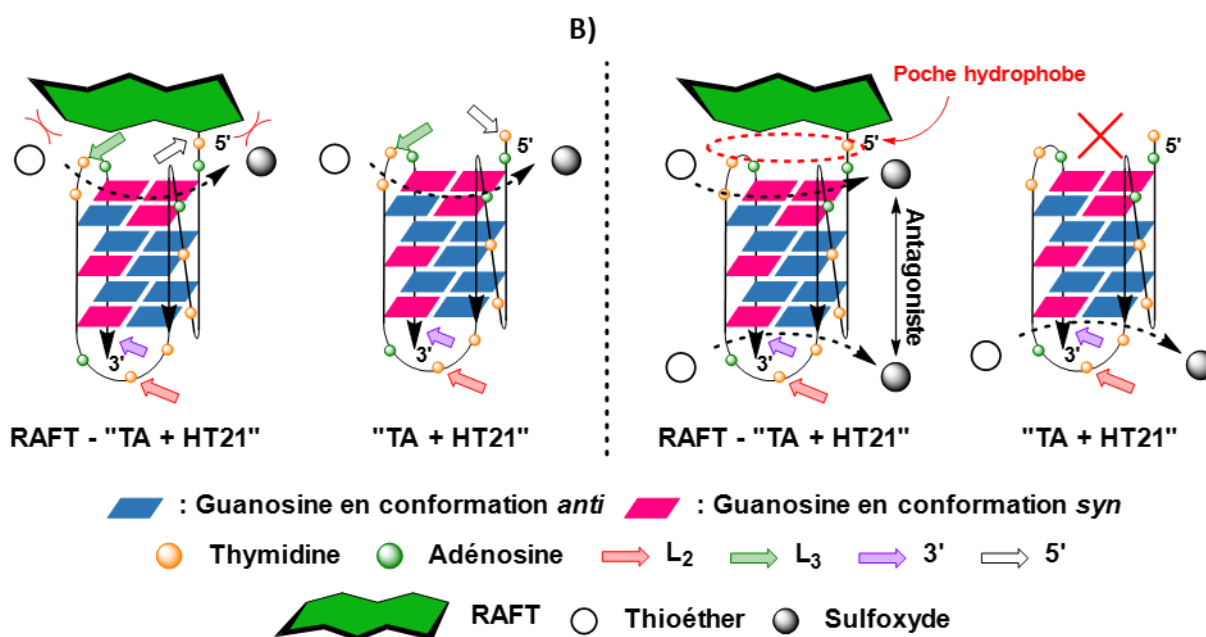
Concernant la présence du RAFT en position 5', on constate tout d'abord que les comportements, vis-à-vis de la catalyse asymétrique sans RAFT, sont conservés pour les deux substrats, mais à un degré moindre. Des inductions asymétriques moins importantes sont observées, montrant alors que la présence du RAFT semble, en effet, avoir une incidence négative vis-à-vis de l'induction asymétrique. La différence d'énantiosélectivité la plus importante étant observée, pour le 2-bromothioanisole, en présence de 0,2 mol% de G-quadruplexe, avec un faible excès énantiomérique de -4 % en présence du gabarit tandis qu'un excès de -44 % est obtenu en absence du RAFT (Figure 76B). Ce résultat est plutôt inattendu, puisque la position d'ancrage du RAFT est supposée être à l'opposé des sites d'intérêts.

Sachant que nous avons pu confirmer, par dichroïsme circulaire, que la présence du RAFT n'a aucune incidence sur la topologie adoptée, ces différents résultats ne peuvent alors être expliqués que par une gêne et/ou une approche différente du substrat, lors de la réaction. A ce stade, deux hypothèses peuvent être faites quant à ces observations :

- Les deux substrats présentent des sites d'interaction différents de ceux identifiés par Can Li. De ce fait, le RAFT, en position 5', serait positionné proche des zones effectives et perturberait donc, par encombrement stérique, la catalyse asymétrique (Figure 77A). Cela peut être soit dû à la topologie hybride 1 et notamment à la présence des nucléotides supplémentaires en position 5', soit dû à la nature des

substrats. Des comportements différents, entre les deux substrats d'étude, sont en effet également observés en présence de la séquence libre « TA + HT21 ».

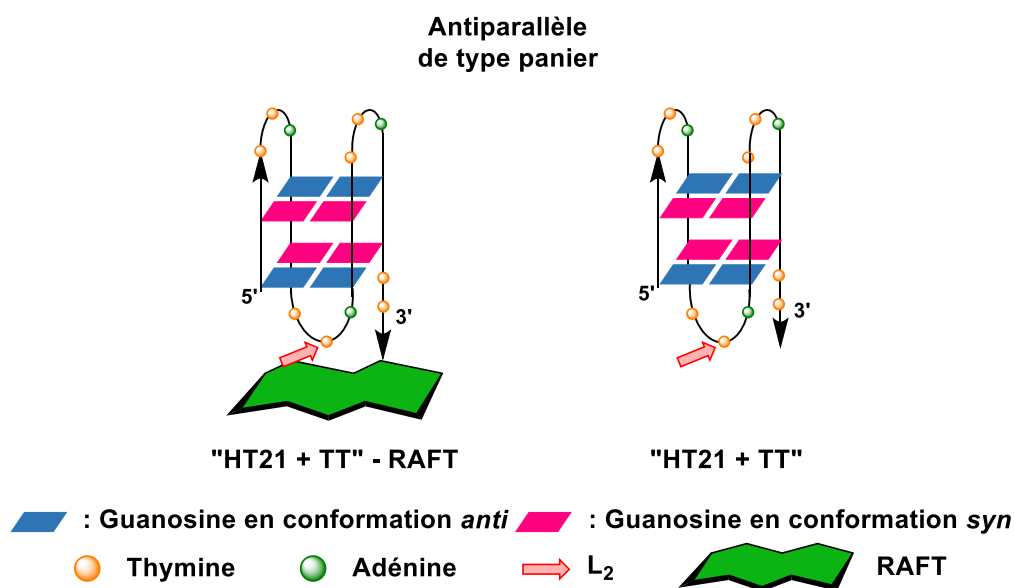
- La présence du RAFT en position 5' induit la formation d'une poche hydrophobe, favorisant les interactions des substrats à ce niveau (Figure 77B). En supposant alors que la face 5' et/ou la boucle L<sub>3</sub> (boucle du côté du RAFT), sont des sites de catalyse antagonistes de la face 3' et de la boucle L<sub>2</sub>, il est possible d'expliquer les excès énantiomériques moins importants observés.



**Figure 77** : Illustrations des hypothèses faites en présence des structures « TA + HT21 » et RAFT-« TA + HT21 ». A) Les zones d'interactions des thioéthers sont au niveau de la boucle L<sub>3</sub> et de la face 5', proche du RAFT. B) La présence du RAFT induit la formation d'une poche hydrophobe, favorisant l'interaction au niveau de la face 5' du substrat. Les faces 3' et 5' favorisent chacune un énantiomère antagoniste.

### III.2.2. Incidence du RAFT positionné proche des zones d'interactions

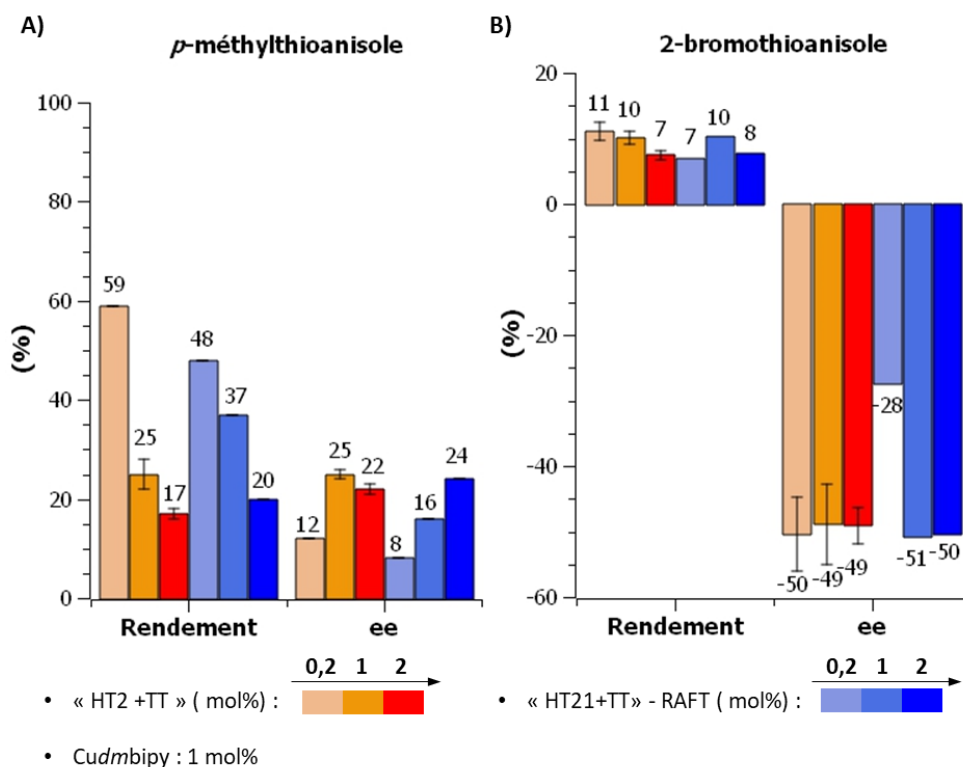
De la même manière, nous souhaitons maintenant analyser l'incidence de la présence du RAFT lorsque celui-ci est situé proche de la boucle L<sub>2</sub> et de la tétrade 3'. Pour cela, nous faisons le choix de travailler avec la séquence « HT21 + TT », déjà étudiée par Can Li, et la structure « sur gabarit » RAFT-« HT21 + TT ». Le RAFT étant ancré, cette fois-ci, en position 3', il est positionné proche des zones d'interactions identifiées par Can Li (Figure 78). Notons toutefois, que l'idée ici était de seulement faire varier la position du RAFT, tout en conservant une topologie hybride. En effet, nous pensions que du fait de la présence des thymidines en position 3', et de l'absence de nucléotides supplémentaire en position 5', la séquence « HT21 + TT » adopterait une topologie hybride 2.<sup>96</sup> Cependant, l'analyse par dichroïsme circulaire semble montrer que cette séquence adopte très certainement une topologie antiparallèle à deux tétrades, de type panier, en présence de potassium (*cf.* chapitre II, partie II.2.1). Ainsi, bien que le RAFT soit toujours positionné proche de la tétrade 3' et de la boucle L<sub>2</sub>, un paramètre supplémentaire, la topologie, est malheureusement introduit par rapport à l'étude précédente.



**Figure 78** : Zones d'interaction identifiées pour la topologie antiparallèle de type panier. Les flèches représentent les zones d'interactions, au niveau de la boucle L<sub>2</sub> et de la tétrade 3'.

Les réactions de sulfoxydation sont réalisées en présence des deux G-quadruplexes, dans les mêmes conditions que celles présentées précédemment. En absence de RAFT, on observe toujours des rendements de sulfoxydation, pour les deux substrats, légèrement décroissants lorsque la proportion en G-quadruplexe augmente (Figure 79). Cela va donc dans le sens d'une cinétique de catalyse asymétrique plus lente, ou de l'occupation de sites non effectifs par le complexe de cuivre. Il est aussi intéressant d'observer que les deux substrats affichent deux tendances complètement différentes, vis-à-vis de l'induction asymétrique. En effet, on peut voir que pour le *p*-méthylthioanisole, plus la concentration en G-quadruplexe est importante et plus l'excès énantiomérique augmente (Figure 79A), tandis que celui-ci reste constant pour le 2-bromothioanisole (Figure 79B). Cette observation vient donc appuyer l'hypothèse que les deux substrats adoptent des comportements différents lors de la réaction de sulfoxydation asymétrique, vis-à-vis du G-quadruplexe. Le 2-bromothioanisole semble présenter une affinité pour la séquence « HT21 + TT » bien plus importante que le *p*-méthylthioanisole, l'induction asymétrique étant indépendante de la concentration.

Enfin, on constate que pour les deux substrats, des résultats similaires sont obtenus en présence ou en absence du RAFT, attaché en position 3'. De ce fait, bien que les excès énantiomériques ne soient pas exacerbés par rapport à ceux observés en absence du RAFT, il est possible que cela confirme l'hypothèse de la formation d'une poche hydrophobe au niveau de la position du RAFT. En effet, nous avons pu observer une perte de l'induction asymétrique lorsque celui-ci est situé loin de la face 3'.



**Figure 79:** Comparaison des résultats de catalyse en fonction de la proportion en G-quadruplexe, pour les substrats A) *p*-méthylthioanisole et B) 2-bromothioanisole, en présence des structures "HT21 + TT" et de "HT2 + TT" - RAFT. N.B. : la proportion en Cudmbipy est fixée à 1 mol%.

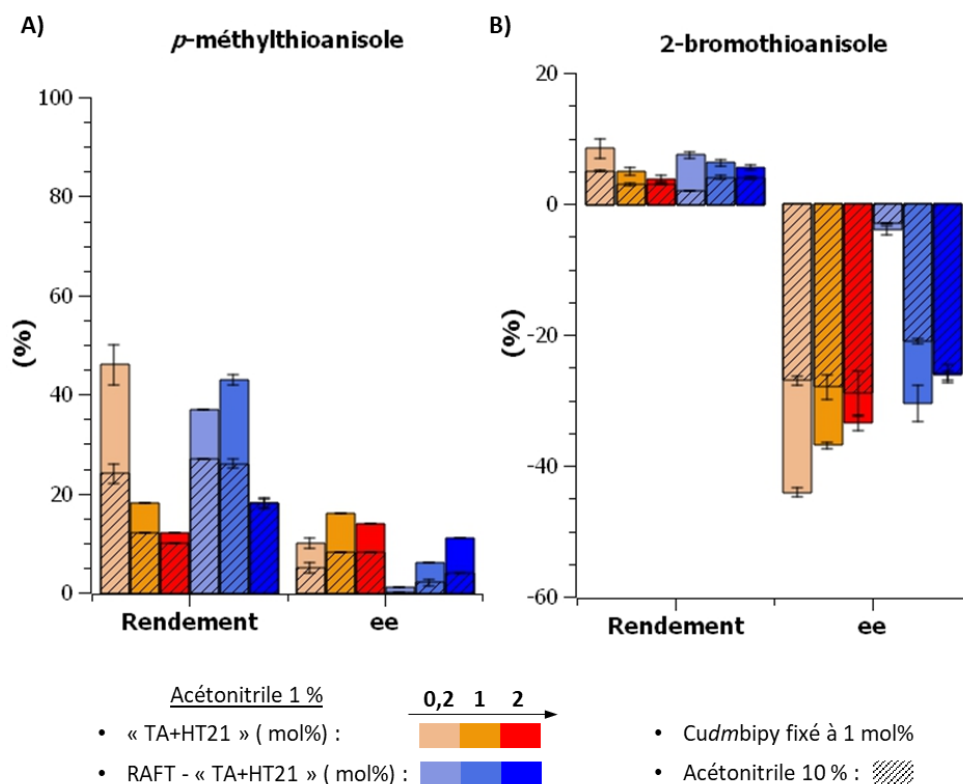
### III.3. Influence de la proportion en acétonitrile

Nous avons pu voir que, parmi les deux hypothèses émises quant à l'influence de la présence du RAFT, la formation d'une poche hydrophobe est envisagée. Ainsi, nous avons souhaité observer les comportements des séquences « TA + HT21 » et « HT21 + TT », ainsi que des structures « sur gabarit », en présence de 10 % d'acétonitrile. Rappelons que lors des analyses par dichroïsme circulaire, aucun changement significatif n'a été observé en présence de 10 % d'acétonitrile, et ce 5 h après ajout.

#### III.3.1. Cas du RAFT loin de la face 3' et de la boucle L<sub>2</sub>

De la même manière que pour la séquence libre « HT21 », on constate des rendements moins importants en présence de 10 % d'acétonitrile, pour les deux substrats (Figure 80). De plus, les excès énantiomériques sont globalement moins importants que ceux obtenus en présence de 1 % d'acétonitrile, seul le *p*-méthylthioanisole présente les mêmes ee, en présence de 1 et 10 % d'acétonitrile. Néanmoins, il est intéressant de voir que pour le 2-bromothioanisole, en présence de l'édifice « sur gabarit », l'énantiosélectivité semble être diminuée de manière plus modérée qu'en présence de la séquence « TA + HT21 » (Figure 80B). En effet, en présence de 10 % d'acétonitrile, des excès énantiomériques similaires ont été obtenus avec les deux structures, tandis que des écarts significatifs ont été observés en présence de 1 % d'acétonitrile.



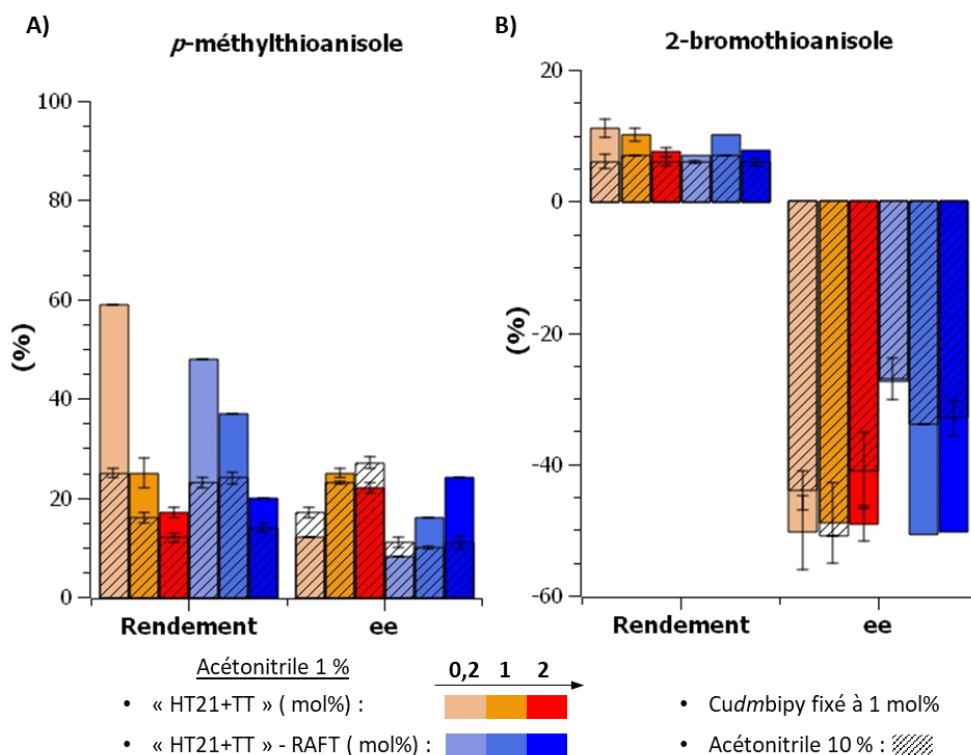


**Figure 80** : Comparaison des résultats de catalyse en fonction de la proportion en acétonitrile et en G-quadruplexe, pour les substrats A) *p*-méthylthioanisole et B) 2-bromothioanisole, en présence des structures "TA + HT21" et RAFT - "TA + HT21". N.B. : la proportion en Cudmbipy est fixée à 1 mol%.

### III.3.2. Cas du RAFT proche de la face 3' et de la boucle L<sub>2</sub>

On observe alors que la présence de 10 % d'acétonitrile ne modifie pas, ou peu, l'énantiosélectivité des réactions de sulfoxydation en présence de « HT21 + TT » pour les deux substrats de références (Figure 81). En revanche, les rendements sont moins importants que ceux observés en présence de 1 % d'acétonitrile.

Dans l'hypothèse où les sites d'interaction, à savoir la face 3' et la boucle L<sub>2</sub>, sont identiques à ceux identifiés pour le thioanisole avec la séquence « HT21 », plusieurs conclusions peuvent alors être tirées de ces résultats. On constate, en effet, que lorsque le RAFT est positionné au niveau de la face 5', les excès énantiomériques sont moins influencés par la proportion en acétonitrile, que la structure libre. A l'inverse, on observe des différences significatives, avec la structure libre, lorsque le châssis peptidique est ancré en position 3', *i.e.* proche des sites identifiés. Ainsi, la présence du RAFT, en position 3' par exemple, semble rendre plus sensible cette position vis-à-vis des variations de solvant. Cela semble alors confirmer la formation d'une poche hydrophobe, de par la présence du RAFT, réduisant alors les interactions entre le substrat et le G-quadruplexe, l'acétonitrile occupant la poche hydrophobe.



**Figure 81** : Comparaison des résultats de catalyse en fonction de la proportion en acétonitrile et en G-quadruplexe, pour les substrats A) *p*-méthylthioanisole et B) 2-bromothioanisole, en présence des structures "HT21 + TT" et "HT21 + TT" - RAFT. N.B. : la proportion en Cudmbipy est fixée à 1 mol%.

#### III.4. Bilan sur l'influence du RAFT

Nous avons souhaité, dans cette partie, déterminer l'influence de la présence du RAFT lors de la catalyse de sulfoxydation. Une étude préliminaire nous a permis de mettre en évidence que le RAFT seul ne possède aucune propriété catalytique et n'induit aucune asymétrie lors de la catalyse en présence du complexe de cuivre.

Par la suite, des études complémentaires ont été menées en présence de G-quadruplexes afin de déterminer si la présence du châssis peptidique est susceptible d'avoir une influence sur l'induction asymétrique de la réaction. Nous avons alors fait l'hypothèse que les deux substrats étudiés interagissent aux mêmes endroits que les sites identifiés par Can Li avec le thioanisole, à savoir la face 3' et la boucle L<sub>2</sub>. De ce fait, les structures RAFT – « TA + HT21 » et « HT21 + TT » - RAFT avec, respectivement, le RAFT ancré en position 5' et 3', ont été étudiées. Plusieurs observations ont alors pu être faites :

- **La réaction de sulfoxydation semble être substrat dépendante**, puisque des comportements complètement différents ont pu être observés avec les composés *p*-méthylthioanisole et 2-bromothioanisole.
- Nous avons pu confirmer que la **topologie du G-quadruplexe joue un rôle déterminant dans l'induction asymétrique**. En effet, lorsque la concentration en G-quadruplexe augmente, on observe pour le 2-bromothioanisole, une diminution de

l'excès énantiomérique en présence d'une conformation hybride 1 (« TA + HT21 »), tandis que l'excès reste constant en présence d'une topologie antiparallèle (« HT21 + TT »).

- **La présence du RAFT ne semble pas avoir d'influence significative** sur la catalyse asymétrique, en présence de 1 % d'acétonitrile. Néanmoins, il est tout à fait envisageable que sa présence induise la **formation d'une poche hydrophobe**, favorisant les interactions avec les substrats au niveau de la position d'ancrage. On constate, en effet, que lorsque le châssis peptidique est positionné loin des zones d'interactions, une perte significative de l'induction asymétrique est observée par rapport à la structure libre. En revanche, lorsque le RAFT est proche de la face 3' et de la boucle L<sub>2</sub>, des résultats identiques, à ceux de la structure libre, sont obtenus avec la séquence libre. Cela semble être confirmé par les essais réalisés en présence de 10 % d'acétonitrile.

Ces différentes observations témoignent ainsi de la complexité du système catalytique ainsi que des nombreux paramètres - topologie, compétition d'hydrophobicité, nature et présence des « flanking », *etc.*- qui semblent être impliqués dans le contrôle de l'énantiosélectivité de la réaction.

#### IV. Réaction de sulfoxydation en présence de G-quadruplexes parallèles

Les différentes observations faites dans la partie III témoignent de la complexité du système catalytique ainsi que des nombreux paramètres - topologie, compétition d'hydrophobicité, nature et présence des « flanking », *etc.*- qui semblent être impliqués dans le contrôle de l'énantiosélectivité de la réaction. Ainsi, dans cette partie IV sont présentés les résultats de catalyse en présence des édifices tétramoléculaires parallèles, contraints ou libres. Il s'agit alors des modèles les plus simple de G-quadruplexes, puisque seule la composition et la longueur des éventuels « flanking », aux niveaux des tétrades extérieures, sont variables, les autres paramètres restants constants.

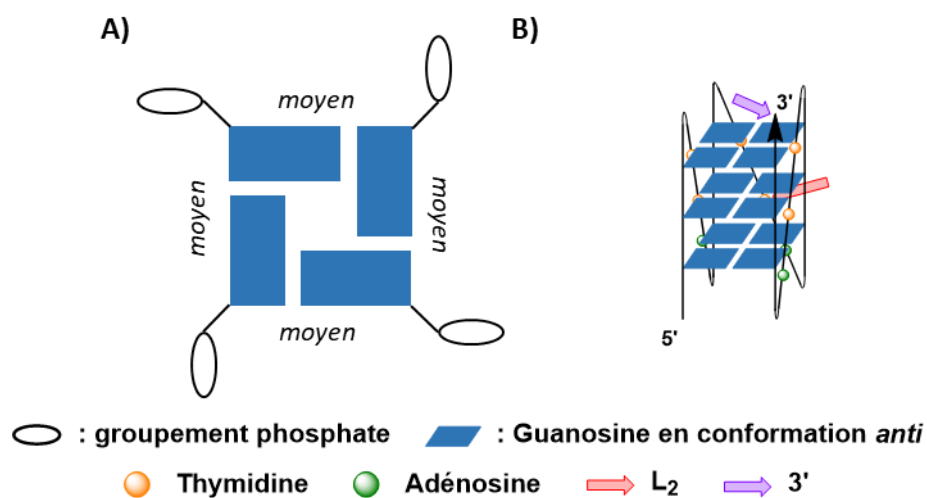
L'apport de la contrainte vis-à-vis du G-quadruplexe est discuté tout au long de la présentation des résultats, et des perspectives d'études complémentaires sont ensuite abordées en fin de cette partie. Afin de pouvoir mettre en lumière les résultats obtenus, quelques rappels sont faits dans un premier temps, notamment sur les résultats obtenus par Can Li en présence des G-quadruplexes parallèles.

##### IV.1. Rappels sur la topologie parallèle

Historiquement, la topologie parallèle est la première conformation étudiée pour l'utilisation de G-quadruplexes en catalyse.<sup>34</sup> Il est en effet possible de trouver de nombreux exemples dans la littérature, la grande majorité étant des réactions d'oxydation en présence du

complexe supramoléculaire nucléo-hémine.<sup>68b-c,107</sup> De manière générale, des études ont notamment montré que les ligands plans, de type porphyrine, interagissent de manière préférentielle par empilement au niveau de la tétrade 3'. Il a, par exemple, pu être observé que, lors d'une réaction d'époxydation en présence d'une porphyrine de manganèse et d'un G-quadruplexe parallèle, seule une des deux faces actives est impliquée dans le mécanisme d'oxydation. La deuxième face est encombrée car interagit par «  $\pi$ -staging » avec une des tétrades extérieures.<sup>108</sup> Dans certains cas, des activités de type peroxydase, proches de certaines enzymes, ont alors pu être obtenues mais aucune induction asymétrique n'a pu être observée lors de ces réactions de catalyse. Seuls quelques rares exemples de catalyse asymétrique de type Diels-Alder<sup>28</sup> ou de type Friedel & Craft,<sup>33b,109</sup> en présence de G-quadruplexes parallèles, sont en effet décrits dans la littérature.

De ce fait, la topologie parallèle étant la topologie la plus symétrique des conformations de G-quadruplexes, il est envisageable qu'elle ne soit pas particulièrement adaptée à la catalyse asymétrique. En effet, contrairement aux autres conformations, chaque face du quadruplexe est équivalente et possède des sillons de largeur moyenne (Figure 82). Nous avons pu voir en introduction de ce chapitre que la topologie parallèle a déjà été explorée par Can Li pour la réaction de sulfoxydation du thioanisole. Il présente des résultats de catalyse en présence du G-quadruplexe d'ARN « rHT21 ». Cependant, comme pour les exemples de réaction d'oxydation cités précédemment, aucune induction asymétrique n'a été observée.



**Figure 82** : Représentation schématique d'une topologie parallèle de G-quadruplexe vue du dessus (A) et de côté (B). Les zones d'interactions identifiées par Can Li sont repérées à l'aide de flèches. Chaque sillon du G-quadruplexe est de largeur moyenne ( $\approx 10,2$  Å).

Toutefois, lors de son étude par fluorescence, Can Li a pu mettre en évidence que les interactions effectives se situent très probablement au niveau de sillons de taille moyennes.<sup>73b</sup> De ce fait, malgré les nombreuses observations de non induction asymétrique, lors des

<sup>107</sup> Stefan, L., Denat, F., Monchard, D., *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 8759-8772; (d) Chen, J., Guo, Y., Zhou, J., Ju, H., *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 4210-4215.

<sup>108</sup> Pradines, V., Pratviel, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2185-2188.

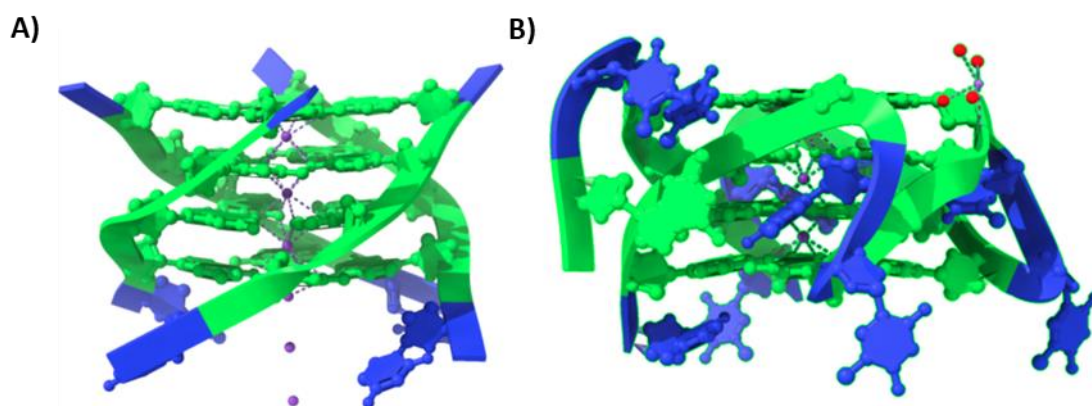
<sup>109</sup> Dey, S., Jäschke, A., *Molecules* **2020**, *25*, 3121.

réactions d'oxydation, nous avons tout de même souhaité explorer la topologie parallèle. En effet, seule la séquence d'ARN « rHT21 » a été testée par Can Li lors de ses recherches. Or, nous avons pu observer que les inductions asymétriques dépendent, certes, de la topologie du G-quadruplexe, mais aussi de la composition de la séquence. De plus, les G-quadruplexes d'ARN et d'ADN présentent des propriétés différentes en milieu aqueux, notamment à pH neutre. Ainsi, plusieurs séquences de G-quadruplexes parallèles d'ADN ont été testées, afin de confirmer, ou non, la pertinence de cette topologie pour la réaction asymétrique de sulfoxydation.

#### IV.2. Séquence télomérique humaine

Il a été choisi d'étudier, dans un premier temps, des séquences télomérique humaine, *i.e.* respectant le motif  $(GGGTTA)_n$  avec  $n \in \mathbb{N}$ , susceptibles d'adopter une topologie parallèle dans les conditions de réaction. Ainsi, la même composition que les G-quadruplexes précédemment étudiés, peut alors être conservée. De ce fait, seul un paramètre varie, la topologie, lors des réactions de sulfoxydation. Cependant, conserver un motif télomérique humain nous oblige alors à travailler en présence de G-quadruplexes tétramoléculaires, puisque nous avons pu voir que la séquence « HT21 » n'adopte pas de topologie parallèle dans les conditions de réaction. Un ajout significatif de PEG est généralement nécessaire pour induire une transition de repliement vers la topologie parallèle.

Il est alors nécessaire de préciser que les G-quadruplexes tétramoléculaires adoptent uniquement des conformations parallèles, mais sans présence de boucles externe.<sup>101b</sup> Or, nous avons pu voir que la boucle  $L_2$  est une des zones d'intérêt pour l'induction asymétrique identifiée par Can Li. Ainsi, sauf éventuellement dans le cas d'un ajout de « flanking » de longueur suffisante, seule la position d'intérêt 3' est présente pour les structures parallèles tétramoléculaires. De plus, il est envisageable que les sillons des structures tétramoléculaires (Figure 83A) soient plus accessibles que pour les G-quadruplexes monobrins, de par l'absence de boucles externes (Figure 83B). Ainsi, il est possible que le substrat et/ou le complexe de cuivre interagissent plus facilement à ces endroits.

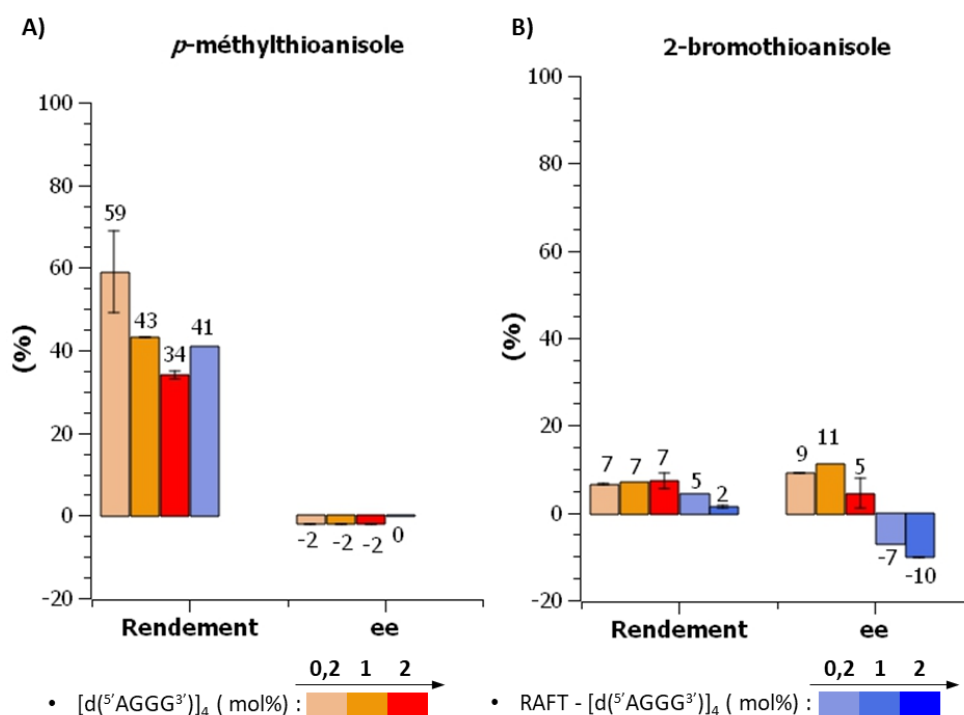


**Figure 83** : Représentation (A) de la structure cristalline du G-quadruplexe parallèle tétramoléculaire  $[d(5'TGGGG3')]_4$  (PDB : 4R44) et (B) de la structure cristalline du G-quadruplexe parallèle monobrin  $d(5'GT_2G_4T_2G_4T_2G_4T_3')$  (PDB : 6W9P).

## IV.2.1. En absence de « flanking »

Dans un premier temps, la séquence  $[d(5'AGGG3')]_4$ , contrainte ou libre, est étudiée afin de déterminer si la topologie parallèle est susceptible d'induire une asymétrie en absence de « flanking ». Elle adopte ainsi, comme il a pu être observé au chapitre II, la conformation la plus simple de G-quadruplexe parallèle. Pour rappel, des adénosines sont ajoutées en position 5' afin de stabiliser la structure par formation d'une tétrade.<sup>65</sup> Les résultats de catalyse obtenus en présence des substrats de références, dans les conditions usuelles, sont présentés sur la Figure 84.

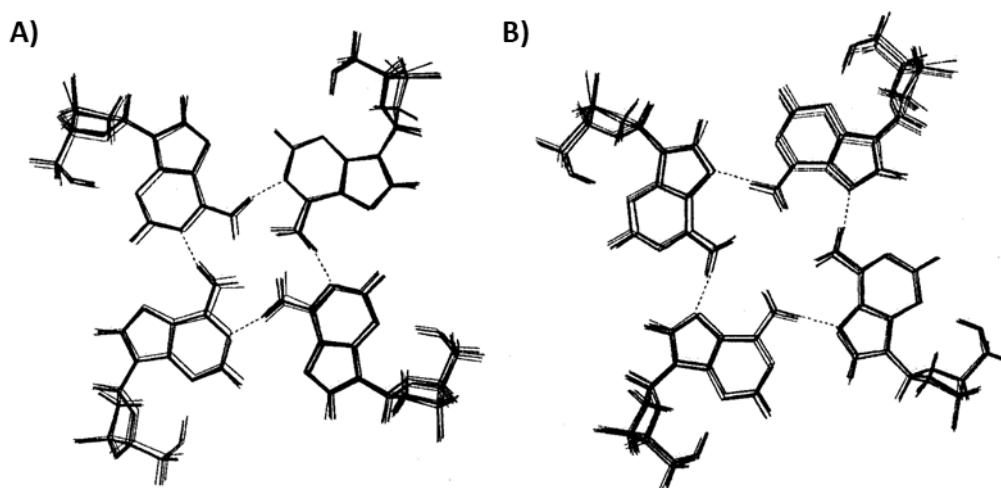
On observe tout d'abord que la topologie parallèle, du moins sans présence de « flanking », ne semble pas pertinente vis-à-vis du *p*-méthylthioanisole (Figure 84A). En effet, bien que des rendements importants, de l'ordre de 40 % soient obtenus, aucune induction asymétrique n'est observée en présence des structures contrainte et libre. En revanche, concernant le 2-bromothioanisole, une induction asymétrique est observée en présence de la topologie parallèle (Figure 84B). On constate, en effet, en présence du G-quadruplexe libre, une induction asymétrique opposée à celle observée en présence des séquences « HT21 » et analogues. Cela est un résultat particulièrement intéressant et confirme ainsi que la topologie du G-quadruplexe influe directement sur l'énantiosélectivité de la réaction. Étonnamment, cette inversion d'énantiosélectivité n'est observée qu'en présence de la structure libre, puisqu'en présence de la structure contrainte, l'énantiomère « usuel » est favorisé.



**Figure 84** : Comparaison des résultats de catalyse en fonction de la proportion en G-quadruplexe, pour les substrats A) *p*-méthylthioanisole et B) 2-bromothioanisole, en présence des structures  $[d(5'AGGG3')]_4$  et RAFT -  $[d(5'AGGG3')]_4$ . N.B. : la proportion en Cudmbipy est fixée à 1 mol%.

Ces premières observations viennent donc confirmer l'hypothèse faite dans la partie précédente selon laquelle la réaction de sulfoxydation, en présence de G-quadruplexe, est substrat dépendante. De plus, elles viennent aussi appuyer l'idée qu'il existe plusieurs sites d'interaction avec des inductions asymétriques antagonistes les unes des autres. En effet, on constate, pour le 2-bromothioanisole, des inductions asymétriques opposées selon que la structure soit contrainte ou non. Or, seul l'ancrage en position 5' du RAFT différencie les deux G-quadruplexes, puisqu'ils adoptent tous les deux une topologie parallèle, comme présenté au chapitre II. Ainsi, il est alors envisageable, soit que l'induction asymétrique ait lieu directement au niveau de la tétrade 5', soit tout simplement que la présence des adénosines supplémentaires au niveau cette tétrade jouent un rôle dans cette nouvelle induction.

P.K. Patel observe, en effet, la formation d'une tétrade d'adénosines en position 5', pouvant adopter deux conformations, en équilibre.<sup>60</sup> Soit une conformation que nous appellerons « ouverte », avec uniquement la participation des fonctions amines pour stabiliser la tétrade (Figure 85A) ; soit une conformation que nous nommerons « fermée », impliquant cette fois-ci la participation des purines en plus des fonctions amines (Figure 85B). Il est d'autant plus intéressant qu'il a aussi été montré qu'en cas de présence de nucléotides supplémentaires, en position 5' des adénines, seule la conformation « fermée » est observée (Figure 85A).<sup>110</sup> Ainsi, dans le cas de la structure contrainte RAFT – [d(5'AGGG3')]4, l'ancrage du châssis peptidique en position 5' favorise potentiellement la tétrade d'adénosines en conformation « fermée ».



**Figure 85 :** Représentation des deux conformations, « ouverte » (A) et fermée (B), d'une tétrade d'adénosines. Figure issue de la publication *Nucleic Acids Res.*, 1999, Vol. 27, No. 19. 3836-3843.<sup>60</sup>

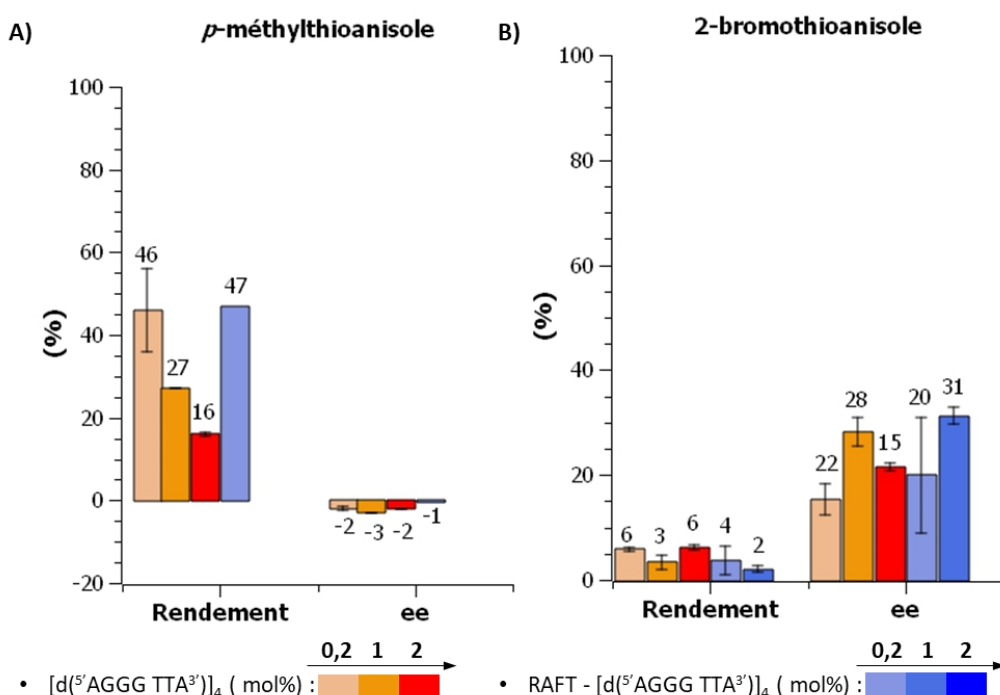
A la vue de ces explications, il est envisageable que la présence de cette tétrade d'adénosines « souple », *i.e.* pouvant s'ouvrir et se fermer, favorise l'interaction des substrats thioéthers au niveau de la face 5'. Cette poche hydrophobe ne serait en revanche pas accessible dans le cas des structures contraintes, de par la gêne stérique induite par le RAFT et la conformation « fermée », plus compacte, de la tétrade d'adénosines. Cela expliquerait alors les différentes

<sup>110</sup> Gavathiotis, E., Searle, M. S., *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 1650-1656.

énantiosélectivités observées, les sites d'interactions étant différents selon que la structure soit contrainte ou non.

#### IV.2.2. En présence de « flanking »

Afin de vérifier cette hypothèse, une réaction de sulfoxydation est conduite en présence, cette fois-ci, de la séquence  $[d(5'AGGGTTA^3')]_4$ , présentant ainsi une chaîne longue de trois nucléotides (TTA) au niveau de la tétrade 3'. Les résultats obtenus, en présence des G-quadruplexes libre et contraint, sont présentés sur la Figure 86. De la même manière qu'en présence du G-quadruplexe parallèle  $[d(5'AGGG^3')]_4$ , aucune induction asymétrique est observée pour le substrat *p*-méthylthioanisole, que ce soit en présence de la séquence libre ou de la structure RAFT -  $[d(5'AGGGTTA^3')]_4$  (Figure 86A). La topologie parallèle ne semble donc pas être adaptée pour la sulfoxydation asymétrique de ce composé. Concernant le 2-bromothioanisole, on constate tout d'abord que l'ajout d'une chaîne de « flanking » permet d'observer de plus grands excès énantiomériques, toujours dans le sens opposé à celui observé avec les séquences « HT21 » et analogues, ainsi qu'à celui observé sans « flanking » (Figure 86B). De plus, les structures contrainte et libre favorisent cette fois-ci le même énantiomère, démontrant alors que la présence du « flanking » est déterminante dans le contrôle de l'énantiosélectivité.



**Figure 86** : Comparaison des résultats de catalyse en fonction de la proportion en G-quadruplexe, pour les substrats A) *p*-méthylthioanisole et B) 2-bromothioanisole, en présence des structures  $[d(5'AGGGTTA^3')]_4$  et RAFT -  $[d(5'AGGGTTA^3')]_4$ . N.B. : la proportion en Cudmbipy est fixée à 1 mol%.

#### IV.3. Importance de la nature du flanking

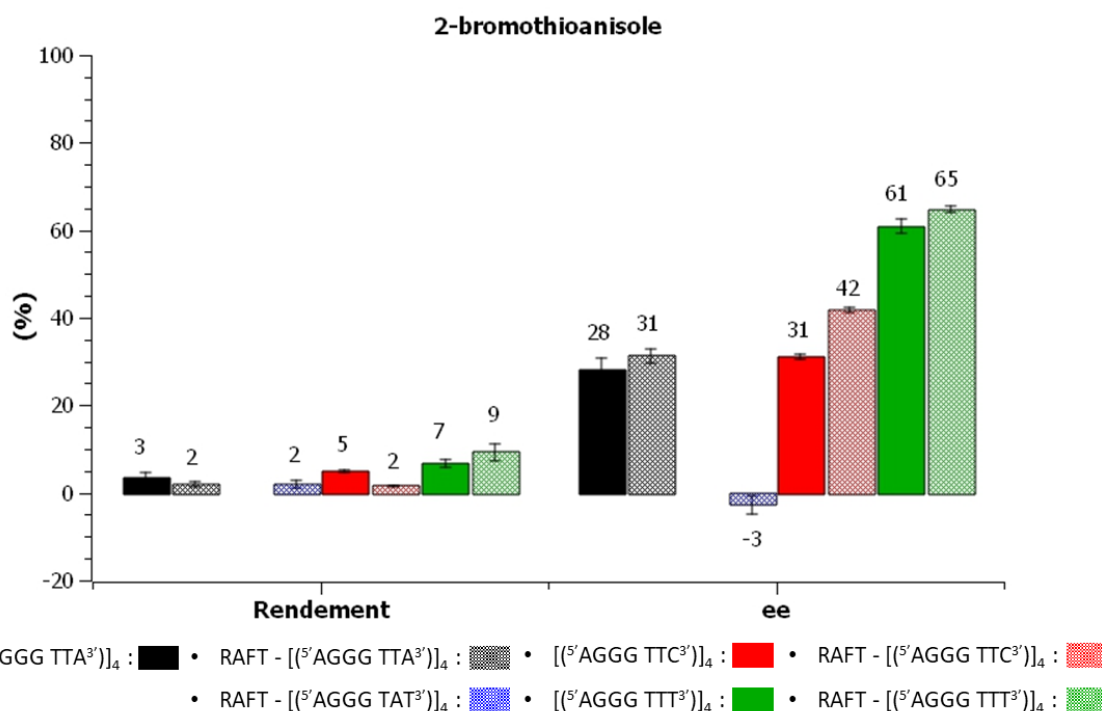
Nous avons pu identifier que la présence de « flanking » est primordiale pour induire une asymétrie opposée à celle observée jusqu'à présent. Nous faisons maintenant varier la composition de ce « flanking » afin de déterminer l'influence que cela peut avoir sur



l'énantiosélectivité de la réaction. Notons que nous faisons le choix, pour la suite des études, de travailler exclusivement avec le substrat 2-bromothioanisole, aucune induction asymétrique n'étant observée avec *p*-méthylthioanisole.

#### IV.3.1. Influence de la composition

Il a été choisi, dans un premier temps, de conserver la longueur de 3 nucléotides, mais d'en faire varier la composition. Seule la proportion optimale de 1 mol% est utilisée pour les G-quadruplexes et le complexe *Cudmbipy*. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 87. Une disparité dans les énantiométries est observée, selon la nature des nucléotides supplémentaires. On constate ainsi que les meilleurs résultats sont obtenus avec la composition « TTT », des excès énantiomériques respectifs de 61 % et 65 % étant observés avec les édifices libres et contraints. Nous pensons que les excès énantiomériques importants, obtenus avec cette composition, sont dus à la formation d'une poche particulièrement hydrophobe, facilitant les interactions chirales avec le 2-bromothioanisole. En effet, parmi les bases nucléiques, la thymine présente un grand caractère lipophile. Il est d'ailleurs intéressant d'observer que parmi les modifications de composition des boucles de « HT21 », Can Li observe aussi de très bons résultats en présence de la boucle « TTT » (Tableau 9, page 103)



**Figure 87** : Influence de la nature du « flanking » sur la réaction de sulfoxydation asymétrique du 2-bromothioanisole, en présence des séquences libres et contraintes. N.B. : la proportion en *Cudmbipy* est fixée à 1 mol%.

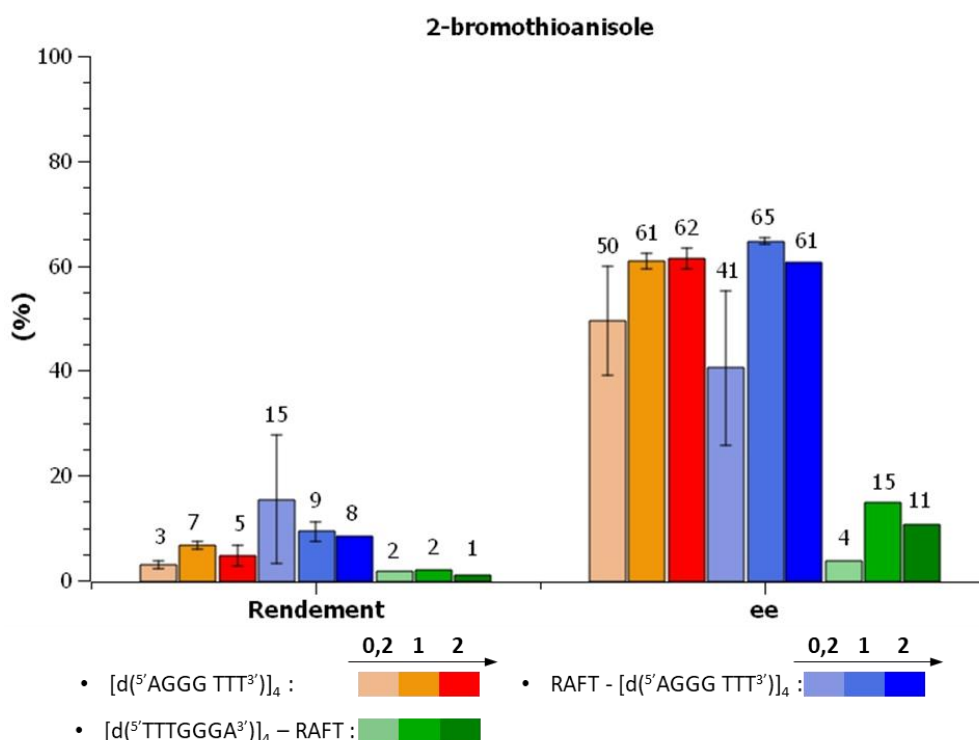
Concernant les excès énantiomériques observés en présence de la composition « TTA », nous proposons l'hypothèse suivante. Plusieurs publications décrivent la boucle « TTA » comme se repliant sur elle-même : l'adénine se superposant par empilement «  $\pi$ - $\pi$  » avec la première

thymine.<sup>111</sup> De ce fait, il est envisageable que l'environnement chiral soit moins accessible que celui fournit par le « flanking TTT », expliquant l'excès énantiomérique plus faible. Enfin, concernant la composition « TAT », nous supposons que les trois bases nucléiques sont superposées par empilement «  $\pi$ - $\pi$  », empêchant ainsi les interactions avec le substrat, d'où le mélange achiral obtenu. Il aurait été intéressant de réaliser la sulfoxydation en présence de la séquence libre  $[d(5'AGGG\ TAT^3')]_4$ , afin de confirmer, ou non, cette théorie. Les adénosines en position 5' étant disponibles nous aurions éventuellement pu observer un excès énantiomérique positif, témoignant de la non induction asymétrique de la composition « TAT ». Malheureusement, par manque de temps et de matières, les essais n'ont pas encore été réalisés.

#### IV.3.2. Modulation de la boucle « TTT »

##### IV.3.2.1. En position 3' ou 5'

La composition « TTT » étant la composition avec laquelle on observe les meilleurs résultats, il a été décidé d'approfondir les études sur cette structure. Ainsi, dans un premier temps, nous faisons le choix de varier les positions du flanking « TTT », *i.e.* aux extrémités 3' ou 5'. Toutes les proportions en G-quadruplexes sont ici testées (Figure 88).



**Figure 88** : Influence de la position du flanking "TTT" vis-à-vis de l'induction asymétrique en présence de G-quadruplexes tétramoléculaires parallèles, contraints ou libre. N.B. : la proportion en Cudmbipy et en G-quadruplexe est fixée à 1 mol%.

De manière assez surprenante, on constate que lorsque le RAFT est ancré au niveau de la face 3', des rendements ainsi que des excès énantiomériques moins importants sont observés. Cela

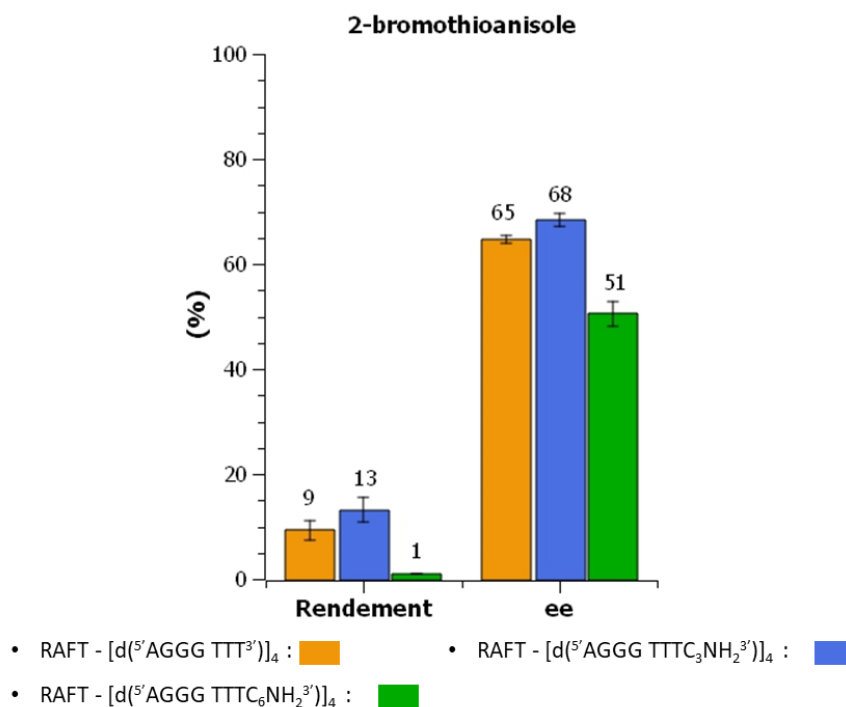
<sup>111</sup> Collie, G. W., Campbell, N. H., Neidle, S., *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 4785-4799.

confirme alors que les deux faces, 3' et 5', ne sont pas équivalentes vis-à-vis de la catalyse asymétrique. Les mêmes observations ont été relevées dans la littérature lors de réactions d'oxydation en présence du complexe nucléo-hémine. Il a alors été montré que la face 3' est catalytiquement plus active que la face 5'.<sup>59,112</sup> Néanmoins, les réactions décrites étant achirales, il aurait été intéressant d'observer les résultats en présence de la séquence libre [d(5' TTT GGGA 3')]<sub>4</sub> afin d'observer les résultats de catalyse asymétrique lorsque les deux faces sont disponibles. Il est intéressant de noter que lorsque la face 5' est libre, *i.e.* lorsque le RAFT est ancré au niveau de la face 3', ce sont les bases nucléiques qui sont présentées au niveau de la tétrade extérieure. Dans le cas inverse, *i.e.* lorsque la face 3' est libre, ce sont les sucres (désoxyribose) qui sont présentés au niveau de la tétrade extérieure.

#### IV.3.2.2. Présence de groupements amines en bout de « flanking »

Nous avons pu voir, dans le chapitre I, que des structures contraintes comportant des fonctions amines, aux extrémités du « flanking » TTT, ont été synthétisées dans le but de lier de façon covalente le complexe de cuivre. Plusieurs espaceurs, C3 et C6, ont alors été explorés. Cependant, les ligations covalentes avec le complexe de cuivre n'ayant pas pu être réalisées, nous avons tout de même souhaité engager ces édifices **47**<sub>a-b</sub> en catalyse de sulfoxydation (Figure 89). Notons ici que l'intérêt de cette étude est de confirmer, ou non, l'implication du « flanking » dans l'induction asymétrique. En effet, bien que le complexe de cuivre(II) ne soit pas lié de façon covalente au G-quadruplexe, les fonctions amines, présentes en bout de chaînes, sont tout de même susceptibles de coordonner le complexe de cuivre(II). Ainsi, si ce dernier se retrouve trop éloigné des zones d'interaction, une diminution significative du rendement et/ou de l'excès énantiomérique devrait pouvoir être observée.

<sup>112</sup> (a) Li, W., Li, Y., Liu, Z., Lin, B., Yi, H., Xu, F., Nie, Z., Yao, S., *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 7373-7384; (b) Yamamoto, Y., Araki, H., Shinomiya, R., Hayasaka, K., Nakayama, Y., Ochi, K., Shibata, T., Momotake, A., Ohyama, T., Hagihara, M., Hemmi, H., *Biochemistry* **2018**, *57*, 5938-5948.

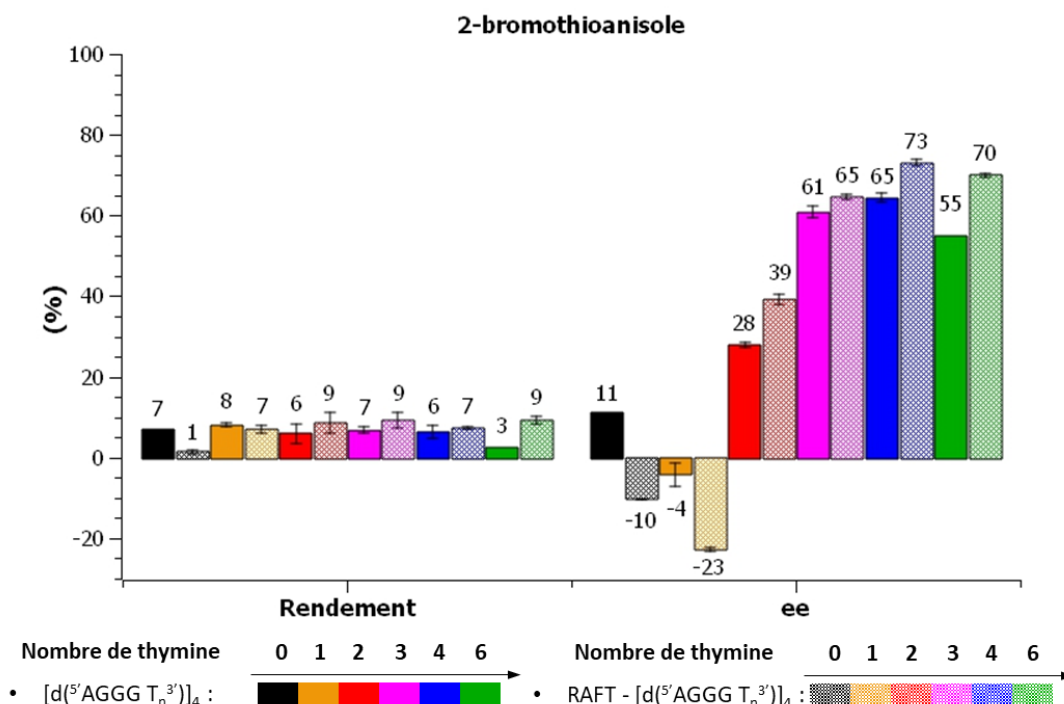


**Figure 89** : Influence de l'ajout d'une fonction amine en bout de "flanking" sur la catalyse de sulfoxydation du 2-bromothioanisole, en présence du « flanking TTT ». Les G-quadruplexes et le Cudmbipy sont introduits à 1 mol%.

Il est alors intéressant de constater qu'en présence de l'espacer C3, les rendements ainsi que l'induction asymétrique sont sensiblement plus importants que ceux observés avec la structure RAFT – [d(5'AGGG TTT<sup>3'</sup>)]<sub>4</sub>. En revanche, lorsque l'espacer est plus important, *i.e.* long de 6 carbones, on observe que la réaction de sulfoxydation du 2-bromothioanisole n'a pas lieu, ou du moins se trouve très limitée. Cela montre alors que le complexe de cuivre est potentiellement chélaté avec l'espacer amine et que la taille/flexibilité importante de ce dernier limite les interactions avec les sites de catalyse. Cependant, nous devons toutefois conserver un regard critique vis-à-vis de ces résultats préliminaires, puisqu'aucune étude montrant que le complexe de cuivre est bien coordonné par les fonctions amines n'a, à ce jour, pas encore été menée.

#### IV.3.3. Influence de la longueur du « flanking » en thymidine

Nous souhaitons maintenant déterminer l'influence que peut avoir la longueur du « flanking » sur l'énantiosélectivité de la réaction. Les meilleurs résultats ayant été obtenus en présence de thymidine au niveau de la tétrade 3', seule cette composition est étudiée (Figure 90). Pour rappel, dans le cas d'une absence d'acide nucléique au niveau de la tétrade 3', des énantiosélectivités opposées avaient pu être observées, avec un excès énantiomérique « négatif » pour la structure contrainte et « positif » pour la séquence libre. Cela avait alors été expliqué par la présence des adénosines, au niveau de la face 5', susceptible d'induire cette inversion d'énantiosélectivité. En effet, la présence du RAFT, dans le cas de l'édifice contraint, ne permet pas l'accès à ce « flanking » par les substrats. Cette hypothèse a par la suite pu être appuyée lors de l'étude de catalyse en présence de différents « flanking », puisque seuls des excès énantiomériques « positifs » ont alors été observés.

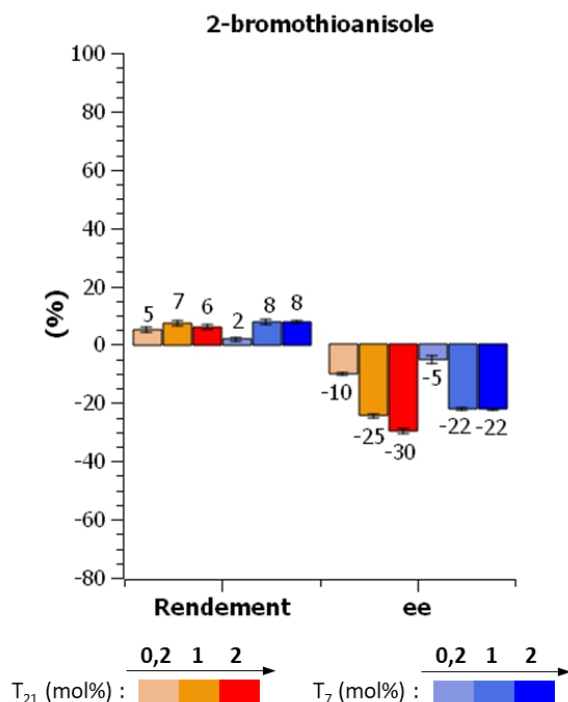


**Figure 90** : Influence de la longueur du « flanking » en thymine sur l'énantiosélectivité de la réaction de sulfoxydation du 2-bromothioanisole. Les édifices libres et contraint sont comparés. Les G-quadruplexes et le Cudmbipy sont introduits à 1 mol%.

Il est donc surprenant de constater l'obtention d'un mélange quasi racémique en présence de la séquence libre [d<sup>5'</sup>AGGG T<sup>3'</sup>]<sub>4</sub> (orange), ainsi qu'un excès énantiomérique « négatif » pour la structure contrainte, puisque des « flanking » sont présents sur les deux faces du G-quadruplexe. A la vue de cette observation, nous supposons alors que les deux tétrades extérieures, 3' et 5', catalysent chacune la formation d'un énantiomère de façon antagoniste. La face 5' favoriserait un excès « positif », tandis que la face 3', quant à elle, favoriserait l'excès « négatif ». C'est donc pourquoi, dans le cas de la séquence libre, un mélange racémique est observé, tandis qu'un excès énantiomérique « négatif » est obtenu avec la structure contrainte, puisque seule la face 3' est disponible. Il est d'autant plus intéressant d'observer qu'à partir de deux thymidines présentes au niveau de la tétrade 3', on observe exclusivement des excès énantiomériques « positifs ». Cela suggère alors que les zones d'interactions sont différentes, selon qu'il y ait un seul, ou plusieurs, nucléotides au niveau des tétrades. De plus, on constate que plus la longueur du « flanking » est importante, plus l'excès énantiomérique augmente, avec un palier maximal aux alentours de 65 – 70 %. Deux hypothèses sont alors envisageables, soit la présence d'au moins deux nucléotides au niveau des tétrades favorise les interactions au sein des sillons du G-quadruplexe ; soit l'induction asymétrique se déroule uniquement au niveau du « flanking », la structure du G-quadruplexe n'étant pas impliquée.

Afin de vérifier cela, des réactions de sulfoxydation du 2-bromothioanisole ont été menées, dans les conditions usuelles, en présence des séquences de thymidines T<sub>7</sub> et T<sub>21</sub>. Étrangement, bien que ces séquences n'adoptent pas de structuration définie, des excès énantiomériques

« négatifs », sont observés (Figure 91). Ces excès résultent certainement de la chiralité intrinsèque des nucléotides.



**Figure 91** : Résultats de la catalyse de sulfoxydation du 2-bromothioanisole, en présence des séquences T<sub>21</sub> et T<sub>7</sub>. Le Cudmbipy est fixé à 1 mol%.

Dans le cas des G-quadruplexes parallèles étudiés, les inductions asymétriques ne sont alors pas uniquement dues à la chiralité des nucléotides formant le « flanking », mais bien par l'ensemble de la structure, puisque des excès « positifs » sont observés. Il est envisageable que la présence d'au moins deux nucléotides au niveau de la tétrade extérieure favorise les interactions au sein des sillons du G-quadruplexe. Enfin, on observe que, dans le cas de la présence de six thymidines au niveau de la tétrade 3', un excès énantiomérique significativement moins important, par rapport à l'édifice contraint, est obtenu avec la séquence libre. Cela s'explique très probablement par la différence de stabilité des édifices, puisque nous avons pu observer, au chapitre II, un  $\Delta T_m$  de +50 °C, en faveur de la structure contrainte. De ce fait, concernant la séquence libre [d(5'AGGG T<sub>6</sub><sup>3'</sup>)]<sub>4</sub>, il est envisageable qu'une partie de la catalyse soit faite par le « flanking » non structuré « T<sub>6</sub> », expliquant alors l'excès énantiomérique plus faible de par l'énantiosélectivité antagoniste du G-quadruplexe structuré.

#### IV.4. Apport de la contrainte

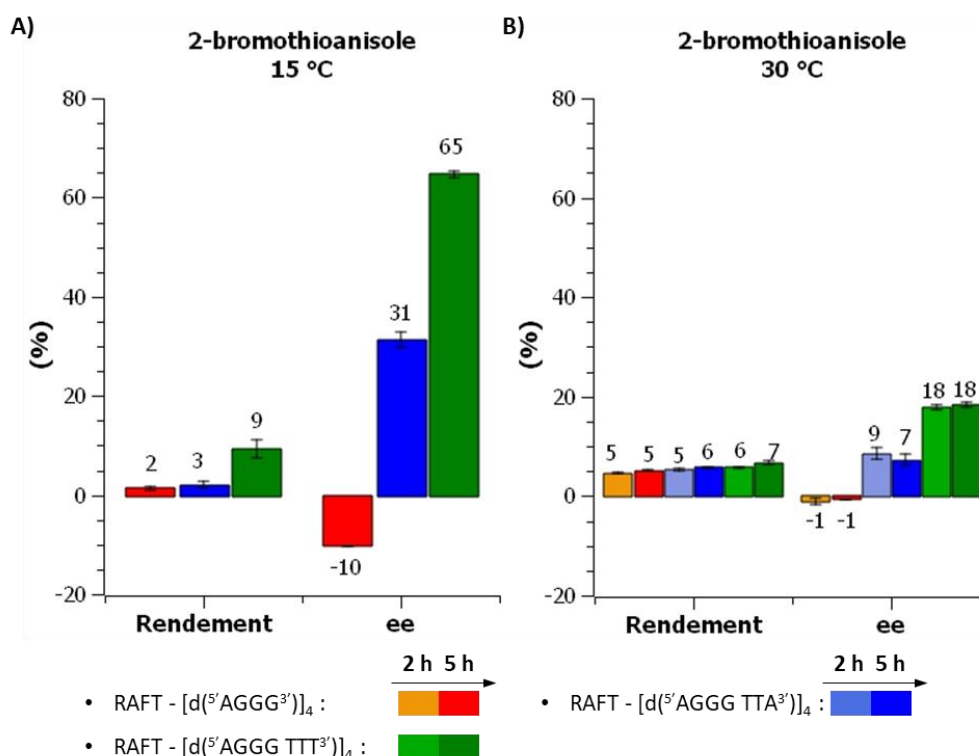
Jusqu'à présent, nous avons principalement pu observer l'importance du « flanking » sur l'énantiosélectivité. Cependant, parmi ces nombreuses observations, on constate que les structures, contraintes et libres, présentent globalement les mêmes résultats, même si un meilleur ee est souvent obtenu avec les séquences contraintes. Nous abordons alors, dans cette partie, différentes études faites dans le but d'observer un éventuel apport des structures

contraintes, par rapport aux séquences libres, vis-à-vis de la catalyse asymétrique de sulfoxydation.

#### IV.4.1. Température

Afin d'améliorer les faibles rendements observés lors de la sulfoxydation du 2-bromothioanisole, il peut être intéressant de chauffer la réaction afin d'en améliorer la cinétique. Cependant, il a pu être observé, en introduction, que la température optimale pour la réaction de sulfoxydation est de 15 °C, une perte d'énantiosélectivité étant observée par Can Li pour des températures plus importantes. Il est possible d'expliquer cela soit par une cinétique plus importante de la catalyse effectuée par le complexe de cuivre en suspension dans la solution, soit tout simplement par une dénaturation partielle de la structure de l'édifice G-quadruplexe.

L'idée, ici, est alors d'essayer de tirer profit du gain de stabilité des structures contraintes, par rapport aux séquences libres, pour réaliser la catalyse de sulfoxydation à des températures plus importantes. Il a ainsi été choisi de réaliser la sulfoxydation du 2-bromothioanisole à une température de 30 °C, en présence de différentes structures contraintes. Les rendements et inductions asymétriques observées, après 2 h et 5 h de réaction, sont présentés sur la Figure 92.



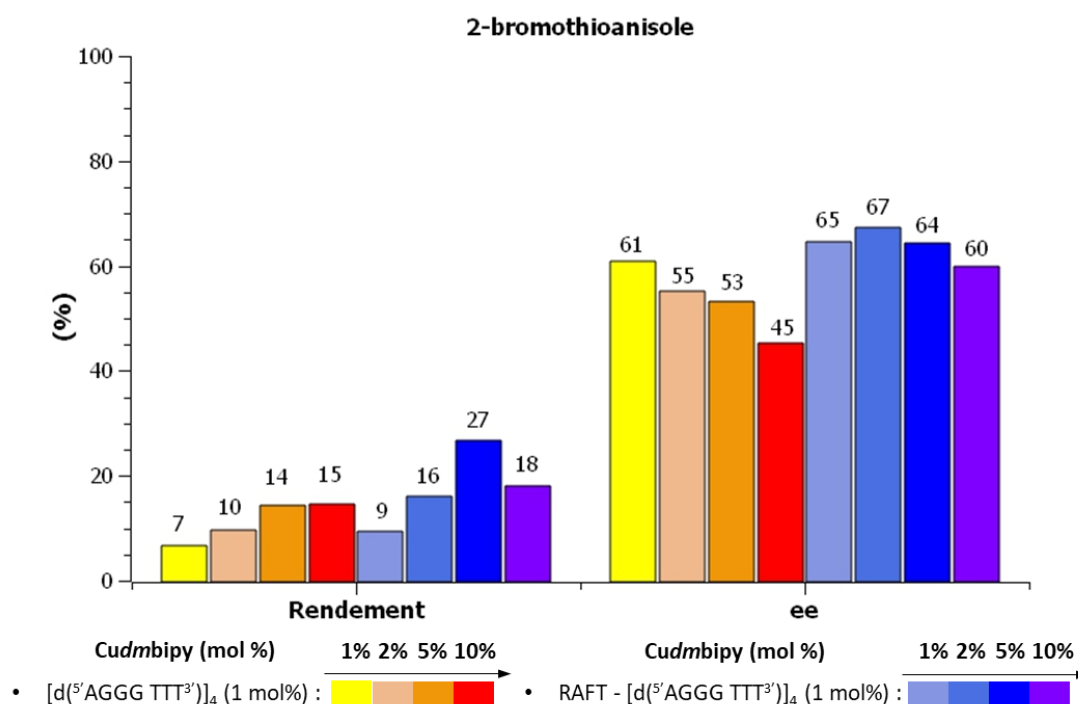
**Figure 92** : Influence de la température sur la réaction de sulfoxydation du 2-bromothioanisole. Le Cudmbipy et les G-quadruplexes sont introduits avec une proportion de 1 mol%.

Une perte d'énantiosélectivité est malheureusement observée lors de la réaction de sulfoxydation à 30 °C (Figure 92B), par rapport aux résultats observés à 15 °C (Figure 92A). Sachant que les structures contraintes testées lors de ces études ont chacune des Tm

supérieur à 90 °C, en présence de potassium, il est peu probable que cela soit dû à une dégradation des édifices de G-quadruplexe. De ce fait, la perte d'énantiosélectivité est alors due à une cinétique plus importante de la catalyse réalisée par le complexe de cuivre en suspension dans la solution.

#### IV.4.2. Proportion en *Cudmbipy*

La température de réaction ne pouvant être, pour le moment, modifiée, nous faisons le choix de faire varier la proportion en *Cudmbipy* afin d'améliorer l'efficacité catalytique de la réaction et ainsi augmenter les rendements en sulfoxyde. La réaction de sulfoxydation du 2-bromothioanisole a alors été effectuée en présence d'une proportion de 1 mol% des séquences  $[d(5'AGGG\ TTT3')]_4$ , libre et contrainte (Figure 93). On constate, pour la séquence libre, que plus la proportion en complexe de cuivre est importante, plus le rendement de sulfoxydation est important, avec un palier à 15 % dès 5 mol% en *Cudmbipy*. L'efficacité catalytique a ainsi pu être doublée, malheureusement au détriment de l'induction asymétrique, résultat d'une potentielle catalyse effectuée par *Cudmbipy* en suspension dans la solution.



**Figure 93** : Influence de la proportion en *Cudmbipy* lors de la sulfoxydation du 2-bromothioanisole, en présence des structures  $[d(5'AGGG\ TTT3')]_4$  et RAFT -  $[d(5'AGGG\ TTT3')]_4$ .

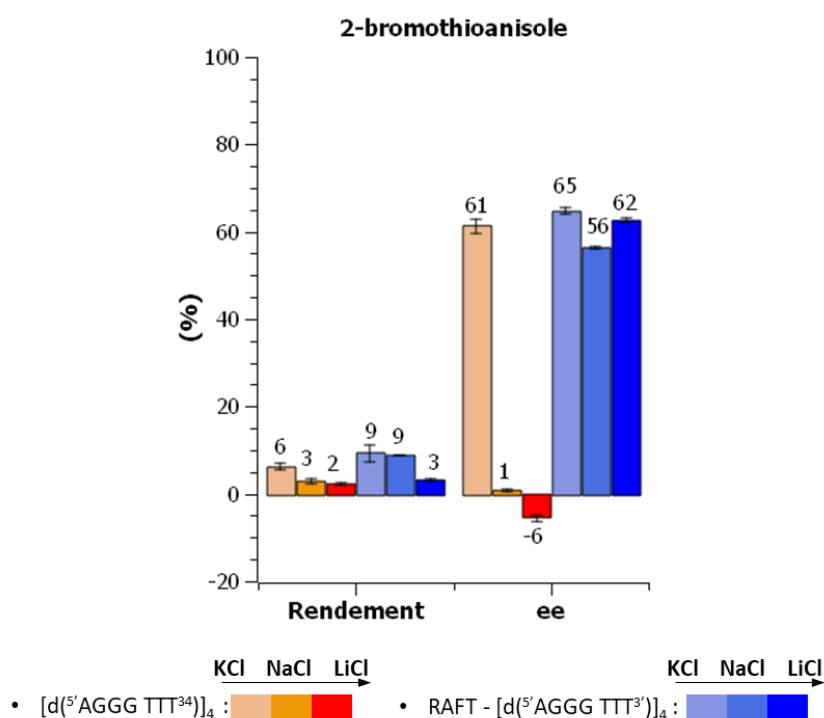
Concernant la structure contrainte RAFT -  $[d(5'AGGG\ TTT3')]_4$ , on observe jusqu'à 27 % de rendement en présence de 5 mol% de complexe de cuivre, *i.e.* un rendement trois fois plus important que dans les conditions usuelles. De plus, on constate que, contrairement au cas de la séquence libre, **l'énantiosélectivité de la réaction reste inchangée, témoignant alors d'un apport significatif de la contrainte par rapport à la séquence libre.**



Il est possible de rationaliser cela en s'appuyant sur la plus grande stabilité de la structure contrainte et donc potentiellement de sa moindre dégradation, du fait de la présence importante de cuivre et du milieu oxydant, par rapport au G-quadruplexe non contraint.

#### IV.4.3. Influence de la nature du cation en solution

Enfin, nous avons souhaité réaliser la réaction de sulfoxydation en présence de différents cations, *i.e.* en présence de potassium, de sodium et de lithium, afin de déterminer l'apport potentiel de la contrainte, vis-à-vis des conditions de réaction. Pour rappel, les structures de G-quadruplexes sont généralement moins stables en présence de sodium, celui-ci se plaçant au sein même de la tétrade de guanosines, tandis que le potassium s'intercale entre deux tétrades successives et déstabilise moins l'édifice. Les ions lithium sont considérés comme trop petits pour interagir de façon significative avec les tétrades de guanosines. Les réactions de sulfoxydation sont réalisées à 15 °C, en présence des séquences  $[d(5'AGGG TTT3')]_4$ , libres et contraintes (Figure 94).

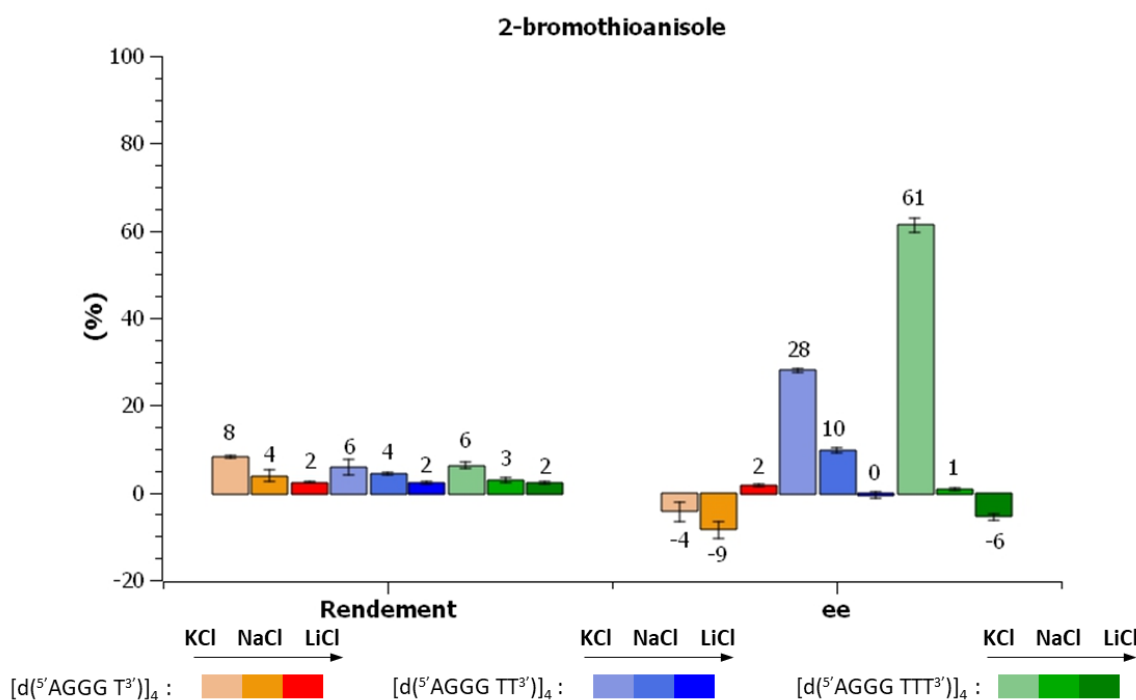


**Figure 94** : Influence de la nature du cation lors de la sulfoxydation du 2-bromothioanisole, en présence des structures  $[d(5'AGGG TTT^3')]_4$  et RAFT -  $[d(5'AGGG TTT^3')]_4$ . N.B. : Le G-quadruplexe et le Cudmbipy sont introduits avec une proportion de 1 mol%.

De manière assez flagrante, on constate que la réaction de sulfoxydation asymétrique ne peut être réalisée qu'en présence de potassium pour la séquence libre, tandis que les excès énantiomériques sont conservés dans le cas de l'édifice contraint. Cela concorde alors avec les stabilités observées au chapitre II, puisque de très faibles structurations en G-quadruplexes ont été observée pour les séquences libres, en présence de NaCl et LiCl. De plus, de la même manière que dans le cas de la séquence mutée « cgmHT21 » (*cf.* chapitre III, partie I.2.1), cela

traduit l'importance de la structure du G-quadruplexe dans l'induction asymétrique de la réaction de sulfoxydation.

Nous avons tout de même souhaité faire des essais supplémentaires, en présence des séquences libres  $[d(5'AGGG T_n 3')]_4$  avec  $n \in [1; 3]$ , afin de confirmer cette première observation. Le choix des séquences a été fait de façon à avoir les structures libres les plus stables possibles. Les réactions de sulfoxydation sont menées dans les conditions usuelles, en présence de 1 mol% de G-quadruplexes et de *Cudmbipy* (Figure 95).



**Figure 95** : Influence de la nature du cation lors de la sulfoxydation du 2-bromothioanisole, en présence des structures  $[d(5'AGGG T_n 3')]_4$  avec  $n \in [1; 3]$ . N.B. : Le G-quadruplexe et le *Cudmbipy* sont introduits avec une proportion de 1 mol%.

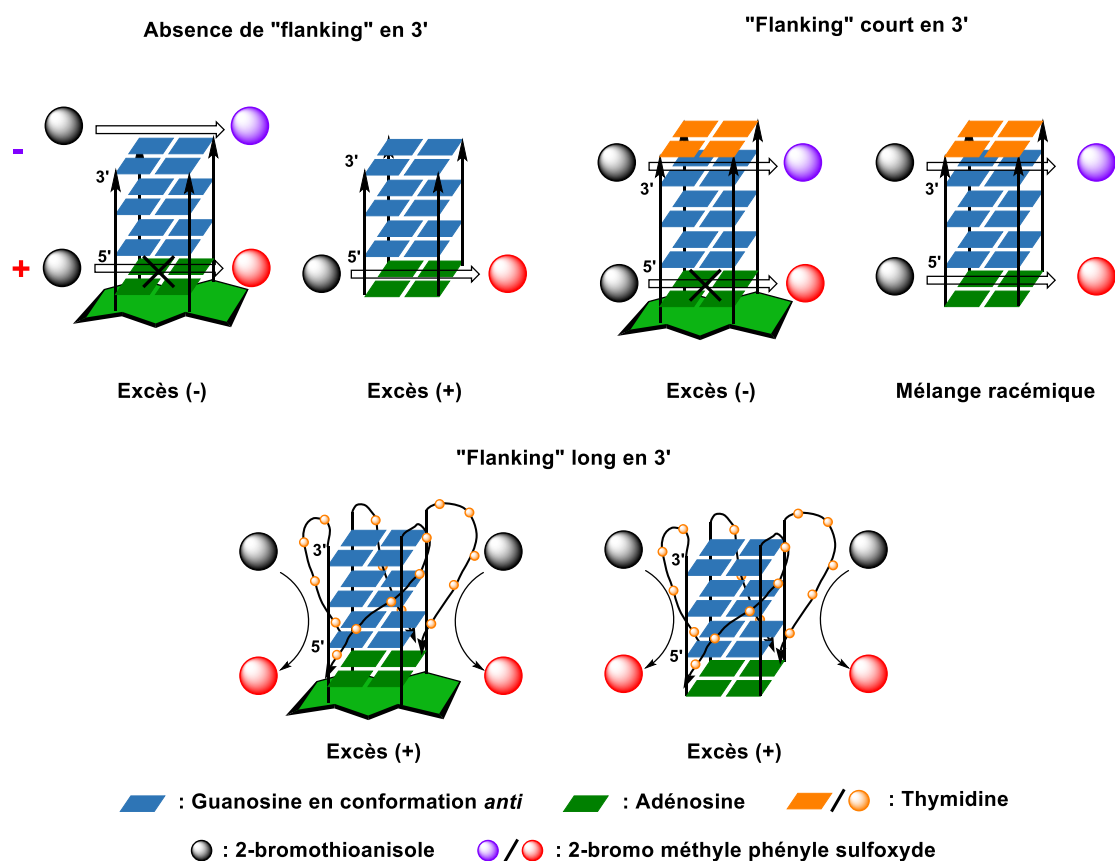
On observe alors le même phénomène, c'est-à-dire une diminution importante de l'excès énantiomérique lorsque la réaction est réalisée en présence de cations différents du potassium. Cela démontre ainsi de l'importance de la structuration du G-quadruplexe dans l'induction asymétrique, et de ce fait de la présence du RAFT pour contraindre l'édifice. Il est aussi intéressant de noter que des excès énantiomériques « négatifs » semblent être obtenus lorsque le G-quadruplexe est peu structuré (NaCl et LiCl). Cela est alors en accord avec les résultats observés en présence des séquences non structurées  $T_7$  et  $T_{21}$ .

#### IV.5. Bilan et perspectives sur les G-quadruplexes parallèles

Lors de cette étude, nous avons souhaité analyser la topologie parallèle en catalyse asymétrique de sulfoxydation de dérivés du thioanisole. Afin de pouvoir conserver le motif télomérique humain  $(TTAGGG)_n$ , avec  $n \in \mathbb{N}$ , il a été décidé de travailler avec des structures tétramoléculaires, connues pour uniquement adopter des topologies parallèles.

Il a alors pu être observé que la réaction de sulfoxydation, en présence de G-quadruplexes parallèles, est substrat dépendante. En effet, lors des différentes réactions en présence du *p*-méthylthioanisole, aucune induction n'a été observée, tandis que des excès énantiomériques significatifs ont été obtenus en présence du 2-bromothioanisole. Il a ensuite pu être montré que la présence de « flanking », ainsi que sa composition, sont déterminantes dans le contrôle de l'énantiosélectivité de la réaction. A partir des nombreuses observations faites, nous avons alors proposé les hypothèses suivantes concernant la sulfoxydation du 2-bromothioanisole :

- Les deux tétrades extérieures semblent chacune avoir des propriétés chirales antagonistes. Notons que la présence du RAFT en position 5', pour les édifices contraints, empêche les interactions avec le substrat à cet endroit (Figure 96A et B).
  - **La face 3', favorise un excès énantiomérique « négatif »**, *i.e.* le premier énantiomère, par ordre d'élution en HPLC chirale.
  - **La face 5', quant à elle, favorise un excès énantiomérique « positif »**.
- Les plus grand excès énantiomériques ont été observés en **présence de thymidines**, des nucléotides hydrophobes. Il est alors envisageable que cela soit dû à la **formation d'une poche hydrophobe**, facilitant les interactions avec le substrat.
- Lorsque le « flanking » est court, l'induction asymétrique est favorisée au niveau de la tétrade (Figure 96B), tandis que lorsque le « **flanking** » est long, *i.e.* composé d'au moins deux acides nucléiques, **l'induction asymétrique semble se faire au niveau des sillons** (Figure 96C). Cette hypothèse a pu être confirmée lors de l'étude en présence des séquence poly dT.



**Figure 96** : Schématisation des différentes zones d'interactions et des excès énantiomériques observés en présence des structures parallèles, libres et contraintes, A) en absence de « flanking », B) en présence d'un « flanking » court, C) en présence d'un « flanking » long.

Les ligands de type porphyrine étant largement décrits comme des ligands sélectifs des tétrades extérieures, il serait intéressant de réaliser une compétition d'affinité entre une porphyrine de magnésium et le *Cudmbipy*, lors de la réaction de sulfoxydation. De ce fait, la/les tétrade(s) extérieure(s) étant encombrée(s) par le complexe de porphyrine, il serait possible de confirmer ou non que l'induction asymétrique ait bien lieu au niveau des sillons du G-quadruplexe, lorsque le « flanking » est long. Bien entendu, la porphyrine de magnésium serait choisie car inactive d'un point de vue catalytique pour la réaction de sulfoxydation. Des études ont également montré que la substitution de l'adénine par la 2-aminopurine permet de mettre en évidence, par fluorescence et/ou DC, la formation de boucles externes.<sup>113</sup>

Enfin, bien que les inductions asymétriques en présence des structures libres et contraintes soient globalement similaires, il a pu être montré que la présence du RAFT apporte une stabilisation significative de la structure. De ce fait, en présence des édifices contraints, la réaction de sulfoxydation asymétrique peut être réalisée indépendamment de la nature du cation en solution, tandis que la présence de KCl est nécessaire avec les séquences libres parallèles. De plus, il a également été observé qu'il est possible d'augmenter la quantité de

<sup>113</sup> Peng, P., Du, Y., Sun, Y., Liu, S., Mi, L., Li, T., *Analyst* **2018**, *143*, 3814-3820.

complexe de cuivre, dans le but d'accroître les rendements de sulfoxydation, jusqu'à 5 mol%, sans observer de perte d'énantiosélectivité, en présence des édifices contraints.

## V. Catalyse en présence de G-quadruplexes antiparallèles

Dans cette partie V, sont présentés les résultats de catalyse obtenus en présence d'édifices antiparallèles, contraints ou libres. Nous avons choisi d'axer la discussion autour des différentes conformations possibles, à savoir de type « panier » ou de type « chaise ». Pour cela, les séquences « TBA » et « HT21 + T », connues pour adopter les conformations respectives de types « chaise » et de type « panier » en présence de potassium, ont été analysées. Dans un premier temps, un bref rappel est fait sur les résultats de catalyse asymétrique, observés dans la littérature et par Can Li, en présence d'une topologie antiparallèle. La structure contrainte est ensuite comparée aux deux séquences libres. Enfin, des perspectives d'amélioration sont abordées en fin de partie.

### V.1. Rappels sur la topologie antiparallèle

Contrairement à la topologie parallèle, il existe de nombreux exemples dans la littérature traitant de catalyse asymétrique en présence d'une topologie antiparallèle. Ainsi par exemple, Can Li montre qu'en présence de la séquence « HT21 », en topologie antiparallèle dans le NaCl, on observe, lors de la réaction de Diels-Alder entre le cyclopentadiène et une azachalcone, le composé *endo* avec un excès énantiomérique de 74 % (Schéma 30A).<sup>28</sup> Un excès de 75 %, en présence de la séquence « HT21 », est obtenu lors d'une réaction d'alkylation de Friedel & Craft, dans les mêmes conditions (Schéma 30B).<sup>32</sup>

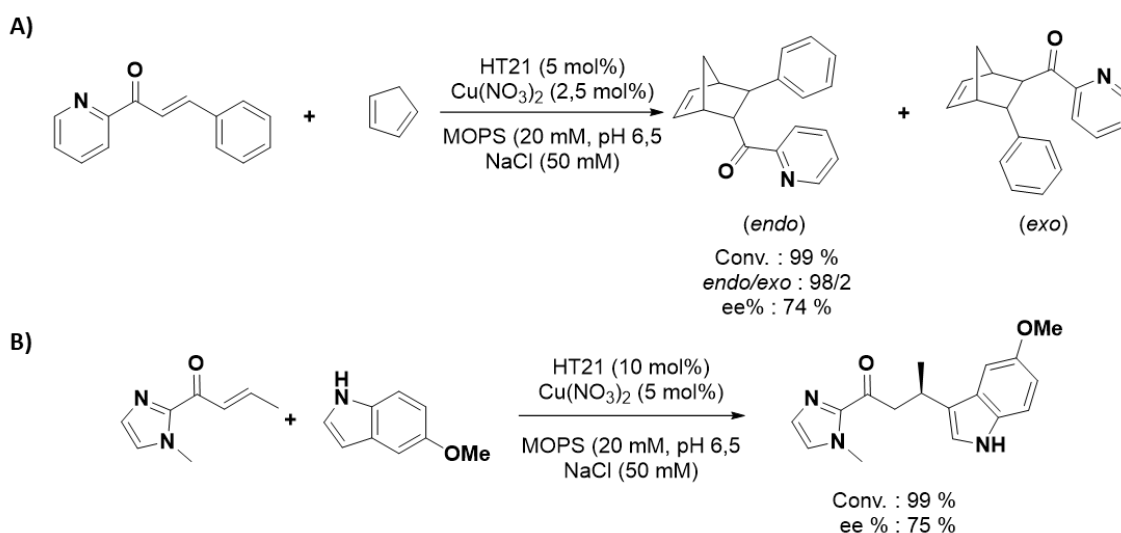


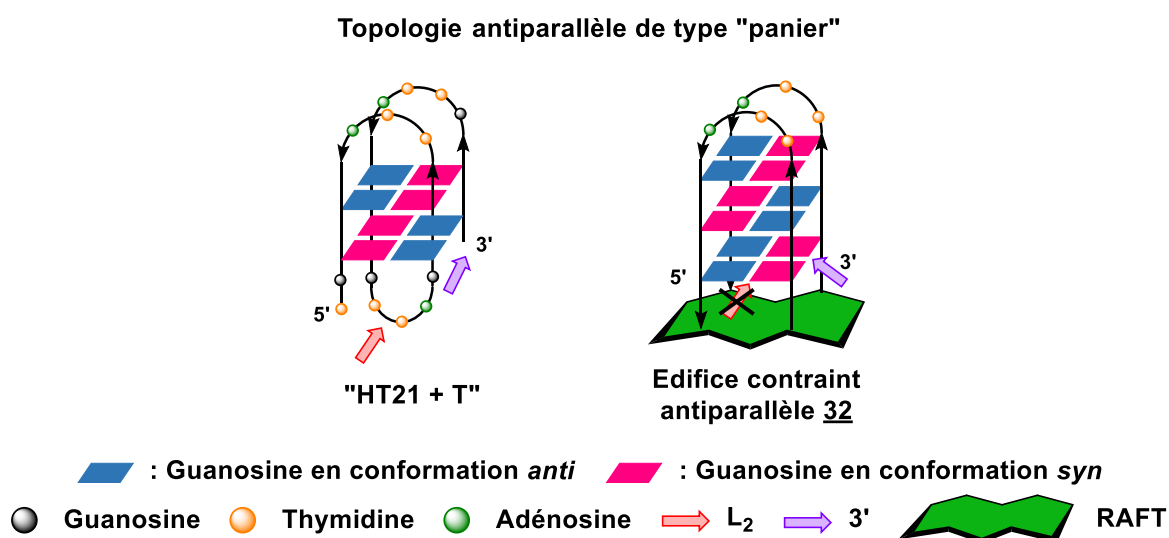
Schéma 30

De la même manière, nous avons pu voir, en introduction de ce chapitre, que les meilleurs résultats obtenus en sulfoxydation, lors des analyses en présence des différentes topologies, sont avec la topologie antiparallèle. Un excès de 35 % est, en effet, obtenu avec la séquence « HT21 + T », décrite comme adoptant une topologie antiparallèle à deux tétrades en présence de potassium. Notons toutefois qu'un mélange racémique est obtenu en présence

de la séquence télomérique « HT21 » antiparallèle, en présence de NaCl, rappelant que la nature du cation est importante.

#### V.2. Catalyse en présence d'un G-quadruplexe antiparallèle de type « panier »

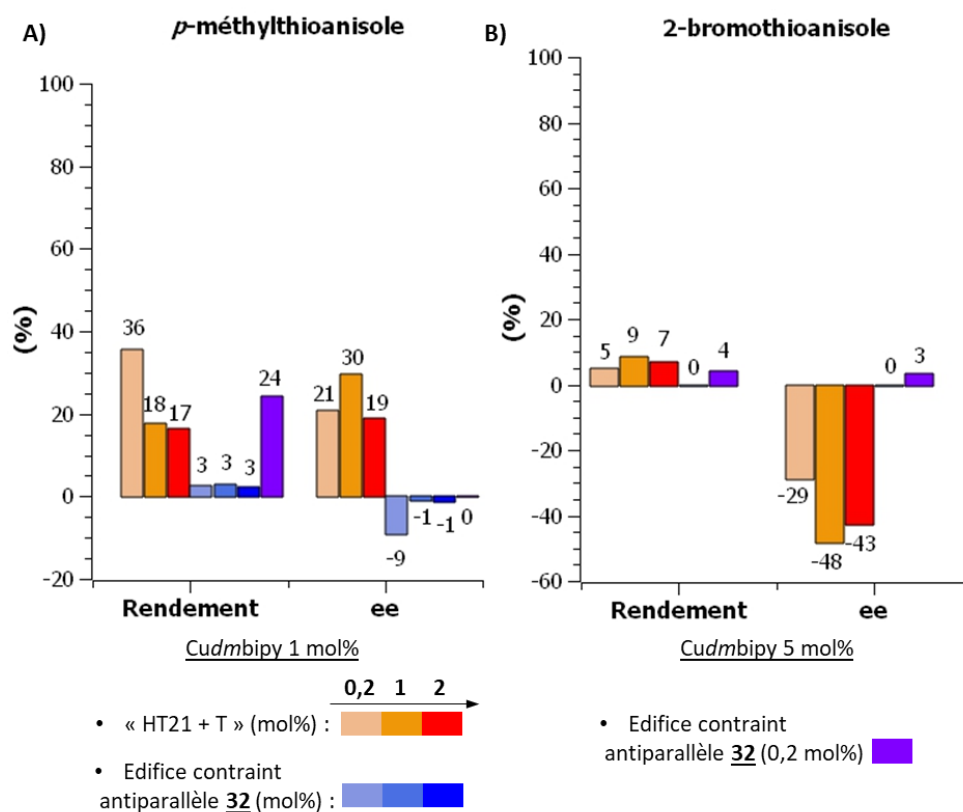
Nous souhaitons, dans un premier temps, comparer les deux structures adoptant une topologie antiparallèle de type « panier » en présence de potassium, à savoir la séquence « HT21 + T » **24** et l'édifice contraint antiparallèle **32** (Figure 97). Il est important de rappeler que la séquence « HT21 + T » adopte, certes, une conformation de type « panier », mais la structure du G-quadruplexe est uniquement constituée de deux tétrades de guanosines (Figure 97A). De ce fait, la boucle L<sub>2</sub>, site d'interactions préférentiel identifié par Can Li, de composition « GTTAG », est différente de la composition « TTA » usuellement observée dans le cas des séquences télomériques humaines. Notons, de plus, que dans le cas de l'édifice contraint, cette boucle diagonale L<sub>2</sub> est absente et seules les boucles latérale L<sub>1</sub> et L<sub>3</sub> sont présentes (Figure 97B).



**Figure 97** : Représentation des G-quadruplexes, A) « HT21 + T » et B) **32**, en topologie antiparallèle de type « panier ».

Les réactions de sulfoxydation sont réalisées dans les conditions usuelles, pour les deux substrats, et les résultats sont présentés sur la Figure 98. On observe, pour les deux substrats, avec la structure « HT21 + T », des rendements et excès énantiomériques proches de ceux observés en présence de la séquence « HT21 ». Cela est bien en accord avec les observations faites par Can Li lors de ses recherches. La topologie antiparallèle de type « panier » semble ainsi être une conformation intéressante pour la réaction de sulfoxydation asymétrique. De ce fait, il est surprenant de constater qu'aucune induction asymétrique significative n'est observée en présence de l'édifice contraint. Certes, un excès de -9 % est observé avec le *p*-méthylthioanisole (Figure 98A) en présence de 0,2 mol% de G-quadruplexe, mais le rendement étant de seulement 3 %, cela reste non significatif. De plus, on constate que pour des proportions plus importantes de G-quadruplexe, des mélanges racémiques sont obtenus. Aucune sulfoxydation du 2-bromothioanisole n'est observée en présence de 1 mol% de

Cudmbipy (Figure 98B). Les très faibles rendements observés sont particulièrement surprenants. Une hypothèse pourrait être que le complexe de cuivre, voire l'ion cuivre, pourrait être piégé par le G-quadruplexe au niveau des triazoles. En effet, même si l'édifice contraint ne participe pas à la réaction, le Cudmbipy, en suspension dans la solution, devrait pouvoir la réaliser.



**Figure 98** : Comparaison des résultats de sulfoxydation (A) du *p*-méthylthioanisole et (B) du 2-bromothioanisole, en présence de la séquence « HT21 + T » et de l'édifice contraint **32**.

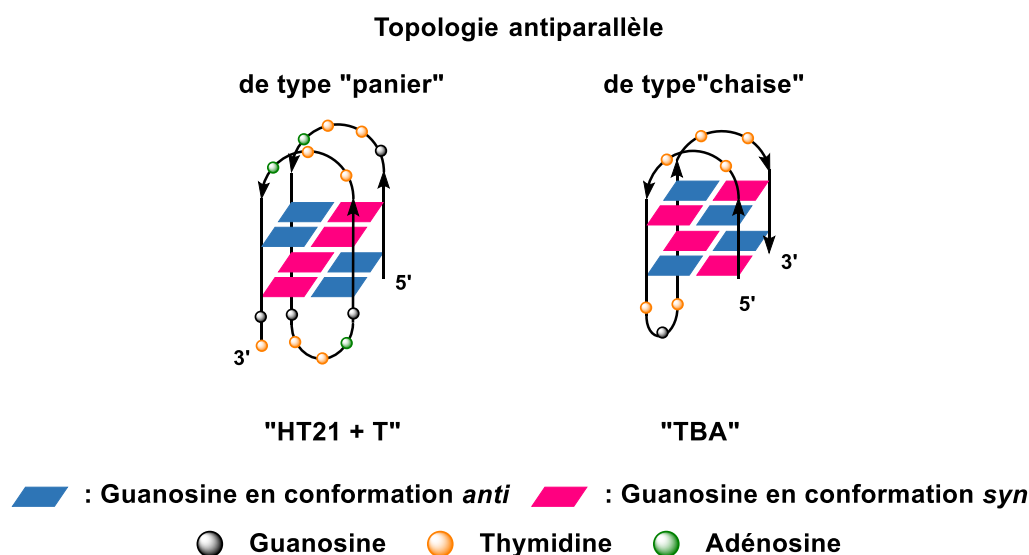
Il a ainsi été décidé de réaliser la réaction de sulfoxydation en présence de 5 mol% de Cudmbipy, afin de se placer dans le cas d'un excès conséquent de complexe de cuivre par rapport au G-quadruplexe. Dans ces nouvelles conditions, on observe alors des rendements respectifs de 24 % et 4 % pour la sulfoxydation du *p*-méthylthioanisole et du 2-bromothioanisole, respectivement, mais toujours sans aucune induction asymétrique. Cela semble alors montrer que la réaction est bien catalysée uniquement par le complexe de cuivre en solution et que le G4 joue le rôle d'un piège à cuivre, limitant sa réactivité.

Il est fortement envisageable que la présence du RAFT soit responsable des faibles rendements observés en présence de l'édifice contraint. En effet, comme le châssis peptidique se trouve proche de la face 3' et que la boucle L<sub>2</sub> est absente, les sites d'interactions identifiés par Can Li sont inaccessibles. De plus, il est envisageable que le complexe de cuivre se retrouve, en partie, piégé par les groupements triazoles présents en position 5', au niveau du RAFT. Cependant, cela n'ayant pas été observé lors des réactions de catalyse en présence des

structures parallèles, il est plus probable que l'absence d'induction asymétrique lors de la réaction de sulfoxydation soit la conséquence de l'absence de la boucle L<sub>2</sub>.

### V.3. Catalyse en présence d'un G-quadruplexe antiparallèle de type « chaise »

Bien qu'aucune structure contrainte de G-quadruplexe antiparallèle en conformation « chaise » n'ait, pour le moment, été synthétisée, nous faisons le choix d'étudier la séquence « TBA ». Il nous sera alors possible d'avoir une idée quant à l'importance de la présence et de la position de la boucle L<sub>2</sub> dans l'induction asymétrique. En effet, dans le cas d'une conformation « chaise » (Figure 99A), la boucle L<sub>2</sub> est dite latérale et ne passe pas au-dessus de la tétrade 3', tandis que dans le cas d'une conformation « panier », elle est dite diagonale et recouvre la tétrade 3' (Figure 99B). Cependant, nous devons tout de même préciser que la composition de la séquence « TBA » [d(5'<sup>G</sup>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>TGTG<sub>2</sub>T<sub>2</sub>G<sub>2</sub>3')], est significativement différente de la composition télomérique humaine (TTAGGG)<sub>n</sub>, avec  $n \in \mathbb{N}$ .



**Figure 99** : Représentation A) du G-quadruplexe « TBA » en conformation « chaise » et B) du G-quadruplexe « HT21 + T » en conformation « panier ».

Cette étude étant faite en fin de thèse, seule la proportion 2 mol% en G-quadruplexe est employée, dans les conditions usuelles de réaction. On observe un rendement de 12 % et un excès énantiomérique de 17 % pour le *p*-méthylthioanisole, plus faibles que ceux observés en présence du G-quadruplexe « HT21 + T ». Concernant le 2-bromothioanisole, le rendement de sulfoxydation est trop faible pour que le résultat puisse être commenté (Tableau 16).

**Tableau 16** : Comparaison des résultats de sulfoxydation du *p*-méthylthioanisole et du 2-bromothioanisole.

Substrat	G-quadruplexe	Rendement (%)	ee (%)
<i>p</i> -méthylthioanisole	« TBA »	12	17
	« HT21 + T »	17	19
2-bromothioanisole	« TBA »	2	-4
	« HT21 + T »	7	-43

Les réactions sont faites dans une solution de tampon de MOPS (20 mM, pH = 7,0), en présence de KCl (150 mM). N.B. : La réaction est faite en présence de 2 mol% de G-quadruplexe et de 1 mol% de Cudmbipy.

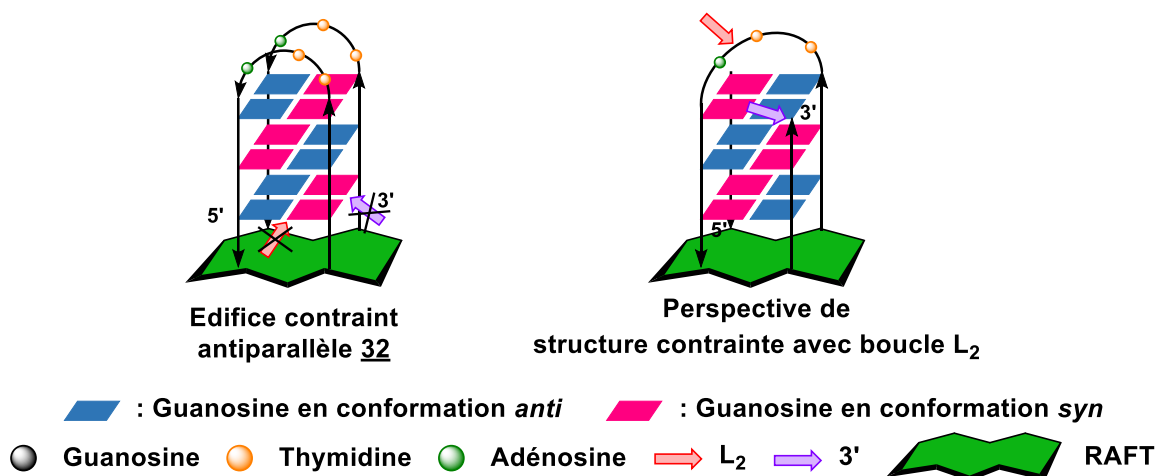


Il est alors envisageable que la position de la boucle  $L_2$  soit déterminante dans l'énantiosélectivité de la réaction. Des excès énantiomériques plus importants sont, en effet, observés avec la conformation « panier », *i.e.* lorsque la boucle  $L_2$  est diagonale, qu'avec la conformation « chaise » comportant une boucle  $L_2$  latérale. Il est ainsi possible que le « recouvrement » de la face 3' par une boucle diagonale permette la formation d'une poche hydrophobe plus importante, facilitant alors les interactions avec le substrat.

#### V.4. Bilan et perspectives pour la topologie antiparallèle

Lors de cette étude sur la topologie antiparallèle, nous avons pu observer que la présence du RAFT bloque la réaction de sulfoxydation. Ce résultat semble alors confirmer que les interactions entre le G-quadruplexe et le substrat se déroulent bien au niveau de la face 3' et/ou de la boucle  $L_2$  (Figure 100A). Cependant, la boucle  $L_2$  étant absente de la structure contrainte, nous ne pouvons dire si celle-ci est essentielle, ou non, dans l'induction asymétrique de la réaction. Il serait alors particulièrement intéressant de mettre au point la synthèse d'une structure contrainte antiparallèle de type « panier », mais comportant une boucle  $L_2$ , diagonale (Figure 100B).

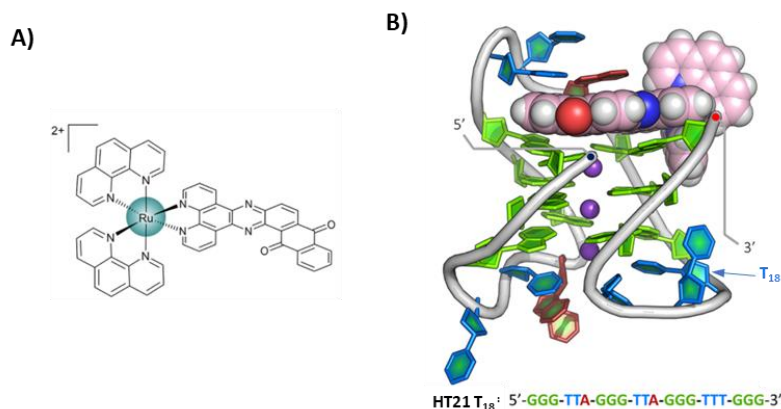
#### Topologie antiparallèle de type "panier"



**Figure 100** : Représentation d'édifices contraints en topologie antiparallèle de type « panier ». A) Structure **32**, ancrée au RAFT du côté de la face 3', empêchant la formation d'une boucle  $L_2$ . B) Perspective de structure contrainte comportant une boucle  $L_2$  et la face 3' libre.

De plus, au vu des résultats observés en présence des conformations de type « panier » et « chaise », nous pouvons supposer que la position de la boucle  $L_2$  est déterminante dans l'induction asymétrique. En effet, des excès énantiomériques plus importants sont observés en présence d'une conformation « panier », *i.e.* lorsque la boucle  $L_2$  est diagonale et recouvre alors la face 3'. Il est ainsi envisageable que la présence de la boucle  $L_2$  permette la formation d'une poche hydrophobe plus importante, que dans le cas d'une boucle latérale, facilitant ainsi les interactions asymétriques avec le substrat. Cependant, il est important de rappeler que la séquence « TBA » [ $d(5'G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_23')$ ] est significativement différente de la séquence télomérique humaine. Une étude a récemment été publiée montrant que la

séquence « HT21 T<sub>18</sub> » [d(5'G<sub>3</sub>(TTAGGG)<sub>2</sub>TTG<sub>3</sub>3')] adopte une conformation de type « chaise ». <sup>114</sup> Il aurait alors été intéressant de réaliser la réaction de sulfoxydation avec cette séquence, plus proche de la séquence télomérique humaine utilisée lors des études en catalyse. Il est notamment observé, lors de cette étude, qu'un complexe plan de ruthénium (Figure 101A) se place sélectivement au niveau de la face 3', la boucle L<sub>2</sub> venant prendre en « sandwich » le complexe (Figure 101B). L'observation de cette poche hydrophobe autour du complexe nous conforte ainsi dans nos hypothèses quant à l'importance de cette boucle dans l'induction asymétrique.



**Figure 101** : Représentation (A) du complexe de ruthénium et (B) de son interaction avec « HT21 T<sub>18</sub> », au niveau de la face 3'. Figure tirée de la publication : *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 13, 5956–5964. <sup>114</sup>

## VI. Conclusion et perspectives sur la catalyse

Lors des travaux présentés dans ce chapitre, nous avons pu optimiser les conditions de la réaction de sulfoxydation de dérivé du thioanisole, présentée par Can Li. De ce fait, la réaction a pu être adaptée aux conditions de réaction du laboratoire, permettant alors d'obtenir des résultats comparables à la publication de référence, tout en étant reproductibles. Il a de plus été choisi de mettre en place des droites d'étalonnage afin de pouvoir quantifier les rendements de réaction, tandis que seules des conversions sont présentées par Can Li.

Des premiers essais de catalyse, en présence de structures « sur gabarit », ont montré que la présence du RAFT, seul ou ancré à une extrémité d'un G-quadruplexe, ne semble pas avoir d'influence significative sur l'induction asymétrique de la réaction. Néanmoins, plusieurs hypothèses ont pu être faites quant à **la formation d'une poche hydrophobe accessible**, de par la présence du RAFT, favorisant ainsi les interactions du substrat à ce niveau. Enfin, lors de ces essais, nous avons pu mettre en évidence que la **réaction de sulfoxydation est substrat dépendante**, des comportements significativement différents étant observés pour les composés *p*-méthylthioanisole et 2-bromothioanisole. Cette observation semble ainsi confirmer l'hypothèse soulevée par Can Li selon laquelle, l'induction asymétrique est faite lors

<sup>114</sup> McQuaid, K. T., Takahashi, S., Baumgaertner, L., Cardin, D. J., Paterson, N. G., Hall, J. P., Sugimoto, N., Cardin, C. J., *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 5956-5964.

de l'approche du G-quadruplexe par le substrat, et non nécessairement par la formation d'un complexe supramoléculaire chiral [G-quadruplexe – complexe de cuivre].

Dans un second temps, des études ont été menées sur les topologies parallèles et antiparallèles, contraintes ou libres, lors des réactions de catalyse de sulfoxydation. Les observations et hypothèses suivantes ont alors été faites :

▪ **Topologie antiparallèle :**

- Lors des essais avec l'édifice contraint antiparallèle **32**, il a pu être observé que **l'accès à la face 3' et la boucle L<sub>2</sub> est primordial** pour la réaction de sulfoxydation et l'induction asymétrique (Figure 102A).
- La **position de la boucle L<sub>2</sub> semble déterminante** dans l'induction asymétrique. De meilleurs résultats ont, en effet, été observés lorsque la boucle L<sub>2</sub> est dite « diagonale », *i.e.* recouvrant la face 3', formant alors potentiellement une meilleure poche hydrophobe que dans le cas d'une boucle dite « latérale » (Figure 102B).

▪ **Topologie parallèle :**

- Les essais en présence de « flanking » court et long semblent montrer l'existence de **deux sites d'induction asymétrique antagonistes**. Il a alors été fait l'hypothèse que la face 5' favorise un excès énantiomérique « positif » tandis que la face 3' favoriserait un excès « négatif », comme représenté sur la (Figure 102C et D).
- En présence de « **flanking** » long, *i.e.* long d'au moins deux nucléotides, les excès énantiomériques sont exclusivement « positifs », que ce soit en présence des édifices contraints ou libres (Figure 102E). Il a alors été supposé que ce « flanking » long se comporte comme des boucles externes « mobiles », **favorisant les interactions au sein des sillons**.

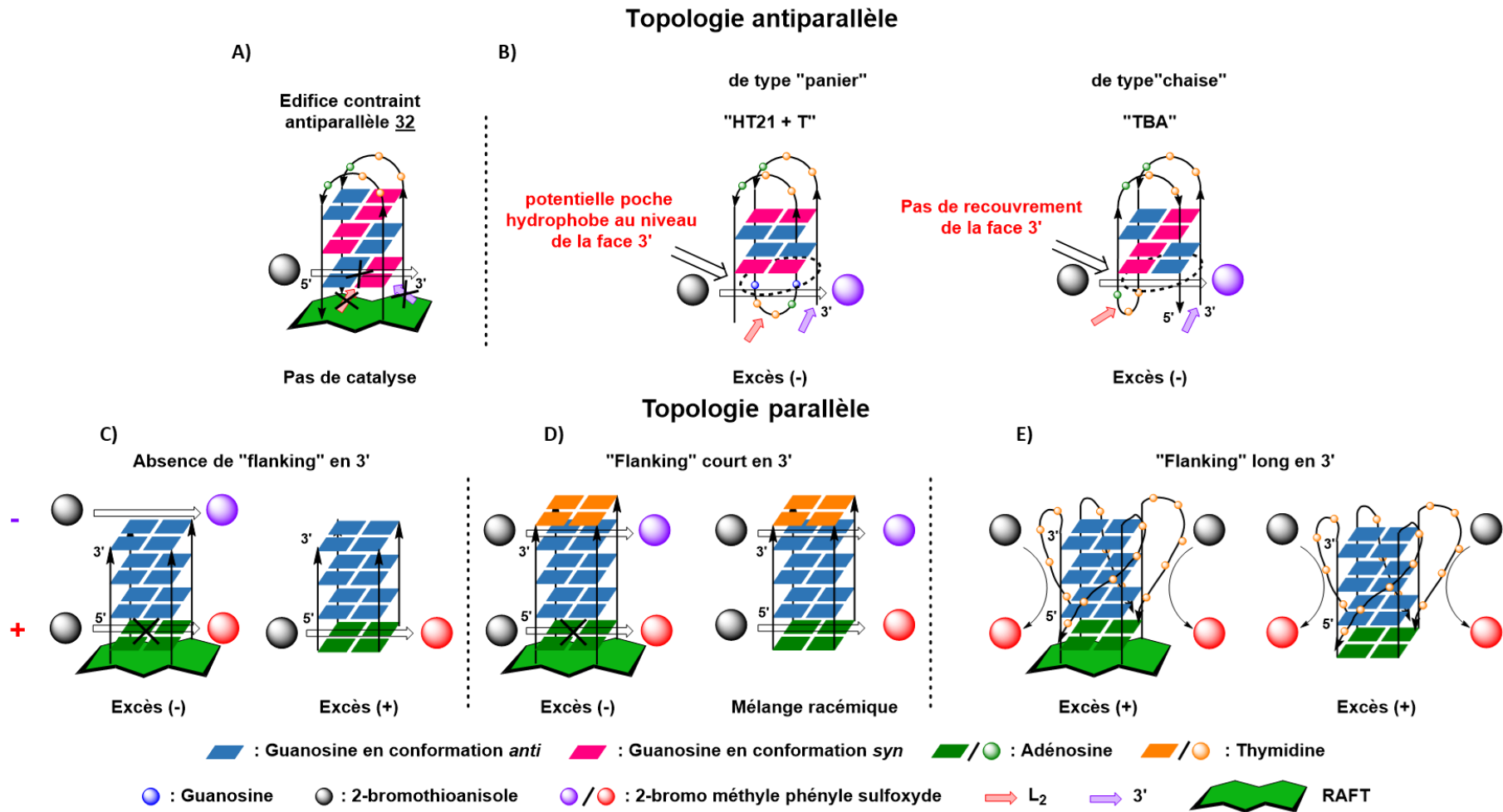
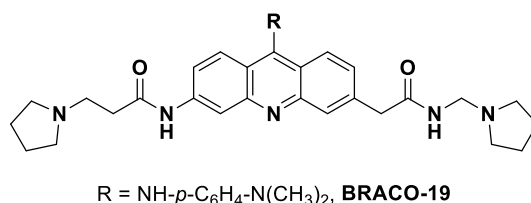


Figure 102 : Illustration des inductions asymétriques observées pour (A) la topologie antiparallèle et (B, C, D) la topologie parallèle, selon la longueur du flanking en position 3'.

A la vue de ces résultats, nous pouvons alors affirmer qu'il est primordial de connaître et maîtriser la topologie des G-quadruplexes en catalyse asymétrique. Bien que nous ayons pu constater que les tétrades extérieures des G-quadruplexes semblent être les sites les plus sensibles au contrôle asymétrique, la présence de « flanking » important sur les structures parallèles semble montrer que les sillons sont aussi impliqués. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse à l'avenir *via* l'utilisation de ligands spécifiques des sillons, tel que BRACO-19 (Figure 103), lors de la réaction de catalyse.<sup>115</sup>



**Figure 103** : Représentation d'un ligand spécifique des sillons de G-quadruplexes, BRACO-19.

Une alternative possible pour mettre en évidence l'induction asymétrique au niveau des sillons serait la mise en place d'une compétition d'affinité au niveau des tétrades extérieures, *via* l'utilisation d'une porphyrine de magnésium, inactive en catalyse. Enfin, il serait particulièrement intéressant d'essayer de mettre en place une étude par « docking » de la réaction de catalyse en présence du complexe Cu*dm*bipy, afin de déterminer à la fois les zones d'interactions susceptibles et le positionnement du « flanking » vis-à-vis du G-quadruplexe. La formation de boucles externes « souples » peut aussi être mise en évidence par fluorescence *via* l'incorporation de la 2-aminopurine dans la composition des « flanking ».<sup>113</sup>

Concernant les topologies antiparallèles, la synthèse d'une structure contrainte possédant une boucle L<sub>2</sub> « diagonale » semble être le meilleur moyen pour observer l'importance de celle-ci dans l'induction asymétrique.

<sup>115</sup> Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.-P., *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 627-636.

---

## Conclusion générale

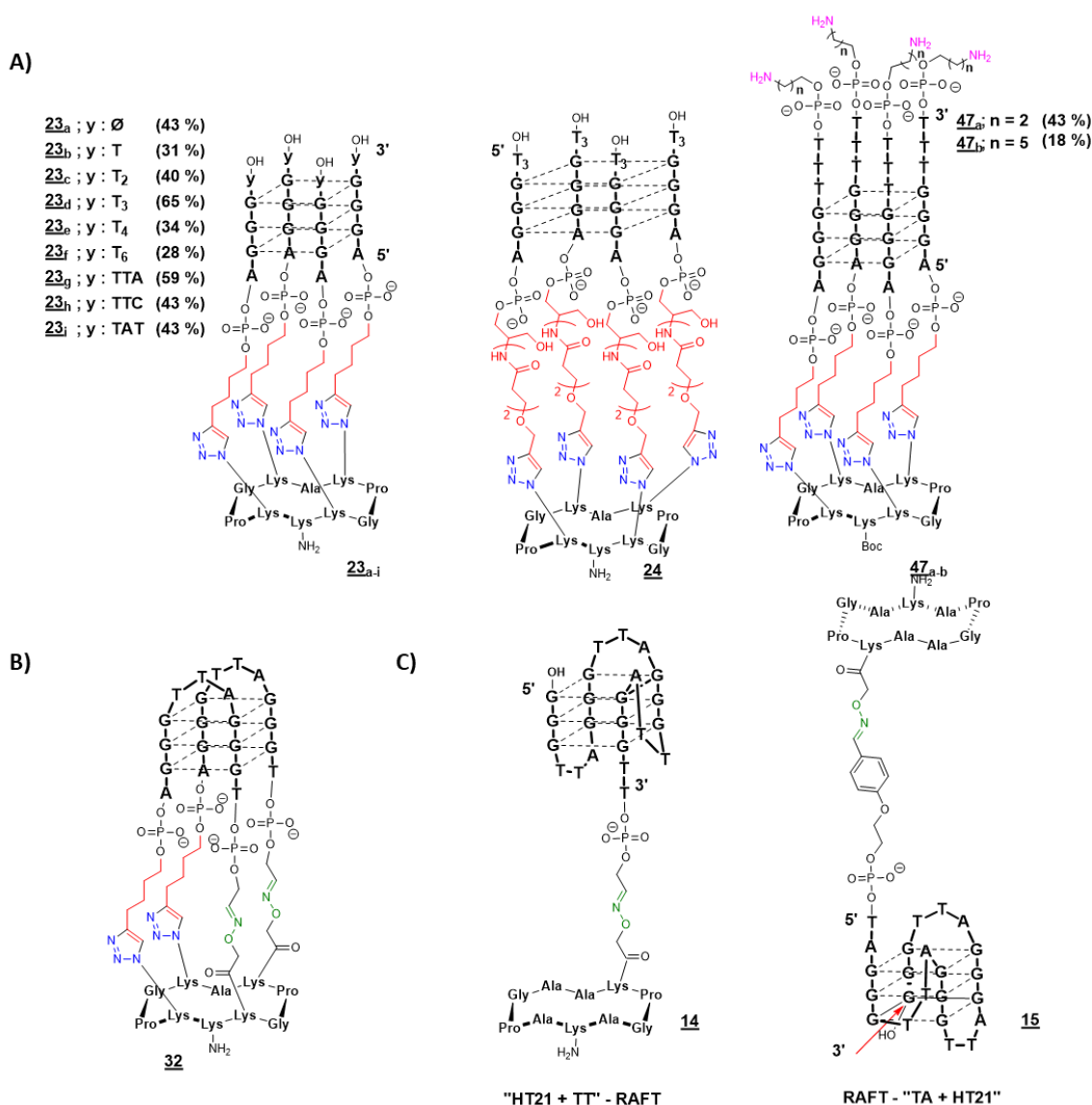
---

« La nature a doté les acides nucléiques, ADN et ARN, de propriétés fascinantes qui leur permettent de se plier en structures tridimensionnelles complexes, à l'origine de leur diversité fonctionnelle et de leur réactivité ». <sup>116</sup> Parmi les nombreuses structures pouvant être adoptées par l'ADN, une attention particulière est portée aux G-quadruplexes, dans le but de les utiliser en tant qu'auxiliaires de catalyse. Bien que D. Sen ait décrit, en 1998, l'utilisation de G-quadruplexes pour booster l'activité de type peroxydase de l'hémine, il faut attendre 2010 pour comprendre tout le potentiel de cet édifice. En effet, en 2010, l'équipe de J.E. Moses décrit pour la première fois une réaction de catalyse asymétrique en présence de G-quadruplexes. Depuis, de nombreux autres exemples de réactions, telles que des Diels-Alder, Friedel & Crafts ou encore des additions de Michael, ont pu être décrites. Il a alors pu être observé que le polymorphisme important des G-quadruplexes joue un rôle déterminant dans le contrôle de l'énantiosélectivité des réactions de catalyse. Des inductions antagonistes ont pu être observées selon la nature de la topologie majoritairement adoptée par le G-quadruplexe. Or, bien qu'il soit possible de favoriser une topologie par rapport aux autres en jouant sur les conditions de réaction, ou la nature des séquences d'ODN mises en jeu, il existe toujours un équilibre entre chacune des topologies. De ce fait, le polymorphisme important des G-quadruplexes, dépendant des conditions de réactions, représente à la fois un avantage, mais peut aussi être un handicap, pour l'élaboration de catalyseurs asymétriques efficaces.

Dans ce contexte, le premier chapitre de cette thèse décrit la synthèse de treize mimes de G-quadruplexes à topologie contrainte. Ainsi, douze édifices tétramoléculaires, contraints en topologie parallèle, ont pu être obtenus après bio-conjugaison par ligation CuAAC entre des séquences courtes d'ODN et un châssis cyclodécapeptide, nommé RAFT (Figure 104A). La combinaison de ligations de type éther d'oxime et CuAAC, a permis de concevoir un mime contraint en topologie antiparallèle (Figure 104B). Enfin, deux structures « sur gabarit », *i.e.* des G-quadruplexes naturels ancrés à l'une de leurs extrémités au RAFT *via* une ligation bio-orthogonale, ont été obtenus (Figure 104C).

---

<sup>116</sup> Micura, R., Höbartner, C., *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 7331-7353.



**Figure 104** : Représentation des structures de G-quadruplexes contraints en topologie (A) parallèle et (B) antiparallèle, ainsi que (C) des édifices « surbarit ».

Chacune de ces structures à topologie contrainte, ainsi que des séquences d'ODN libres équivalentes, a pu être étudiée dans le chapitre II par dichroïsme circulaire. La ou les séquences libres ont, généralement, montré un polymorphisme dépendant des conditions d'analyse. Il a pu être confirmé que les édifices contraints conservent leur topologie, indépendamment des conditions. De plus, des résultats particulièrement intéressants ont pu être observés concernant les structures tétramoléculaires parallèles. En effet, du fait de la contrainte imposée par la présence du RAFT, il a pu être montré qu'il est possible d'observer « instantanément » une structuration en G-quadruplexe parallèle et ce indépendamment de la concentration en ODN. Par comparaison, il a été nécessaire de préalablement conditionner les séquences d'ODN libres à une concentration de l'ordre de 1 mM pour observer une structuration en G-quadruplexe, et ce uniquement en présence de KCl. L'apport de la contrainte s'est aussi traduit par des gains de stabilité particulièrement importants par rapport aux structures libres. A titre indicatif, des  $\Delta T_m \geq +50$  °C, en faveur des édifices



contraints, ont été mesurés pour les édifices contraints parallèles en présence de KCl, les  $T_m$  n'ayant pu être déterminés pour les structures libres en présence de NaCl et LiCl (Tableau 17). Des  $\Delta T_m$  respectif de +23 et +27 °C ont, quant à eux, été déterminés pour la structure contrainte **32** par rapport aux séquences antiparallèles « HT21 + T » et « TBA », dans les conditions de réaction de sulfoxydation.

**Tableau 17** : Récapitulatif des valeurs de  $T_m$  (°C) observés pour une structure parallèle, libre et contrainte, et les différentes structures antiparallèles.

G-quadruplexe	Parallèle		Antiparallèle		
	<b>23<sub>d</sub></b> <i>contraint</i>	$[d(5'AGGG\ T_3^{3'})]_4$ <i>libre</i>	<b>32</b> <i>contraint</i>	« HT21 + T » <i>libre</i>	« TBA » <i>libre</i>
KCl	> 95 °C	49 °C	80 °C	57 °C	53 °C
NaCl	63 °C	/	71 °C	/	24 °C

Enfin, après avoir décrit les conditions de réaction utilisées dans la publication de Can Li, publication ayant servi de référence tout au long de ces travaux de thèse, des optimisations ont pu être présentées en début de chapitre III. Lors des essais en présence des édifices contraints, les meilleurs résultats de catalyse ont été obtenus en présence des topologies parallèles de G-quadruplexes. La taille du « flanking », ainsi que la présence ou non du RAFT, a permis d'observer plusieurs sites potentiellement responsables de l'induction asymétrique (Figure 105). Enfin, il a pu être confirmé l'importance de la contrainte des topologies lors des catalyses en présence de différents cations. En effet, il est possible d'observer des excès énantiomériques indépendamment des conditions pour les édifices contraints, tandis que les séquences libres nécessitent la présence de KCl. La structure contrainte en topologie antiparallèle ne s'est pas révélée, à ce jour, être pertinente vis-à-vis de la sulfoxydation de dérivés du thioanisole.

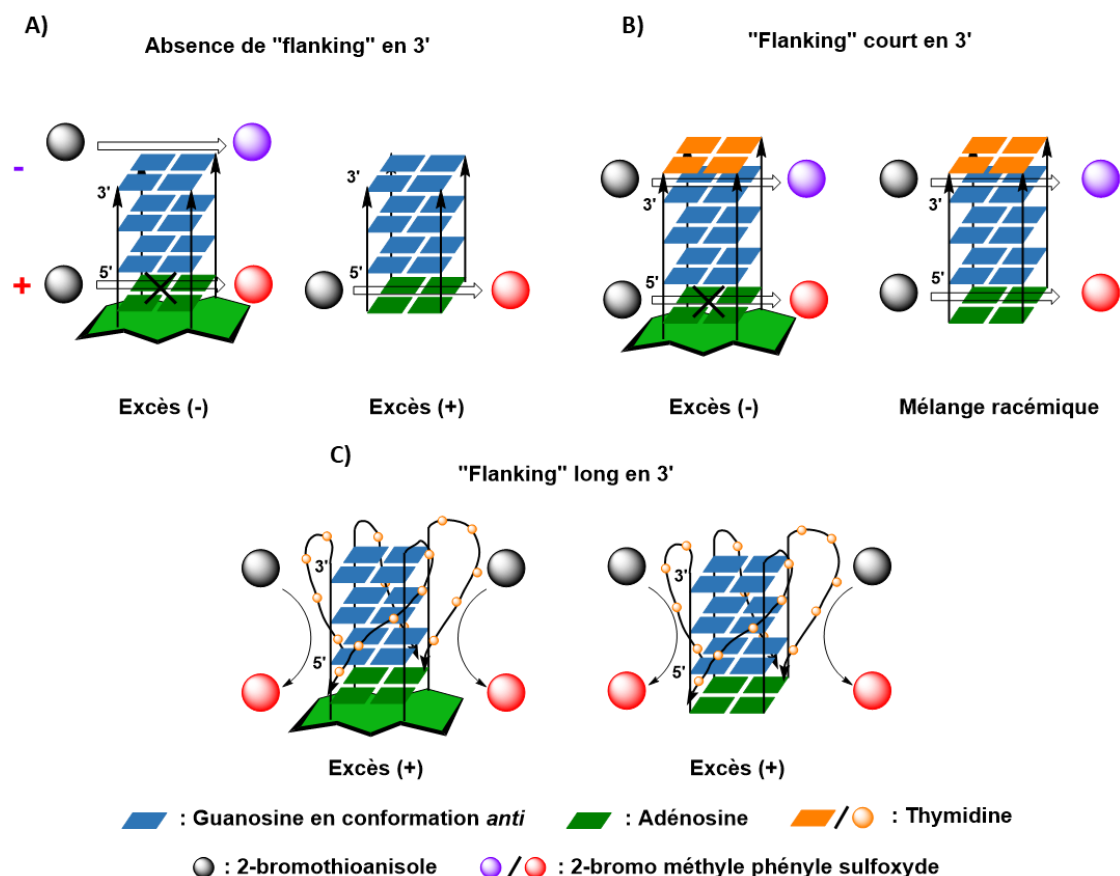
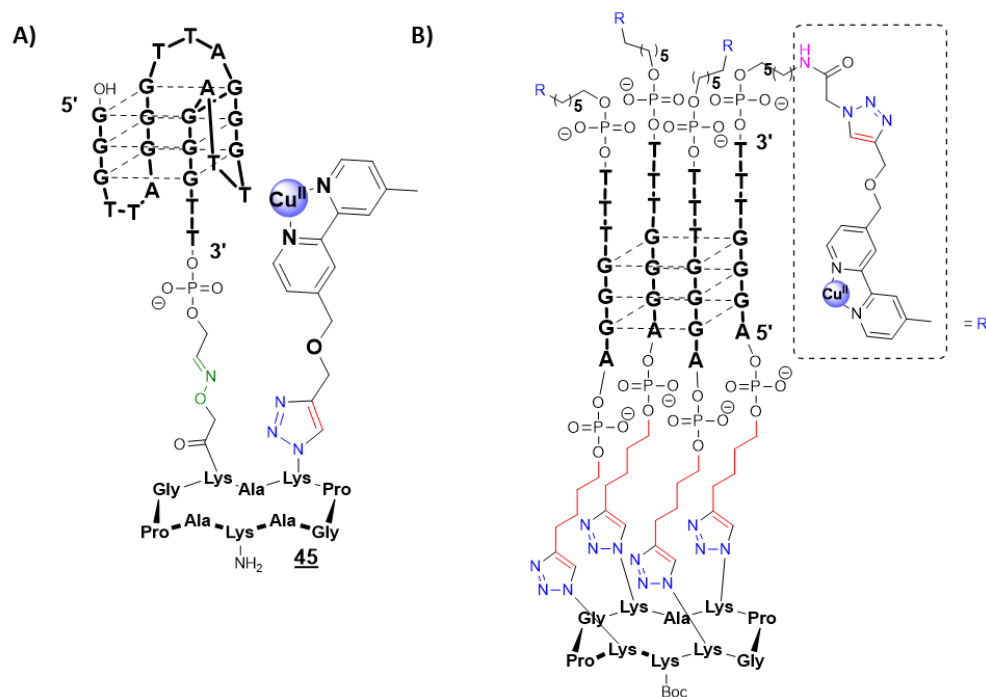


Figure 105 : Illustration des résultats de catalyse asymétrique observés en présences des structures parallèles.

Ainsi, lors de cette thèse, il a pu être montré qu'il est possible de contraindre la topologie d'un G-quadruplexe *via* l'utilisation de ligations bio-orthogonales, stabilisant alors fortement l'ensemble de la structure. Les travaux réalisés en catalyse ont montré que la topologie parallèle est la topologie la plus intéressante vis-à-vis de la réaction de sulfoxydation. Enfin, la contrainte imposée aux G-quadruplexes a permis de réaliser les catalyses de sulfoxydation asymétrique, indépendamment des conditions de réaction.

Cependant, la conception de catalyseur chiraux à partir d'oligonucléotides contraints ne représente encore qu'un concept, que ces travaux de thèse ont pu valider. De nombreuses études complémentaires sont encore nécessaires pour espérer pouvoir rivaliser avec les systèmes catalytiques actuels. Il est, en effet, primordial, dans un premier temps, d'améliorer les rendements et excès énantiomériques lors de la réaction de sulfoxydation. Pour cela, la conception de structures contraintes liées de façon covalente au complexe catalytique semble être la stratégie la plus évidente à mettre en place. Les ligations peuvent alors être faites soit sur le châssis peptidique (Figure 106A), soit directement sur la séquence d'oligo-désoxyribonucléotides (Figure 106B). Pour cela, plusieurs voies de synthèse ont été proposées au chapitre I, mais nécessitent encore des optimisations.



**Figure 106** : Représentation des structures de G-quadruplexes liés de façon covalente au complexe de cuivre Cudmbipy, (A) au niveau du RAFT ou (B) en bout de séquence d'ODN.

Afin d'introduire le moins de paramètres possibles, il me semble important de focaliser les futurs efforts sur les édifices parallèles. Il s'agit, en effet, des édifices contraints les plus simples à concevoir, tous les brins d'ODN étant orientés dans le même sens, un seul type de ligation est nécessaire lors de la synthèse. De plus, de par leur topologie parallèle, toutes les faces latérales et tous les sillons sont identiques. Ainsi, dans le cas d'une induction asymétrique au niveau des sillons, il sera possible de profiter de tous les sillons disponibles dans la structure. L'adage : « pourquoi faire compliqué, quand on peut faire simple » prend alors tout son sens ici.

Enfin, il est nécessaire de continuer les études réalisées sur l'utilisation de solvants organiques. En effet, bien qu'une présence plus importante d'acétonitrile semble être défavorable à l'induction asymétrique, une étude préliminaire a montré qu'il est possible d'utiliser des solvants organiques tels que le THF ou l'acétone sans observer de perte d'énantiosélectivité. Il est alors primordial de comprendre les mécanismes mis en jeu afin d'élargir le panel de substrats disponibles pour les réactions de catalyse en présence de G-quadruplexes. De cette manière, il serait alors possible d'explorer la synthèse de composés d'intérêt industriel, tel que l'Oméprazole, par exemple. Bien entendu, l'utilisation de techniques d'analyse structurale, telles que la RMN ou la cristallographie serait un véritable plus pour comprendre l'organisation des structures contraintes, et, notamment, le positionnement des « flanking » vis-à-vis du G-quadruplexe. Cela permettrait alors de déterminer réellement les mécanismes mis en jeu lors de l'induction asymétrique.

---

## Partie expérimentale

---

## I. Materials and equipment

Protected amino acids and PyBOP were purchased from Activotec (Cambridge, UK), Bachem Biochimie SARL (Voisins-les-Bretonneux, France), France Biochem SA (Meudon, France), Merck Eurolab (Fontenay-sous-Bois, France) or Calbiochem-Novabiochem (Merck Biosciences - VWR, Limonest, France).

Other reagents were obtained from Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), Acros (Noisy-le-Grand, France) and Eurogentec (Angers, France). All solvents and reagents used were of highest purity commercially available.

Electron spray ionization mass spectra (ESI-MS) were obtained on an Esquire 3000 (Bruker) or on an Acquity (UPLC-MS) system from Waters equipped with a SQ Dectector 2. The multiply charged data produced by the mass spectrometer on the  $m/z$  scale were converted to the molecular weight. Peptides were analysed in positive mode and oligonucleotides and conjugates in negative mode. Water was of Milli-Q quality and was obtained after filtration of distilled water through a Milli-Q® cartridge system. CH<sub>3</sub>CN and TFA were HPLC quality. NMR spectra were recorded on a BRUKER Advance 400 spectrometer. Chemical shifts were expressed in ppm and calculated taking the solvent peak as an internal reference. During catalysis, samples were thermostated and agitated using a ThermoMixer C (Eppendorf).

## II. General procedure for peptide synthesis

The synthesis was performed on a Syro II synthesizer using Fmoc/*t*Bu strategy on a 2-chlorotrityl resin. The course of reactions was monitored by using UPLC-MS system Waters, it includes reverse phase chromatography using Nucleosil C18 column (130 Å, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm) and dual UV detection at 214 nm and 250 nm and by electron spray ionization mass spectrometry. A 0.6 mL/min flow linear gradient from 95 % solvent A (0.1 % formic acid in water) and 5% solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile) to 100 % B for 4 minutes was applied.

RP-HPLC purifications were performed on a Gilson or Waters system with Nucleosil C18 column (100 Å, 250 x 21 mm, 7 µm) with UV monitoring at 214 nm and 250 nm. A 22 mL/min flow linear gradient was applied from 95 % solvent A (0.1 % formic acid in water) and 5 % solvent B (0.1 % formic acid in acetonitrile) to 100 % B for 15 minutes.

### II.1. Syntheses of linear protected peptides by SPPS

Peptides were synthesised using commercially available 2-chlorotrityl resin with a loading of 0.78 mmol/g. Fmoc-Gly-OH (3 eq.) was coupled on the resin in anhydrous DCM in a glass reaction vessel fitted with a sintered glass. The pH was adjusted around 8 using DIEA. The mixture was stirred for 1 h at room temperature. The resin was washed using a DCM/MeOH/DIEA solution (17/2/1, v/v/v). Fmoc protecting group was removed using three washes with 20 % piperidine in DMF (40 mL). A resin loading of 0.35 mmol/g was measured by quantifying free dibenzofulvene using UV absorbance at 299 nm. The elongation was performed on a Syro II using Fmoc/*t*Bu strategy on the above-prepared resin. Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH and Fmoc-Pro-OH were commercially

available. Fmoc-azidonorleucine<sup>117</sup> and Fmoc-Lys(-CO-CH<sub>2</sub>-O-N=Eei)-OH<sup>57</sup> were obtained using reported protocols. The synthesizer uses amino acid at 4 equiv., DIEA and HBTU as activators. Unless otherwise stated, supported peptide was separated from the resin using a DCM/TFA solution (99/1, v/v). The solution was evaporated under vacuum and the peptides were precipitated in diethyl ether as a white powder.

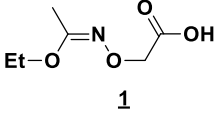
## II.2. General procedure for cyclisation reactions

Linear peptides were dissolved in DMF to reach a 0.5 mM concentration and 1.2 equiv. of PyBOP was added. The pH was adjusted to 8 - 9 using DIEA and the solution was stirred at room temperature until the complete peptide cyclisation (UPLC monitoring). The solvent was evaporated under vacuum then the crude peptides were precipitated in diethyl ether. The crude products were purified on RP-HPLC and freeze-dried to obtain white powders.

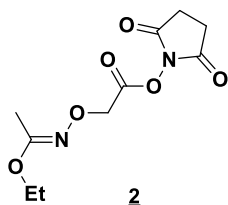
## II.3. General procedure for N-ε Boc or oxyamine deprotection

Peptides were dissolved in a TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/4.5/0.5, v/v/v) solution and the mixture was stirred for 30 min at room temperature. The solvent was then evaporated under vacuum and the crude peptides were precipitated in diethyl ether as white powders.

## II.4. Experimental procedures

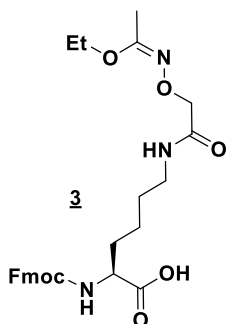
<b>2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetic acid (<u>1</u>)</b>	
 <p style="text-align: center;">1</p>	<p>To a stirred solution of iodoacetic acid (9.00 g, 48.4 mmol) in water (19 mL) at 0 °C was added aqueous NaOH (3.0 mL, 40 % w/w). The resulting solution was allowed to heat to room temperature, after ethyl N-hydroxyacetimidate (6.0 g, 58.3 mmol) was added followed by aqueous NaOH (4.5 mL, 40 % w/w) and water (19 mL) (pH of solution &gt;12). After 5 h of stirring at 80 °C and cooling to room temperature, water was added (70 mL) and the aqueous mixture was washed with DCM (3 x 50 mL). The aqueous phase was cooled at 0°C and the pH was adjusted to 2-3 with a 1 M hydrochloride solution. The acidified water phase was then extracted with EtOAc (4 x 50 mL). (NB: After each extraction, the pH was adjusted to 2-3 with a 1 M hydrochloride solution). The combined organic phases from this last extraction was washed with brine (50 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under vacuum, providing the compound as a colourless oil (7.41 g, 45.8 mmol, yield: 95 %).</p>
<p><b><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ(ppm):</b> 4.49 (2H, s), 4.00 (2H, q, J = 7.0 Hz), 2.01 (3H, s), 1.27 (3H, t, J = 7.2 Hz).</p>	

<sup>117</sup> Byrne, C., McEwan, P. A., Emsley, J., Fischer, P. M., Chan, W. C., *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2589-2591.

**N-hydroxysuccinimidyl 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetate** Erreur ! Signet non défini. (**2**)

To a stirred solution of 2-(1-Ethoxyethylideneaminoxy)acetic acid **1** (7.41 g, 45.8 mmol) and N-hydroxysuccinimide (6.80 g, 59.8 mmol) in ethyl acetate / dioxane (120 mL, 1/1, v/v) at 0 °C was added DCC (11.4 g, 55.2 mmol) in one portion. The resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The formed DCU was filtered off and the filtrate concentrated under vacuum. The obtained residue was dissolved in ethyl acetate (200 mL), and the solution was washed with 5 % aqueous NaHCO<sub>3</sub> (2 x 75 mL), water (75 mL), and brine (75 mL). The organic solution was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum which affording **2** without further purification (11.1 g, 42.0 mmol, yield: 83 %).

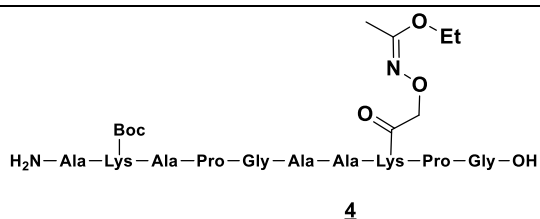
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 4.78 (2H, s), 4.01 (2H, q, J = 7.1 Hz), 2.84 (4H, s), 1.98 (3H, s), 1.26 (3H, t, J = 7.1 Hz).

**Fmoc-Lys(Eei)-OH (3)**

The Fmoc-Lys-OH (1 equiv., 16.3 mmol, 6.0 g) was dissolved in DMF (100 mL), the pH was adjusted to 8-9 using DIEA. A solution of compound **2** (1.2 equiv., 19.6 mmol, 5.6 g) in DMF (40 mL) was added dropwise during 20 min and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. The solvent was evaporated. The obtained residue was dissolved in EtOAc (100 mL), and the solution was washed with 10 % aqueous citric acid (3 x 50 mL), and brine (100 mL). The organic solution was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated under vacuum to obtain a yellow powder (15.8 mmol, 8.1 g, yield: 97 %).

R<sub>t</sub> = 2.11 min (UPLC)

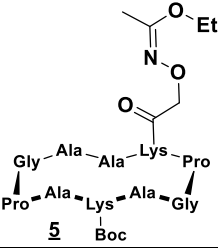
ESI MS(+) *m/z* calcd for C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>: 512.23, *m/z* found: 512.18 [M+H]<sup>+</sup>

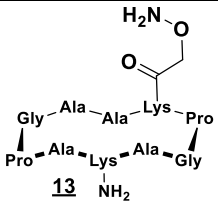
**Linear peptide (4)**

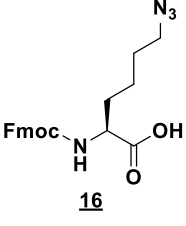
The linear decapeptide **4** was synthesized using modified amino acid **3** and the general protocol II.1., but was separated from the resin using a DCM/TFE/AcOH solution (70/20/10, v/v/v). The crude product was used without purification.

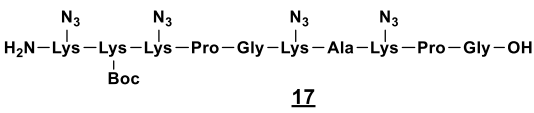
R<sub>t</sub> = 1.33 min (UPLC)

UPLC-MS(+) *m/z* calcd for C<sub>49</sub>H<sub>83</sub>N<sub>13</sub>O<sub>16</sub>: 1110.61, *m/z* found: 1110.89 [M+H]<sup>+</sup>

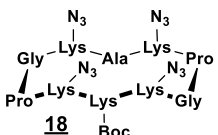
<b>RAFT <u>5</u></b>	
 <p style="text-align: center;"><b>5</b></p>	<p>The linear peptide <b>4</b> (219 mg, 197 <math>\mu</math>mol) was cyclized using the general procedure <b>II.2</b>. The crude product was purified on RP-HPLC and freeze-dried to obtain a white powder (191 mg, 130 <math>\mu</math>mol, yield: 66 %).</p>
<p><math>R_t = 1.69</math> min (UPLC)</p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <math>m/z</math> calcd for <math>C_{49}H_{81}N_{13}O_{15}</math>: 1092.60, <math>m/z</math> found: 992.80 [M+H-Boc]<sup>+</sup></p>	

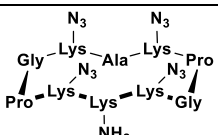
<b>RAFT <u>13</u></b>	
 <p style="text-align: center;"><b>13</b></p>	<p>The deprotection was carried out using the general method <b>II.3</b>. using peptide <b>5</b> (1.80 mg, 1.65 <math>\mu</math>mol). After precipitation in diethyl ether the product was used without any further purification.</p>
<p><math>R_t = 0.81</math> min (UPLC)</p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <math>m/z</math> calcd for <math>C_{40}H_{67}N_{13}O_{12}</math>: 922.50, <math>m/z</math> found: 922.80 [M+H]<sup>+</sup></p>	

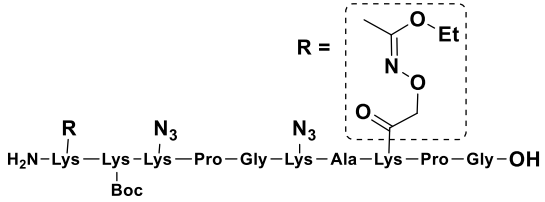
<b>Fmoc-azidonorleucine (<u>16</u>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>16</b></p>	<p>Fmoc-Lys-OH (1 equiv., 10.5 mmol, 4.2 g), <math>CuSO_4</math> (0.04 equiv., 0.42 mmol, 0.11 g), <math>NaHCO_3</math> (3.5 equiv., 36.9 mmol, 3.10 g) and Imidazole-1-sulfonyl azide (1.2 equiv., 12.7 mmol, 2.2 g) were dissolved in a MeOH/<math>H_2O</math> solution (50 mL, 1/1). pH 8-9 was adjusted using a solution of saturated <math>NaHCO_3</math>. The mixture was stirred overnight at room temperature. pH 2 was adjusted using a 3 M hydrochloric acid solution and EtOAc (60 mL) was added. The solution was washed with saturated <math>NaHCO_3</math> solution (8 x 60 mL) and brine (2 x 60 mL). The organic solution was dried over <math>Na_2SO_4</math> and evaporated under vacuum to obtain a yellow solid (9.5 mmol, 3.7 g, yield: 90 %).</p>
<p><math>R_t = 2.31</math> min (UPLC)</p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <math>m/z</math> calcd for <math>C_{21}H_{22}N_4O_4</math>: 395.16 <math>m/z</math> found: 394.6 [M+H]<sup>+</sup></p>	

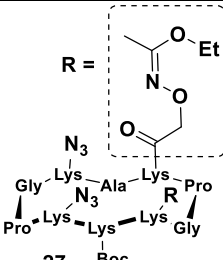
<b>Linear peptide (<u>17</u>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>17</b></p>	<p>The linear decapeptide <b>17</b> was synthesized using the modified amino acid <b>16</b> and the general protocol <b>II.1</b>. The crude product was used without any purification.</p>
<p><math>R_t = 1.70</math> min (UPLC)</p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <math>m/z</math> calcd for <math>C_{52}H_{87}N_{23}O_{13}</math>: 1242.69 <math>m/z</math> found: 1242.00 [M+H]<sup>+</sup></p>	



<b>RAFT <u>18</u></b>	
 <p><b>18</b> Boc</p>	<p>The linear peptide <b>17</b> (162 mg, 130 μmol) was cyclized using the general procedure <b>II.2</b>. The crude product was purified on RP-HPLC and freeze-dried to obtain a white powder (135 mg, 110 μmol, yield: 85 %).</p>
<p><math>R_t = 2.17</math> min (UPLC)</p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <math>m/z</math> calcd for <math>C_{52}H_{85}N_{23}O_{12}</math>: 1224.67 <math>m/z</math> found: 1225.22 [M+H]<sup>+</sup></p>	

<b>RAFT <u>19</u></b>	
 <p><b>19</b> NH<sub>2</sub></p>	<p>The deprotection was carried out using the general method <b>II.3</b>. using RAFT <b>18</b> (120 mmol, 87 mg). After precipitation in diethyl ether the product was used without any further purification.</p>
<p><math>R_t = 1.55</math> min (UPLC)</p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <math>m/z</math> calcd for <math>C_{47}H_{77}N_{23}O_{10}</math>: 1124.62 <math>m/z</math> found: 1124.87 [M+H]<sup>+</sup></p>	

<b>Linear peptide (<u>26</u>)</b>	
 <p><b>26</b></p>	<p>The linear decapeptide <b>26</b> was synthesized using the modified amino acids <b>3</b> and <b>16</b> and the general protocol <b>II.1.</b>, but was separated from the resin using a DCM/TFE/AcOH solution (70/20/10, v/v/v). The crude product was used without any purification.</p>
<p><math>R_t = 1.63</math> min (UPLC)</p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <math>m/z</math> calcd for <math>C_{64}H_{111}N_{21}O_{19}</math>: 1478.84 <math>m/z</math> found: 1478.30 [M+H]<sup>+</sup></p>	

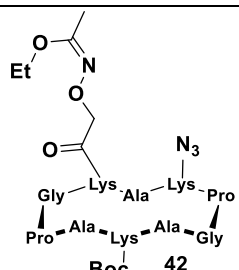
<b>RAFT <u>27</u></b>	
 <p><b>27</b> Boc</p>	<p>The linear peptide <b>26</b> (175 mg, 119 μmol) was cyclized using the general procedure <b>II.2</b>. The crude product was purified on RP-HPLC and freeze-dried to obtain a white powder (121 mg, 83 μmol, yield: 70 %).</p>
<p><math>R_t = 2.08</math> min (UPLC)</p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <math>m/z</math> calcd for <math>C_{64}H_{109}N_{21}O_{18}</math>: 1460.83 <math>m/z</math> found: 1460.14 [M+H]<sup>+</sup></p>	

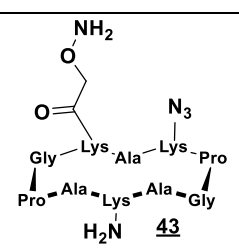
<b>RAFT <u>30</u></b>	
<p style="text-align: center;"><b>30</b></p>	<p>The deprotection was carried out using the general method <b>II.3</b>. using RAFT <b>27</b> (1.4 mg, 0.96 μmol). After precipitation in diethyl ether the product was used without any further purification.</p>
<p><b>R<sub>t</sub> = 1.13 min (UPLC)</b></p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <i>m/z</i> calcd for C<sub>51</sub>H<sub>87</sub>N<sub>21</sub>O<sub>14</sub>: 1218.67 <i>m/z</i> found: 1218.98 [M+H]<sup>+</sup></p>	

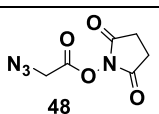
<b>Linear peptide (<u>33</u>)</b>	
<p style="text-align: center;"><b>33</b></p>	<p>The linear decapeptide <b>33</b> was synthesized using the modified amino acid <b>16</b> and the general protocol <b>II.1</b>. The crude product was used without purification.</p>
<p><b>R<sub>t</sub> = 1.76 min (HPLC)</b></p> <p><b>ESI MS(+)</b> <i>m/z</i> calcd for C<sub>50</sub>H<sub>82</sub>N<sub>16</sub>O<sub>15</sub>: 1147.61 <i>m/z</i> found: 1148.00 [M+H]<sup>+</sup></p>	

<b>RAFT <u>34</u></b>	
<p style="text-align: center;"><b>34</b></p>	<p>The linear peptide <b>33</b> (286 mg, 249 μmol) was cyclized using the general procedure <b>II.2</b>. The crude product was purified on RP-HPLC and freeze-dried to obtain a white powder (257 mg, 227 μmol, yield: 91 %).</p>
<p><b>R<sub>t</sub> = 2.20 min (UPLC)</b></p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <i>m/z</i> calcd for C<sub>50</sub>H<sub>82</sub>N<sub>16</sub>O<sub>15</sub>: 1129.60 <i>m/z</i> found: 1130.17 [M+H]<sup>+</sup></p>	

<b>RAFT <u>36</u></b>	
<p style="text-align: center;"><b>36</b></p>	<p>The deprotection was carried out using the general method <b>II.3</b>. using RAFT <b>34</b> (2.2 μmol, 2.3 mg). After precipitation in diethyl ether the product was used without any further purification.</p>
<p><b>R<sub>t</sub> = 1.54 min (UPLC)</b></p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <i>m/z</i> calcd for C<sub>42</sub>H<sub>64</sub>N<sub>16</sub>O<sub>14</sub>: 1017.48 <i>m/z</i> found: 1017.92 [M+H]<sup>+</sup></p>	

<b>RAFT <u>42</u></b>	
 <p style="text-align: center;"><b>Boc 42</b></p>	<p>The RAFT <b>42</b> was obtained after the cyclisation, according to the general procedure <b>II.2.</b>, of a linear decapeptide synthesized using the modified amino acids <b>3</b> and <b>16</b> according to the general procedure <b>II.1</b>. The crude product was purified on RP-HPLC and freeze-dried to obtain a white powder.</p>
<p><math>R_t = 1.79</math> min (<b>UPLC</b>)</p> <p><b>UPLC-MS(+)</b> <math>m/z</math> calcd for <math>C_{43}H_{72}N_{16}O_{12}</math>: 1005.55 <math>m/z</math> found: 1005.12 <math>[M+H]^+</math></p>	

<b>RAFT <u>43</u></b>	
 <p style="text-align: center;"><b>H<sub>2</sub>N 43</b></p>	<p>The deprotection was carried out using the general method <b>II.3.</b> using RAFT <b>42</b> (2.2 <math>\mu</math>mol, 2,3 mg). After precipitation in diethyl ether the product was used without any further purification.</p>

<b>Azidoacetic Acid NHS Ester <u>48</u></b>	
 <p style="text-align: center;"><b>48</b></p>	<p>The product <b>49</b> was synthesized according to the published procedure described by Galibert <i>et al.</i><sup>118</sup></p>

### III. General procedure for oligonucleotides synthesis

DNA were prepared using  $\beta$ -cyanoethylphosphoramidite chemistry on a 3400 DNA synthesizer at a 1  $\mu$ mol scale.

RP-UPLC-MS analysis were performed on a Waters UPLC-MS system, it includes reverse phase chromatography using a Nucleosil C18 column (130 Å, 2.1 x 50 mm, 1.7  $\mu$ m) and detection by UV at 260 nm and 280 nm and by electron spray ionization mass spectrometry. A 0.3 mL/min, a flow linear gradient was applied. Solvent C (triethylamine (15 mM) and hexafluoro-2-propanol (50 mM) in water) and solvent D (triethylamine (15 mM) and hexafluoro-2-propanol (50 mM) in methanol) were used. Several gradients have been used: gradient I (0-30 % B in 12.5 minutes), gradient II (0-50 % B in 12.5 minutes).

The RP-HPLC purifications of oligonucleotides were performed on a Gilson system with a Nucleosil C-18 column (Macherey-Nagel, 100 Å, 250 x 10 mm, 7  $\mu$ m) using a 4 mL/min speed

<sup>118</sup> Galibert, M., Dumy, P., Boturyn, D., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2576–2579.

with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm. Solvent A (50 mM triethylammonium acetate buffer with 5 % acetonitrile) and solvent B (acetonitrile with 5 % water) were used.

Desalting of oligonucleotides was performed by SEC on NAP 25 cartridges using the recommended protocol. Quantifications of oligonucleotides were performed at 260 nm. Molar extinction  $\epsilon_{260\text{ nm}}$  were estimated according to the nearest neighbour model.

### III.1. General procedure for DNA synthesis

Cleavage from the resin and deprotection were performed in a 28 % aqueous  $\text{NH}_3$ /methylamine (1/1) solution for 30 min at 60 °C. When no modification was introduced at the 5' position, the crude product was purified using a Glen-Pak® C-18 cartridge using the recommended protocol, otherwise the product was purified on RP-HPLC then desalted and freeze-dried.

### III.2. General procedure for 3'-diol DNA and oxidation

20 equiv. of sodium periodate were added to a solution of 3'-diol oligonucleotide in water to obtain a final concentration of  $10^{-3}$  M. The mixture was stirred for 30 min at room temperature in dark conditions. Excess of  $\text{NaIO}_4$  was then removed by SEC. The oxidation was considered quantitative and the crude oligonucleotide was used for oxime ligation without further purification.

### III.3. Experimental procedures

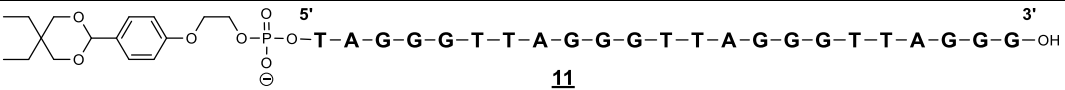
<b>"HT21" <u>6</u></b>
$\text{HO}-\overset{5'}{\text{G}}-\overset{3'}{\text{G}}-\overset{3'}{\text{G}}-\text{T}-\text{T}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{T}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{T}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{OH}$
<b><u>6</u></b>
Oligonucleotide <b><u>6</u></b> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 $\mu\text{mol}$ scale, using the general procedure <b>III.1.</b> (433 nmol, yield: 43 %, $\epsilon_{260\text{ nm}} = 215\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b><math>R_t = 4.98</math> min (UPLC, gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) <math>m/z</math> calcd for <math>\text{C}_{210}\text{H}_{259}\text{N}_{87}\text{O}_{127}\text{P}_{20}</math>: 6649.12 <math>m/z</math> found: 6649.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

<b>"HT21 + TT" <u>7</u></b>
$\text{HO}-\overset{5'}{\text{G}}-\overset{3'}{\text{G}}-\overset{3'}{\text{G}}-\text{T}-\text{T}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{T}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{T}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{T}-\text{OH}$
<b><u>7</u></b>
Oligonucleotide <b><u>7</u></b> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 $\mu\text{mol}$ scale, using the general procedure <b>III.1.</b> (355 nmol, yield: 36 %, $\epsilon_{260\text{ nm}} = 231\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b><math>R_t = 4.82</math> min (UPLC gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) <math>m/z</math> calcd for <math>\text{C}_{230}\text{H}_{285}\text{N}_{91}\text{O}_{141}\text{P}_{22}</math>: 7257.22 <math>m/z</math> found: 7257.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

<b>“TA + HT21” <u>8</u></b>
$5' \text{ HO-T-A-G-G-G-T-T-A-G-G-G-T-T-A-G-G-G-T-T-A-G-G-G-OH } 3'$
<b>8</b>
Oligonucleotide <b>8</b> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (510 nmol, yield: 51 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 236\,500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b><math>R_t = 5.00 \text{ min (UPLC gradient I)}</math></b>
<b>UPLC-MS(-) <math>m/z</math> calcd for <math>\text{C}_{230}\text{H}_{284}\text{N}_{94}\text{O}_{139}\text{P}_{22}</math>: 7266.23 <math>m/z</math> found: 7266.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

<b>“HT21 + TTx”, x = diol (<u>9</u>)</b>
$5' \text{ HO-G-G-G-T-T-A-G-G-G-T-T-A-G-G-G-T-T-A-G-G-G-T-T-O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-OH } 3'$
<b>9</b>
Oligonucleotide <b>9</b> was obtained from automated synthesis using commercially available 3'-glyceryl CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (218 nmol, yield: 22 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 231\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b><math>R_t = 4.73 \text{ min (UPLC gradient I)}</math></b>
<b>UPLC-MS(-) <math>m/z</math> calcd for <math>\text{C}_{233}\text{H}_{292}\text{N}_{91}\text{O}_{146}\text{P}_{23}</math>: 7411.22 <math>m/z</math> found: 7412.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

<b>“HT21 + TTx”, x = aldehyde (<u>10</u>)</b>
$5' \text{ HO-G-G-G-T-T-A-G-G-G-T-T-A-G-G-G-T-T-A-G-G-G-T-T-O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CHO } 3'$
<b>10</b>
Oligonucleotide <b>10</b> was oxidized using the general procedure III.2.
<b><math>R_t = 4.03 \text{ min (UPLC)}</math></b>
<b>UPLC-MS(-) <math>m/z</math> calcd for <math>\text{C}_{232}\text{H}_{288}\text{N}_{91}\text{O}_{145}\text{P}_{23}</math>: 7379.19 <math>m/z</math> found: 7379.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

<b>“xTA + HT21”, x = protected aldehyde (<u>11</u>)</b>

<b>11</b>
Oligonucleotide <b>11</b> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. without any purification (243 nmol, yield: 24 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 236\,500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b><math>R_t = 7.32 \text{ min (UPLC gradient I)}</math></b>
<b>UPLC-MS(-) <math>m/z</math> calcd for <math>\text{C}_{246}\text{H}_{307}\text{N}_{94}\text{O}_{145}\text{P}_{23}</math>: 7608.35 <math>m/z</math> found: 7609.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

<b>"xTA + HT21", x = aldehyde (<u>12</u>)</b>
<b>12</b>
Oligonucleotide <b>12</b> was deprotected using a 80 % AcOH solution for 30 min at room temperature. The deprotection was considered quantitative.
<b>R<sub>t</sub> = 5.82 min (UPLC gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) m/z calcd for C<sub>239</sub>H<sub>293</sub>N<sub>94</sub>O<sub>144</sub>P<sub>23</sub>: 7494.25 m/z found: 7494.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

<b>DNA <u>20<sub>a</sub></u></b>
<b>20<sub>a</sub></b>
Oligonucleotide <b>20<sub>a</sub></b> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (583 nmol, yield: 58 %, ε <sub>260nm</sub> = 45 200 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ).
<b>R<sub>t</sub> = 2.20 min (UPLC gradient II)</b>
<b>UPLC-MS(-) m/z calcd for C<sub>40</sub>H<sub>49</sub>N<sub>20</sub>O<sub>21</sub>P<sub>3</sub>: 1237.27 m/z found: 1236.82 [(M-2H)/2]<sup>2-</sup></b>

<b>DNA <u>20<sub>b</sub></u></b>
<b>20<sub>b</sub></b>
Oligonucleotide <b>20<sub>b</sub></b> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (522 nmol, yield: 52 %, ε <sub>260nm</sub> = 53 700 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ).
<b>R<sub>t</sub> = 3.10 min (UPLC gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) m/z calcd for C<sub>40</sub>H<sub>49</sub>N<sub>20</sub>O<sub>21</sub>P<sub>3</sub>: 1541.31 m/z found: 1541.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

<b>DNA <u>20<sub>c</sub></u></b>
<b>20<sub>c</sub></b>
Oligonucleotide <b>20<sub>c</sub></b> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (583 nmol, yield: 58 %, ε <sub>260nm</sub> = 61 800 M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> ).
<b>R<sub>t</sub> = 3.28 min (UPLC gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) m/z calcd for C<sub>60</sub>H<sub>75</sub>N<sub>24</sub>O<sub>35</sub>P<sub>5</sub>: 1845.35 m/z found: 1846.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

DNA <u>20<sub>d</sub></u>
$\begin{array}{c} 5' \qquad \qquad 3' \\ \text{HO}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{T}-\text{T}-\text{OH} \end{array}$
<u>20<sub>d</sub></u>
Oligonucleotide <u>20<sub>d</sub></u> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (434 nmol, yield: 43 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 69\,900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b>R<sub>t</sub> = 3.52 min (UPLC gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) <i>m/z</i> calcd for C<sub>70</sub>H<sub>88</sub>N<sub>26</sub>O<sub>42</sub>P<sub>6</sub>: 2149.40 <i>m/z</i> found: 1074.22 [(M-2H)/2]<sup>2-</sup></b>

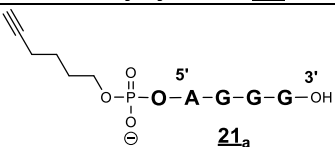
DNA <u>20<sub>e</sub></u>
$\begin{array}{c} 5' \qquad \qquad 3' \\ \text{HO}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{T}-\text{T}-\text{T}-\text{OH} \end{array}$
<u>20<sub>e</sub></u>
Oligonucleotide <u>20<sub>e</sub></u> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (610 nmol, yield: 61 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 78\,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b>R<sub>t</sub> = 4.42 min (UPLC gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) <i>m/z</i> calcd for C<sub>80</sub>H<sub>101</sub>N<sub>28</sub>O<sub>49</sub>P<sub>7</sub>: 2453.44 <i>m/z</i> found: 2452.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

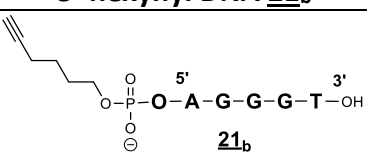
DNA <u>20<sub>f</sub></u>
$\begin{array}{c} 5' \qquad \qquad 3' \\ \text{HO}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{T}-\text{T}-\text{T}-\text{T}-\text{OH} \end{array}$
<u>20<sub>f</sub></u>
Oligonucleotide <u>20<sub>f</sub></u> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (475 nmol, yield: 48 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 94\,200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b>R<sub>t</sub> = 6.23 min (UPLC gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) <i>m/z</i> calcd for C<sub>100</sub>H<sub>127</sub>N<sub>32</sub>O<sub>63</sub>P<sub>9</sub>: 3061.54 <i>m/z</i> found: 3064.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

DNA <u>20<sub>g</sub></u>
$\begin{array}{c} 5' \qquad \qquad 3' \\ \text{HO}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{T}-\text{A}-\text{OH} \end{array}$
<u>20<sub>g</sub></u>
Oligonucleotide <u>20<sub>g</sub></u> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (430 nmol, yield: 43 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 76\,500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b>R<sub>t</sub> = 3.88 min (UPLC gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) <i>m/z</i> calcd for C<sub>70</sub>H<sub>87</sub>N<sub>29</sub>O<sub>40</sub>P<sub>6</sub>: 2158.41 <i>m/z</i> found: 2159.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

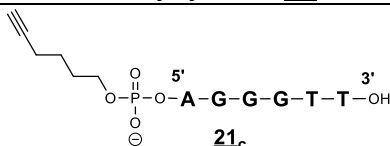
DNA <u>20<sub>h</sub></u>
$\begin{array}{c} 5' \qquad \qquad 3' \\ \text{HO}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{T}-\text{C}-\text{OH} \end{array}$
<u>20<sub>h</sub></u>
Oligonucleotide <u>20<sub>h</sub></u> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (404 nmol, yield: 40 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 69\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b>R<sub>t</sub> = 3.70 min (UPLC gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) <i>m/z</i> calcd for C<sub>69</sub>H<sub>87</sub>N<sub>27</sub>O<sub>41</sub>P<sub>6</sub>: 2134.40 <i>m/z</i> found: 2135.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

DNA <u>20<sub>i</sub></u>
$\begin{array}{c} 5' \qquad \qquad 3' \\ \text{HO}-\text{A}-\text{G}-\text{G}-\text{G}-\text{T}-\text{A}-\text{T}-\text{OH} \end{array}$
<u>20<sub>i</sub></u>
Oligonucleotide <u>20<sub>i</sub></u> was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. (348 nmol, yield: 35 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 75\,800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b>R<sub>t</sub> = 6.18 min (UPLC gradient I)</b>
<b>UPLC-MS(-) <i>m/z</i> calcd for C<sub>70</sub>H<sub>87</sub>N<sub>29</sub>O<sub>40</sub>P<sub>6</sub>: 2158.41 <i>m/z</i> found: 1079.089.00 [(M-2H)/2]<sup>2-</sup></b>

5' hexynyl DNA <u>21<sub>a</sub></u>

<u>21<sub>a</sub></u>
Oligonucleotide <u>21<sub>a</sub></u> was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl (β-cyanoethyl) phosphoramidite and G SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. The crude product was used without any further purification (580 nmol, yield: 58 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 45\,200\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b>R<sub>t</sub> = 3.13 min (UPLC gradient II)</b>
<b>UPLC-MS(-) <i>m/z</i> calcd for C<sub>46</sub>H<sub>58</sub>N<sub>20</sub>O<sub>24</sub>P<sub>4</sub>: 1397.29 <i>m/z</i> found: 1396.71 [M-H]<sup>-</sup></b>

5' hexynyl DNA <u>21<sub>b</sub></u>

<u>21<sub>b</sub></u>
Oligonucleotide <u>21<sub>b</sub></u> was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl (β-cyanoethyl) phosphoramidite and T SynBase™ CPG resin at 1 μmol scale, using the general procedure III.1. The crude product was used without any further purification (825 nmol, yield: 83 %, $\epsilon_{260\text{nm}} = 53\,700\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).
<b>R<sub>t</sub> = 4.50 min (UPLC gradient II)</b>
<b>UPLC-MS(-) <i>m/z</i> calcd for C<sub>56</sub>H<sub>71</sub>N<sub>22</sub>O<sub>31</sub>P<sub>5</sub>: 1701.33 <i>m/z</i> found: 1701.00 [M-H]<sup>-</sup></b>

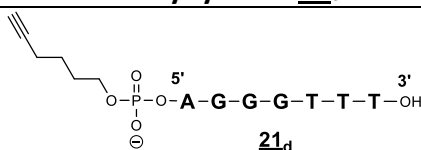


**5' hexynyl DNA 21<sub>c</sub>**

Oligonucleotide 21<sub>c</sub> was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and T SynBase™ CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure III.1. The crude product was used without any further purification (675 nmol, yield: 68 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 61\,800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 6.55\text{ min}$  (UPLC gradient I)

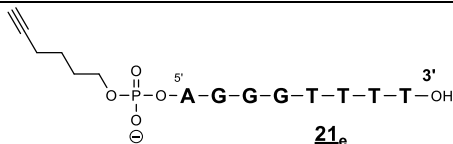
UPLC-MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{66}\text{H}_{84}\text{N}_{24}\text{O}_{38}\text{P}_6$ : 2005.38  $m/z$  found: 2006.00 [M-H]<sup>-</sup>

**5' hexynyl DNA 21<sub>d</sub>**

Oligonucleotide 21<sub>d</sub> was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and T SynBase™ CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure III.1. The crude product was used without any further purification (300 nmol, yield: 30 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 69\,900\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 5.13\text{ min}$  (UPLC gradient I)

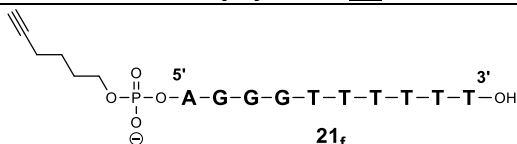
UPLC-MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{66}\text{H}_{84}\text{N}_{24}\text{O}_{38}\text{P}_6$ : 2309.43  $m/z$  found: 1154.09 [(M-2H)/2]<sup>2-</sup>

**5' hexynyl DNA 21<sub>e</sub>**

Oligonucleotide 21<sub>e</sub> was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and T SynBase™ CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure III.1. The crude product was used without any further purification (654 nmol, yield: 66 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 78\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 6.88\text{ min}$  (UPLC gradient I)

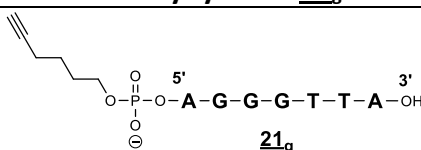
UPLC-MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{86}\text{H}_{110}\text{N}_{28}\text{O}_{52}\text{P}_8$ : 2613.47  $m/z$  found: 2614.00 [M-H]<sup>-</sup>

**5' hexynyl DNA 21<sub>f</sub>**

Oligonucleotide 21<sub>f</sub> was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and T SynBase™ CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure III.1. The crude product was used without any further purification (773 nmol, yield: 77 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 94\,200\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 4.87$  min (UPLC gradient II)

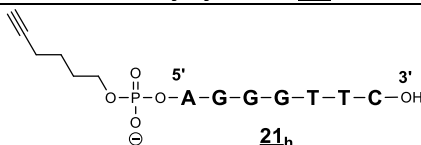
UPLC-MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{106}\text{H}_{136}\text{N}_{32}\text{O}_{66}\text{P}_{10}$ : 3221.56  $m/z$  found: 3222.00  $[\text{M-H}]^-$

**5' hexynyl DNA 21<sub>g</sub>**

Oligonucleotide 21<sub>g</sub> was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and A SynBase™ CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure III.1. The crude product was used without any further purification (737 nmol, yield: 74 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 76\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 4.63$  min (UPLC gradient I)

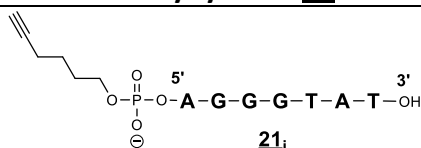
UPLC-MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{76}\text{H}_{96}\text{N}_{29}\text{O}_{43}\text{P}_7$ : 2318.44  $m/z$  found: 1158.49  $[(\text{M}-2\text{H})/2]^{2-}$

**5' hexynyl DNA 21<sub>h</sub>**

Oligonucleotide 21<sub>h</sub> was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and C SynBase™ CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure III.1. The crude product was used without any further purification (710 nmol, yield: 71 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 69\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 4.60$  min (UPLC gradient II)

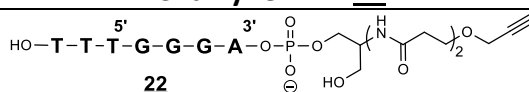
UPLC-MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{75}\text{H}_{96}\text{N}_{27}\text{O}_{44}\text{P}_7$ : 2294.43  $m/z$  found: 2295.00  $[\text{M-H}]^-$

**5' hexynyl DNA 21<sub>i</sub>**

Oligonucleotide 21<sub>i</sub> was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and T SynBase™ CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure **III.1**. The crude product was used without any further purification (700 nmol, yield: 70 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 75\,800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 4.68\text{ min}$  (UPLC gradient II)

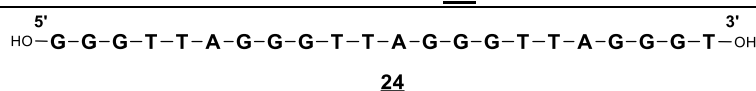
**UPLC-MS(-)**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{76}\text{H}_{96}\text{N}_{29}\text{O}_{43}\text{P}_7$ : 2318.44  $m/z$  found: 1158.79  $[(\text{M}-2\text{H})/2]^{2-}$

**3' alkyne DNA 22**

Oligonucleotide 22 was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure **III.1**. (530 nmol, yield: 53 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 69\,100\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 4.88\text{ min}$  (UPLC gradient II)

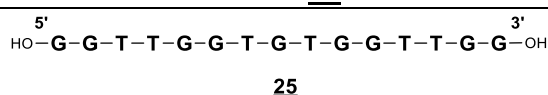
**UPLC-MS(-)**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{82}\text{H}_{107}\text{N}_{28}\text{O}_{49}\text{P}_7$ : 2483.49  $m/z$  found: 2486.00  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$

**“HT21 + T” 24**

Oligonucleotide 24 was obtained from automated synthesis using commercially available T SynBase™ CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure **III.1**. (240 nmol, yield: 24 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 223\,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 4.67\text{ min}$  (UPLC gradient I)

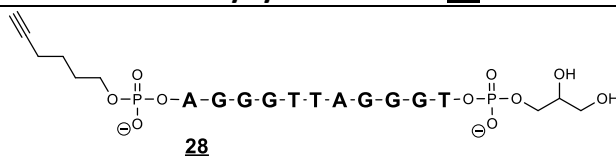
**UPLC-MS(-)**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{220}\text{H}_{272}\text{N}_{89}\text{O}_{134}\text{P}_{21}$ : 6953.17  $m/z$  found: 6953.00  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$

**“TBA” 25**

Oligonucleotide 25 was obtained from automated synthesis using commercially available G SynBase™ CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure **III.1**. (630 nmol, yield: 63 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 143\,300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 4.78\text{ min}$  (UPLC)

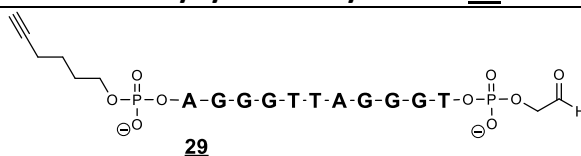
**UPLC-MS(-)**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{150}\text{H}_{187}\text{N}_{57}\text{O}_{94}\text{P}_{14}$ : 4722.79  $m/z$  found: 4723.00  $[\text{M}-\text{H}]^{-}$

**5' hexynyl 3' diol DNA 28**

Oligonucleotide **28** was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and 3'-glyceryl CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure **III.1**. The crude product was used without any further purification (720 nmol, yield: 72 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 114\ 800\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 5.33\ \text{min}$  (UPLC gradient I)

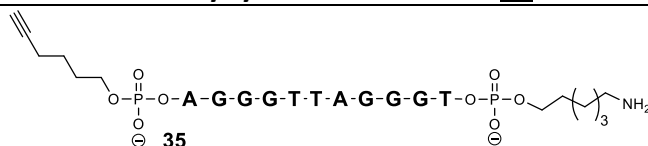
UPLC-MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{119}\text{H}_{152}\text{N}_{46}\text{O}_{73}\text{P}_{12}$ : 3763.64  $m/z$  found: 3764.00 [M-H]<sup>-</sup>

**5' hexynyl 3' aldehyde DNA 29**

Oligonucleotide **30** was oxidized using the general procedure **III.2**. The crude product was used without any further purification. The yield was considered as quantitative ( $\epsilon_{260\text{nm}} = 114\ 800\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 3.40\ \text{min}$  (UPLC gradient I)

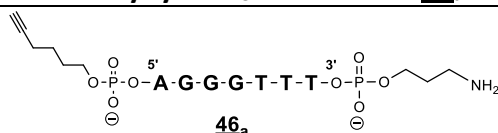
UPLC-MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{118}\text{H}_{148}\text{N}_{46}\text{O}_{72}\text{P}_{12}$ : 3731.62  $m/z$  found: 3732.00 [M-H]<sup>-</sup>

**5' hexynyl 3'-C<sub>6</sub>-amino DNA 35**

Oligonucleotide **35** was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and 3'-PT-amino-modifier C6 CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure **III.1**. The crude product was purified on RP-HPLC and freeze-dried (680 nmol, yield: 68 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 108\ 800\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 5.52\ \text{min}$  (UPLC gradient I)

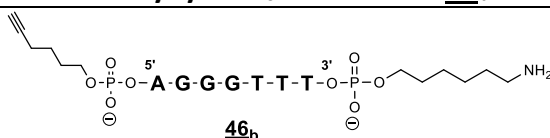
UPLC-MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{122}\text{H}_{160}\text{N}_{44}\text{O}_{73}\text{P}_{12}$ : 3779.70  $m/z$  found: 3780.00 [M-H]<sup>-</sup>

**5' hexynyl 3'-C<sub>3</sub>-amino DNA 46<sub>a</sub>**

Oligonucleotide **46<sub>a</sub>** was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and 3'-PT-amino-modifier C3 CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure III.1., but the crude product was purified on RP-HPLC and freeze-dried (600 nmol, yield: 60 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 69\,900\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 4.99$  (UPLC gradient I)

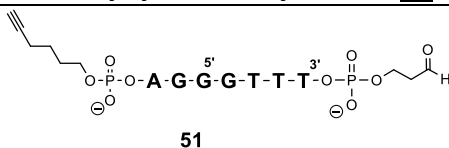
**UPLC-MS(-)**  $m/z$  calcd for  $C_{79}H_{105}N_{27}O_{48}P_8$ : 2446.45  $m/z$  found: 1222.94  $[(M-2H)/2]^{2-}$

**5' hexynyl 3'-C<sub>6</sub>-amino DNA 46<sub>b</sub>**

Oligonucleotide **46<sub>a</sub>** was obtained from automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and 3'-PT-amino-modifier C6 CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure III.1., but the crude product was purified on RP-HPLC and freeze-dried (791 nmol, yield: 79 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 69\,900\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 5.80$  (UPLC gradient I)

**UPLC-MS(-)**  $m/z$  calcd for  $C_{82}H_{111}N_{27}O_{48}P_8$ : 2488.50  $m/z$  found: 1243.66  $[(M-2H)/2]^{2-}$

**5' hexynyl 3'-aldehyde DNA 51**

Oligonucleotide **46<sub>a</sub>** was obtained after automated synthesis using commercially available 5'-hexynyl ( $\beta$ -cyanoethyl) phosphoramidite and 3'-PT-amino-modifier C6 CPG resin at 1  $\mu$ mol scale, using the general procedure III.1., and oxidation of the crude product using general procedure III.2. After purification, the desired product was obtained (577 nmol, yield: 58 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 69\,900\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 4.30$  (UPLC gradient I)

**UPLC-MS(-)**  $m/z$  calcd for  $C_{78}H_{100}N_{26}O_{49}P_8$ : 2431.40  $m/z$  found: 2431.00  $[M-H]^{-}$

#### IV. General procedure for conjugate synthesis

RP-UPLC-MS analysis were performed on a Waters UPLC-MS system, it includes reverse phase chromatography using a Nucleosil C18 column (130 Å, 2.1 x 50 mm, 1.7  $\mu$ m) and detection by

UV at 260 nm and 280 nm and by electron spray ionization mass spectrometry. A 0.3 mL/min flow linear gradient was applied. Solvent C (triethylamine (15 mM) and hexafluoro-2-propanol (50 mM) in water) and solvent D (triethylamine (15 mM) and hexafluoro-2-propanol (50 mM) in methanol) were used. Several gradients have been used: gradient I (0-30 % B in 12.5 minutes), gradient II (0-50 % B in 12.5 minutes).

The RP-HPLC purifications of oligonucleotides were performed on a Gilson system with a Nucleosil C-18 column (Macherey-Nagel, 100 Å, 250 x 10 mm, 7 µm) using a 4 mL/min flow with UV-monitoring at 260 nm and 280 nm. Solvent A (50 mM triethylammonium acetate buffer with 5 % acetonitrile) and solvent B (acetonitrile with 5 % water) were used.

#### IV.1. General procedure for oxime ligation

Aldehyde oligonucleotide (1 to 1.5 equiv. by oxyamine function) was dissolved in 0.4 M ammonium acetate buffer (pH 4.5, concentration  $10^{-3}$ M) and free aminoxy peptide (1 equiv.) was added. The solution was stirred at room temperature for 2 h then the crude product was purified on RP-HPLC with a gradient from 0 % to 45 % solvent B' in solvent A' for 30 min.

#### IV.2. General procedures for CuAAC

##### IV.2.1. Procedure in HEPES

To a solution of alkyne oligonucleotide (1.2 equiv., concentration  $10^{-3}$  M) and azide peptide (1 equiv.) in 100 mM HEPES buffer (pH 7.4) were added  $\text{CuSO}_4$  (2 equiv./function), THPTA (20 equiv./function) and sodium ascorbate (40 equiv./function). The reaction was stirred at room temperature for 2 h and quenched with a 0.5 M EDTA solution (50 equiv.). The product was purified on RP-HPLC then freeze-dried.

##### IV.2.2. Procedure in TEAA

To a solution of alkyne oligonucleotide (1.2 equiv., concentration  $10^{-3}$  M) and azide peptide (1 equiv.) in 2 M TEAA buffer (pH 8) were added  $\text{CuSO}_4$  (4 equiv./function), THPTA (20 equiv./function) and sodium ascorbate (60 equiv./function). The reaction was stirred at room temperature for 6 h and quenched with a 0.5 M EDTA solution (50 equiv.). The product was purified on RP-HPLC then freeze-dried.

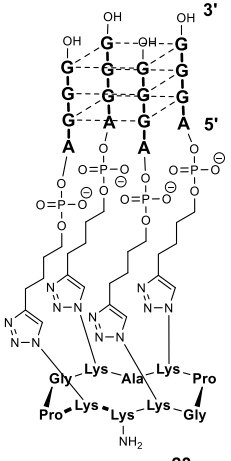
#### IV.3. General procedure for *t*Bu deprotection

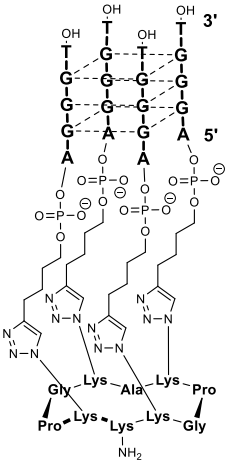
The *t*Bu conjugate (1 equiv., 0.5 mM) was heated at 90 °C, for 18 h, in a buffer solution of sodium borate (250 mM, pH 9.5). The product was then desalted by SEC on a NAP 25 cartridge using the recommended protocol and then freeze-dried.

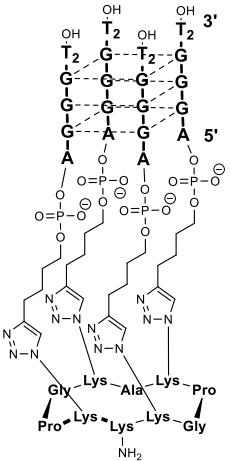
## IV.4. Experimental procedures

<b>“HT21 + TT” - RAFT (14)</b>	
<p style="text-align: right;"><b>14</b></p>	<p>The oxime ligation was carried out with aldehyde containing oligonucleotide <b>10</b> (1.2 equiv., 240 nmol) and RAFT <b>13</b> (1 equiv., 200 nmol) according to the general procedure <b>IV.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (150 nmol, yield: 75 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 231600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}</math>).</p>
	<p><b><math>R_t = 4.62 \text{ min}</math> (UPLC – gradient I)</b></p> <p><b>UPLC-ESI MS(-) <math>m/z</math> calcd for <math>\text{C}_{272}\text{H}_{353}\text{N}_{104}\text{O}_{156}\text{P}_{23}</math>: 8287.70</b></p> <p><b><math>m/z</math> found: 8283.69 [M-H]<sup>-</sup></b></p>

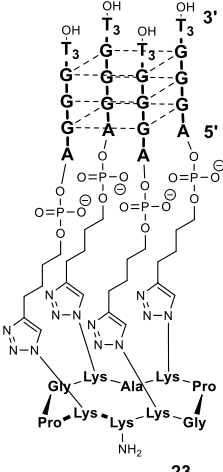
<b>RAFT – “TA + HT21” (15)</b>	
<p style="text-align: right;"><b>15</b></p>	<p>The oxime ligation was carried out with aldehyde containing oligonucleotide <b>12</b> (1.2 equiv., 290 nmol) and RAFT <b>13</b> (1 equiv., 240 nmol) according to the general procedure <b>IV.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (222 nmol, yield: 92 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 236500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}</math>).</p>
	<p><b><math>R_t = 6.40 \text{ min}</math> (UPLC – gradient I)</b></p> <p><b>UPLC-ESI MS(-) <math>m/z</math> calcd for <math>\text{C}_{279}\text{H}_{358}\text{N}_{107}\text{O}_{155}\text{P}_{23}</math>: 8397.74</b></p> <p><b><math>m/z</math> found: 8396.00 [M-H]<sup>-</sup></b></p>

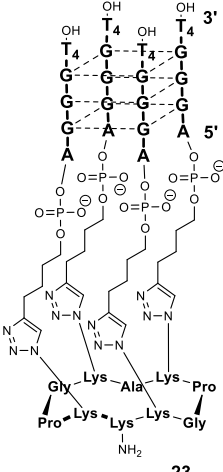
<b>RAFT – [d(5'AGGG<sup>3'</sup>)]<sub>4</sub> (<b>23<sub>a</sub></b>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>23<sub>a</sub></b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide <b>20<sub>a</sub></b> (4.4 equiv., 410 nmol) and RAFT <b>19</b> (1 equiv., 93 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (40 nmol, yield: 43 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 180800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p> <p style="text-align: center;"><b>R<sub>t</sub> = 6.45 min (UPLC – gradient I)</b>  <b>UPLC-ESI MS(-) m/z calcd for C<sub>231</sub>H<sub>309</sub>N<sub>103</sub>O<sub>106</sub>P<sub>16</sub>: 6716.78</b>  <b>m/z found: 6716.00</b></p>

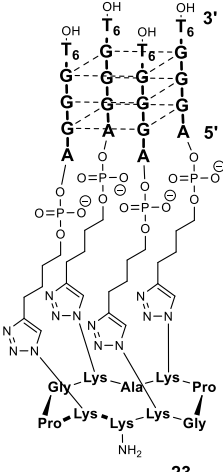
<b>RAFT – [d(5'AGGG T<sup>3'</sup>)]<sub>4</sub> (<b>23<sub>b</sub></b>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>23<sub>b</sub></b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide <b>20<sub>b</sub></b> (4.2 equiv., 432 nmol) and RAFT <b>19</b> (1 equiv., 103 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (32 nmol, yield: 31 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 214800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p> <p style="text-align: center;"><b>R<sub>t</sub> = 8.10 min (UPLC – gradient I)</b>  <b>MS-ESI/LTQ m/z calcd for C<sub>271</sub>H<sub>361</sub>N<sub>111</sub>O<sub>134</sub>P<sub>20</sub>: 7932.9640</b>  <b>m/z found: 7932.9570 (error -0,61 ppm)</b></p>

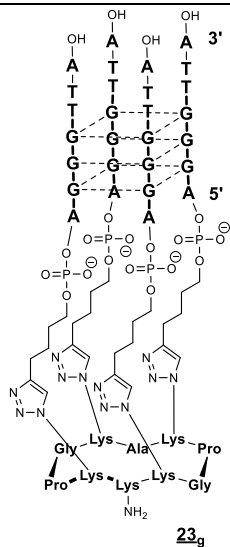
<b>RAFT – [d(5'AGGG T<sub>2</sub><sup>3'</sup>)]<sub>4</sub> (<b>23<sub>c</sub></b>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>23<sub>c</sub></b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide <b>20<sub>c</sub></b> (4.2 equiv., 327 nmol) and RAFT <b>19</b> (1 equiv., 78 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (31 nmol, yield: 40 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 247\,200 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p> <p style="text-align: center;"><b>R<sub>t</sub> = 8.07 min (UPLC – gradient I)</b>  <b>MS-ESI/LTQ m/z calcd for C<sub>311</sub>H<sub>413</sub>N<sub>119</sub>O<sub>162</sub>P<sub>24</sub>: 9149.1503</b>  <b>m/z found: 9149.1553 (error 0,16 ppm)</b></p>



<b>RAFT – [d(5'AGGG T<sub>3</sub><sup>3'</sup>)]<sub>4</sub> (<b>23<sub>d</sub></b>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>23<sub>d</sub></b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide <b>20<sub>d</sub></b> (4.2 equiv., 450 nmol) and RAFT <b>19</b> (1 equiv., 107 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (70 nmol, yield: 65 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 279\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p>
<p><math>R_t = 7.03\text{ min (UPLC – gradient I)}</math>  <b>ESI MS(-)</b> <math>m/z</math> calcd for C<sub>351</sub>H<sub>465</sub>N<sub>127</sub>O<sub>190</sub>P<sub>28</sub>: 10370.43  <math>m/z</math> found: 10371.09 [M-H]<sup>-</sup></p>	

<b>RAFT – [d(5'AGGG T<sub>4</sub><sup>3'</sup>)]<sub>4</sub> (<b>23<sub>e</sub></b>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>23<sub>e</sub></b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide <b>20<sub>e</sub></b> (4.2 equiv., 544 nmol) and RAFT <b>19</b> (1 equiv., 130 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (44 nmol, yield: 34 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 312\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p>
<p><math>R_t = 8.27\text{ min (UPLC – gradient I)}</math>  <b>MS-ESI/LTQ</b> <math>m/z</math> calcd for C<sub>391</sub>H<sub>517</sub>N<sub>135</sub>O<sub>218</sub>P<sub>32</sub>: 11581.5186  <math>m/z</math> found: 11581.4664 (error -0,15 ppm)</p>	

<b>RAFT – [d(5'AGGG T<sub>6</sub><sup>3'</sup>)]<sub>4</sub> (<b>23<sub>f</sub></b>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>23<sub>f</sub></b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide <b>20<sub>f</sub></b> (4.2 equiv., 402 nmol) and RAFT <b>19</b> (1 equiv., 96 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (27 nmol, yield: 28 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 312\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p>
<p><math>R_t = 8.37\text{ min (UPLC – gradient I)}</math>  <b>ESI MS(-)</b> <math>m/z</math> calcd for C<sub>471</sub>H<sub>621</sub>N<sub>151</sub>O<sub>274</sub>P<sub>40</sub>: 14020.74  <math>m/z</math> found: 14020.02 [M-H]<sup>-</sup></p>	

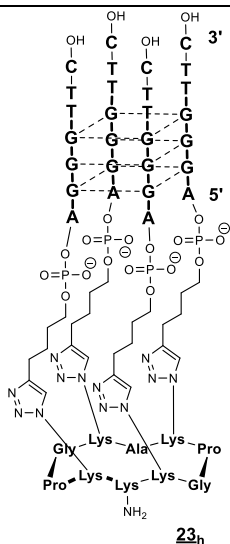
RAFT – [d(5' AGGG TTA 3')]<sub>4</sub> (**23<sub>g</sub>**)

The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide **23<sub>g</sub>** (4.2 equiv., 444 nmol) and RAFT **19** (1 equiv., 105 nmol) according to the general procedure **IV.2.1**. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (57 nmol, yield: 59 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 306\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 6.32\text{ min}$  (UPLC – gradient I)

ESI MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{351}\text{H}_{461}\text{N}_{139}\text{O}_{182}\text{P}_{28}$ : 10406.49

$m/z$  found: 10404.60 [M-H]<sup>-</sup>

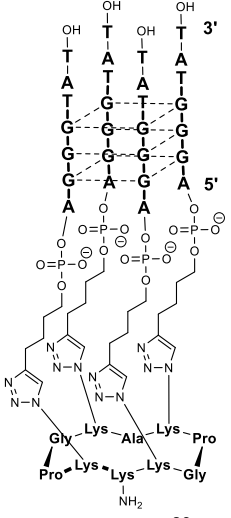
RAFT – [d(5' AGGG TTC 3')]<sub>4</sub> (**23<sub>h</sub>**)

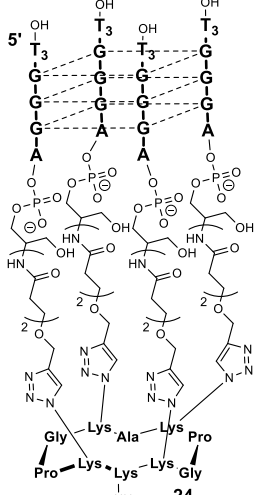
The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide **20<sub>h</sub>** (4.2 equiv., 320 nmol) and RAFT **19** (1 equiv., 76 nmol) according to the general procedure **IV.2.1**. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (22 nmol, yield: 43 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 277\,200\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

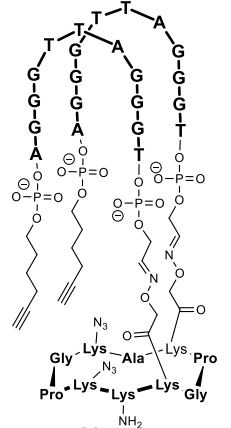
$R_t = 8.27\text{ min}$  (UPLC – gradient I)

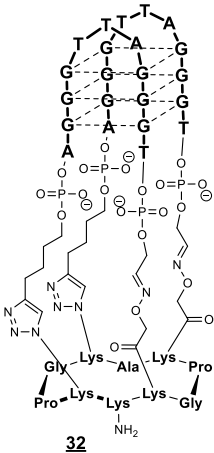
ESI MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{347}\text{H}_{461}\text{N}_{131}\text{O}_{186}\text{P}_{28}$ : 10304.33

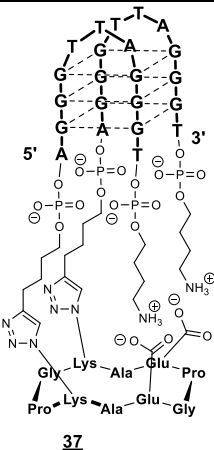
$m/z$  found: 10309.88 [M-H]<sup>-</sup>

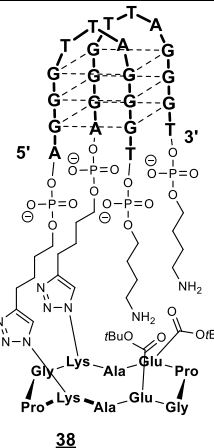
<b>RAFT – [d(5' AGGG TAT3')]4 (23<sub>i</sub>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>23<sub>i</sub></b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide <b>23<sub>i</sub></b> (4.2 equiv., 362 nmol) and RAFT <b>19</b> (1 equiv., 86 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (37 nmol, yield: 43 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 303\,200\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p> <p style="text-align: center;"><b>R<sub>t</sub> = 8.26 min (UPLC – gradient I)</b>  <b>MS-ESI/LTQ <i>m/z</i> calcd for C<sub>351</sub>H<sub>461</sub>N<sub>139</sub>O<sub>182</sub>P<sub>28</sub>: 10401.3796</b>  <i>m/z</i> found: 10401.3591 (error -0,43 ppm)</p>

<b>[d(5' TTT GGGA3')]4 - RAFT (24)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>24</b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide <b>22</b> (4.2 equiv., 318 nmol) and RAFT <b>19</b> (1 equiv., 76 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (26 nmol, yield: 34 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 276\,400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p> <p style="text-align: center;"><b>R<sub>t</sub> = 6.32 min (UPLC – gradient I)</b>  <b>ESI MS(-) <i>m/z</i> calcd for C<sub>385</sub>H<sub>505</sub>N<sub>135</sub>O<sub>206</sub>P<sub>28</sub>: 11060.58</b>  <i>m/z</i> found: 11061.09 [M-H]<sup>-</sup></p>

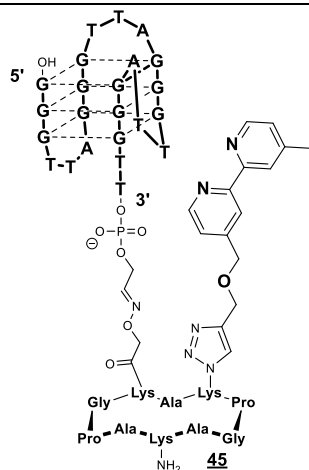
<b>Intermediate antiparallel conjugate (31)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>31</b></p>	<p>The oxime ligation was carried out with aldehyde containing oligonucleotide <b>29</b> (2.2 equiv., 580 nmol) and RAFT <b>30</b> (1 equiv., 260 nmol) according to the general procedure <b>IV.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (75 nmol, yield: 29 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 229\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p> <p style="text-align: center;"><b>R<sub>t</sub> = 6.63 min (UPLC – gradient I)</b>  <b>UPLC-ESI MS(-) <i>m/z</i> calcd for C<sub>287</sub>H<sub>381</sub>N<sub>113</sub>O<sub>156</sub>P<sub>24</sub>: 8648.91</b>  <i>m/z</i> found: 8647.00 [M-H]<sup>-</sup></p>

<b>RAFT – [d(5'AGGG TTA GGGT3')]<sub>2</sub> (<b>32</b>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>32</b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with the intermediate antiparallel conjugate <b>31</b> (1 equiv., 33 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.1</b>. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (20 nmol, yield: 60 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 229\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p> <p style="text-align: center;"><b>R<sub>t</sub> = 6.57 min (UPLC – gradient I)</b>  <b>UPLC-ESI MS(-) m/z calcd for C<sub>287</sub>H<sub>381</sub>N<sub>113</sub>O<sub>156</sub>P<sub>24</sub>: 8648.91</b>  <b>m/z found: 8647.00 [M-H]<sup>-</sup></b></p>

<b>Intermediate antiparallel conjugate (<b>37</b>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>37</b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide <b>35</b> (2.2 equiv., 110 nmol) and RAFT <b>36</b> (1 equiv., 50 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.1</b>. The product was not isolated (<math>\epsilon_{260\text{nm}} = 277\,200\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p> <p style="text-align: center;"><b>R<sub>t</sub> = 6.69 min (UPLC – gradient I)</b>  <b>ESI MS(-) m/z calcd for C<sub>286</sub>H<sub>384</sub>N<sub>104</sub>O<sub>160</sub>P<sub>24</sub>: 8577.88</b>  <b>m/z found: - [M-H]<sup>-</sup></b></p>

<b>Intermediate antiparallel conjugate (<b>38</b>)</b>	
 <p style="text-align: center;"><b>38</b></p>	<p>The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide <b>35</b> (4.2 equiv., 320 nmol) and RAFT <b>36</b> (1 equiv., 76 nmol) according to the general procedure <b>IV.2.2</b>. The crude product was used without further purification (22 nmol, yield: 43 %, <math>\epsilon_{260\text{nm}} = 217\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}</math>).</p> <p style="text-align: center;"><b>R<sub>t</sub> = 6.36 min (UPLC – gradient II)</b>  <b>UPLC-ESI MS(-) m/z calcd for C<sub>294</sub>H<sub>400</sub>N<sub>104</sub>O<sub>160</sub>P<sub>24</sub>: 8690.01</b>  <b>m/z found: - [M-H]<sup>-</sup></b></p>



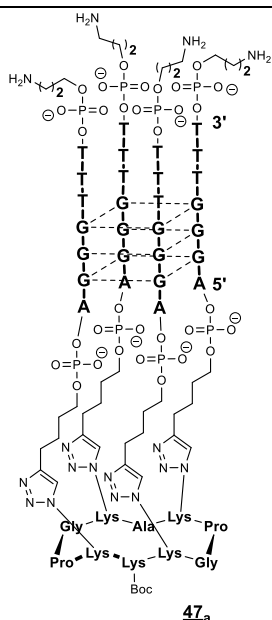
Conjugate **46**

The CuAAC ligation was carried out with product **41** (1.1 equiv., 105 nmol) and conjugate **43** (1 equiv., 100 nmol) according to the general procedure **IV.2.1.**, but in the buffer solution HEPES/DMF (1/1, v/v). The conversion was considered as quantitative. The crude was purified on RP-HPLC and degradation was observed. The product was not quantified. ( $\epsilon_{260\text{nm}} = 231\ 600\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 8.26\ \text{min}$  (UPLC – gradient I)

**MALDI-TOF(-)**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{290}\text{H}_{372}\text{N}_{109}\text{O}_{157}\text{P}_{23}$ : 8604.84

$m/z$  found: 8603.00 [M-H]<sup>-</sup>

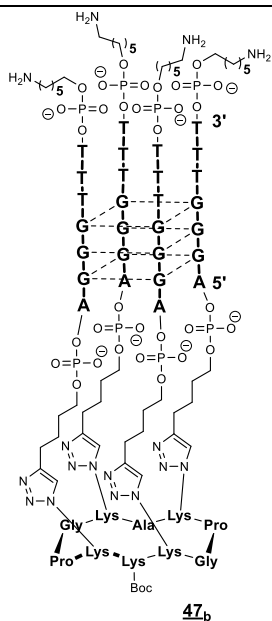
Conjugate **47<sub>a</sub>**

The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide **46<sub>a</sub>** (4.2 equiv., 505 nmol) and RAFT **18** (1 equiv., 120 nmol) according to the general procedure **IV.2.1.** The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (49 nmol, yield: 43 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 279\ 600\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 7.65\ \text{min}$  (UPLC – gradient I)

**UPLC-ESI MS(-)**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{368}\text{H}_{505}\text{N}_{131}\text{O}_{204}\text{P}_{32}$ : 11012.48

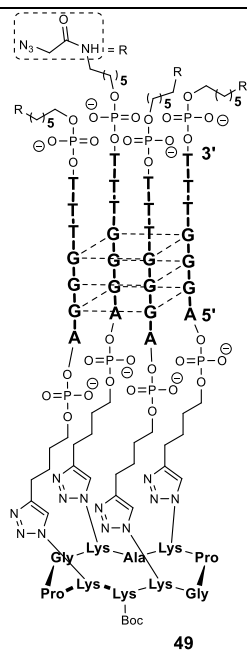
$m/z$  found: 11012.00 [M-H]<sup>-</sup>

**Conjugate 47<sub>b</sub>**

The CuAAC ligation was carried out with alkyne containing oligonucleotide **46<sub>b</sub>** (4.2 equiv., 505 nmol) and RAFT **18** (1 equiv., 120 nmol) according to the general procedure **IV.2.1**. The crude was purified on RP-HPLC and freeze-dried. (49 nmol, yield: 43 %,  $\epsilon_{260\text{nm}} = 279\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ).

$R_t = 7.65\text{ min}$  (UPLC – gradient I)

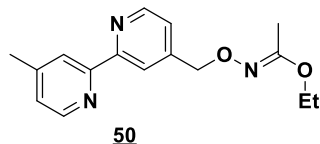
UPLC-ESI MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{368}\text{H}_{505}\text{N}_{131}\text{O}_{204}\text{P}_{32}$ : 11012.48  
 $m/z$  found: 11012.00 [M-H]<sup>-</sup>

**Conjugate 49**

To a solution of conjugate **47<sub>b</sub>** (1 equiv., 100 nmol) in 500 mM TEA.HCl buffer (400  $\mu\text{L}$ , pH 8.0) was added a solution of Azidoacetic Acid NHS Ester **48** (74 equiv./ function, 29.7  $\mu\text{mol}$ ) in DMSO (99  $\mu\text{L}$ ). The reaction was stirred at room temperature for 3 h. The product was then purified by SEC on a NAP 25 cartridge using the recommended protocol and then freeze-dried. The crude product was used without further purification.

$R_t = 9.10\text{ min}$  (UPLC – gradient I)

UPLC-ESI MS(-)  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{388}\text{H}_{533}\text{N}_{131}\text{O}_{204}\text{P}_{32}$ : 11513.71  
 $m/z$  found: 11514.00 [M-H]<sup>-</sup>

**ethyl-*N*-((4'-methyl-[2,2'-bipyridin]-4-yl)methoxy)acetimidate 50**

To an inert stirred solution of 4-(bromomethyl)-4'-methyl-2,2'-bipyridine (100 mg, 380  $\mu\text{mol}$ ) in DMF (20 mL) at 0 °C was added aqueous  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2 equiv., 105 mg, 760  $\mu\text{mol}$ ) and ethyl *N*-hydroxyacetimidate (1.5 equiv., 59 mg, 570  $\mu\text{mol}$ ). A red coloration of the solution was observed. After 5 h of stirring at 90 °C and cooling to room temperature, the solution turned out yellow. Water was then added (150 mL) and a white coloration was observed. The water phase was extracted with EtOAc (3 x 20 mL), and the combined organic phases from this extraction were washed with brine (20 mL), dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated in vacuum, providing the desired compound as a yellow oil (54 mg, 185  $\mu\text{mol}$ , 50 %).

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  8.68 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 8.55 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 8.02 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.74 (d,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.50 (dd,  $J = 4.9, 0.9$  Hz, 1H), 7.32 (dd,  $J = 4.9, 1.1$  Hz, 1H), 5.64 (s, 2H), 4.33 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 1.43 (t,  $J = 5.9$  Hz, 3H).

**ESI MS(+)**  $m/z$  calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2$ : 286.15,  $m/z$  found: 286.12  $[\text{M}+\text{H}]^+$



## V. Circular Dichroism studies

Spectra were recorded on a Jasco J-810 circular dichroism spectropolarimeter coupled with a Peltier controller temperature using a 0.1 mm quartz cuvette. Spectra were recorded every 5 °C in a range from 15 to 95 °C with a wavelength range from 220 to 320 nm. For each temperature, the spectrum was an average of three scans with a 4 s response time, a 1 nm data pitch, a 4 nm bandwidth and a 100 nm.min<sup>-1</sup> scanning speed. Blank spectra of buffer were subtracted of each measure. Melting temperatures were obtained using Boltzmann fit on the Scidavis software. Each curve fit was only accepted with a  $r_{\text{value}} > 0.97$  for unconstrained sequences and with a  $r_{\text{value}} > 0.99$  for constrained ones. Compounds were preliminary annealed by heating at 90 °C for 5 min in an appropriate buffer and cooled slowly at room temperature overnight.

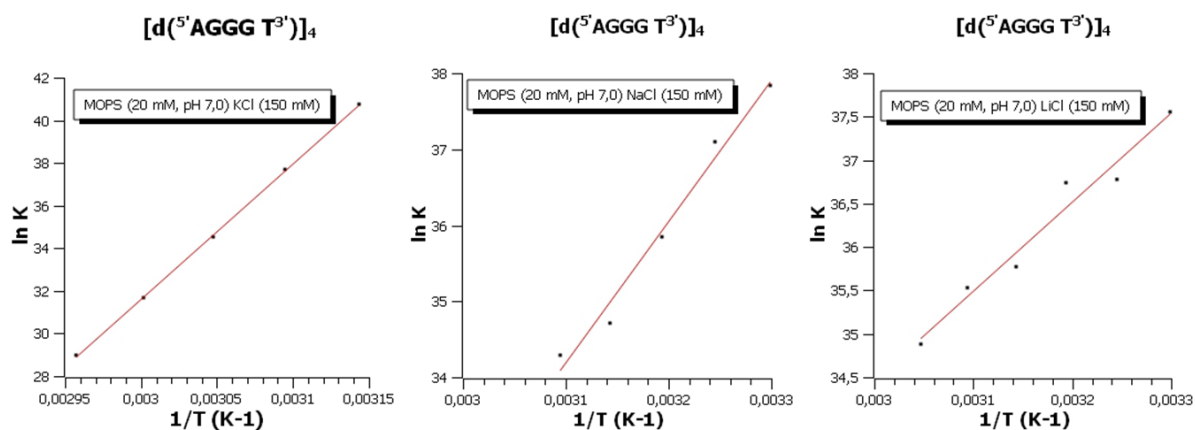


Figure 107 : Variation of  $\ln K = f(1/T)$ , for the sequence  $[d(5'AGGG T_3^3)]_4$ , depending on the nature of the cation.

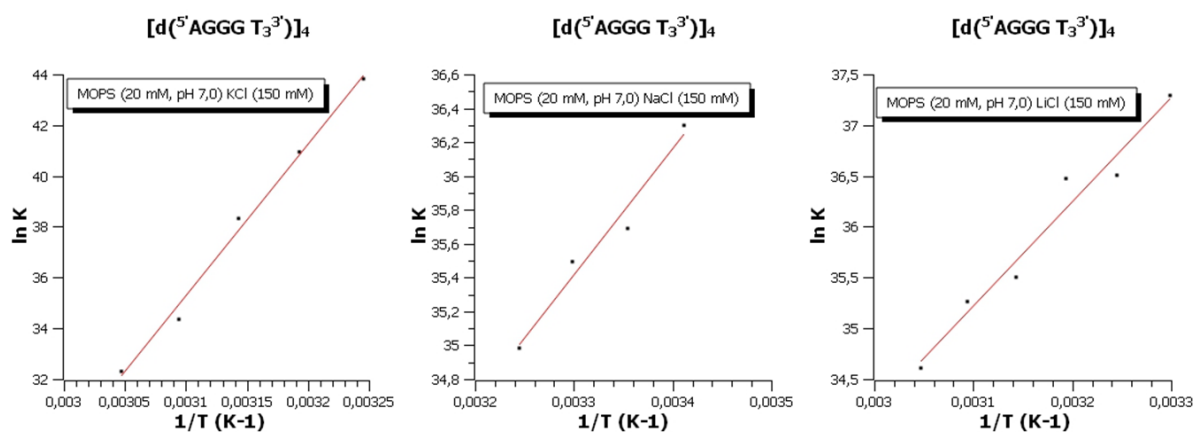


Figure 108 : Variation of  $\ln K = f(1/T)$ , for the sequence  $[d(5'AGGG T_3^3)]_4$ , depending on the nature of the cation.

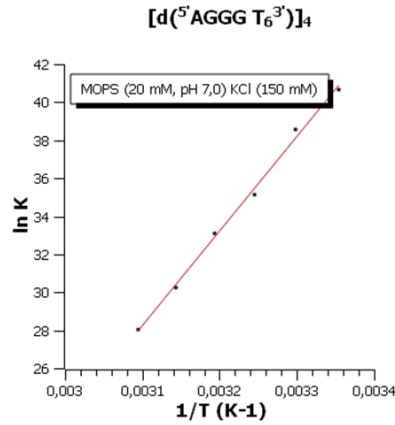


Figure 109 : Variation of  $\ln K = f(1/T)$ , for the sequence  $[d(5'AGGG T_6^{3'})]_4$ , in presence of KCl.

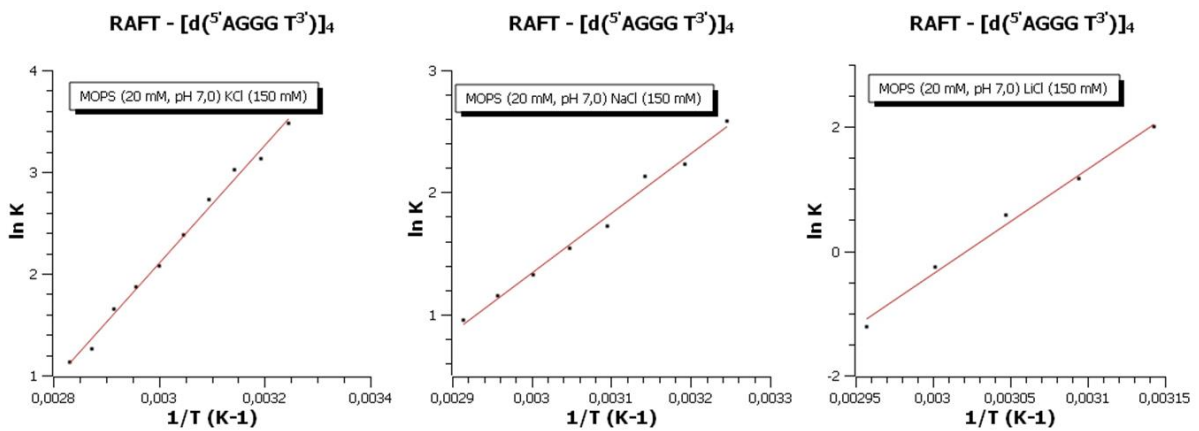


Figure 110 : Variation of  $\ln K = f(1/T)$ , for the sequence  $RAFT - [d(5'AGGG T_3^{3'})]_4$ , depending on the nature of the cation.

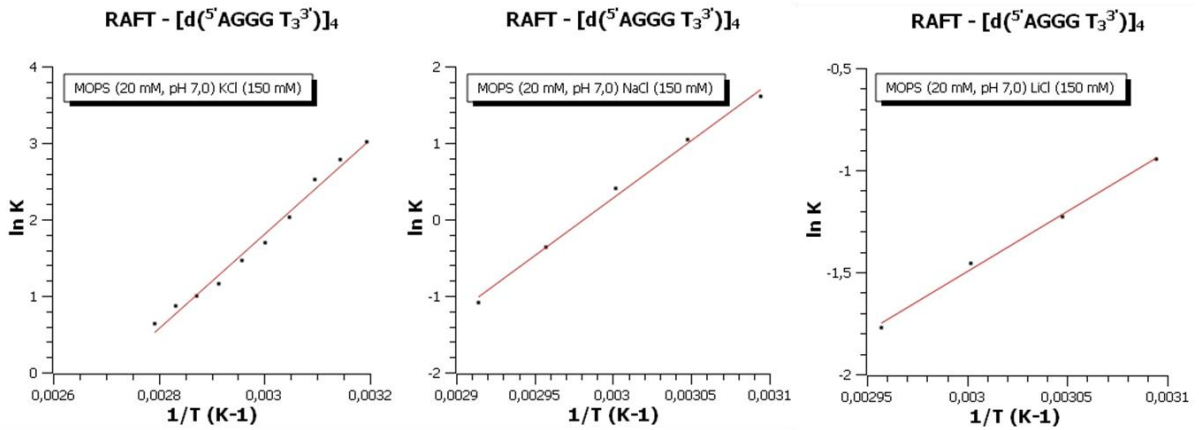


Figure 111 : Variation of  $\ln K = f(1/T)$ , for the sequence  $RAFT - [d(5'AGGG T_3^{3'})]_4$ , depending on the nature of the cation.

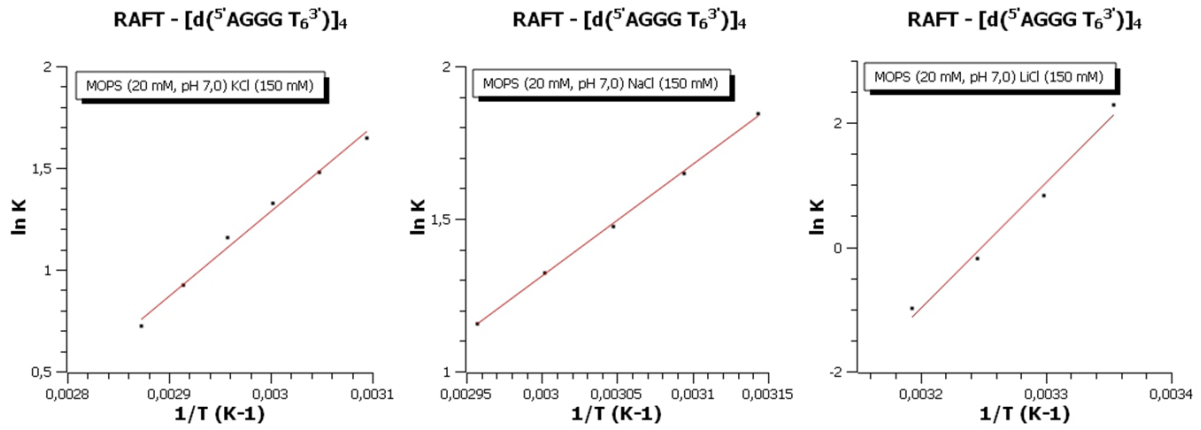


Figure 112 : Variation of  $\ln K = f(1/T)$ , for the sequence RAFT -  $[d(5'AGGG T_6 3')]_4$ , depending on the nature of the cation.

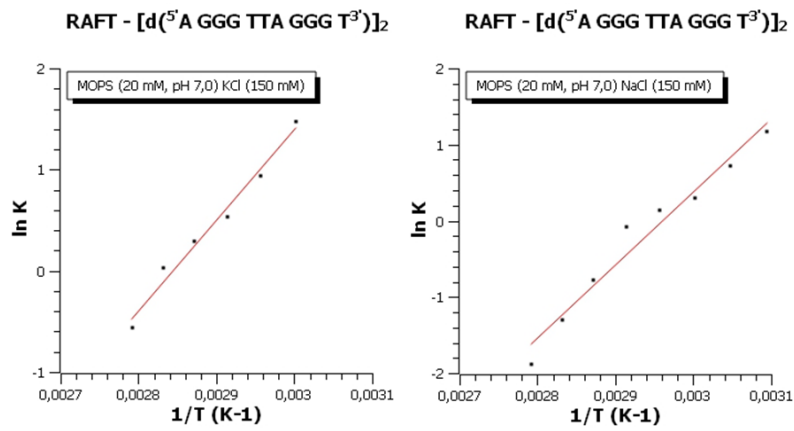


Figure 113 : Variation of  $\ln K = f(1/T)$ , for the sequence RAFT -  $[d(5'AGGG TTA GGG T^3')]_2$ , depending on the nature of the cation.

## VI. General procedure for catalysis

All the reaction of sulfoxidation were thermostated and agitated by using a Thermomixer C (Eppendorf).

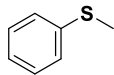
RP-UPLC-MS analysis were performed on a FLEXAR HPLC system, it includes reverse phase chromatography using a CHIRALAK® IG-3 column (2.1 x 150 mm, 3 µm) and detection by UV at 230 nm and 275 nm. A 0.2 mL/min flow was applied with solvent A (Water) and solvent B (CH<sub>3</sub>CN). Several gradients have been used: gradient I (100 % B in 10 minutes), gradient II (95 % B in 10 minutes).

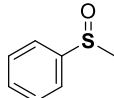
All products and substrates were quantified and characterized by using calibration curves of the corresponding commercially available compounds.

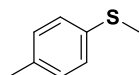
### VI.1. General procedure for sulfoxidation reaction

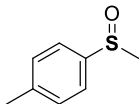
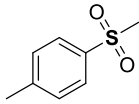
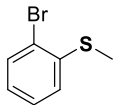

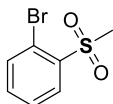
DNA (10 µM, unless otherwise stated) was added to a 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) buffer (100 µL, 20 mM, pH 7.0) containing KCl (150 mM), heated for 3 min at 98 °C and annealed slowly over the course of 2 h to room temperature. Then, an aqueous solution of copper 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine complex (50 µM) was added. The mixture was stirred for 0.5 h at 15 °C. Then, the sulfide dissolved in CH<sub>3</sub>CN (1 µL of a 0.5 M solution, unless otherwise stated) was added. The reaction was started with the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7.5 µL of a 0.3 % aqueous solution). The reaction mixture was stirred for another 5 h at 15 °C. Then ethyl acetate (30 µL x 3) was added to extract the products and remained substrate. The extracted organic phase was diluted with CH<sub>3</sub>CN (90 µL) and the crude product was directly analysed by chiral HPLC.

### VI.2. Characterisation of references

Thioanisole	
	Commercial compound <b>R<sub>t</sub> = 2.58 min (gradient I)</b> λ = 254 nm

Methyl phenyl sulfoxide	
	Commercial compound <b>R<sub>t</sub> = 3.58 min and 3.85 min (gradient I)</b>

Methyl <i>p</i> -tolyl sulfide	
	Commercial compound <b>R<sub>t</sub> = 2.62 min (gradient I)</b> λ = 254 nm

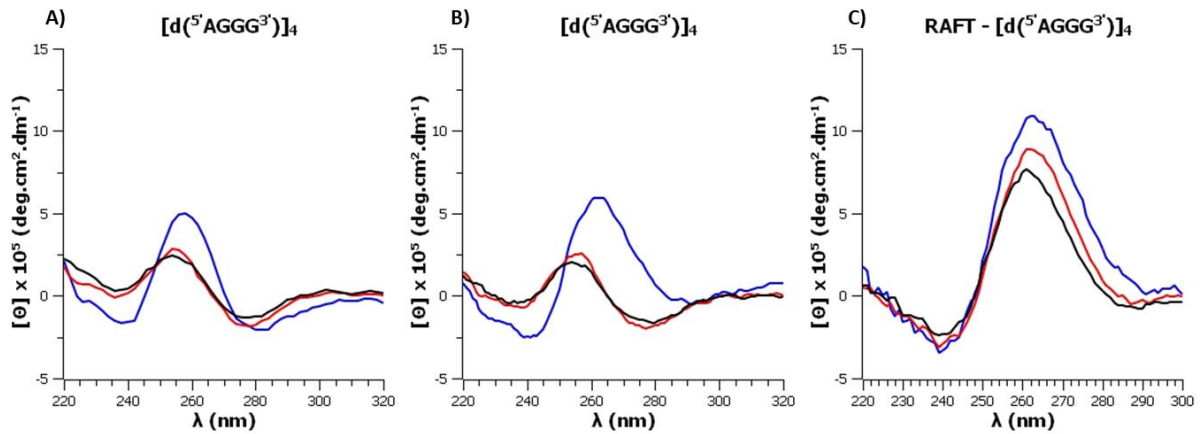
<b>Methyl <i>p</i>-tolyl sulfoxide</b>	
	Commercial compound $R_t = 5.16$ min and $5.96$ min ( <b>gradient I</b> ) $\lambda = 240$ nm
<b>4-(methylsulfonyl)toluene</b>	
	Commercial compound $R_t = 7.10$ min ( <b>gradient I</b> ) $\lambda = 261$ nm
<b>2-bromophenyl methyl sulfide</b>	
	Commercial compound $R_t = 2.76$ min ( <b>gradient II</b> ) $\lambda = 253$ nm
<b>2-bromophenyl methyl sulfoxide</b>	
	Commercial compound $R_t = 3.98$ min and $4.98$ min ( <b>gradient II</b> ) $\lambda = 248$ nm
<b>1-bromo-2-(methylsulfonyl)benzene</b>	
	Commercial compound $R_t = 6.30$ ( <b>gradient II</b> ) $\lambda = 273$ nm

---

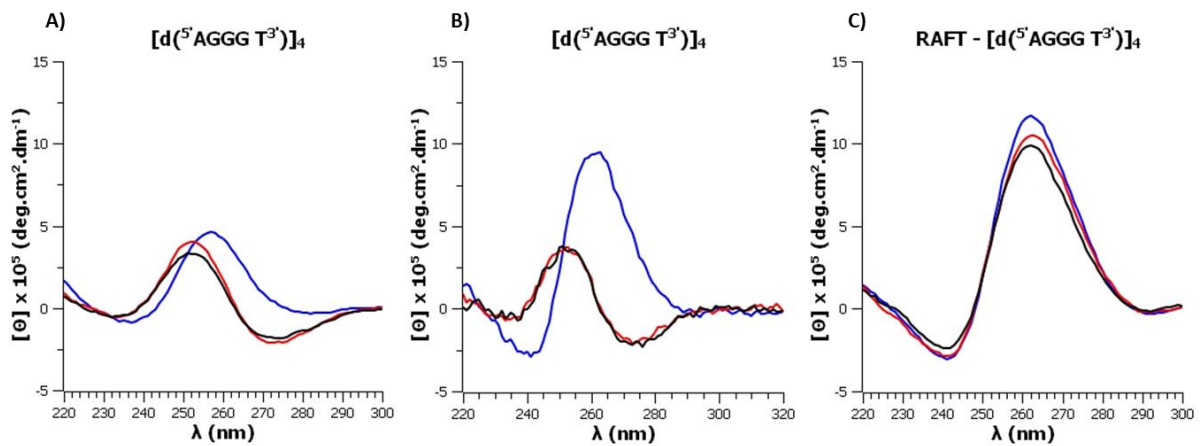
# Annexes

---

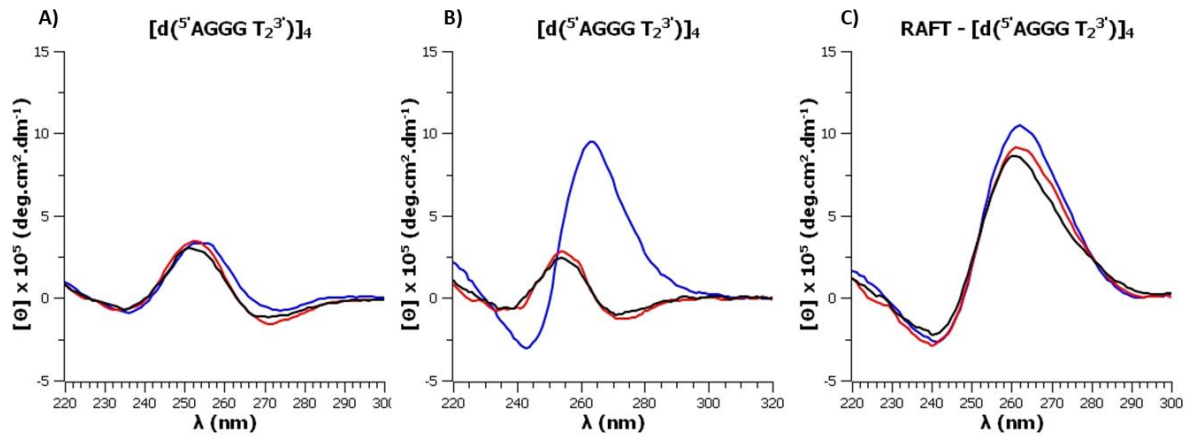
## I. Spectres de dichroïsme circulaire des structures tétramoléculaires parallèles



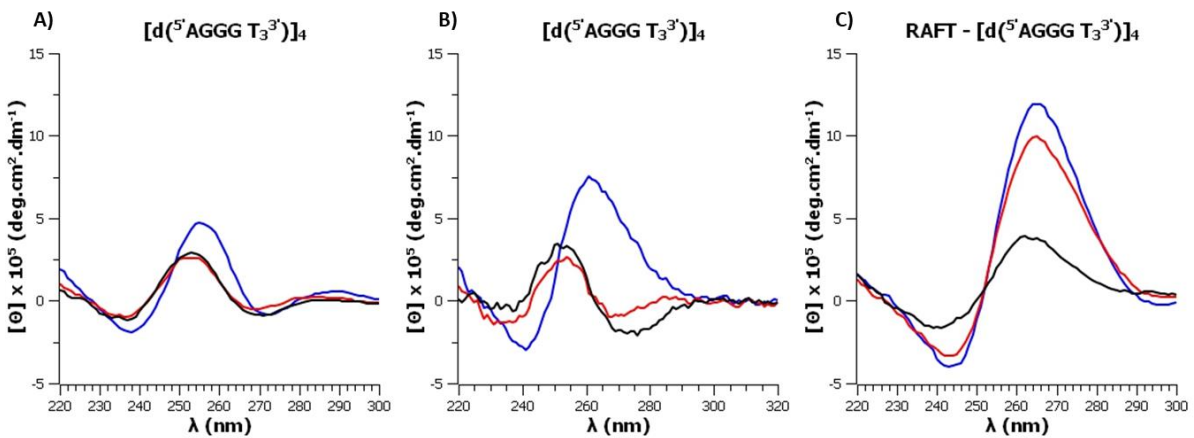
**Figure 114** : Spectres de dichroïsme circulaire pour le G-quadruplexe  $[d(5'AGGG3')]_4$ , conditionné avec une concentration de (A)  $10 \mu M$  et de (B)  $250 \mu M$ . Le spectre (C) correspond à l'édifice contraint RAFT -  $[d(5'AGGG3')]_4$ , conditionné à la concentration de  $10 \mu M$ . N.B. : les analyses sont faites avec des concentrations en G-quadruplexe de  $10 \mu M$ .



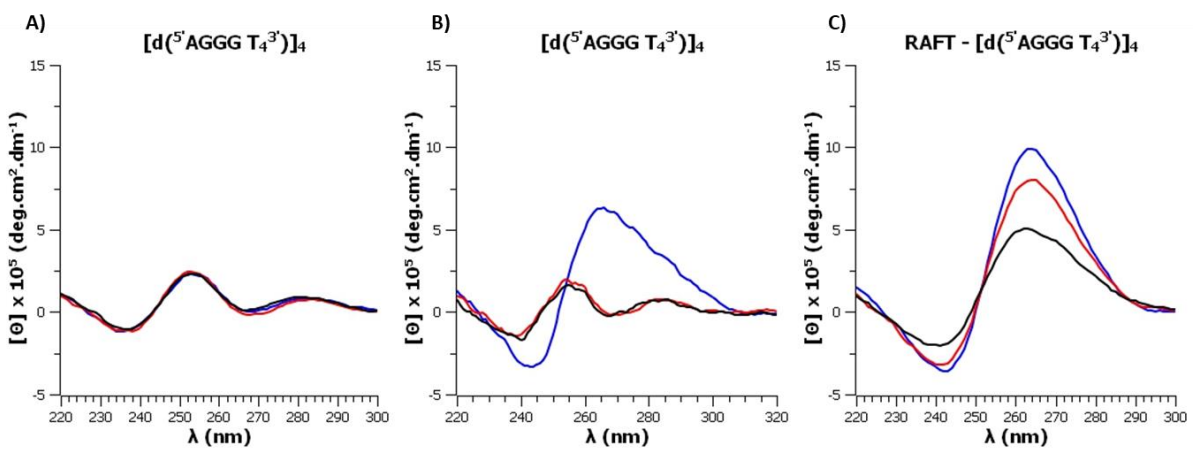
**Figure 115** : Spectres de dichroïsme circulaire pour le G-quadruplexe  $[d(5'AGGG T3')]_4$ , conditionné avec une concentration de (A)  $10 \mu M$  et de (B)  $250 \mu M$ . Le spectre (C) correspond à l'édifice contraint RAFT -  $[d(5'AGGG T3')]_4$ , conditionné à la concentration de  $10 \mu M$ . N.B. : les analyses sont faites avec des concentrations en G-quadruplexe de  $10 \mu M$ .



**Figure 116** : Spectres de dichroïsme circulaire pour le G-quadruplexe  $[d(5'AGGG T_2^{3'})]_4$ , conditionné avec une concentration de (A)  $10 \mu\text{M}$  et de (B)  $250 \mu\text{M}$ . Le spectre (C) correspond à l'édifice contraint RAFT -  $[d(5'AGGG T_2^{3'})]_4$ , conditionné à la concentration de  $10 \mu\text{M}$ . N.B. : les analyses sont faites avec des concentrations en G-quadruplexe de  $10 \mu\text{M}$ .

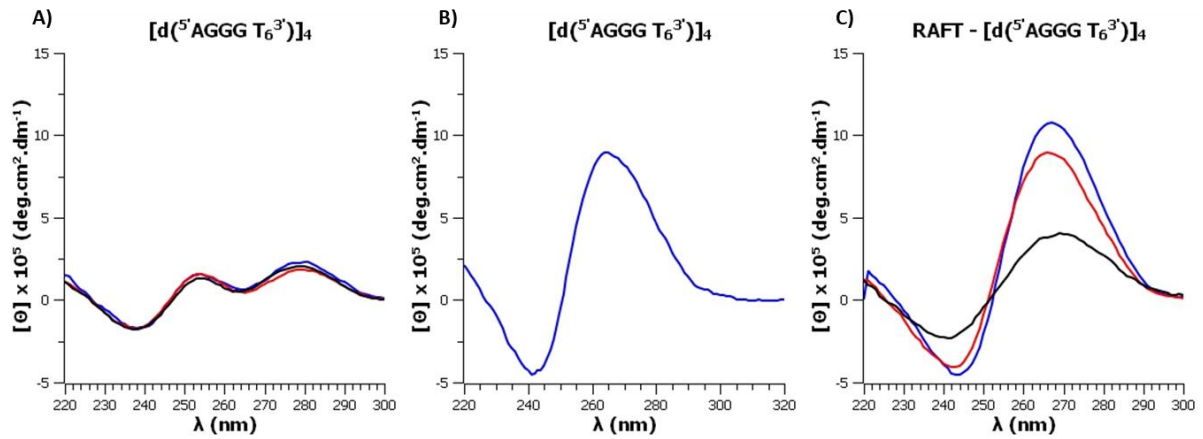


**Figure 117** : Spectres de dichroïsme circulaire pour le G-quadruplexe  $[d(5'AGGG T_3^{3'})]_4$ , conditionné avec une concentration de (A)  $10 \mu\text{M}$  et de (B)  $250 \mu\text{M}$ . Le spectre (C) correspond à l'édifice contraint RAFT -  $[d(5'AGGG T_3^{3'})]_4$ , conditionné à la concentration de  $10 \mu\text{M}$ . N.B. : les analyses sont faites avec des concentrations en G-quadruplexe de  $10 \mu\text{M}$ .

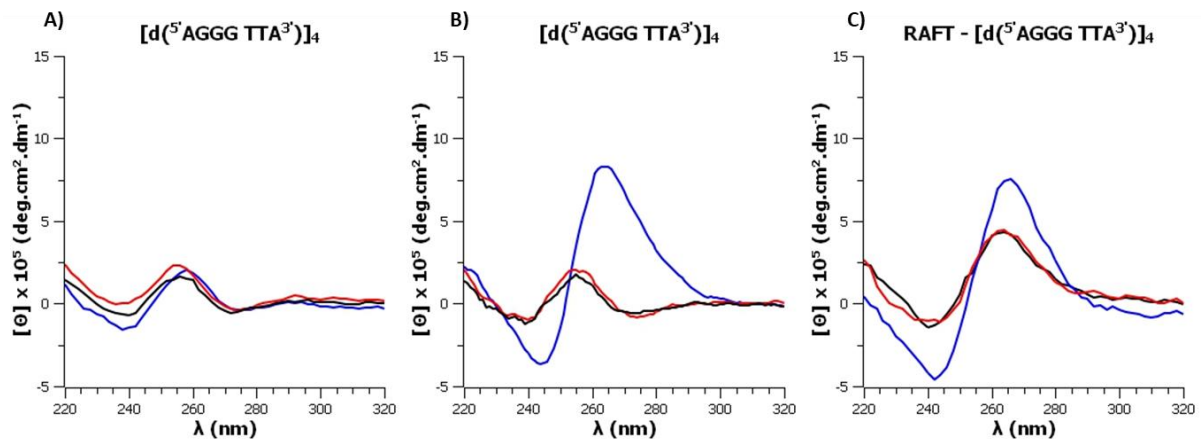


**Figure 118** : Spectres de dichroïsme circulaire pour le G-quadruplexe  $[d(5'AGGG T_4^{3'})]_4$ , conditionné avec une concentration de (A)  $10 \mu\text{M}$  et de (B)  $250 \mu\text{M}$ . Le spectre (C) correspond à l'édifice contraint RAFT -  $[d(5'AGGG T_4^{3'})]_4$ , conditionné à la concentration de  $10 \mu\text{M}$ . N.B. : les analyses sont faites avec des concentrations en G-quadruplexe de  $10 \mu\text{M}$ .

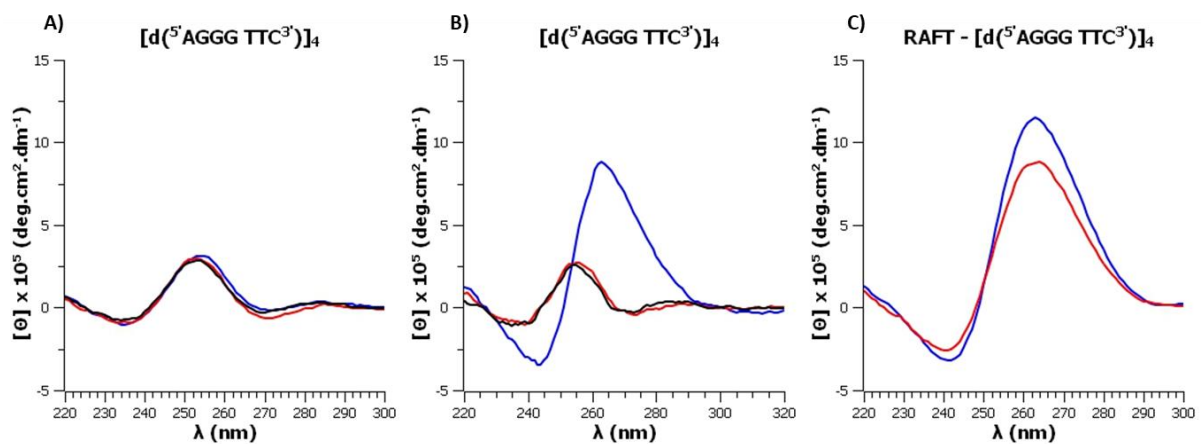




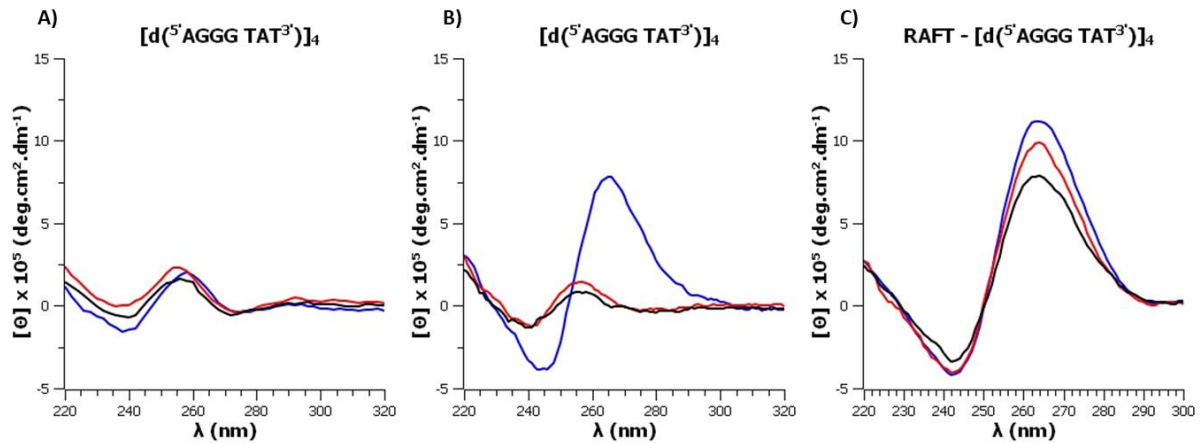
**Figure 119** : Spectres de dichroïsme circulaire pour le G-quadruplexe  $[d(5'AGGG T_6'3')]_4$ , conditionné avec une concentration de (A)  $10 \mu M$  et de (B)  $250 \mu M$ . Le spectre (C) correspond à l'édifice contraint RAFT -  $[d(5'AGGG T_6'3')]_4$ , conditionné à la concentration de  $10 \mu M$ . N.B. : les analyses sont faites avec des concentrations en G-quadruplexe de  $10 \mu M$ .



**Figure 120** : Spectres de dichroïsme circulaire pour le G-quadruplexe  $[d(5'AGGG TAT'3')]_4$ , conditionné avec une concentration de (A)  $10 \mu M$  et de (B)  $250 \mu M$ . Le spectre (C) correspond à l'édifice contraint RAFT -  $[d(5'AGGG TAT'3')]_4$ , conditionné à la concentration de  $10 \mu M$ . N.B. : les analyses sont faites avec des concentrations en G-quadruplexe de  $10 \mu M$ .

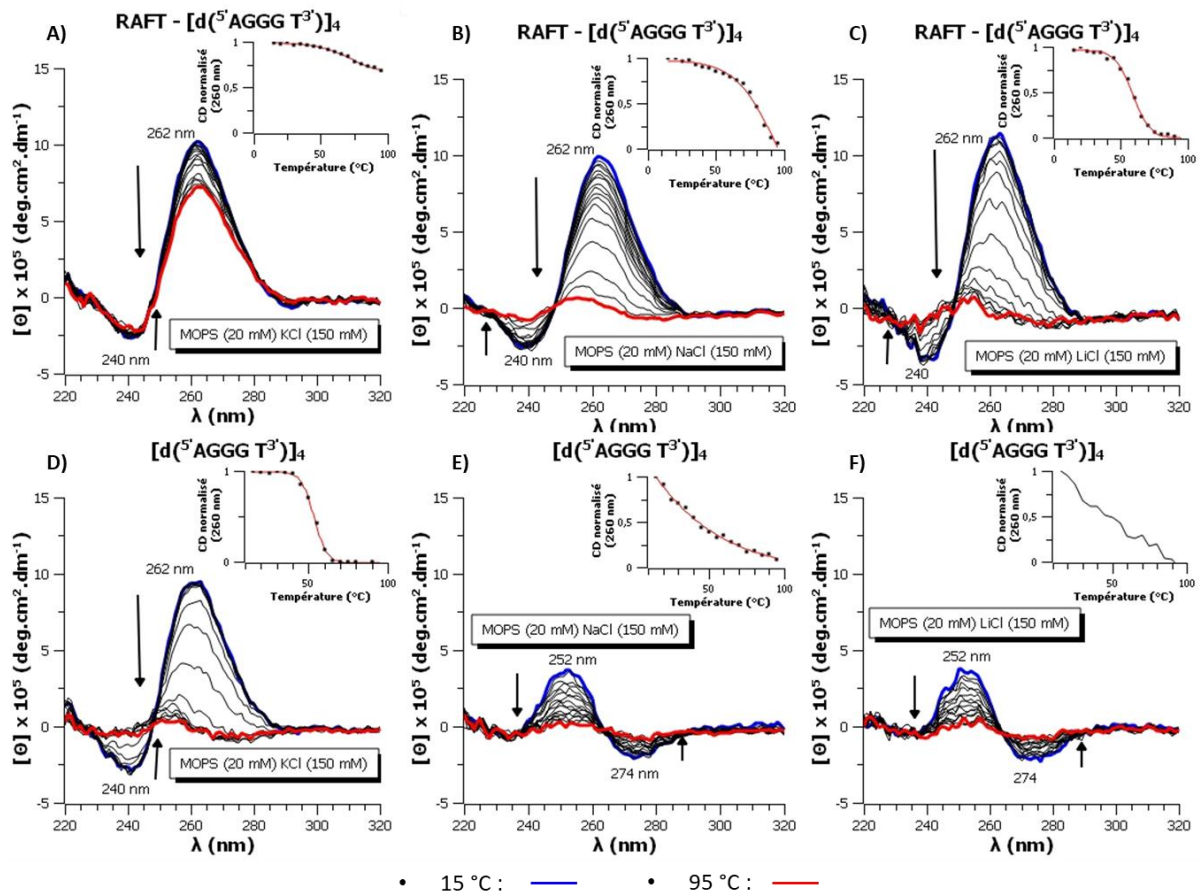


**Figure 121** : Spectres de dichroïsme circulaire pour le G-quadruplexe  $[d(5'AGGG TTC'3')]_4$ , conditionné avec une concentration de (A)  $10 \mu M$  et de (B)  $250 \mu M$ . Le spectre (C) correspond à l'édifice contraint RAFT -  $[d(5'AGGG TTC'3')]_4$ , conditionné à la concentration de  $10 \mu M$ . N.B. : les analyses sont faites avec des concentrations en G-quadruplexe de  $10 \mu M$ .

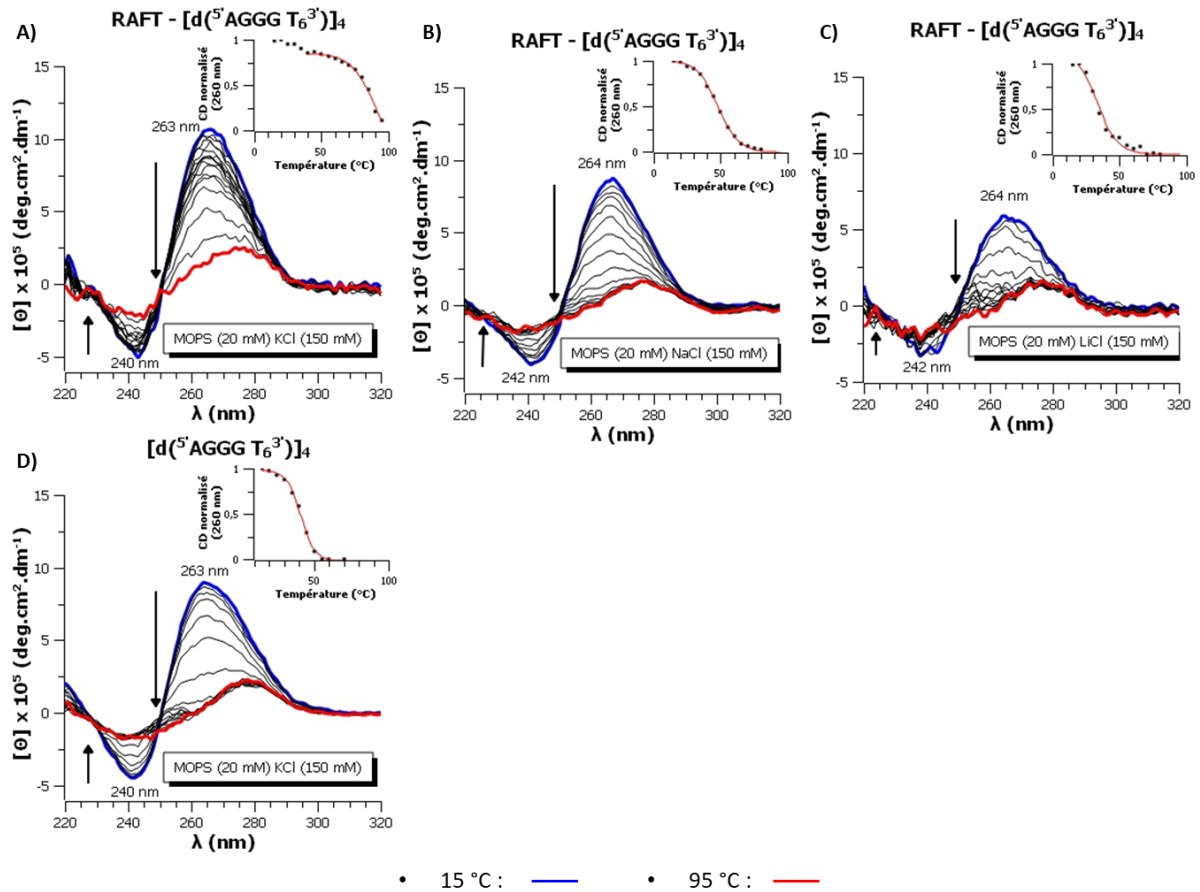


**Figure 122** : Spectres de dichroïsme circulaire pour le G-quadruplexe  $[d(5'AGGG TAT^3')]_4$ , conditionné avec une concentration de (A)  $10 \mu\text{M}$  et de (B)  $250 \mu\text{M}$ . Le spectre (C) correspond à l'édifice contraint RAFT- $[d(5'AGGG TAT^3')]_4$ , conditionné à la concentration de  $10 \mu\text{M}$ . N.B. : les analyses sont faites avec des concentrations en G-quadruplexe de  $10 \mu\text{M}$ .

## II. Courbes de dénaturation des structures parallèles



**Figure 123** : Courbes de dénaturation, des structures respectives  $[d(5'AGGG T^3')]_4$  et RAFT- $[d(5'AGGG T^3')]_4$ , réalisées dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0), en présence de KCl (A,D), de NaCl (B,E) et LiCl (C,F). Les analyses ont été faites avec des concentrations en G-quadruplexe de  $10 \mu\text{M}$ , sur une plage de température de 15 à 95 °C.



**Figure 124 :** Courbes de dénaturation, des structures respectives  $[d(5'AGGG T_6 3')]_4$  et RAFT -  $[d(5'AGGG T_6 3')]_4$ , réalisées dans une solution de tampon MOPS (20 mM, pH 7,0), en présence de KCl (A,D), de NaCl (B,E) et LiCl (C,F). Les analyses ont été faites avec des concentrations en G-quadruplexe de 10  $\mu$ M, sur une plage de température de 15 à 95 °C.

---

## Références

---

- <sup>1</sup> Anastas, P., Eghbali, N., *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312.
- <sup>2</sup> Murphy, M. A., *Found Chem* **2018**, *20*, 121-165.
- <sup>3</sup> Fuster, D., Clotet, B., *Expert Opin. Pharmacother.* **2005**, *6*, 1565-1572.
- <sup>4</sup> Massoomi, F., *Pharmacother.* **1993**, *13*, 14.
- <sup>5</sup> Jacobsen, E. N., *Comprehensive Asymmetric Catalysis*, Springer, Berlin, **2000**.
- <sup>6</sup> Seayad, J., List, B., *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 719.
- <sup>7</sup> Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2011**.
- <sup>8</sup> (a) Reetz, M. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 5716-5722 ; (b) Perez-Rizquez, C., Rodriguez-Otero, A., Palomo, J. M., *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 7114-7123; (c) Thomas, C. M., Ward, T. R., *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 337.
- <sup>9</sup> Lewis, J. C., *ACS Catalysis* **2013**, *3*, 2954-2975.
- <sup>10</sup> Steinreiber, J., Ward, T. R., *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 751-66.
- <sup>11</sup> Roelfes, G., *Mol. BioSyst.* **2007**, *3*, 126-135.
- <sup>12</sup> (a) Fernández-Gacio, A., Codina, A., Fastrez, J., Riant, O., Soumillion, P., *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1013-1016; (b) Okrasa, K., Kazlauskas, R. J., *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1587-1596; (c) Kaiser, E., Lawrence, D., *Science* **1984**, *226*, 505-511; (d) Jing, Q., Okrasa, K., Kazlauskas, R. J., *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 1370-1376.
- <sup>13</sup> Fujieda, N., Schätti, J., Stutfeld, E., Ohkubo, K., Maier, T., Fukuzumi, S., Ward, T. R., *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4060-4065.
- <sup>14</sup> (a) Cherrier, M. V., Girgenti, E., Amara, P., Iannello, M., Marchi-Delapierre, C., Fontecilla-Camps, J. C., Ménage, S., Cavazza, C., *J Biol Inorg Chem* **2012**, *17*, 817-829; (b) Marchi-Delapierre, C., Rondot, L., Cavazza, C., Ménage, S., *Isr. J. Chem.* **2015**, *55*, 61-75; (c) Davis, H. J., Ward, T. R., *ACS Cent. Sci.* **2019**, *5*, 1120-1136.
- <sup>15</sup> Musil, M., Konegger, H., Hon, J., Bednar, D., Damborsky, J., *ACS Catal.* **2019**, *9*, 1033-1054.
- <sup>16</sup> Mergny, J.-L., Lacroix, L., *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515-537.
- <sup>17</sup> Crick, W., *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- <sup>18</sup> Wilkins, M., Hugh, Frederick, Stokes, A. R., Wilson, H. R., *Nature* **1953**, *171*, 738-740.
- <sup>19</sup> Franklin, R. E., Gosling, R. G., *Nature* **1953**, *171*, 740-741.
- <sup>20</sup> Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D., Williams, D. M., Eds., in *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, RSC, Cambridge, **2007**, pp. 13-76.
- <sup>21</sup> (a) Neidle, S., Parkinson, G. N., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 275-283; (b) Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., Prescott, D. M., *Nature* **1991**, *350*, 3.
- <sup>22</sup> Yum, J. H., Park, S., Hiraga, R., Okamura, I., Notsu, S., Sugiyama, H., *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 2548-2553.
- <sup>23</sup> Neidle, S., Balasubramanian, S., Eds., in *Quadruplex Nucleic Acids*, RSC, Cambridge, **2006**, pp. 1-30.
- <sup>24</sup> Roelfes, G., Feringa, B. L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3230-3232.
- <sup>25</sup> (a) Boersma, A. J., Feringa, B. L., Roelfes, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3346-3348 ; (b) Park, S., Ikehata, K., Watabe, R., Hidaka, Y., Rajendran, A., Sugiyama, H., *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10398.
- <sup>26</sup> (a) Li, Y., Wang, C., Jia, G., Lu, S., Li, C., *Tetrahedron* **2013**, *69*, 6585-6590 ; (b) Guo, J., Wang, D., Pantatosaki, E., Kuang, H., Papadopoulos, G. K., Tsapatsis, M., Kokkoli, E., *JACS Au* **2022**, *2*, 483-491.
- <sup>27</sup> Rioz-Martínez, A., Oelerich, J., Ségaud, N., Roelfes, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14136-14140.
- <sup>28</sup> Wang, C., Jia, G., Zhou, J., Li, Y., Liu, Y., Lu, S., Li, C., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9352-9355.
- <sup>29</sup> Roe, S., Ritson, D. J., Garner, T., Searle, M., Moses, J. E., *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4309.
- <sup>30</sup> Li, Y., Cheng, M., Hao, J., Wang, C., Jia, G., Li, C., *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 5578-5585.
- <sup>31</sup> Wilking, M., Hennecke, U., *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 6940.
- <sup>32</sup> Wang, C., Li, Y., Jia, G., Liu, Y., Lu, S., Li, C., *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6232.
- <sup>33</sup> (a) Zhao, H., Shen, K., *Biotechnol Progr.* **2016**, *32*, 891-898 ; (b) Dey, S., Jäschke, A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 11279-11282.
- <sup>34</sup> Travascio, P., Li, Y., Sen, D., *Chem. Biol* **1998**, *5*, 505-517.
- <sup>35</sup> Kosman, J., Juskowiak, B., *Anal. Chim. Acta* **2011**, *707*, 7-17.
- <sup>36</sup> Golub, E., Freeman, R., Willner, I., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 11710-11714.
- <sup>37</sup> Guo, Y., Chen, J., Cheng, M., Monchaud, D., Zhou, J., Ju, H., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 16636-16640.
- <sup>38</sup> Murat, P., Bonnet, R., Van der Heyden, A., Spinelli, N., Labbé, P., Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.-P., Dumy, P., Defrancq, E., *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6106-6114.
- <sup>39</sup> Bonnet, R., Lavergne, T., Gennaro, B., Spinelli, N., Defrancq, E., *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4850-4853.
- <sup>40</sup> Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- <sup>41</sup> Matteucci, M. D., Caruthers, M. H., *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3185-3191.

- <sup>42</sup> Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004-2021.
- <sup>43</sup> Prescher, J. A., Bertozzi, C. R., *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13-21.
- <sup>44</sup> Jencks, W. P., *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475-481.
- <sup>45</sup> Rose, K., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 30-33.
- <sup>46</sup> Kalia, J., Raines, R. T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523-7526.
- <sup>47</sup> Pina, A., Kadri, M., Arosio, D., Dal Corso, A., Coll, J., Gennari, C., Boturyn, D., *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 7492-7496.
- <sup>48</sup> Murat, P., Cressend, D., Spinelli, N., Van der Heyden, A., Labbé, P., Dumy, P., Defrancq, E., *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2588-2591.
- <sup>49</sup> Huisgen, R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2*, 565-598.
- <sup>50</sup> Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- <sup>51</sup> Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M., *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064.
- <sup>52</sup> Agard, N. J., Prescher, J. A., Bertozzi, C. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046-15047.
- <sup>53</sup> Bonnat, L., Bar, L., Génaro, B., Bonnet, H., Jarjayes, O., Thomas, F., Dejeu, J., Defrancq, E., Lavergne, T., *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 5602-5613.
- <sup>54</sup> Tietze, L. F., Schroeter, C., Gabius, S., Brinck, U., Goerlach-Graw, A., Gabius, H. J., *Bioconjug. Chem.* **1991**, *2*, 148-153.
- <sup>55</sup> Fonvielle, M., Sakkas, N., Iannazzo, L., Le Fournis, C., Patin, D., Mengin-Lecreulx, D., El-Sagheer, A., Braud, E., Cardon, S., Brown, T., Arthur, M., Etheve-Quellejeu, M., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13553-13557.
- <sup>56</sup> Shivalingam, A., Taemaitree, L., El-Sagheer, A. H., Brown, T., *Angew. Chem.* **2020**, *132*, 11513-11519.
- <sup>57</sup> Foillard, S., Rasmussen, M. O., Razkin, J., Boturyn, D., Dumy, P., *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 983-991.
- <sup>58</sup> Murat, P., Gennaro, B., Garcia, J., Spinelli, N., Dumy, P., Defrancq, E., *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 5791-5795.
- <sup>59</sup> Virgilio, A., Esposito, V., Lejault, P., Monchaud, D., Galeone, A., *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *151*, 976-983.
- <sup>60</sup> Patel, P., *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3836-3843.
- <sup>61</sup> Mergny, J.-L., *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 81-94.
- <sup>62</sup> Sigman, D. S., Graham, D. R., D'Aurora, V., Stern, A. M., *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12269-12272.
- <sup>63</sup> Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C., Finn, M. G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9879-9883.
- <sup>64</sup> Macaya, R. F., Schultze, P., Smith, F. W., Roe, J. A., Feigon, J., *PNAS* **1993**, *90*, 3745-3749.
- <sup>65</sup> Lim, K. W., Amrane, S., Bouaziz, S., Xu, W., Mu, Y., Patel, D. J., Luu, K. N., Phan, A. T., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4301-4309.
- <sup>66</sup> Li, Y., Gabriele, E., Samain, F., Favalli, N., Sladojevich, F., Scheuermann, J., Neri, D., *ACS Comb Sci* **2016**, *18*, 438-443.
- <sup>67</sup> Ratnayake, A. S., Flanagan, M. E., Foley, T. L., Smith, J. D., Johnson, J. G., Bellenger, J., Montgomery, J. I., Paegel, B. M., *ACS Comb. Sci.* **2019**, *21*, 650-655.
- <sup>68</sup> (a) Canale, T. D., Sen, D., *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - General Subjects* **2017**, *1861*, 1455-1462; (b) Cao, Y., Ding, P., Yang, L., Li, W., Luo, Y., Wang, J., Pei, R., *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 6896-6906; (c) Chen, J., Zhang, Y., Cheng, M., Guo, Y., Šponer, J., Monchaud, D., Mergny, J.-L., Ju, H., Zhou, J., *ACS Catal.* **2018**, *8*, 11352-11361.
- <sup>69</sup> Ali, A., Kamra, M., Roy, S., Muniyappa, K., Bhattacharya, S., *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 341-352.
- <sup>70</sup> Bertrand, H., Monchaud, D., De Cian, A., Guillot, R., Mergny, J.-L., Teulade-Fichou, M.-P., *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2555.
- <sup>71</sup> Draksharapu, A., Boersma, A. J., Browne, W. R., Roelfes, G., *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 3656-3663.
- <sup>72</sup> Lopez, S., De nouveaux biocatalyseurs hétérogènes pour des réactions d'oxydation : des cristaux de métalloenzymes artificielles, Thèse, Université Grenoble Alpes, **2018**.
- <sup>73</sup> (a) Cheng, M., Li, Y., Zhou, J., Jia, G., Lu, S.-M., Yang, Y., Li, C., *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9644-9647; (b) Cheng, Y., Cheng, M., Hao, J., Jia, G., Li, C., *ChemBioChem* **2018**, *19*, 2233-2240.
- <sup>74</sup> Mansot, J., Aubert, S., Duchemin, N., Vasseur, J.-J., Arseniyadis, S., Smietana, M., *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 2875-2881.
- <sup>75</sup> Roelfes, G., Boersma, A. J., Feringa, B. L., *Chem. I Commun.* **2006**, 635.
- <sup>76</sup> Gottarelli, G., Lena, S., Masiero, S., Pieraccini, S., Spada, G. P., *Chirality* **2008**, *20*, 471-485.
- <sup>77</sup> Fasman, G. D., Ed., *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Springer US, Boston, MA, **1996**.
- <sup>78</sup> Telfer, S. G., McLean, T. M., Waterland, M. R., *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 3097.
- <sup>79</sup> Kasha, M., Rawls, H. R., Ashraf El-Bayoumi, M., *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371-392.
- <sup>80</sup> (a) Chaires, J. B., Graves, D., Eds., *Quadruplex Nucleic Acids*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2013**; (b) Clark, L. B., *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5265-5270.
- <sup>81</sup> Gray, D. M., Wen, J.-D., Gray, C. W., Regges, R., Regges, C., Raabe, G., Fleischhauer, J., *Chirality* **2008**, *20*, 431-440.

- <sup>82</sup> Masiero, S., Trotta, R., Pieraccini, S., De Tito, S., Perone, R., Randazzo, A., Spada, G. P., *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2683.
- <sup>83</sup> Šponer, J., Mládek, A., Špačková, N., Cang, X., Cheatham, T. E., Grimme, S., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9785-9796.
- <sup>84</sup> Hardin, C. C., Watson, T., Corregan, M., Bailey, C., *Biochemistry* **1992**, *31*, 833-841.
- <sup>85</sup> Gray, R. D., Chaires, J. B., *Biophys. Chem.* **2011**, *159*, 205-209.
- <sup>86</sup> Largy, E., Mergny, J.-L., Gabelica, V., in *The Alkali Metal Ions: Their Role for Life* (Eds.: A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel), Springer International Publishing, Cham, **2016**, pp. 203-258.
- <sup>87</sup> Balagurumoorthy, P., Brahmachari, S. K., *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 21858-21869.
- <sup>88</sup> Ambrus, A., Chen, D., Dai, J., Bialis, T., Jones, R. A., Yang, D., *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2723-2735.
- <sup>89</sup> Zhou, J., Wei, C., Jia, G., Wang, X., Tang, Q., Feng, Z., Li, C., *Biophys. Chem.* **2008**, *136*, 124-127.
- <sup>90</sup> Miller, M. C., Buscaglia, R., Chaires, J. B., Lane, A. N., Trent, J. O., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 17105-17107.
- <sup>91</sup> Vorlíčková, M., Bednářová, K., Kypr, J., *Biopolymers* **2006**, *82*, 253-260.
- <sup>92</sup> Fonseca Guerra, C., Zijlstra, H., Paragi, G., Bickelhaupt, F. M., *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12612-12622.
- <sup>93</sup> Wang, Y., Patel, D. J., *Structure* **1993**, *1*, 263-282.
- <sup>94</sup> Parkinson, G. N., Lee, M. P. H., Neidle, S., *Nature* **2002**, *417*, 876-880.
- <sup>95</sup> Miyoshi, D., Nakao, A., Sugimoto, N., *Biochemistry* **2002**, *41*, 15017-15024.
- <sup>96</sup> Dai, J., Carver, M., PUNCHIHEWA, C., Jones, R. A., Yang, D., *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4927-4940.
- <sup>97</sup> Li, Q., Zhao, J., Liu, L., Jonchhe, S., Rizzuto, F. J., Mandal, S., He, H., Wei, S., Sleiman, H. F., Mao, H., Mao, C., *Nat. Mater.* **2020**, *19*, 1012-1018.
- <sup>98</sup> (a) Gaynutdinov, T. I., Neumann, R. D., Panyutin, I. G., *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4079-4087; (b) Renčiuk, D., Kejnovská, I., Školáková, P., Bednářová, K., Motlová, J., Vorlíčková, M., *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 6625-6634.
- <sup>99</sup> Mergny, J.-L., Phan, A.-T., Lacroix, L., *FEBS Letters* **1998**, *435*, 74-78.
- <sup>100</sup> Wang, Z.-F., Li, M.-H., Hsu, S.-T. D., Chang, T.-C., *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 4723-4733.
- <sup>101</sup> (a) Bardin, C., Leroy, J. L., *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 477-488; (b) Tran, P. L. T., De Cian, A., Gros, J., Moriyama, R., Mergny, J.-L., in *Quadruplex Nucleic Acids* (Eds.: J.B. Chaires, D. Graves), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2012**, pp. 243-273.
- <sup>102</sup> Mergny, J.-L., Lacroix, L., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* **2009**, *37*, 17.1.1-17.1.15.
- <sup>103</sup> Russo Krauss, I., Merlino, A., Randazzo, A., Novellino, E., Mazzarella, L., Sica, F., *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 8119-8128.
- <sup>104</sup> Dai, J., Carver, M., Yang, D., *Biochimie* **2008**, *90*, 1172-1183.
- <sup>105</sup> Lee, J. Y., Kim, D. S., *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 3625-3634.
- <sup>106</sup> Yum, J. H., Park, S., Sugiyama, H., *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 9547-9561.
- <sup>107</sup> Stefan, L., Denat, F., Monchaud, D., *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 8759-8772; (d) Chen, J., Guo, Y., Zhou, J., Ju, H., *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 4210-4215.
- <sup>108</sup> Pradines, V., Pratviel, G., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2185-2188.
- <sup>109</sup> Dey, S., Jäschke, A., *Molecules* **2020**, *25*, 3121.
- <sup>110</sup> Gavathiotis, E., Searle, M. S., *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1650-1656.
- <sup>111</sup> Collie, G. W., Campbell, N. H., Neidle, S., *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 4785-4799.
- <sup>112</sup> (a) Li, W., Li, Y., Liu, Z., Lin, B., Yi, H., Xu, F., Nie, Z., Yao, S., *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 7373-7384; (b) Yamamoto, Y., Araki, H., Shinomiya, R., Hayasaka, K., Nakayama, Y., Ochi, K., Shibata, T., Momotake, A., Ohyama, T., Hagiwara, M., Hemmi, H., *Biochemistry* **2018**, *57*, 5938-5948.
- <sup>113</sup> Peng, P., Du, Y., Sun, Y., Liu, S., Mi, L., Li, T., *Analyst* **2018**, *143*, 3814-3820.
- <sup>114</sup> McQuaid, K. T., Takahashi, S., Baumgaertner, L., Cardin, D. J., Paterson, N. G., Hall, J. P., Sugimoto, N., Cardin, C. J., *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 5956-5964.
- <sup>cxv</sup> Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.-P., *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627-636.
- <sup>cxvi</sup> Micura, R., Höbartner, C., *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 7331-7353.
- <sup>117</sup> Byrne, C., McEwan, P. A., Emsley, J., Fischer, P. M., Chan, W. C., *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2589-2591.
- <sup>118</sup> Galibert, M., Dumy, P., Boturyn, D., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2576-2579.
- <sup>119</sup> Dickschat, A. T., Behrends, F., Surmiak, S., Weiß, M., Eckert, H., Studer, A., *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2195.

## **Elaboration de catalyseurs chiraux à partir d'oligonucléotides contraints**

Depuis la révolution industrielle, la chimie n'a cessé de prospérer et de développer de nouveaux procédés de plus en plus performants, afin de répondre aux besoins d'une société en pleine expansion. Cependant, compte tenu des conditions climatiques actuelles, il est devenu primordial de développer une chimie plus verte et éco-responsable. Afin de répondre aux exigences de cette « chimie verte », le domaine des métalloenzymes artificielles, combinant à la fois les approches bio-inspirées et catalytique, a été particulièrement explorées. En raison de leur polymorphisme de repliement important, dépendant de la nature de la séquence ainsi que du milieu salin, les G-quadruplexes constituent des entités catalytiques polyvalentes à base d'ADN pour les réactions asymétriques sélectives. Cependant, il a été montré que l'énantiosélectivité des réactions de catalyse dépend grandement de la topologie majoritairement adoptée par le G-quadruplexe, et donc des conditions de réaction. Il est, en effet, possible d'observer différentes énantiosélectivité selon la nature de la topologie majoritairement adoptée par le G-quadruplexe. Dans ce contexte, notre laboratoire a développé le concept de RAFT (pour « Regioselectively Adressable Functionalized Template ») pour assembler des mimes stables de G-quadruplexe. La première partie de notre étude a consisté à synthétiser un panel de topologie contrainte de G-quadruplexe, en utilisant une plateforme cyclopeptidique fonctionnelle et des ligations chimiosélectives distinctes. Puis, dans un second temps, les édifices synthétisés ont été analysés par dichroïsme circulaire afin de confirmer les topologies majoritairement adoptées et le gain de stabilité par rapport aux structures non contraintes. Enfin, des réactions de catalyse de sulfoxydation de dérivés de thioéther ont été réalisées afin de déterminer l'impact de chacune des topologies sur l'énantiosélectivité de cette réaction.

**Mots-clés :** Oligonucléotide contraint, G-quadruplexe, Catalyse asymétrique, Sulfoxydation.

### **Constrained oligonucleotides based chiral catalyst**

Since the industrial revolution, chemistry has continued to flourish and develop new and increasingly efficient processes to meet the needs of a growing society. However, given the current climatic conditions, it has become essential to develop a greener and more eco-responsible chemistry. In order to meet the requirements of this "green chemistry", the field of artificial metalloenzymes, combining both bio-inspired and catalytic approaches, has been particularly explored. Due to their high folding polymorphism, depending on the nature of the sequence as well as the salt environment, G-quadruplexes are versatile DNA-based catalytic entities for selective asymmetric reactions. However, it has been shown that the enantioselectivity of catalytic reactions is highly dependent on the topology predominantly adopted by the G-quadruplex. Indeed, it is possible to observe different enantioselectivities depending on the nature of the predominant topology adopted. In this context, our laboratory has developed the concept of RAFT (for "Regioselectively Addressable Functionalized Template") to assemble stable G-quadruplex mimes. The first part of our study consisted in synthesizing a panel of constrained G-quadruplex, using a functional cyclopeptide platform and distinct chemoselective ligations. Then, in a second step, the synthesized structures were analyzed by circular dichroism in order to confirm the predominantly adopted topologies and the enhanced stability compared to the unconstrained structures. Finally, catalytic reactions for the sulfoxidation of thioether derivatives were performed to determine the impact of each topology on the enantioselectivity of this reaction.

**Keywords:** Constrained oligonucleotide, G-quadruplex, Asymmetric catalysis, Sulfoxidation.