



HAL
open science

Oligonucléotides fonctionnalisés, mimes de protéases à sérine

Crystalle Chardet

► **To cite this version:**

Crystalle Chardet. Oligonucléotides fonctionnalisés, mimes de protéases à sérine. Chimie organique. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30259 . tel-04049528

HAL Id: tel-04049528

<https://theses.hal.science/tel-04049528v1>

Submitted on 28 Mar 2023

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

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Crystalle CHARDET

Le 14 décembre 2022

Oligonucléotides fonctionnalisés, mimes de protéases à sérine

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Chimie-Biologie-Santé**

Unité de recherche :

**SPCMIB - Laboratoire de Synthèse et PhysicoChimie de Molécules d'Intérêt
Biologique**

Thèse dirigée par
Béatrice GERLAND

Jury

Mme Karine ALVAREZ, Rapporteur
M. Thomas LAVERGNE, Rapporteur
Mme Christelle DUPOUY, Examinatrice
Mme Laurence SALOMÉ, Examinatrice
M. Christophe COUDRET, Examineur
Mme Béatrice GERLAND, Directrice de thèse

A mon papa et ma maman.
Merci de m'avoir donné "un prénom de chimiste".

*"Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté.
Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé
devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées."*

Marie Curie

"DNA neither cares nor knows. DNA just is. And we dance to its music."

Richard Dawkins

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés durant les trois dernières années au sein de l'équipe MoNALISA du laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécule d'intérêt Biologique (SPCMIB) sous la direction de Madame Béatrice Gerland. Je remercie Monsieur Yves Génisson, directeur du laboratoire, de m'avoir accueillie au sein de l'unité.

Je souhaite remercier toutes les personnes ayant participé à mon jury : Madame Karine Alvarez et Monsieur Thomas Lavergne, je vous remercie tous les deux d'avoir accepté de juger mon travail et pour toutes vos remarques constructives.

Je remercie Madame Laurence Salomé d'avoir accepté de présider ce jury et de l'avoir fait avec une telle pertinence et bienveillance. Je souhaite également remercier Monsieur Christophe Coudret d'avoir accepté d'être examinateur sur ce sujet pourtant un peu éloigné de sa spécialité et d'avoir été si juste. Pour finir, je tiens à adresser un remerciement tout particulier à Madame Christelle Dupouy pour avoir, non seulement accepté d'être membre de ce jury en temps qu'examinatrice, mais également pour m'avoir, il y a quelques années, initiée à la chimie des oligonucléotides puis guidée vers cette thèse et avoir depuis veillé sur moi de loin.

Je vous suis très reconnaissante à tous les cinq d'avoir accepté de faire partie de ce jury, du temps que vous avez consacré à l'évaluation de ma thèse et de tous vos conseils et remarques lors de la discussion très enrichissante lors de ma soutenance le 14 décembre dernier.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont entourée durant cette thèse :

Tout d'abord, Béa, ma cheffe merci pour ta patience, pour ta bienveillance, et la confiance que tu m'as accordée tout au long de ces trois années. Merci pour ton enthousiasme et ton soutien de chaque instant. Merci de m'avoir portée, supportée et emportée jusque-là. Merci de m'avoir envoyée au Japon. C'était une sacrée aventure que ces trois ans, j'ai appris plus que je ne le réalise encore je pense, tant humainement que professionnellement et j'espère que tu auras pu apprendre à ton tour à bien torturer une étudiante en thèse. Sache que je suis honorée d'avoir été ta première thésarde...et que je souhaite bien du courage à tous celles et ceux, que je souhaite nombreux, qui suivront. ;p

Jean-Marc, mon colocataire de bureau préféré. Merci de m'avoir acceptée au sein de ton bureau, de m'avoir initiée à France Inter. J'ai toujours beaucoup apprécié nos grandes conversations politiques, sur le monde, l'environnement et la bêtise humaine. Nous n'aurons pas changé grand-chose mais ça m'aura fait du bien de savoir que je ne suis pas seule à penser tout ça. Tu m'as beaucoup appris et m'as toujours donné de très bons conseils, ces trois années n'auraient pas été les mêmes sans toi. Merci pour ton soutien et d'avoir veillé sur moi...et sur mon vélo ! Pour finir, merci pour l'impact INFLUENCE très positive que tu as eu sur cette thèse !

Corinne, à toi aussi je dois beaucoup. Tout d'abord merci pour ta gentillesse et ta patience. Tout particulièrement quand Béa et moi parlions bruyamment un jargon incompréhensible à côté de toi alors que tu tentais de corriger tes copies. Merci d'avoir été le soir, la lumière au bout du couloir, m'évitant de rester seule tard. Merci pour ta bienveillance, pour ton sourire, tes bons conseils pour l'enseignement et les anecdotes de corrections. Sur le thème des corrections, merci pour le temps que tu as passé sur les miennes et pour ton soutien de chaque instant. Et par-dessus tout merci de m'avoir montré qu'avec de la volonté, on peut déplacer des montagnes...ou le cas échéant, une armoire pour rentrer dans un bureau fermé à clé ! Merci Coco.

A tous les trois, merci d'avoir veillé sur moi et de m'avoir tant appris tant sur la chimie qu'humainement.

Je tiens à remercier tout particulièrement certain.es d'entre vous :

My Lan, Dr. Tran, je tiens à te remercier tout particulièrement d'avoir été là, dans la même galère que moi durant ces années de thèse. A tour de rôle très motivées ou désespérées, timing idéal pour pouvoir se soutenir. Je te remercie pour ton soutien dans les moments difficiles, quand je débarquais dans le labo au bord des larmes mais que je n'avais pas envie de parler ou qu'on avait

Remerciements

besoin de sortir prendre l'air. Merci pour nos conversations à voix basses dans le couloir, les conneries, les blagues, les surprises et les bonbons. Merci d'avoir lutté toi aussi contre le MALDI infernal pour que je ne sois pas la seule à avoir des galères de machines. Merci de m'avoir écouté me plaindre de mon absence de synthé pendant tous ces mois. On l'a fait, on a réussi, on a été jusqu'au bout et je suis fière de nous. Je suis contente d'avoir fait cette aventure à tes côtés. Merci pour tout et à bientôt au Canada j'espère !

Emma, ma première collègue « jeune » du labo ! La belle époque au début de ma thèse, quand tu es arrivée et qu'on faisait la pause-café au bureau au 3^{ème} car on ne se mélangeait pas encore aux autres, est très loin ! On a vécu de belles aventures toi et moi, que ce soit quand tu venais dormir à l'appart les jours de grèves SNCF ou qu'on allait chercher Maloh à 3h du mat au milieu de nul part. Puis, et surtout, notre trio avec My Lan, nos soirées, week-ends, pause sur la coursive, période inoubliable et qui va beaucoup me manquer.

Sandra, ma "petite Sandra", merci pour cette année à mes côtés ! Pour ton dévouement alors que tu galérais pour nous sur ce qu'il y a de plus pénible à mettre au point, tu as fait un boulot énorme et je t'en remercie. Tu m'as beaucoup impressionnée dans ta capacité d'adaptation car tu es arrivée chez nous biologiste, un peu perdue dans tout ce que je racontais et tu es repartie biochimiste et spécialiste du DC et de la chromatographie ionique ! Chapeau et merci pour tout. Valentin, merci d'avoir été le parfait voisin-stagiaire pour mon deuxième hiver de thèse. Motivé et motivant. Merci pour ton courage face aux couplages, têtus, et à ma mauvaise humeur de chimiste désabusée en mal de synthé. Et puis merci pour les gâteaux !! Et aussi simplement merci d'avoir pris le relais à Montpellier : que la mécanochimie soit avec toi, que ta thèse soit belle et que tes stagiaires soient vaillants. Cette année aurait été bien plus difficile sans vous à mes côtés, nos pauses de labo valaient de l'or. Sachez en tout cas tous les deux que j'ai été ravie de travailler à vos côtés.

Margaux et Marc. Je suis vraiment contente que vous ayez débarqué pour égayer cette deuxième année de thèse. Merci Marc pour ta motivation, ton énergie, ton « talent pour le chant » et ton « humour ». Merci Margaux, pour ta gentillesse, pour nos bavardages, pour ta motivation contagieuse et pour tous ces bons moments à parler lecture ou théâtre durant ces deux dernières années. Courage à vous deux pour ces derniers mois, la fin va arriver vite mais vous serez prêts. Mélina, merci pour ta présence, ton soutien et ta gentillesse, pour ton grand sens de l'organisation (vive les week-ends à la neige ou à la montagne) et de l'accueil (tu nous nourris toujours très bien). Je sais à quel point tu as donné pour My Lan et moi à la fin de la thèse pour nous organiser de beaux pots de thèse avec Emma et vraiment merci et bravo ! Courage pour la fin de ta thèse, tu tiens le bon bout ! Rasoul à toi aussi, bon courage pour la fin et bonne chance pour la suite !

Merci à « ma petite » Mathilde d'avoir été ma stagiaire adoptée, merci pour ta bonne humeur, ta joie de vivre et ton humour. Solène et Tom merci d'avoir été « mes » premiers vrais stagiaires après avoir fait partie de mes premiers étudiants en TP. Merci de m'avoir « choisie », fait confiance et d'avoir égayé notre petit bout de labo. A tous les trois, merci pour votre motivation et votre implication, je suis très fière de vous, de vous avoir vu grandir en tant que chimistes et de vous avoir eu à mes côtés durant ces quelques mois.

Cécile, Stéphanie, merci à toutes les deux d'avoir sans être mes cheffes, été aussi des modèles pour moi, d'avoir eu toujours un bon mot et d'avoir veillé sur nous tous les « jeunes » avec une telle bienveillance.

A Muriel, un merci tout particulier pour ta gentillesse, ton sourire, nos conversations quotidiennes sur tout et n'importe quoi. Merci d'avoir cherché avec moi des bonnes nouvelles dans un monde qui n'en offre pas toujours. Merci de m'avoir soutenue, encouragée et parfois même nourrie de bon chocolat. Merci pour tout, du fond du cœur !

Remerciements

Emeline, Lieutenant, je compte sur vous pour continuer comme ça, le bon boulot, la bonne humeur, et les T-shirts rigolo (*repos*). L'ambiance n'aurait pas été la même sans toi ces dernières années, toi Emeline caution "permanente jeune" du SPCMIB !

Caro, merci pour les pauses chocolat chaud, merci pour Ugo, pour les conneries, pour le carnaval. Merci d'être la fée de la RMN !

Nadine, Isabelle, Nathalie, merci pour votre accueil bienveillant au début de ma thèse et pour toutes nos bonnes conversations. Aux « petits nouveaux thésard.es » : Valentine, Maëlle, Jon et Stephen, je vous souhaite à chacun.ne une très belle thèse et je suis ravie d'avoir eu le temps d'apprendre à vous connaître. Merci pour votre énergie et votre enthousiasme et bonne chance à vous quatre ! A toutes celles et ceux que j'ai croisé et côtoyé tous les jours au sein du bâtiment 2R1, je dis merci pour vos sourires, vos rires et vos idées.

A ma famille, à mes amies, je vous dois tout le reste. Merci à vous, pour tout, de m'avoir porté jusque-là. J'ai grandi et suis devenue ce que je suis grâce à vous. Quelques remerciements tout particuliers :

Pauline, Dr. Fischer, ma binôme, mon inséparable des années à la fac... Merci d'avoir vécu cette même misère à distance, d'avoir compris mes peurs, mes inquiétudes et d'avoir partagé les tiennes pour qu'on se sente moins seules ! Pour les BK, les mcflurry et les apremis à trainer chez moi ou sur la plage lors des weekends de désespoir. Astrid, mon "modèle", j'ai eu beaucoup de chance de te rencontrer en master, que tu m'aies accueillie à mon arrivée à Toulouse et que tu m'aies toujours soutenue depuis ! Merci pour tout et merci surtout, d'être mon amie.

Myriam, bientôt je pourrais aussi t'appeler docteur même si pour moi tu l'es déjà ! Tu es la meilleure et je suis déjà immensément fière de toi. On a bien grandi depuis l'époque terrible de notre prépa/PACES respectifs et nos restos du samedi midi pour tenir le coup. Je suis contente qu'on ait pu se soutenir pendant ces épreuves et toutes nos études, et je te suis infiniment reconnaissante pour ta présence à mes côtés !

Estelle, on a grandi ensemble et ma vie ne serait pas la même sans toi, ton amitié et ta présence ! Difficile de résumer en quelques phrases tout ce que je te dois et la chance que j'ai d'avoir fait ta connaissance. Merci pour ton soutien de tous les instants, tes encouragements et ta lumière. Merci à vous deux d'être mes meilleures amies, ma famille adoptée.

Bien évidemment, je ne serais pas devenue l'adulte que je suis aujourd'hui sans ma famille. Ainsi, je remercie tout particulièrement ma Maman de m'avoir toujours encouragée à faire des études. Sans ton soutien infini durant toutes ces années et celui de Thierry je n'aurais pas été si loin. Merci également à ma fratrie (et Marina bien sûr !) et mes grands-parents, pour avoir toujours été à mes côtés au quotidien. Un merci tout particulier à Yaël pour ses nombreuses relectures durant mes études, je t'ai épargné la thèse, c'est cadeau !

Pour finir, Ugo, merci à toi, pour ton amour, pour ta bonté, pour les danses, pour la cuisine, pour les rires, le bonheur et tout le reste... Tu as rendu cette année si belle, envers et contre tout, et particulièrement durant la rédaction de ce manuscrit.

Table des matières

Abréviations :	1
Introduction	3
Chapitre I : Etude bibliographique	9
1. Les acides nucléiques	11
1.1. Généralités	11
1.1.1. Structure élémentaire	11
1.1.1. Structures secondaires	11
1.1.1.1. Structure secondaire en double hélice	11
1.1.1.2. Structure secondaire en double hélice	12
1.1.1.3. Autres structures secondaires	15
1.1.2. Assemblage de tétraèdres (structures tertiaires)	17
1.1.3. Propriétés de reconnaissance des acides nucléiques	19
1.1.3.1. Aptamères - Reconnaissance d'un substrat.....	19
1.1.3.2. Aptazymes - Reconnaissance et activité catalytique	20
1.1.4. Applications biologiques	21
1.2. Oligonucléotides : synthèse et modification	22
1.2.1. Synthèse en solution des oligonucléotides – Bref historique des méthodes. 22	
1.2.2. Synthèse supportée	24
1.2.2.1. Description du cycle de synthèse.....	25
1.2.2.2. Nouvelle méthode	27
1.2.3. Oligonucléotides modifiés	27
1.2.3.1. Modifications de la base	28
1.2.3.2. Modifications du lien phosphodiester	29
1.2.3.3. Modifications du sucre.....	30
1.2.3.4. Fonctionnalisation et conjugaison	32
1.2.3.5. Conjugaison des extrémités.....	33
1.2.3.6. Modification post-synthétique d'oligonucléotides convertibles.....	34
1.2.3.6.1. Chimie Click et fonctionnalisation des oligonucléotides.....	34
1.2.4. Synthèse enzymatique (à partir de nucléosides triphosphates)	36
2. Les protéases	37
2.1. Définition et généralités	37
2.2. Le cas des protéases à sérine	37
2.3. Mimes de protéases	39
2.3.1. Mimes de métalloprotéases	39
2.3.2. Mime de protéases à sérine (ou cystéine)	40
2.3.2.1. Mimes organocatalytiques	40
2.3.2.2. Mimes au squelette peptidique.....	42
2.3.2.3. Mimes de types surfactants.....	45
2.3.2.4. Mimes de types nanostructures	46

2.3.2.5.	Mimes nucléiques	48
2.3.2.5.1.	Des acides nucléiques comme mimes de protéases ?	48
2.3.2.5.2.	Approche enzymatique	48
2.3.2.5.3.	Approche phosphoramidite	49
Bibliographie du chapitre I		53
Chapitre II : Synthèse des Tripodes.....		65
1. Synthèse des Tripodes.....		67
1.1.	Tripode à squelette sérine (TripSer)	67
1.1.1.	Analyse rétrosynthétique	67
1.1.2.	Synthèse des bras azoture	69
1.1.3.	Voie A	69
1.1.4.	Voie B	71
1.2.	Tripode à squelette histidine (TripHis)	74
1.2.1.	Analyse rétrosynthétique	74
1.2.2.	Synthèse	75
2. Etude de l'activité catalytique de TripHis.....		77
3. Conclusion.....		82
Bibliographie du chapitre II		84
Chapitre III : Approche covalente		87
1. Principe de l'approche covalente.....		89
2. Synthèse des substrats chromogéniques		90
3. Synthèse des bulges ⁵B₁ fonctionnalisés		91
3.1.	Séquences	91
3.2.	Synthèse des brins convertibles CvON	92
3.2.1.	Synthèse des phosphoramidites convertibles.....	92
3.2.2.	Synthèse des oligonucléotides convertibles CvON.....	93
3.2.3.	Obtention des oligonucléotides fonctionnalisés FuON	96
3.2.4.	Déprotection des FuON-Tripode en conditions basiques	98
3.2.4.1.	Déprotection de FuON- TripSer-Me	98
1.1.1.1.	Déprotection de FuON- TripHis-Me	99
1.2.	Assemblage du Bulge ⁵ B ₁ fonctionnalisé.....	100
1.2.1.	Etude physicochimique du Bulge ⁵ B ₁ fonctionnalisé.....	100
1.2.2.	Etudes complémentaires de dénaturation thermique	103
2. Assemblage des Bulges ⁵B₃, ⁷B₁ et ⁷B₃ fonctionnalisés		108
2.1.1.	Synthèse des CvON.....	108
2.1.2.	Assemblage et études de dénaturation thermique des bulges étendus	109
3. Premiers tests d'hydrolyse		112
2.2.1.1.	Etude UV de l'acétate de <i>p</i> -nitrophénol et du <i>p</i> -nitrophénol	113
2.2.1.2.	Etude UV de l'acétate de <i>p</i> -nitroaniline et du <i>p</i> -nitroaniline	114
2.2.1.3.	Tests d'hydrolyse en solution	115
4. Conclusions		116
Bibliographie du chapitre III		118

Chapitre IV : Approche Aptazyme.....	121
1. L'approche Aptazyme.....	123
2. Choix de l'aptamère	123
2.2. La séquence 1OLD	124
2.3. Le substrat Arm et ses dérivés	126
3. Etude de l'aptamère 1OLD-wt par dichroïsme circulaire.....	127
3.1. Aptamère 1OLD et Arm	127
3.2. Evaluation de la spécificité de l'interaction 1OLD-substrat.....	129
3.3. Etude par DC de l'ajustement induit par les substrats dérivés de l'argininamide sur l'aptamère 1OLD	130
4. Synthèse et fonctionnalisation de l'aptamère 1OLD	132
4.1. Synthèse des CvON-1OLD	132
4.2. Synthèse des brins fonctionnalisés	133
4.3. Caractérisation des CvON-1OLD et FuON-1OLD par HPLC.....	134
4.4. Caractérisation des CvON-1OLD et FuON-1OLD par MALDI-TOF.....	135
4.5. Etudes de dénaturation thermique.....	135
4.3.1. Dichroïsme circulaire	137
4.3.1.1. Contrôle de la reconnaissance de l'Arm	137
4.3.1.1. Contrôle de la reconnaissance d'ArmpNA.....	138
4.3.4. Tests d'hydrolyse.....	139
5. Conclusion.....	140
Bibliographie du chapitre IV :	142
Conclusion générale et perspectives	145
Experimental Part	153
Tripodes synthesis (Chapter II)	156
1. Azide-alkyl chains	156
2. TripSer (compound 12)	158
3. TripHis (compound 21)	162
Substrates synthesis (Chapter III and IV)	168
1. General Synthesis of azido carboxylic acids.....	168
2. General Synthesis of C ₁ and C ₃ <i>p</i> -nitro ester	169
3. General Synthesis of C ₁ -, C ₃ - and C ₅ <i>p</i> -nitro amides 28, 29 and 30.....	171
4. Synthesis of a coumarin argininamide derivative	173
Transesterification studies	174
UV Spectra of <i>p</i> -nitrophenol acetate and <i>p</i> -nitroaniline acetate	175
Oligonucleotides synthesis (Chapter III and IV).....	176
1. Automated synthesis.....	176
1.1. Wild-type references	177
1.2. Convertible Oligonucleotides (CvON).....	178
2. Functionalized Oligonucleotides (FuON)	178

2.1.	CuAAC protocol	178
2.2.	FuON conditions for CuAAC and analyses.....	179
3.	Physicochemical studies	180
3.1.	Thermal denaturation studies	181
3.2.	Circular dichroism studies.....	181
3.2.1.	ArgpNA DC and UV spectra	182
3.2.2.	Arg-AMC (33) DC and UV spectra	182
3.2.3.	DC signal for 1OLD after and before addition of substrates	182
3.2.4.	Control of 1OLD Absorbance after and before addition of substrate.....	184
3.2.4.	CD analysis of 1OLD with Arg-pNA	185
3.2.5.	CD analysis of 1OLD with Arg-AMC	186

Abréviations :

3WJ : jonction trois voies	HATU : hexafluorophosphate de <i>N,N</i> -diméthylméthaniminium
A : adénine / adénosine	HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
ADN : acide désoxyribonucléique	HPLC : High Pressure Liquid Chromatography
AE : acétate d'éthyle	HPA : 3-hydroxypicolinic acid
Agm : agmatine	HRMS : High-Resolution Mass Spectrometry
AMA : hydroxyde d'Ammonium et MethylAmine	HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
ARN : acide ribonucléique	I₄AA : acide 2-(1 <i>H</i> -imidazol-4-yl)acétique
ARNm : acide ribonucléique messenger	Im : imidazole
Arg : L-arginine	IR : infrarouge
Arg-AMC : L-arginine AminoMethylCoumarine	k_{cat} : constante catalytique
Arg-OME : ester de méthyle de la L-arginine	LNA : Locked Nucleic Acid
Arm : L-argininamide	MALDI-TOF : Matrice Assisted Laser Detection Ionization – Time Of Flight
ArmpNA : L-arginine <i>p</i> -nitroanilide	miARN : micro ARN interférent
Asp : acide aspartique	NaN₃ : azoture de sodium
Bn : benzyle	NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
BSA : Bovine Serum Albumine	ODN : oligonucléotide
C : cytosine / cytidine	<i>p</i>- : <i>para</i> -
CCM : Chromatographie sur Couche Mince	pb : paire de base
CDCl₃ : chloroforme deutéré	ppm : partie par million
C₂NA : Constrained and Convertible Nucleic Acids	PCR : Polymerase Chain Reaction
COSY : Correlated Spectroscopy	<i>p</i>NPA : acétate de <i>para</i> -nitrophényle
CNA : Constrained Nucleic Acids	RCA : Rolling Circle Amplification
CNE : β-cyanoéthyle	RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
CuAAC : Copper(I)-Catalysed Azide-Alcyne Cycloaddition	SELEX : Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
CvNP(s) : convertible phosphoramidite(s)	Ser : sérine
CvON(s) : convertible oligonucleotide(s)	siARN : petit ARN interférent
Cys : cystéine	SN : substitution nucléophile
D₂O : eau deutérée	SPS : synthèse en phase solide
DCC : <i>N,N</i> -dicyclohexylcarbodiimide	T : thymine / thymidine
DCI : Desorption Chemical Ionisation	TBDMS : <i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
DCM : dichlorométhane	TBDPS : <i>tert</i> -butyldiphénylsilyle
DMF : diméthylformamide	TCA : acide trichloroacétique
DMSO : diméthylsulfoxyde	TEA : triéthylamine
DMTr : 4,4'-diméthoxytrityle	TEAAc : triéthylammonium acetate
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique	THF : tétrahydrofurane
EP : éther de pétrole	<i>T_m</i> : température de fusion
ESI : electrospray ionization	r.t. : room temperature
Et₂O : diéthyléther	U : uracile / uridine
FuNP(s) : functionalized phosphoramidite(s)	UV : ultra-violet
FuON(s) : functionalized oligonucleotide(s)	wt : wild-type
G : guanine / guanosine	
Gly : glycine	
His : histidine	

Introduction

Cette thèse réalisée au sein du laboratoire SPCMIB (Synthèse et Physicochimie de Molécules d'Intérêt Biologique) dans l'équipe MoNALISA (Modified Nucleic Acids, Lipids and Innovative Synthetic Approaches) a été financée par le projet ANR-JCJC-PROLIFIC (Protease-Like Oligonucleotides, Functionalization and Catalysis).

Depuis une quinzaine années, les acides nucléiques ont évolué vers des structures fonctionnelles uniques détournées de leur rôle fondamental de macromolécules porteuses et vectrices de l'information génétique. Ces acides nucléiques artificiels sont aussi sélectionnés pour leurs propriétés de reconnaissance (aptamères), de catalyse (ribozymes) ou les deux (aptazymes) et sont capables de catalyser une large gamme de réactions, de la formation de la liaison carbone-carbone jusqu'à la rupture de la liaison phosphodiester.

Resté longtemps dans l'ombre de l'ARN, car permettant un accès moindre à des structures tridimensionnelles complexes, l'ADN s'impose petit à petit comme une plateforme nucléique de choix dans le domaine des mimes de protéases à sérine, enzymes en charge de la coupure de liaison peptidique. Afin de développer des mimes fonctionnels, il est apparu nécessaire d'augmenter le répertoire catalytique de l'ADN *via* des modifications chimiques pour obtenir des catalyseurs hybrides. Ces derniers peuvent ainsi être organisés en différentes structures secondaires et présenter, à la différence des protéines, un repliement tridimensionnel, contrôlé et reproductible, créant une poche pouvant rappeler le site actif de ces enzymes.

Ainsi, des oligonucléotides sur lesquels sont greffées des fonctions rappelant les chaînes latérales d'acides aminés impliqués dans la triade catalytique, peuvent être conçus pour mimer l'activité de ces enzymes grâce à une topologie programmable. De plus, la capacité de l'ADN à être sélectionné pour reconnaître une (macro)molécule cible peut être combinée à une activité catalytique de coupure. Cette propriété aptazyme pourrait être exploitée à terme pour dégrader des protéines pathogènes.

L'objectif de ce travail de thèse est donc la conception et la synthèse d'oligonucléotides fonctionnalisés (**FuON**) présentant à des positions précises, soit des organocatalyseurs en charge de l'hydrolyse de la fonction amide, soit des substrats amides activés. Ainsi organisés *via* les structures secondaires de type bulge, ils permettront de s'affranchir d'une poche de reconnaissance en rapprochant de manière artificielle les deux partenaires. Enfin, en modifiant, selon le même principe, une séquence reconnaissant un substrat d'intérêt, de nouveaux aptazymes seront conçus et évalués.

Le premier chapitre présente une étude bibliographique des propriétés des acides nucléiques, de leur structure primaire puis secondaire jusqu'à leur organisation tridimensionnelle. Après un bref rappel de leur structure chimique, leur synthèse et les modifications structurantes et/ou fonctionnalisantes développées pour conférer aux oligonucléotides de nouvelles propriétés, en terme de stabilité et/ou de pré-organisation, sont décrites, ainsi que leurs capacités de reconnaissance et de catalyse. Les travaux de cette thèse sont ensuite replacés dans le contexte plus général des mimes de protéases à sérine avant de conclure sur l'utilisation des oligonucléotides comme plateforme de choix pour le développement de tels mimes.

Le second chapitre décrit l'élaboration de deux organocatalyseurs porteurs d'un bras azoture et de trois groupements organiques (alcool, carboxylate, noyau imidazole) mimant les fonctions des chaînes latérales des acides aminés impliqués dans la triade catalytique en charge de la coupure de la

liaison amide. Après avoir rappelé la pertinence de regrouper sur une seule molécule les trois motifs, l'intérêt de critères additionnels pour développer un mime fonctionnel (site de protonation, longueur de bras...) et la nécessité d'un nombre d'étapes restreint, la synthèse de deux "Tripodes" basés sur un squelette sérine ou histidine sera présentée. Une étude plus approfondie portant sur une réaction modèle de trans-estérification sera ensuite menée afin d'évaluer les capacités d'hydrolyse du Tripode à squelette histidine et de ces analogues protégés afin de comprendre la contribution relative de chaque fonction organique.

Le troisième chapitre porte dans un premier temps sur la synthèse et la caractérisation d'oligonucléotides fonctionnalisés nécessaires à la mise en œuvre de l'approche dite "covalente". Dans cette partie seront décrites, l'incorporation d'un 5'-C-propargyl-phosphoramidite convertible qui conduit à l'obtention de séquences convertibles, puis la conjugaison de ces dernières par CuAAC à des molécules d'intérêt. Dans un second temps, un **FuON** porteur d'un Tripode sera présenté face à un **FuON** porteur d'un substrat amide chromogénique *via* l'assemblage d'une structure secondaire de type bulge afin d'augmenter de façon artificielle la concentration effective. L'ensemble des combinaisons possibles conduisant à des bulges seront présentées et leurs stabilités évaluées. Afin de comprendre au mieux les phénomènes mis en jeu, des études de dénaturation thermique seront menées et des résultats préliminaires seront également présentés afin de guider l'élaboration de nouveaux mimes fonctionnels de type bulge.

Le quatrième chapitre décrit la synthèse d'oligonucléotides fonctionnalisés de type aptazyme. Une preuve de concept sera réalisée grâce à la conjugaison d'un petit organocatalyseur sur une séquence aptamère sélectionnée pour reconnaître un substrat argininamide. Les **FuONs** résultants seront caractérisés en particulier par dichroïsme circulaire pour évaluer la reconnaissance potentielle de leur substrat et leurs capacités d'hydrolyse.

Après une conclusion générale, le dernier chapitre regroupe, quant à lui, les protocoles expérimentaux.

Chapitre I : Etude bibliographique

1. Les acides nucléiques

1.1. Généralités

1.1.1. Structure élémentaire

L'ADN (acide désoxyribonucléique) et son pendant ribonucléique l'ARN, sont deux macromolécules poly-anioniques. L'ADN est plus particulièrement le support de l'information génétique. L'ARN, quant à lui, sert d'intermédiaire sous la forme d'ARN messenger (ARNm). Obtenu par la traduction de l'ADN génomique, il est ensuite épissé puis traduit au niveau du cytoplasme par le ribosome lors de la synthèse de protéines.¹

Dans les deux cas, chaque brin d'oligonucléotide est un polymère formé d'une succession de nucléotides (Figure 1). Ces nucléotides sont composés de trois parties : un sucre 2'-désoxyribofuranose (pour l'ADN) ou 2'-ribofuranose (pour l'ARN), une base azotée (au nombre de quatre par série) et un lien phosphodiester. Le sucre porte en position C_{1'} sa base azotée. Les bases sont de deux types, purique (adénine et guanine) ou pyrimidique (thymine, ou uracile pour l'ARN, et cytosine) et ont la capacité à s'apparier deux à deux *via* des liaisons hydrogène de type Watson et Crick. Ces nucléosides (base + sucre) sont reliés entre eux par un lien phosphodiester ayant pour points d'ancrage les positions 5' et 3'. Une séquence d'acide nucléique est, de manière conventionnelle, lue de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', cette direction correspondant au sens de la synthèse naturelle des acides nucléiques par les enzymes.

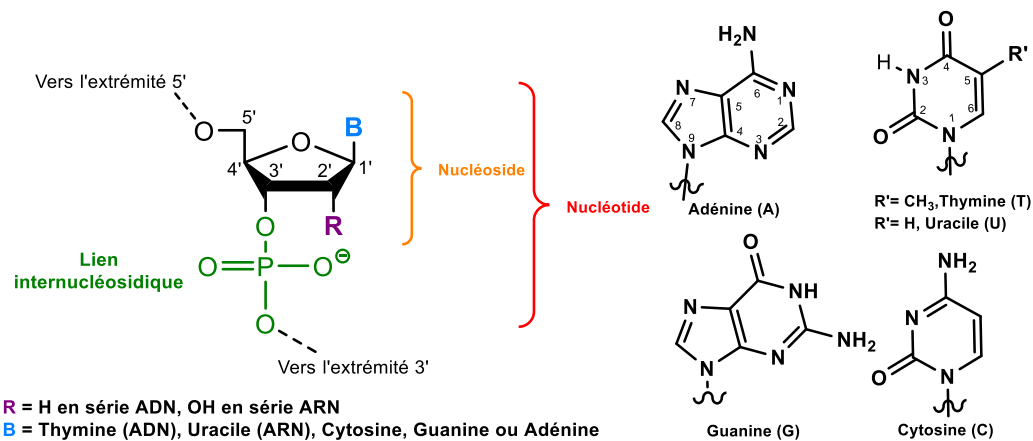


Figure 1. Structure primaire de l'ADN

1.1.1. Structures secondaires

Les acides nucléiques sont des macromolécules flexibles adoptant, pour une même structure primaire, différentes conformations elles-mêmes à l'origine de structurations secondaires.

En raison de la libre rotation des six liaisons répétées le long du squelette sucre-phosphate, la conformation d'un brin d'ADN est définie par l'ensemble des valeurs des angles de torsion leur correspondant.² Ces six angles sont identifiés par les premières lettres de l'alphabet grec (α , β , γ , δ , ϵ et ζ) et correspondent aux angles de rotations autour des différentes liaisons du squelette nucléique (Figure 2.a).⁴ -adaptée de Carter et al.⁴

1.1.1.1. Structure secondaire en double hélice

L'angle γ ($O_5'-C_5'-C_4'-C_3'$) a la particularité de donner la position du groupement phosphate par rapport au sucre. En effet, dans le cas d'une conformation *gauche* (+), le groupement phosphate se

retrouve positionné au-dessus du sucre. Cette conformation est préférentiellement adoptée dans le cas où la base portée par le nucléotide est une pyrimidine. Pour des raisons d'encombrement stérique, dans le cas d'une purine, le groupement phosphate est plus éloigné de la base grâce à un équilibre entre les conformations antipériplanaire (*trans*) ou *gauche* (-), présentes en proportions équivalentes.³

La rotation autour de la liaison β -N-glycosidique entre l'atome de carbone C_{1'} et l'atome d'azote N₁ des pyrimidines ou N₉ des purines, définit le septième angle de torsion, χ . En effet, la base a la possibilité d'adopter deux conformations, *syn* ou *anti* (Figure 2.b.). La conformation *syn*, dans laquelle le carbonyle en position 2 des pyrimidines ou l'atome d'azote en position 3 des purines, se retrouve positionné au-dessus du sucre est la moins favorisée puisqu'elle présente un encombrement stérique plus important. Au contraire, la conformation *anti*, où les atomes d'hydrogène H₆ (pyrimidines) et H₈ (purines), plus petits, sont situés au-dessus du sucre est fortement privilégiée.

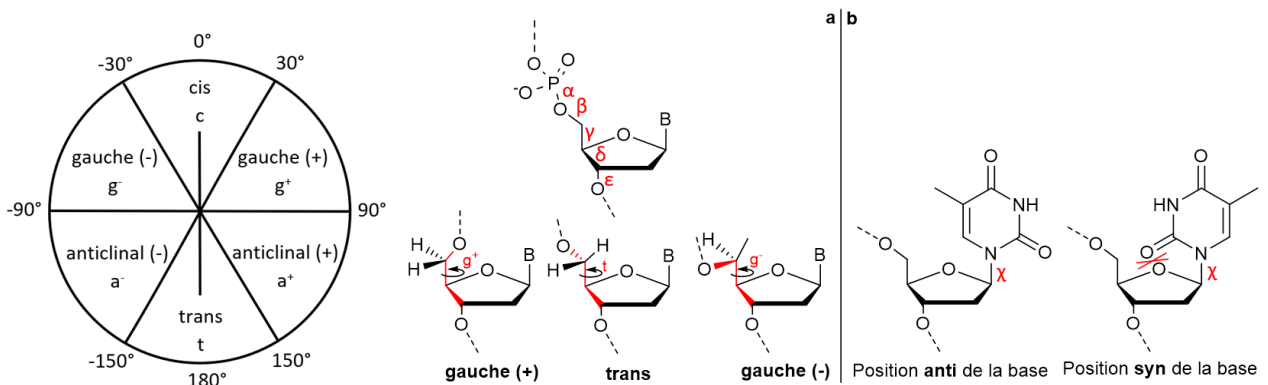


Figure 2. Angles de torsion des nucléotides et conformation des angles γ (a) et χ (b)

D'autre part, comme illustré Figure 3, le cycle furanose (non plan) présente une conformation particulière avec trois atomes coplanaires, et, un atome au-dessus et un en dessous du plan. La conformation C_{3'}-endo (Nord), où le groupement hydroxyle en C_{3'} est du même côté du plan que l'atome de carbone C_{5'}, est adoptée par le ribose dans le cas de l'ARN puisqu'elle favorise l'éloignement du groupement hydroxyle en 2' vers l'extérieur de l'hélice. La conformation C_{2'}-endo (Sud) est préférée par l'ADN pour conduire à une hélice de type B.

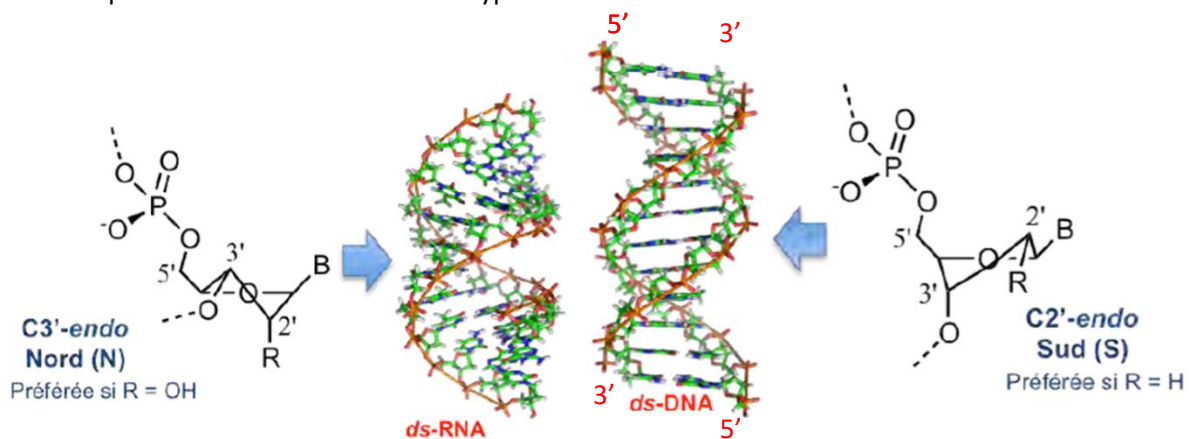


Figure 3. Conformation des sucres et influence sur la double hélice -adaptée de Carter et al.⁴

1.1.1.2. Structure secondaire en double hélice

L'ADN se trouve naturellement sous forme de double hélice, structure secondaire la plus connue. L'ARN, quant à lui, est largement sous forme monocaténaire bien qu'il puisse notamment être retrouvé sous forme double brin au sein du ribosome ou du génome viral. Dans les deux cas, l'association de deux brins (ou de deux parties complémentaires d'un même brin d'acide nucléique)

de façon antiparallèle est permise par des interactions non covalentes formées entre les bases. Cet appariement a lieu entre deux bases complémentaires, l'adénine A et la thymine T d'une part, associées *via* deux liaisons hydrogène, et la cytosine C et la guanine G (*via* trois liaisons hydrogène) d'autre part (Figure 4).

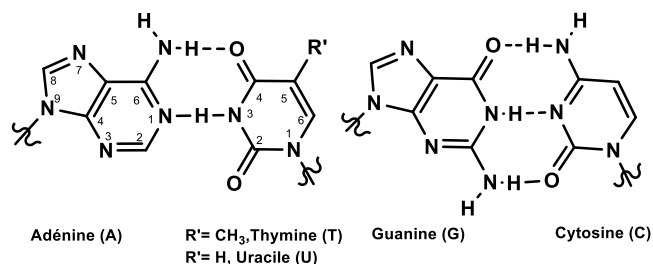


Figure 4. Structure des bases et leur appariement selon les règles de Watson et Crick

Ces interactions et la structuration en hélice double brin qui en résulte ont été mise en évidence en 1953 par Watson, Crick et Wilkins. Ces derniers proposent la structure de l'ADN admise aujourd'hui, grâce à la contribution cruciale, et longtemps tue, de Rosalind Franklin dont les clichés obtenus par diffraction de rayons X furent la clé qui permit de corriger les assemblages imaginés jusqu'alors.

En effet, pour la première fois, était décrit un agencement en double hélice de deux brins s'appariant de manière antiparallèle. A l'opposé, leur contemporains Pauling et Corey, supposaient notamment une orientation des groupements phosphate vers l'intérieur de la structure.⁵ Les travaux de Franklin et d'autres par la suite permettront de mettre en évidence l'existence de plusieurs types d'hélices, dépendants du taux d'hydratation des structures et du type d'acides nucléiques.^{4,5,6}

L'hélice B (Figure 5.B.), ou « double hélice canonique », est donc la forme sous laquelle l'ADN est le plus souvent présent *in vivo*. Il s'agit d'une double hélice droite, ayant un pas de 3,4 Å, un diamètre de 20 Å et dont le grand sillon est plus large et plus profond que le petit. La composition du grand sillon (plus riche en atomes d'oxygène et d'azote) ainsi que ses dimensions qui le rendent plus accessible, permettent des interactions avec différentes molécules. Ce type d'hélice est obtenu quand les 2'-désoxyribose de la séquence adoptent majoritairement une conformation C_2' -endo (Sud).

L'hélice de type A (Figure 5.A.), peut être retrouvée au sein de duplex d'ADN dans des conditions où le taux d'hydratation est plus faible. En revanche, l'ARN existe exclusivement sous cette forme qui présente une liaison β -N-glycosidique en *anti* avec le sucre en conformation C_3' -endo. Ainsi, une hélice de type A est plus compacte et d'un diamètre plus large (23 Å).

L'ADN Z (pour ADN Zig-Zag, Figure 5.C.), forme plus rare que les deux précédentes, est une double hélice gauche. Sa structure est caractérisée par la répétition dans sa séquence de dinucléotides G-C et par l'alternance de sucres en conformation C_3' -endo et C_2' -endo. De structure plus compacte, 12 paires de bases (pb) par tour d'hélice, elle est plus particulièrement présente dans les parties du génome à forte activité transcriptionnelle, comme en témoigne la forte répétition de dinucléotides G-C (motif promoteur de l'expression génétique).

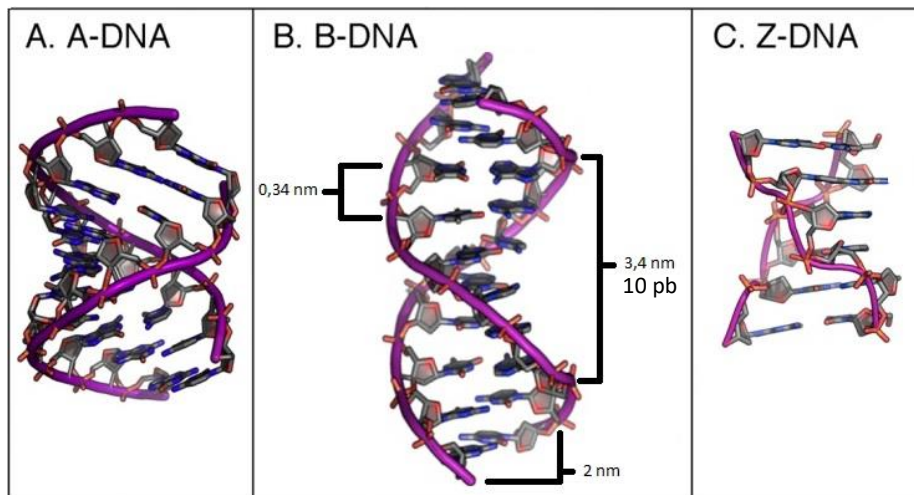


Figure 5. Conformations en double hélice A, B et Z – figure adaptée de Carter et al.⁴

En 1963, Hoogsteen a proposé un nouvel appariement des bases qui permet l'interaction d'un troisième brin avec un duplex classique (Figure 6) pour former une triple hélice.⁸ Les bases de deux brins s'assemblent grâce aux interactions de Watson et Crick, la base pyrimidique du troisième brin interagissant, de plus, avec le noyau purine du duplex. Les liaisons hydrogène sont formées d'une part entre les atomes d'azote N_3 et N_7 , et d'autre part entre les atomes exo-cyclique porté en C_4 des pyrimidines (oxygène pour une base T, azote pour C) et C_6 des purines (oxygène pour G, azote pour A).

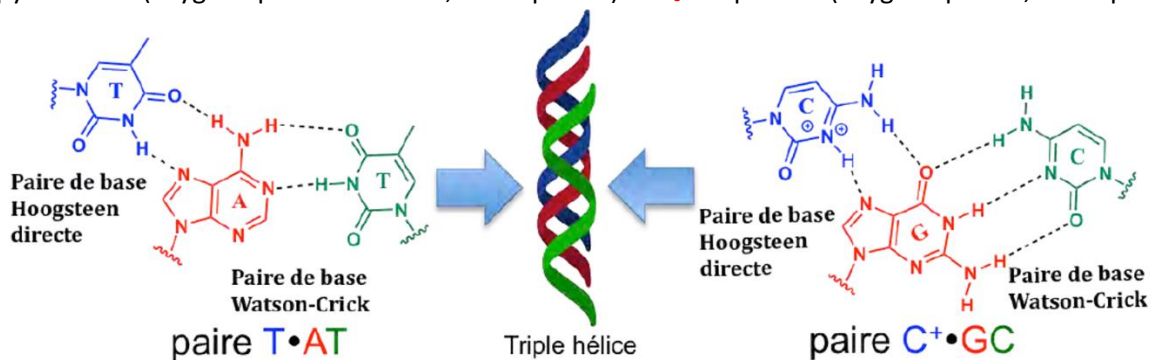


Figure 6. Formation d'une triple hélice via les appariements de Watson et Crick et Hoogsteen⁴

Ce type d'interactions se retrouve tout particulièrement dans les structures types G-quadruplex (G-quad) impliquant l'atome d'azote N_7 et la fonction amine exo-cyclique portée en C_6 .⁹

En complément des liaisons hydrogène, l'empilement (stacking) des bases azotées est responsable de la stabilisation des structures secondaires. En raison de l'hydrophobicité des bases aromatiques, cet empilement permet de minimiser leur contact du milieu aqueux. Le squelette phosphate chargé négativement est, quant à lui, solvate par la molécule d'eau *via* un réseau de liaisons hydrogène.¹⁰ De plus, chaque base contient plusieurs sites donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène capables d'interagir avec des molécules d'eau, en fonction du taux d'hydratation. D'autres facteurs comme la température et le pH influencent également la stabilité de ces structures. La structuration des deux brins dépendant ainsi de liaisons non covalentes, une augmentation de température peut, par exemple, mener à la dissociation des brins appariés. Ce processus, dit de dénaturation thermique, est utilisé pour rendre compte de la stabilité des duplex ou autres assemblages. En soumettant les structures secondaires (ici un duplex, Figure 7) à une augmentation de température, la mesure de l'absorbance est réalisée par spectroscopie UV (à 260 nm).

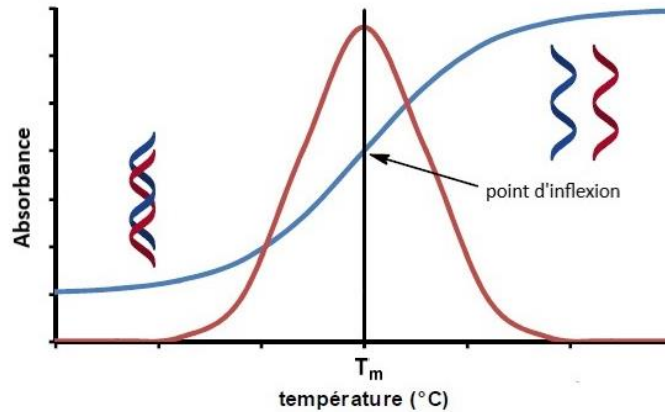


Figure 7. Détermination de la température de fusion (T_m) d'un duplex

Cette température de fusion (notée T_m), mesurée par spectroscopie UV à 260 nm, correspond à la température à laquelle 50% des brins de la structure sont non appariés. Elle est lisible en abscisse du point d'inflexion de la courbe représentant l'absorbance en fonction de la température. La dérivée de cette sigmoïde donne également en son maximum la valeur de T_m . A haute température, les brins sont entièrement dissociés et l'absence d'interactions π - π engendre une exaltation de l'absorbance UV des bases. Celle-ci décroît donc fortement lors du ré-appariement complet des brins. Il est important de noter que cette dénaturation, contrairement à celle des protéines, est un mécanisme entièrement réversible, la formation de structures secondaires d'acides nucléiques étant ainsi programmable et reproductible en fonction du choix de la séquence.

1.1.1.3. Autres structures secondaires

Grâce à l'appariement des bases et selon leur séquence, plusieurs types de structures secondaires peuvent résulter de l'auto-assemblage d'un à quatre brins d'oligonucléotides (Figure 8). Décrite précédemment, la double hélice, ou duplex, présente deux brins entièrement appariés, leurs séquences étant parfaitement complémentaires.

Cependant, il existe des structures dites non canoniques, présentant des régions non appariées. Les conformations de leur squelette sucre-phosphate diffèrent de celle trouvée dans la double hélice. Ces structures secondaires sont impliquées dans des processus biologiques (en particulier dans les mécanismes de réplication et de transcription des enzymes) de façon souvent transitoire. Cinq exemples de ces structures sont présentés sur la Figure 8.

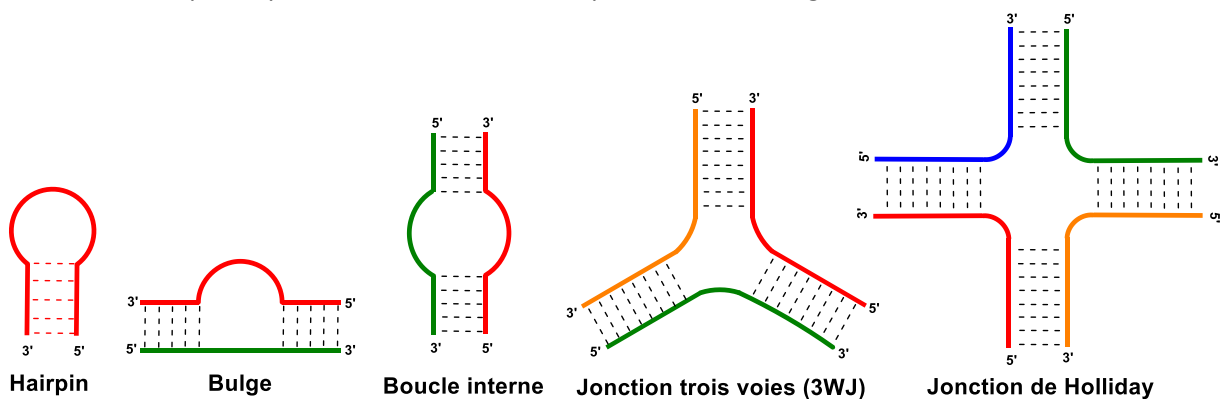


Figure 8. Structures secondaires

La première structure, l'épingle à cheveux (tige-boucle ou encore hairpin), se forme à partir d'un seul brin d'oligonucléotide dont les extrémités sont auto-complémentaires. La partie "tige"

correspond à cette zone, la boucle étant, au contraire, constituée de la partie centrale non appariée du brin. Ce type de motif se retrouve généralement dans des segments d'ARN comme par exemple dans le ribozyme à tête de marteau. Ce dernier, en charge de la coupure spécifique de molécules d'ARN, présente trois hairpins et deux boucles internes, illustrant bien l'importance des structures secondaires pour son activité catalytique.¹¹ Au sein de séquences d'ADN, des motifs de type hairpin sont reconnus par l'ADN polymérase et permettent l'initiation du processus de réplication de l'ADN.¹²

Formé de deux brins aux séquences partiellement complémentaires, le renflement (nommé couramment bulge) et la boucle interne sont des structures secondaires constituées de deux brins. L'extrémité 5' de chaque brin est complémentaire à l'extrémité 3' du brin opposé.

A partir de trois ou quatre brins semi-complémentaires, des jonctions trois ou quatre voies peuvent être assemblées. Cette dernière est également appelée jonction de Holliday. Elle est formée lors de la recombinaison de l'ADN, et permet un échange d'information génétique entre deux chromosomes. Cette jonction quatre voies est par conséquent le substrat de nombreuses protéines recombinantes.^{13,14}

Les G-quadruplexes (G-quad ou G4) sont également des structures secondaires qui s'assemblent en milieu physiologique à partir de brins dont la séquence est riche en guanine.⁹ La capacité des guanines à former des structures tétramériques est connue depuis les années 1960. Cependant, les structures G-quadruplexes n'ont été identifiées *in vivo* qu'en 2002 au sein des télomères humains. Leur structuration résulte de l'empilement en tétrade de guanines organisées en un plan, grâce à des liaisons hydrogène de type Hoogsteen (Figure 9). Ces plans (G-quartets ou G-tetrads) sont stabilisés par la présence d'un cation potassium (K^+) en leur cœur. Ces assemblages peuvent être obtenus à partir d'un seul brin *in vivo*, qui selon sa séquence peut former ces plans de manière parallèle, antiparallèle ou hybride, ou à partir de deux brins d'ADN (voire plus).

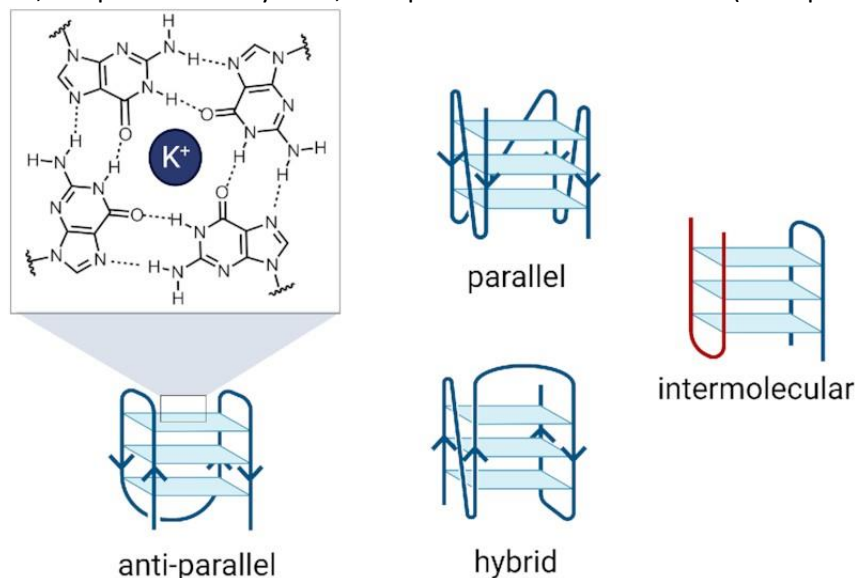


Figure 9. Structures de G-quadruplex - adaptée de Robinson et al.⁹

L'implication des G-quad dans la régulation de la transcription des gènes est aujourd'hui bien connue.^{9,15} Cette topologie remarquable est retrouvée fréquemment au sein d'oligonucléotides aptamères, sélectionnés pour reconnaître une cible d'intérêt, ce qui fait d'eux une plateforme de choix pour des applications en chimie ou comme outils biochimiques.¹⁶ De plus, leur repliement pouvant être particulièrement contrôlé et la structure se révélant très stable, ils peuvent être fonctionnalisés

pour introduire des fluorophores ou plus simplement pour intercaler entre les plans des tétrades des structures de type hème complexant du cuivre pour catalyser des réactions de transfert de carbènes.¹⁷

1.1.2. Assemblage de tétraèdres (structures tertiaires)

Le domaine de l'origami d'ADN, en plein essor, donne accès à des structures plus grandes et plus complexes, et aux applications variées.¹⁸⁻²⁰ La nanostructure origami la plus simple est un petit polyèdre d'ADN, le tétraèdre (d'ADN). Comportant quatre arrêtes, quatre faces et quatre sommets, il peut être obtenu en une seule étape d'assemblage à partir de différents brins d'oligonucléotides.

Le premier assemblage de tétraèdre d'ADN, décrit par l'équipe de Tuberfield en 2005, est obtenu à partir de quatre brins (Schéma 1.a.).²¹ Cette structure s'autoassemble grâce à la complémentarité des paires de base sur chaque arrête. Chaque brin forme une face et contient dans ce but trois sections. Chaque section est capable de s'apparier avec une section d'un autre brin, permettant ainsi la formation de duplex sur les arrêtes. Depuis ce premier tétraèdre, de nombreux autres ont été assemblés en faisant varier la taille et la géométrie des structures, en jouant sur la séquence, l'introduction et le positionnement de zones non appariées (au niveau des sommet ou sur les faces) pour en relâcher la structure.

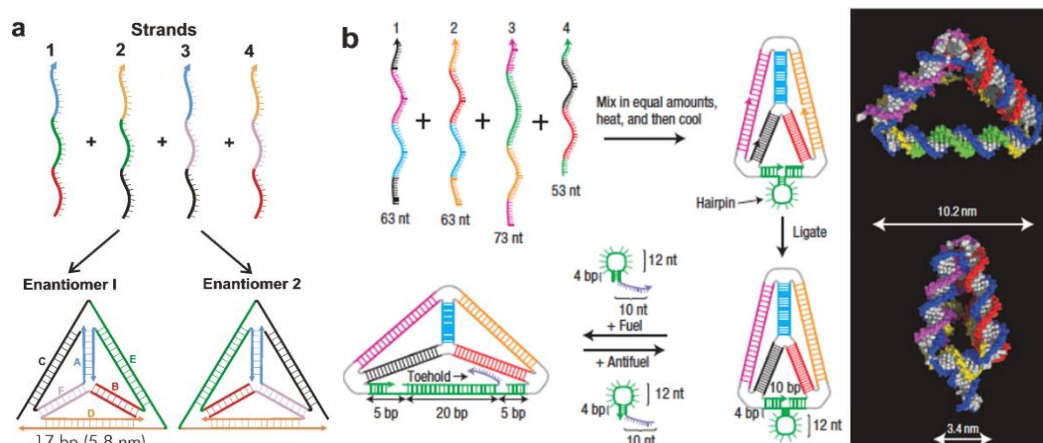


Schéma 1. Tétrahédre assemblé à partir de 4 brins (a) et tétraèdre reconfigurable (b) – adaptées de Tuberfield et coll.^{21,23}

Depuis, l'équipe de Tuberfield a décrit plusieurs exemples de tétraèdres asymétriques et notamment un tétraèdre reconfigurable (Schéma 1.b.) grâce à l'introduction d'une hairpin dans l'une de ses arrêtes.^{22,23} Le tétraèdre va pouvoir changer de conformation, passant d'une forme dite "fermée" à une forme "ouverte" lors de l'ajout du brin complémentaire. Cet exemple démontre bien la richesse des structures origami d'ADN, programmables et modelables à façon par leur séquence.

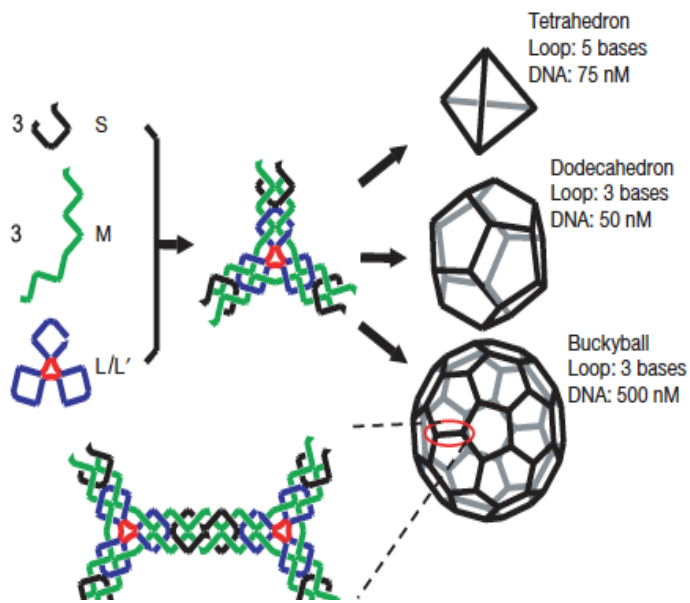


Figure 10. Structures d'ADN 3D assemblées à partir de pièces- adaptée de He et al.²⁴

Un second mode d'assemblage pour ces tétraèdres se base sur la synthèse de pièces ou tuiles (tiles en anglais) pouvant s'assembler entre elles par l'intermédiaire de bouts collants (sticky-ends).²⁴ Comme présenté dans la Figure 10, trois types de brins (court, moyen et long) sont synthétisés et mis en présence en proportion 3:3:1 pour pouvoir s'assembler en tuiles au format "étoile à trois branches". Chacune de ces pièces contient à ses extrémités des portions de brins non appariés correspondant à ces bouts collants. Par l'intermédiaire de la complémentarité de ces mêmes bouts collants, les tuiles peuvent s'assembler deux à deux, pour former des structures en trois dimensions.

En modulant les séquences choisies et le nombre de bases non appariées au centre du motif étoile, l'équipe de Mao a décrit l'accès à des tétraèdres mais également à des structures 3D plus complexes de type dodécaèdre ou buckminsterfullerène ("buckyball").²⁴

Medium strand M (green and purple):
TAG CAA CCT GCC TGA GCG CTT TTG CGC TGT GCA AGC CTA
CGA TGG ACACGG TAA TGA C

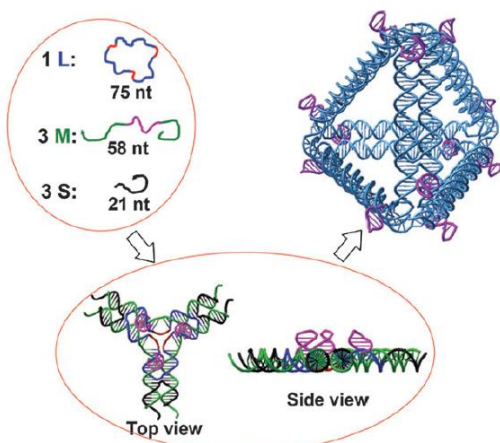


Figure 11. Tétraèdre modifié par des hairpins - adapté de Zhang et al.²⁵

Cette même équipe, a travaillé à la fonctionnalisation d'un tétraèdre assemblé par pièces.²⁵ En positionnant au milieu du brin moyen une séquence d'hairpin, des boucles peuvent être introduites à chaque sommet de la structure (Figure 11). Chaque hairpin est formée d'une tige de 5 paires de base et d'une succession de 4 thymidines non appariées formant la boucle. L'ajout de ces hairpins apporte une certaine flexibilité à chaque tuile, qui a dû être compensée par un raccourcissement de la partie non appariée au cœur du motif étoile à trois branches. En effet un compromis entre flexibilité et rigidité doit être trouvé pour permettre l'assemblage de la structure : sans ce resserrement, la formation de dimère de tuiles au lieu de tétraèdres est observée.

La grande versatilité des tétraèdres et la maîtrise totale de leur assemblage, leur donne la possibilité d'être utilisé comme outils thérapeutiques ou de diagnostic. En effet, la structure 3D des tétraèdres leur permet d'être internaliser par endocytose et de résister à l'action des nucléases ce qui en fait de bons candidats comme vecteur thérapeutique. Ils peuvent, à ces fins, encapsuler ou porter sur l'un des brins un composé d'intérêt. Une grande diversité de tétraèdres fonctionnalisés sont décrits dans la littérature, décorés par des cytochromes,²⁶ des sondes fluorescentes,²⁷ des peptides,²⁸ ou des acides nucléiques : aptamères,²⁹ siARN ou miARN.³⁰

1.1.3. Propriétés de reconnaissance des acides nucléiques

Le ribosome est un complexe ARN-protéines en charge de la synthèse peptidique effectuée à partir d'un ARNm. Sa structure a été élucidée dans les années 1980 ce qui a valu le prix Nobel de chimie à Ramakrishnan, Yonath et Steitz en 2009.³¹ En son sein, c'est la partie nucléique grâce à sa structuration tridimensionnelle, qui est en charge de la lecture fidèle de l'ARNm ainsi que de la catalyse de la formation des liaisons peptidiques.

Jusque dans les années 1980, en biologie, la catalyse était considérée comme le domaine exclusif des protéines. La découverte de la capacité de certains petits ARN à s'auto-épisser (self-splicing) change la donne.^{32,33} Les travaux de Altman et Cech (tous deux récipiendaires du prix Nobel de chimie pour la découverte des propriétés catalytiques de l'ARN en 1989) mettent en évidence l'existence d'ARN enzymes nommés ribozymes. Ce sont des séquences d'ARN présentes *in vivo* qui réalisent leur propre coupure au niveau du lien phosphodiester.

Il apparaît alors que, bien que la structuration tridimensionnelle d'un acide nucléique soit principalement dictée par sa séquence, elle peut également être influencée par son environnement et notamment par la présence de petites molécules, ou d'autres macromolécules, à sa proximité. Ces interactions peuvent induire une réorganisation structurale autour de la (macro)molécule et conduire le cas échéant à une conformation catalytiquement active.

Le *riboswitch* est un autre exemple de séquence nucléique, présente *in vivo*, possédant une réactivité similaire. Il s'agit en effet d'une partie non traduite située en 5' de l'ARNm ont le rôle est de réguler l'expression de l'ARN qui le porte et ainsi de bloquer ou d'activer sa traduction. Cette partie, reconnaissant spécifiquement un métabolite (généralement issu d'une réaction réalisée par la protéine codée par l'ARNm en question), se réorganise spatialement, induisant un changement de conformation plus global de l'ARNm, conduisant par exemple à un arrêt de la traduction dans le cadre d'un rétrocontrôle négatif.³⁴ Ce mécanisme d'action met en évidence la capacité des acides nucléiques, à reconnaître spécifiquement une cible organique.

1.1.3.1. Aptamères - Reconnaissance d'un substrat

Dans le but de mieux comprendre ces mécanismes d'actions, des ARN artificiels ont été sélectionnés pour être capable de reconnaître spécifiquement une molécule d'intérêt.^{35,36} Ces oligonucléotides portant le nom d'aptamères sont décrits comme possédant des propriétés de reconnaissance comparables à celles des anticorps monoclonaux et sont capables de se structurer en trois dimensions pour former une poche de liaison spécifique à une molécule cible.³⁶⁻³⁹

Les aptamères (néologisme, créé par Szostak et Ellington en 1990, du latin *aptus* – adapté) sont des acides nucléiques (ou des peptides dans certains cas) obtenus par sélection *in vitro*.^{36,40} Ils sont sélectionnés à partir de bibliothèques combinatoires d'acides nucléiques auxquelles ont été présentés un substrat d'intérêt *via* la méthode itérative nommée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment, Figure 12). Dans un premier temps, la cible est incubée avec une bibliothèque d'acides nucléiques (Figure 12.A). Les séquences n'interagissant pas avec la cible sont éliminées (Figure 12.B) et celles présentant la meilleure affinité sont séparées puis amplifiées par PCR (Polymerase Chain Reaction - Figure 12. C et D).⁴¹

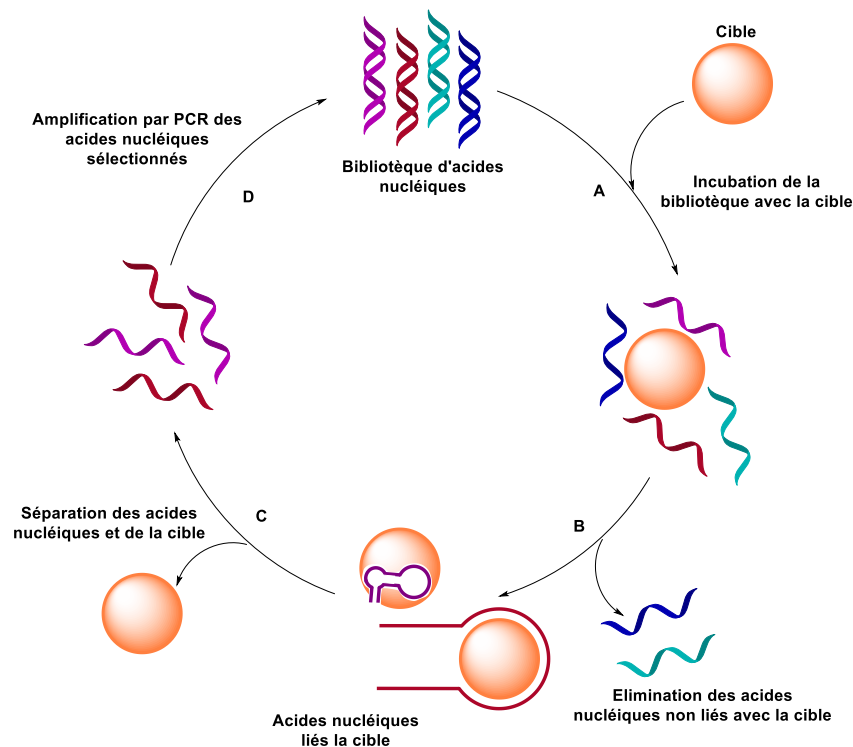


Figure 12. Cycle de sélection par la méthode SELEX

Ces aptamères, sélectionnés et amplifiés par PCR, sont ensuite à nouveau incubés avec le ligand et le processus est répété dans des conditions de plus en plus sélectives, dans le but d'isoler la séquence ayant la plus forte affinité avec la cible.⁴² L'association entre le substrat et l'ODN sélectionné se fait selon le principe de l'ajustement induit. Les aptamères isolés peuvent être des oligonucléotides de série ARN ou ADN et leurs ligands tous types de molécules : des protéines ou peptides complexes, de simples acides aminés, ou encore d'autres petites molécules organiques (nucléotides⁴³, colorants ou fluorophore³⁵ etc...). Cette diversité ouvre ainsi un large champ de possibilité pour les aptamères.^{38,44}

Ainsi, diverses applications thérapeutiques ont été conçues et le domaine est encore aujourd'hui en cours d'expansion.^{39,45,46} Une revue publiée en 2017 par l'équipe de Chaput rassemble toutes ces applications en trois grandes catégories : les aptamères utilisés comme outils, de recherche (pour la régulation de gènes ou encore dans le domaine des nanotechnologies), cliniques (à des fins de diagnostic, de traitement, pour la délivrance de médicaments) ou environnementaux (comme capteurs dans le domaine de l'eau ou de l'alimentation).⁴⁴ Parfois pénalisés par leur faible stabilité aux nucléases lors d'une utilisation *in vivo*, les aptamères doivent être modifiés pour présenter une stabilité accrue.⁴⁶⁻⁴⁸ De plus, le greffage de groupements fonctionnels permet de conférer de nouvelles fonctions chimiques susceptibles de leur permettre de réaliser une réaction chimique sur leur substrat.⁴⁹

1.1.3.2. Aptazymes - Reconnaissance et activité catalytique

Les travaux menés, sur des banques d'oligonucléotides synthétiques *via* SELEX, en quête d'aptamères alliant activité catalytique et reconnaissance d'un substrat, ont permis de sélectionner des ribozymes synthétiques appelés aptazymes. Ces aptazymes ARN sont souvent constitués d'un domaine aptamère et d'un domaine ribozyme structuré (en tige-boucle par exemple).³⁹ L'association

avec le substrat de la partie aptamère implique un changement de conformation qui va permettre d'activer ou d'inhiber l'activité de la partie ribozyme.⁵⁰

Selon le même principe en série désoxyribo, les DNAzymes sont le pendant ADN des ribozymes.⁵¹ A base d'ADN simple brin, ils sont également obtenus *via* SELEX et ne possèdent pas d'équivalents dans la nature.^{52,53} Le premier DNAzyme, décrit en 1994 par Breaker et Joyce, est par exemple capable de réaliser la transestérification du lien phosphodiester de l'ARN.⁵⁴ Depuis, le champ de compétences des DNAzymes s'est élargi, ceux-ci ayant démontré, entre autres, leur capacité à réaliser des réactions de coupure (de liaisons peptidiques), de ligation (d'acides nucléiques), de phosphorylation (de nucléosides) ou encore la réaction de coiffage de substrats de type acides nucléiques.^{52,53,55,56} L'équipe de Willner décrit par exemple l'hydroxylation de la L-tyrosine *via* un motif terpyridine fixé sur un aptamère de cette dernière (Figure 13).⁵⁷

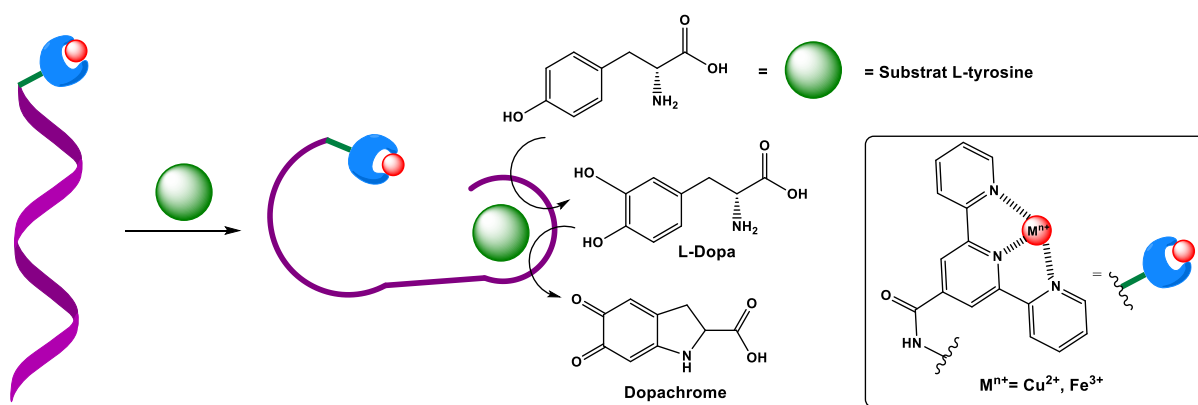


Figure 13. Aptazyme, portant un motif terpyridine permettant l'oxydation séquentielle de la L-tyrosine en L-Dopa puis Dopachrome, développé par Willner et al.⁵⁷

Le cœur nucléique reconnaissant la tyrosine est à présent à proximité du centre métallique. Ce dernier peut à présent oxyder le substrat en L-Dopa, qui à son tour reconnue par l'aptazyme est oxydée. Les aptazymes combinent alors deux propriétés des protéines la reconnaissance et la catalyse, appliquées à présent à des substrats non nucléiques, comme la L-tyrosine. Celle-ci étant à son tour reconnue par l'aptazyme peut être oxydée en Dopachrome.

1.1.4. Applications biologiques

Avec l'amélioration de la compréhension des mécanismes biologiques de transcription et traduction de l'ARN *in vivo* est apparue la possibilité d'utiliser des oligonucléotides à des fins thérapeutiques. Trois stratégies ont alors été développées pour permettre la régulation de l'expression des gènes : les stratégies interférence, antisens et antigène.⁵⁸

La stratégie interférence (Figure 14) a émergé suite à la découverte du principe du même nom.⁵⁹ L'ARNi (pour ARN interférence) est un mécanisme qui permet la dégradation d'un ARNm cible. Ce mécanisme est déclenché par l'enzyme DICER qui coupe un ARN double brin (dsARN) en fragments courts (21 à 25 paires de bases) nommés siARN (pour small interfering RNA). *In cellulo*, ces siARN sont recrutés par un complexe enzymatique nommé RISC (pour RNA-inducing Silencing complex). Celui-ci isole le brin guide (ou antisens) du petit duplex et le sépare du brin passager (sens) qui est détruit. Ce brin antisens va ensuite s'associer avec l'ARNm cible, permettant alors à l'endonucléase du complexe (nommée RNase H) de détruire l'ARNm et d'empêcher sa traduction.

La stratégie antisens est partiellement similaire (Figure 14). En effet, à des fins thérapeutiques, l'administration d'ASO (Antisense Oligonucleotide) permet de contrôler la production d'une protéine cible. En effet, l'ASO va former un hétéro-duplex ADN-ARN qui va être reconnu par la RNase-H, en charge de dégrader l'ARN cible et d'empêcher sa traduction en protéine.⁶⁰

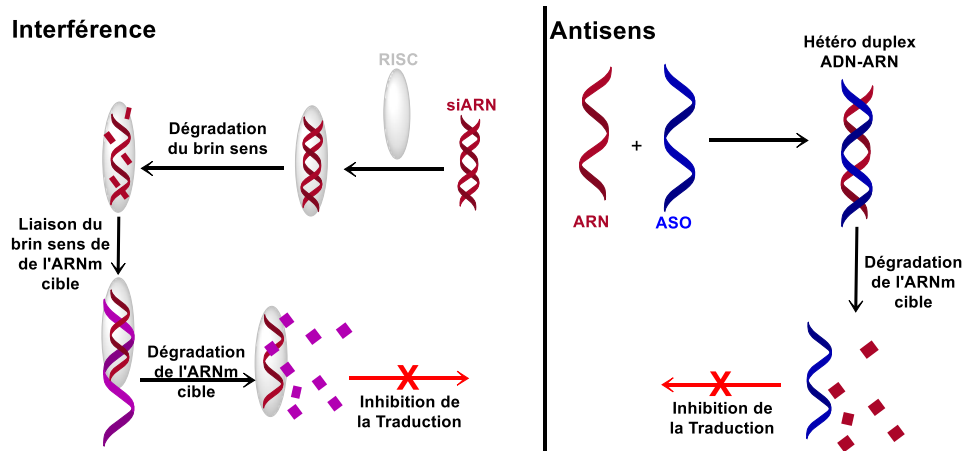


Figure 14. Stratégies interférence et antisens

La stratégie antigène (Figure 15) utilise un ODN de type TFO (Triplex Forming Oligonucléotides) qui a la capacité de se fixer sur un duplex, formant alors une triple hélice. L'association en triple hélice a pour effet d'inhiber la transcription du duplex initial en ARNm et ainsi l'expression du gène concerné. Dans le cadre de cette approche, l'utilisation d'ADN ou ARN simple brin est décrite dans la littérature.⁶¹

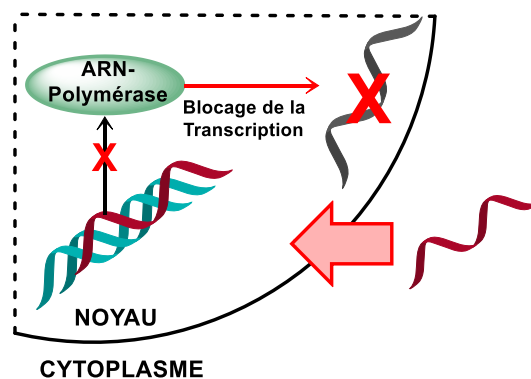


Figure 15. Stratégie antigène

Ces stratégies peuvent être limitées par les propriétés chimiques des ODN utilisés. En effet, pour permettre le succès de ces approches, les oligonucléotides utilisés doivent répondre notamment à des critères de stabilité aux nucléases et de biodisponibilité.⁶² Ainsi, il est nécessaire de pouvoir synthétiser des ODN modifiés, afin d'en améliorer les propriétés.

1.2. Oligonucléotides : synthèse et modification

1.2.1. Synthèse en solution des oligonucléotides – Bref historique des méthodes

Todd et Michelson publient en 1955 une méthode de synthèse de dinucléotides (Schéma 2). A partir d'un nucléoside acétylé en position 5', un intermédiaire 3'-benzylphosphorochloridate a été formé en deux étapes, la première impliquant l'utilisation d'un benzyl-*H*-phosphonate et la seconde du *N*-chlorosuccinimide.⁶³ Le produit ainsi obtenu est engagé sans purification dans l'étape suivante. L'addition d'un nucléoside 3'-acétylé en présence de 2,6-lutidine permet d'obtenir la formation d'un lien 5'-3' entre les deux nucléosides. Après deux étapes de déprotection, (un traitement acide pour

déprotéger le groupement benzyle et un traitement basique pour déprotéger les groupements acétates), un dinucléotide au lien phosphate naturel est obtenu pour la première fois.

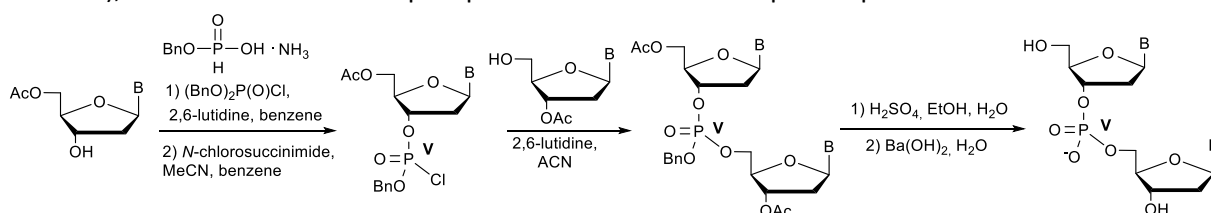


Schéma 2. Approche phosphotriester initialement développée par Todd et col.⁶³

En 1957, l'équipe de Todd décrit une nouvelle méthode en solution, qui permet d'obtenir un dinucléotide porteur d'un lien 5'-5', à partir d'un nucléoside *H*-phosphonate (Schéma 3).^{64,65} Dans cette méthode, les fonctions hydroxyle en position 2' et 3' des deux partenaires sont masquées par une protection isopropylidène. Bien qu'intéressante, cette voie ne donne accès qu'à la formation de lien 5'-5' avec des rendements modestes ce qui cause la mise de côté, pour un temps, de l'utilisation des *H*-phosphonates dans la synthèse d'oligonucléotides.

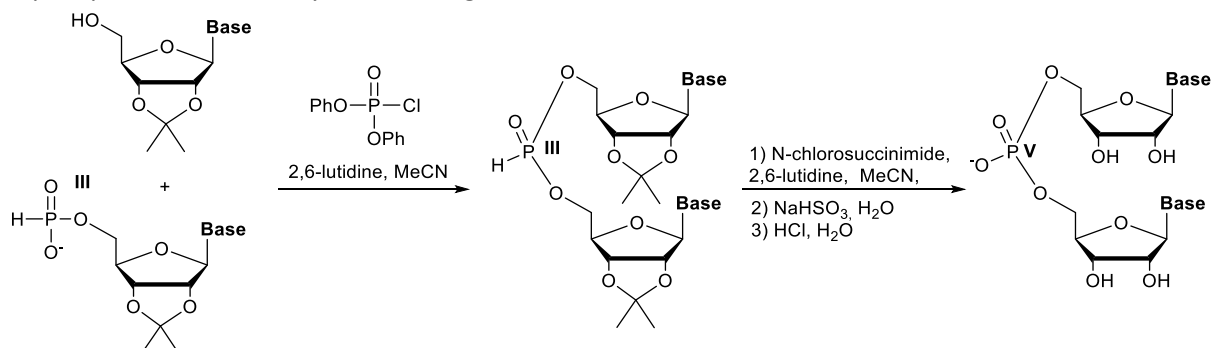


Schéma 3. Approche *H*-phosphonate en solution

En parallèle dès 1957, une nouvelle approche basée sur la chimie des phosphodiester est proposée.⁶⁶ Décrite dans un premier temps par Khorana, elle se diffuse ensuite plus largement puis est optimisée par d'autres équipes.^{64,66,67} Cette méthode, comme proposé dans le Schéma 4 implique une première étape d'activation du groupement phosphate par la DCC (*N,N*-dicyclohexylcarbodiimide) ou le chlorure de tosylo (TsCl), qui permet la condensation sur l'hydroxyle en 3' pour donner le dinucléotide souhaité. Les deux dernières étapes permettent la déprotection des fonctions en 5' et 3' du dinucléotide formé.

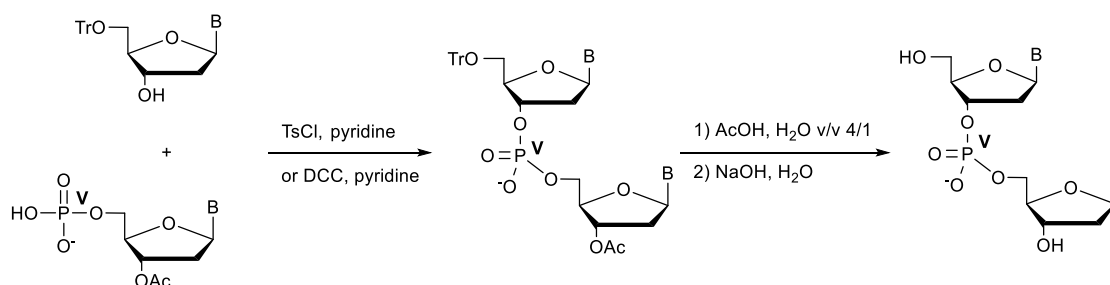


Schéma 4. Approche phosphodiester

Cette stratégie implique l'utilisation de groupements protecteurs sur les fonctions réactives des bases et sur la fonction alcool 5' du premier nucléoside en 5'.^{66,68}

Cela a permis le développement de nouveaux groupements protecteurs notamment le groupement 4,4'-DiMéthoxyTrityle (DMTr).⁶⁴ Cent fois plus labile en conditions acides que son prédécesseur le groupement trityle, il permet de travailler en conditions moins acides pour la

déprotection et ainsi limite la dépurination (particulièrement en série ADN). Aujourd'hui, il est principalement utilisé pour la protection sélective de la position 5' du sucre et est déprotégé rapidement par les acides trichloroacétique (TCA) ou dichloroacétique (DCA).⁶⁹

Les différentes modifications successives apportées à cette méthode ont permis d'améliorer les rendements obtenus (jusqu'à atteindre 70%). Cela n'a cependant pas suffi à en faire une méthode compétitive.⁶⁸

Le groupe d'Eckstein publie en 1967 une voie de synthèse en solution inspirée de la méthode aux phosphotriesters de Todd et collaborateurs.⁷⁰ D'autres laboratoires ont travaillé à la même période sur cette approche, variant les groupes protecteurs utilisés et malgré les avancées permises par leur collaboration jusque dans les années 1990, l'approche phosphotriester a finalement été délaissée au profit des approches supportées plus couramment utilisées aujourd'hui.⁶⁴

1.2.2. Synthèse supportée

Développée à la même époque que la synthèse d'Eckstein et inspirés par les travaux de Merrifield en synthèse peptidique, Letsinger *et al.* publient en 1965 une voie de synthèse supportée d'oligonucléotides.⁷¹ Les objectifs annoncés sont alors la limitation du nombre de produits secondaires et ainsi l'augmentation des rendements de synthèse. Pour ce faire, la protection du groupement phosphate est également apparue nécessaire. En effet, lors de l'élongation de la chaîne oligonucléotidique, l'absence de groupement protecteur sur le lien phosphate nouvellement formé cause l'apparition de branchements. L'utilisation d'un groupement β -cyanoéthyle (CNE) a alors été envisagée.^{72,73} La méthode d'Eckstein décrit ainsi la synthèse supportée d'un dinucléotide C-T ancré par la base du nucléoside en position 5' (Schéma 5).

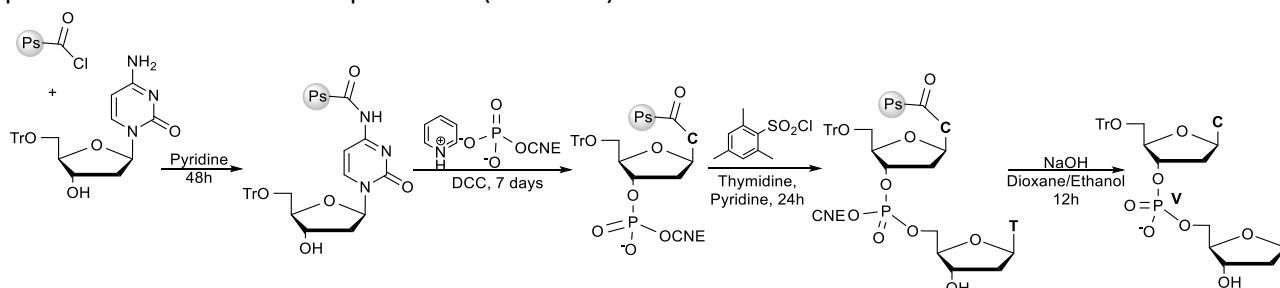


Schéma 5. Première synthèse supportée d'oligonucléotides par Letsinger⁷¹

La première étape a permis la fixation du premier nucléoside (tritylé en 5') à un support polymérique, *via* la réaction d'un chlorure d'acide du support sur l'amine en position 4 d'une cytidine. Une étape de phosphorylation à l'aide de DCC en position 3' du nucléoside supporté a ensuite été réalisée. Le chlorure de mésitylènesulfonyl a été utilisé pour activer le phosphodiester et permettre le couplage avec la fonction hydroxyle en position 5' d'une thymidine non protégée. Un traitement à la soude (NaOH) lors de l'étape finale a permis le décrochage du support et la déprotection du groupement phosphate.

La synthèse supportée permet de gagner en efficacité notamment en termes de purification, l'ODN accroché sur la résine pouvant être aisément séparé des réactifs éliminés par des rinçages successifs. Ainsi, elle a été adoptée et perfectionnée par d'autres équipes.

Les travaux de Beaucage et Caruthers, publiés en 1981, ont été déterminants dans le développement d'une nouvelle approche supportée basée sur la chimie des phosphoramidites.⁷⁴ Initialement, cette méthode fut développée en solution (Schéma 6).

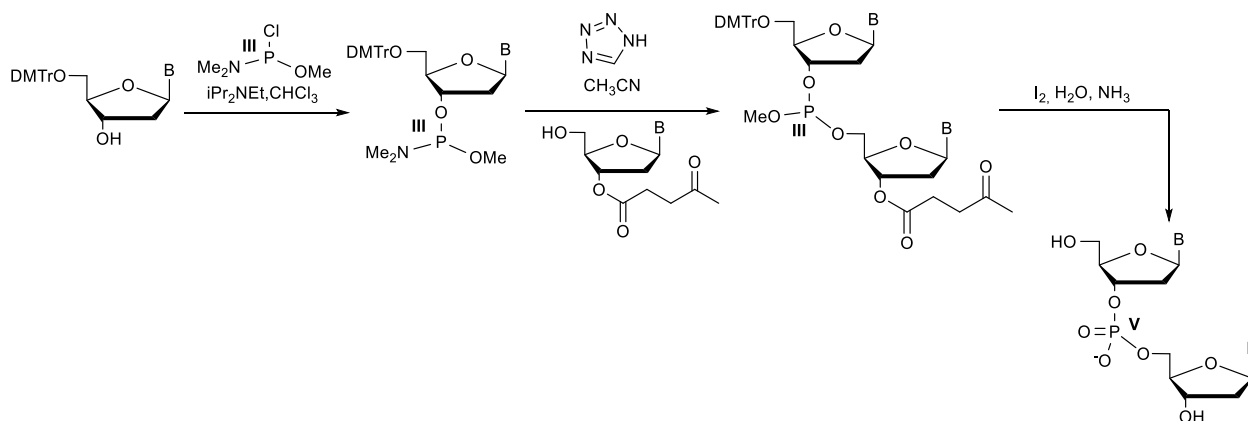


Schéma 6. Approche phosphoramidite en solution

La première étape consiste en une mono-substitution nucléophile entre un premier nucléotide protégé en position 5' et un chlorophosphite pour former le phosphoramidite correspondant en position 3' du sucre. Ce dernier, activé par le tétrazole, réagit avec la fonction hydroxyle libre en 5' du nucléoside 3'-succinyle. L'étape finale permet à la fois de réaliser l'oxydation du lien phosphotriester (III) en phosphate (V) grâce à une solution d'iode aqueux, et la coupure du lien succinyle en 3' grâce à l'ammoniac présent dans la solution.

A travers cette approche en solution, se dessinent déjà les caractéristiques de la synthèse supportée qui sera plus tard automatisée. En particulier, le lien succinyle en position 3' du nucléoside inférieur est de même nature que le lien du support CPG (controlled pore glass) utilisé et le DMTr reste le groupement de choix pour la protection de la fonction 5'-hydroxyle.^{75,76}

Cependant, l'agent de phosphorylation permettant la préparation des phosphoramidites a évolué en faveur de l'utilisation du 2-cyanoéthyle *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite. En effet, le nucléoside phosphoramidite résultant réagit en conditions acides douces et présente, après couplage, un groupement protecteur cyanoéthyle sur l'atome de phosphore.

Bien que moins utilisée aujourd'hui que l'approche *via* les phosphoramidites, une approche basée sur la chimie des *H*-phosphonates a été développée.⁷⁷ Également adaptée sur support solide par Matteucci et coll., celle-ci reste une alternative particulièrement efficace pour la synthèse d'ARN ou la préparation de certains analogues nucléiques.⁷⁶

1.2.2.1. Description du cycle de synthèse

Aujourd'hui, la synthèse automatisée d'oligonucléotides est réalisée majoritairement à partir de phosphoramidites à l'aide d'un cycle itératif automatisé.⁷⁸⁻⁸⁰ Permettant des excellents rendements, les phosphoramidites utilisés sont tous protégés pour limiter le nombre de sous-produits.

En plus des groupements protecteurs DMTr pour le groupement hydroxyle en 5' et 2-cyanoéthyle pour l'atome de phosphore, les bases portent selon leur type des groupements protecteurs destinés à masquer leurs fonctions réactives. Les fonctions amines exocycliques portées par la cytosine (en position 4) et l'adénine (en 6) peuvent l'être par un groupement benzoyle ou acétyle. Celle de la guanine (en position 2) est usuellement protégée par un groupement *isobutyle*.^{64,81} Impliquant des conditions de déprotection parfois drastiques, un groupement DMF (diméthylformamidine) peut lui être préféré car déprotégé dans des conditions plus douces.

Le premier nucléoside, quant à lui, est ancré sur les billes de résine de la colonne permettant la synthèse supportée grâce à un lien succinyle fixé en position 3'.

Le cycle de synthèse utilisé (Schéma 7) est répété $n-1$ fois pour obtenir un oligonucléotide comportant n nucléotides et contient 4 étapes, similaires aux étapes décrites par Caruthers, plus une étape de sortie de cycle.

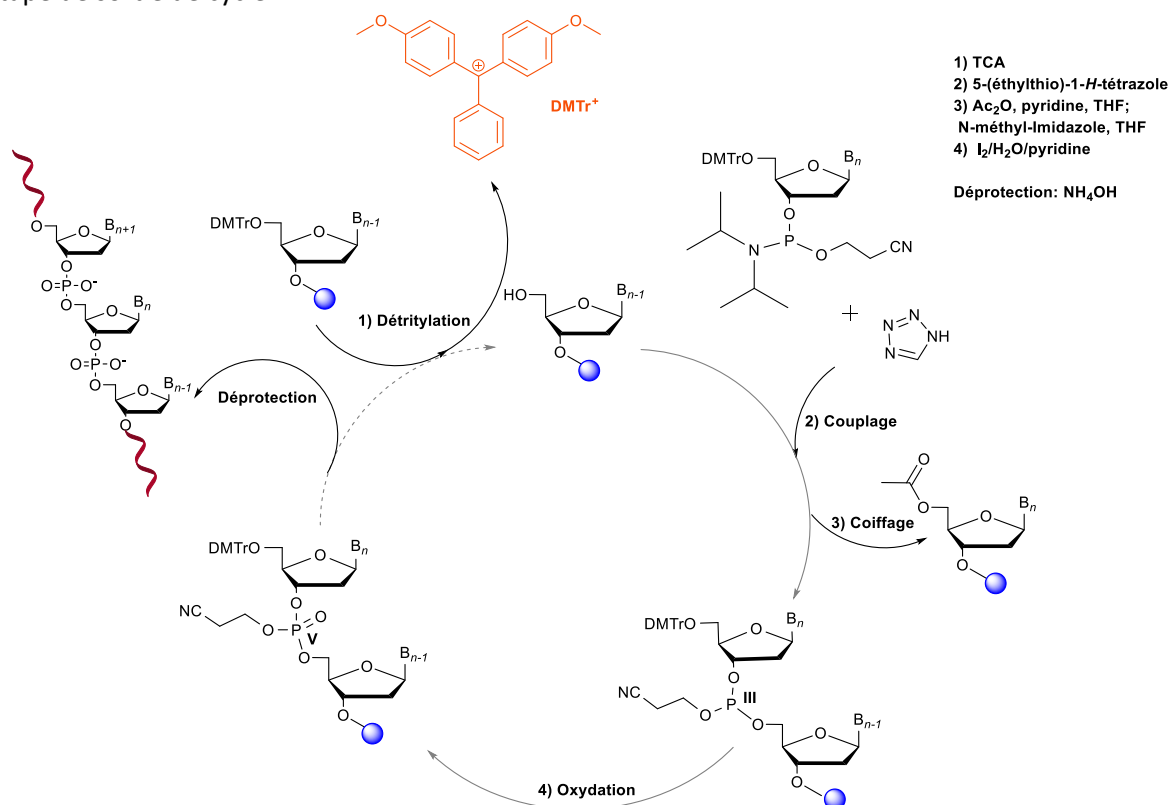


Schéma 7. Synthèse supportée d'oligonucléotides (série ADN) par la méthode aux phosphoramidites

La première étape de déprotection consiste en un traitement par l'acide trichloroacétique pour éliminer rapidement le groupement protecteur DMTr de la fonction alcool 5' du premier nucléoside ancré sur le support. Cette étape sera ensuite répétée au début de chaque nouveau cycle. Le cation DMTr⁺, libéré à chaque étape de déprotection et reconnaissable à sa couleur caractéristique orange permet l'évaluation du rendement de synthèse en dosant sa formation par conductimétrie à chaque cycle. La comparaison avec la quantité dosée suite au couplage de la première base (qui sert de référence) informe sur la perte en rendement et sur la pertinence à continuer la synthèse ou non.

La seconde étape est celle du couplage. Le phosphoramidite à introduire est activé à l'aide de 1-*H*-tétrazole (ou de 5-(éthylthio)-1-*H*-tétrazole) réagissant avec la fonction alcool en 5' néo-libérée du nucléoside pour conduire à la création d'un phosphite (III).

Le coiffage (capping), troisième étape, est réalisé à l'aide d'un agent acylant afin de masquer les fonctions 5' n'ayant pas réagi et ainsi d'éviter l'élongation de séquences tronquées. Il est possible d'utiliser par exemple l'anhydride acétique pour acétyler la position 5' des fragments (décrit sur le Schéma 7) ou encore du chlorure de pivaloyle.

La quatrième étape du cycle est une étape d'oxydation à l'aide d'une solution aqueuse basique contenant du diiode. Le lien phosphite triester (III) est converti en phosphate triester (V) plus stable. Ce cycle est ensuite répété jusqu'à l'obtention de la séquence désirée.

Une étape finale de déprotection en conditions basiques, généralement par une solution aqueuse d'ammoniaque ou une solution d'AMA (hydroxyde d'Ammonium et MethylAmine aqueuse), permet la libération de l'ODN du support, la déprotection des groupement amides des bases et du cyanoéthyle.

Par l'utilisation de cette méthode supportée, il est possible d'obtenir des brins d'acides nucléiques facilement, rapidement et avec de bons rendements (dans la limite de séquences d'une centaine de bases) à l'échelle de 40 nmol à 10 μmol. L'incorporation de modifications au sein de la

séquence est également aisée grâce à la préparation de phosphoramidites modifiés. Cette méthode permet d'accéder à des rendements de synthèse de 98% par cycle.⁶⁴

1.2.2.2. Nouvelle méthode

Bien que la synthèse d'oligonucléotides modifiés ou non ait lieu majoritairement grâce à la chimie des phosphoramidites (P(III)), des travaux récents publiés par Baran proposent une méthode impliquant l'utilisation de réactifs au degré d'oxydation P(V).⁸²⁻⁸⁴ Développée depuis la fin des années 2010, cette méthode permet d'obtenir des oligonucléotides dont les liens phosphates sont modifiés tout en contrôlant rigoureusement la stéréochimie des liens formés quand nécessaire. A cette fin, plusieurs composés ont été développés permettant chacun la formation d'un nucléotide portant un lien phosphate, phosphorothioate (de stéréochimie contrôlée) ou phosphorodithioate. Les liens phosphorothioate *R* ou *S* sont obtenus à l'aide de composés chiraux phosphorothioates dérivés du limonène, respectivement (+)- ψ et (-)- ψ (Figure 16).

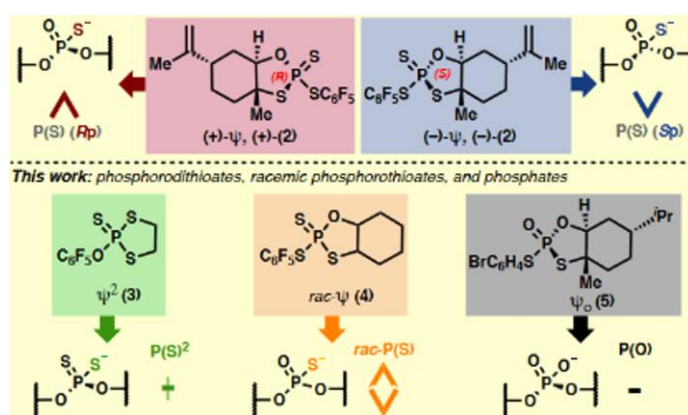


Figure 16. Travaux de Baran et coll. (adapté de Huang et al.)¹⁰⁶

Des réactifs existent également pour la synthèse du lien racémique (*rac*- ψ), phosphorodithioate ψ^2 ou phosphate ψ_o , permettant l'accès par la même méthode à tous les liens sur un même ODN.⁸³

Les nucléotides P(V) obtenus sont ensuite impliqués dans le cycle de synthèse, en affranchissant de l'étape d'oxydation. Toutes les modifications employées sont bien tolérées (comme par exemple les LNA) par le cycle de synthèse, rendant cette méthode très versatile et compatible avec la synthèse de nombreux oligonucléotides modifiés.

Bien que les rendements de réaction obtenus ne soient pas encore compétitifs, cette méthode s'avère très puissante et particulièrement prometteuse pour la synthèse d'oligonucléotides thérapeutiques (en particulier dans le cadre de stratégie antisens), pour lesquels le contrôle absolu de la stéréochimie s'avère crucial pour permettre l'activité nécessaire.⁸⁵

1.2.3. Oligonucléotides modifiés

La maîtrise de la synthèse supportée des acides nucléiques a permis l'introduction de différents types de groupements non naturels, dans le but de jouer sur la stabilité des oligonucléotides, sur leur structuration ou encore de leur conférer de nouvelles propriétés. En effet, les acides nucléiques étant des macromolécules poly-anioniques facilement dégradées par les nucléases en milieu biologique, il peut s'agir d'augmenter leur stabilité. Plusieurs sites de modifications peuvent être envisagés (Figure 17), leur effet variant selon leur type mais également selon la position choisie.⁸⁶

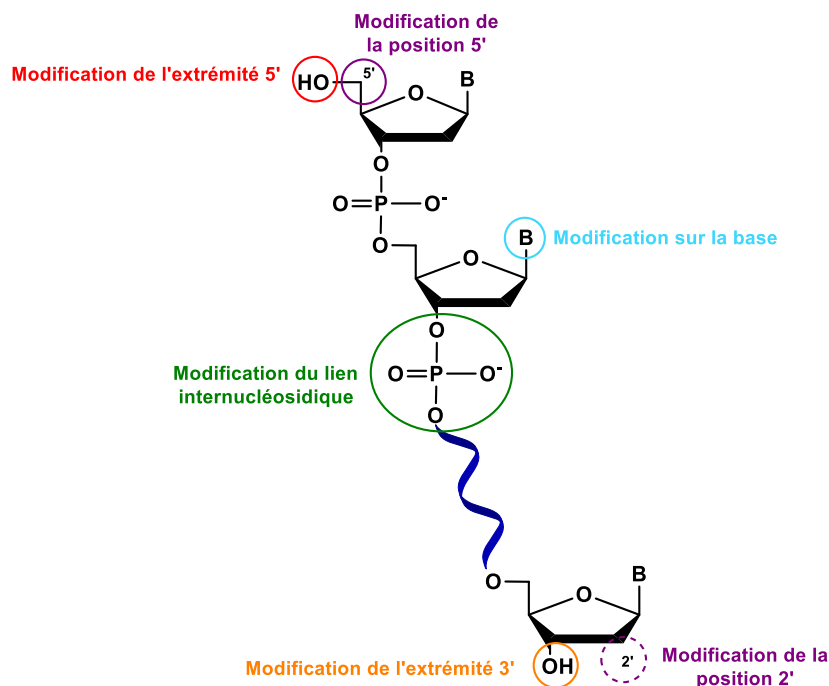


Figure 17. Sites de modifications des oligonucléotides synthétiques

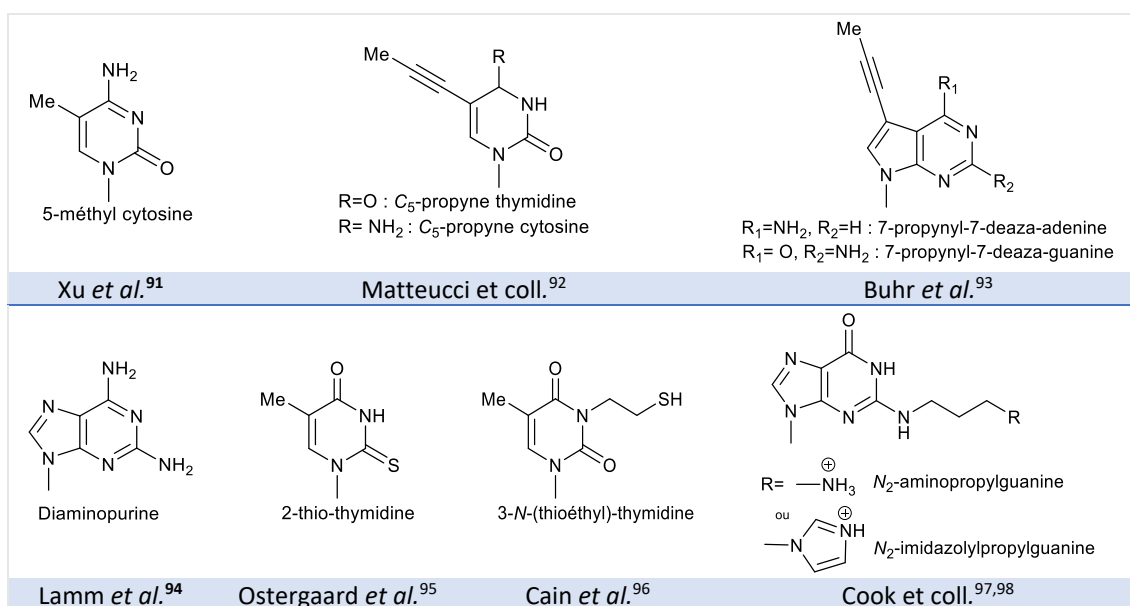
Bien que des stratégies aient été développées pour la méthode aux *H*-phosphonates ou à partir de triphosphates, nous nous intéresserons ici uniquement aux travaux réalisés à partir de phosphoramidites comme cela sera le cas dans le cadre de cette thèse.⁸⁷⁻⁸⁹ Certaines des modifications décrites au paragraphe suivant ont notamment été approuvées par la FDA (Food and Drugs Administration) pour leur utilisation dans le cadre des stratégies antisens.⁹⁰

1.2.3.1. Modifications de la base

Lors de modifications sur les bases, il s'agit dans la majorité des cas de ne pas perturber l'appariement pour maintenir la complémentarité des brins.⁸⁶ Malgré cette considération, il reste possible de modifier les bases en plusieurs positions (Tableau 1). Sur les pyrimidines, les modifications sont le plus souvent introduites en position 5, illustré ci-après avec la 5-méthyl ou les C₅-propynecytosine. Dans le cas de ces dernières, la fonctionnalisation permet d'apporter une amélioration de la stabilité thermique des duplex formés de +0,5°C par modification incorporée grâce au stacking supplémentaire fourni par les groupements propynyle.^{91,92} De façon équivalente, l'introduction d'un groupement propynyle en position 7 d'une purine peut classiquement être effectuée, avec ici remplacement de l'azote N₇ par un atome de carbone.⁹³

A contrario, il peut être envisagé d'accroître la stabilité du duplex en augmentant le nombre de sites impliqués dans des liaisons de type Watson et Crick *via* l'introduction de nouvelles fonctions organiques. La diaminopurine présente en position 2, sous la forme d'une fonction amine, un site d'interaction hydrogène supplémentaire par rapport à l'adénine. Chaque incorporation de nucléotides portant ce type de base stabilise les structures formées (+1,5°C) grâce à l'apport de ce troisième site de liaison hydrogène, la stabilité de l'appariement se rapprochant alors de celle retrouvée sur les paires G-C.⁹⁴

Tableau 1. Exemples de modifications introduites sur la base



Pour jouer sur la stabilité des assemblages obtenus, il peut également être intéressant de fonctionnaliser les amines (endo- ou exocycliques) par de courtes chaînes portant des fonctions susceptibles d'interagir avec l'environnement de la base. Ainsi, un bras éthylthiol peut également être incorporé sur le groupement amine en position 3 d'une thymine pour permettre la formation de pont disulfures inter-brins susceptibles d'apporter de la stabilité aux duplexes.⁹⁶ L'amine exocyclique en position 2 d'une guanine peut également être modifiée par un groupement propylamine dont l'extrémité amine protonée en ammonium accorde une stabilisation électrostatique vis-à-vis des charges négatives du squelette phosphate.⁹⁷ Cette modification, ainsi que celle portée par son analogue N₂-imidazolylpropyle permettent respectivement une stabilisation thermique de +3,3°C et +1°C lorsqu'elles sont introduites au sein d'un duplex.⁹⁸

La substitution d'atomes, par exemple d'un oxygène par un soufre en position 2 d'une thymidine, peut suffire à augmenter la stabilité enzymatique d'une structure, ce type de bases non naturelles n'étant pas reconnues par les nucléases.⁹⁵ En complément de ces nucléobases modifiées, des nucléotides abasiques sont également décrits comme espaceurs dans les séquences de miARN.⁹⁹

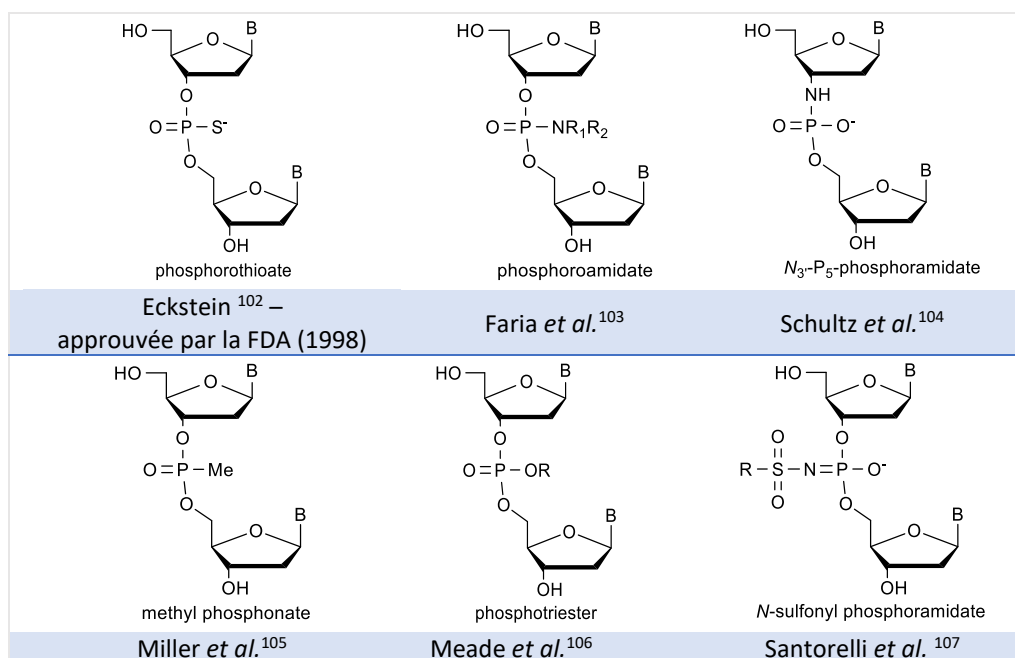
Il est important de noter qu'une partie de l'activité métabolique naturelle consiste en le recyclage des bases des acides nucléiques utilisés. De fait, quand les bases modifiées sont reconnues par les systèmes enzymatiques, elles peuvent être réutilisées dans la synthèse de nouvelles séquences.¹⁰⁰

1.2.3.2. Modifications du lien phosphodiester

Le lien phosphodiester étant rapidement hydrolysé par les nucléases, il s'est avéré nécessaire de le modifier pour améliorer la stabilité des oligonucléotides dans le cadre d'applications thérapeutiques. Différents atomes ont été étudiés pour remplacer l'oxygène du lien phosphate, notamment les atomes de soufre, l'azote ou le carbone (Tableau 2).¹⁰¹ Ces différentes modifications ont des conséquences importantes sur les propriétés physicochimiques et biologiques des oligonucléotides ainsi formés ce qui peut être un inconvénient. Par exemple, un phosphoramidate n'est pas stable dans les conditions acides de déprotection. Au contraire, l'ajout d'un groupement méthyle rend le phosphonate instable aux conditions basiques de déprotection. Le remplacement de

l'atome d'oxygène par un atome de soufre est l'approche qui permet d'obtenir un lien très similaire au lien phosphodiester naturel, avec le maintien de la charge négative, une stabilité chimique équivalente, avec les avantages déterminants d'une meilleure stabilité aux nucléases et une meilleure affinité avec certaines protéines.¹⁰¹

Tableau 2. Exemples de modifications du lien phosphodiester



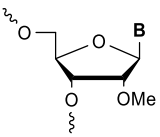
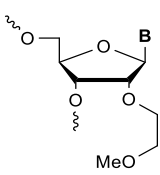
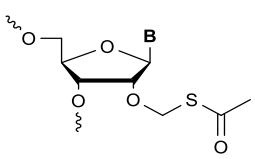
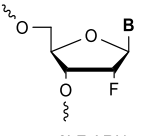
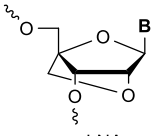
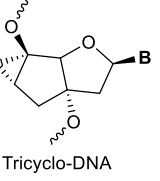
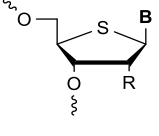
Une approche utilisant un lien phosphotriester, métabolisé *in cellulo*, permet de contourner le problème de la digestion par les nucléases.¹⁰⁶ Très récemment, en juillet 2022, Gothelf décrit également l'introduction d'un large nombre de modifications par l'intermédiaire d'un lien N-sulfonyl phosphoramidite.¹⁰⁷

1.2.3.3. Modifications du sucre

En série ribose, la position 2' est la position privilégiée pour l'introduction des modifications sur le ribose (Tableau 3, entrée 1). L'introduction sur l'hydroxyle en position 2' de groupements méthyle¹⁰⁸ ou méthoxyéthyle,¹⁰⁹ parmi les plus utilisés, permet d'améliorer la stabilité enzymatique des oligonucléotides dans lesquels les deux modifications sont incorporées. De plus, la présence du groupement OMe induit une conformation Nord du sucre qui augmente l'affinité de ces séquences pour des brins d'ARN cibles complémentaires. Ce type de fonction se retrouve ainsi au sein d'oligonucléotides antisens actuellement approuvés par la FDA et commercialisés pour des applications thérapeutiques.^{110, 111}

L'hydroxyle en 2' peut également être remplacé par un atome de fluor, la taille des atomes d'hydrogène et de fluor étant peu différente. Cependant, l'électronégativité de l'atome de fluor a une influence sur les liaisons hydrogène et l'empilement des bases. De plus, les duplexes contenant des modifications 2'-FANA possèdent une stabilité accrue en raison de la préorganisation qu'elles induisent. Ainsi, cette modification est très utilisée dans le cadre de la synthèse d'oligonucléotides thérapeutiques de type siARN, puisqu'elle leur confère des propriétés structurales qui leur sont favorables (changement d'orientation de l'hélice et renforcement des liaisons de Watson et Crick) en plus d'augmenter leur résistance aux nucléases (Manoharan *et al.*, Tableau 3).¹¹²

Tableau 3. Modifications usuelles portées par le sucre

			
2'-methoxy ARN	2'-O-methoxyethyl ARN	2'-O-AcSM ARN	
Shibahara <i>et al.</i> ¹⁰⁸ – approuvée par la FDA (2004)	Decuyperer <i>et al.</i> ¹⁰⁹ – approuvée par la FDA (2013)	Gauthier <i>et al.</i> ¹¹⁵	
			
2'-F ARN	LNA	Tricyclo-DNA	R=H 4'-thio ADN R=OH 4'-thio ARN
Manoharan <i>et al.</i> ¹¹² – approuvée par la FDA (2004)	Singh <i>et al.</i> ¹¹⁸	Renneberg <i>et al.</i> ¹²³	Jones <i>et al.</i> ¹¹³ (ADN) ; Leydier <i>et al.</i> ¹¹⁴ (ARN)

Le remplacement de l'atome d'oxygène en position 4' du sucre par un atome de soufre est un autre exemple de modification qui permet d'améliorer la résistance aux nucléases (bien qu'uniquement aux endonucléases) et également dans certains cas l'activité des siARN concernés (Jones *et al.* en série ADN et Leydier *et al.* en série ARN, Tableau 3).^{113,114}

Les modifications introduites sur l'hydroxyle en position 2' peuvent également être porteuses de fonctions permettant des réactions post-synthétiques. L'introduction sur l'oxygène d'un groupement acétylthiométhyle (AcSM) a par exemple été décrite comme permettant la formation de ponts disulfures entre deux nucléotides voisins d'une hairpin améliorant sa stabilité thermique (+2,7°C) ainsi que sa stabilité enzymatique (Gautier *et al.*, Tableau 3).¹¹⁵

La position 5', bien que moins considérée, peut également être une position d'intérêt pour fonctionnaliser le sucre. Cette position est celle à laquelle nous nous intéresserons plus particulièrement dans ce manuscrit. De nombreux travaux décrivent l'introduction de fonctions en position 5'. C'est le cas des travaux décrits par Manoharan et ses collaborateurs en 2016 qui portent sur la synthèse de 5'-C-méthyl phosphoramidites.¹¹⁶

Des études ont également été menées pour évaluer l'effet des modifications introduites en position 5'. Récemment, et dans le but également de faire de la position 5' du désoxyribose un site aisément fonctionnalisable, Smietana et coll. proposent une stratégie de synthèse pour l'obtention d'un grand nombre de 5'-C-acyl nucléosides pour envisager la synthèse de nouveaux phosphoramidites modifiés.¹¹⁷

Un lien 2',4'-méthylène (Singh *et al.*, Tableau 3) peut être introduit sur le sucre, formant ainsi un nucléotide contraint qui, introduit au sein d'une séquence nucléique, conduit à la formation de LNA (Locked Nucleic Acid). Leur grand intérêt réside dans leur capacité à grandement augmenter (+5 à 10°C) la stabilité thermique des duplexes au sein desquels ils sont incorporés grâce au gain entropique induit par la préorganisation du sucre.¹¹⁸ Des travaux menés par Swayze et son équipe étudient l'influence de l'introduction en position 5' de groupement méthyle sur la stabilité thermique de LNA.¹¹⁹ Celle-ci varie en effet selon que le groupement crée une conformation *R* ou *S* sur la position 5'.

D'autres modifications bloquant la conformation du sucre sont décrites dans la littérature notamment les tricyclo-ADN de l'équipe de Leumann ou les LNA/BNA (pour bicyclo-nucleic acids) des équipes de Imanishi et Wengel. Introduites dans des duplexes, ces modifications permettent, une forte augmentation de la stabilité thermique des structures (jusqu'à +8°C par modification introduite).^{119,120-123} Leur ajout au sein de séquences induit également un changement dans le type d'hélice, favorisant la formation d'une hélice A.

Au sein de notre équipe, a été synthétisée une autre famille de nucléotides contraints préstructurés de type 1,3,2-dioxaphosphorinane (D-Constrained Nucleic Acids, D-CNA) dont les angles de torsions de la liaison avec le groupement phosphate sont bloqués grâce à un cycle neutre à 6 chaînons. Dans le cas de la sous-famille des α,β -D-CNA, un pont éthylène reliant un oxygène du phosphate et le carbone 5' du nucléotide inférieur permet de bloquer les angles de torsions α et β . Le dinucléotide T-T de configuration $R_{C5'}$ présente des angles de torsions α canoniques g^- semblables à ceux observés dans les duplexes d'ADN. Celui de $S_{C5'}$ présente un angle de torsions α g^+ (non canonique) retrouvé dans certaines structures de l'ADN. Ainsi, l'introduction d'un motif $TT_{C5',5}$ permet ainsi de préorganiser une partie non appariée de la séquence d'une épingle à cheveux.¹²⁴⁻¹²⁶ Des travaux menés en collaboration avec l'équipe de Swayze ont porté sur une approche antisens dans le cadre de la maladie de Huntington.¹²⁷

Plus récemment, la synthèse de thio- et seleno- α,β et α,β,γ -CNA ont permis l'élargissement de la famille des acides nucléiques modifiés en 5'.¹²⁸ Dernièrement, les travaux de l'équipe ont été étendus à la synthèse de dinucléotides contraints mais également convertibles (α,β -C₂NA, Convertible and Constrained Nucleic Acids), portant cette fois un cycle *N*-propargyl dioxo-1,3,2-oxazaphosphorinane pouvant être impliqué dans des réactions de type chimie click pour de la fonctionnalisation post synthétique.¹²⁹

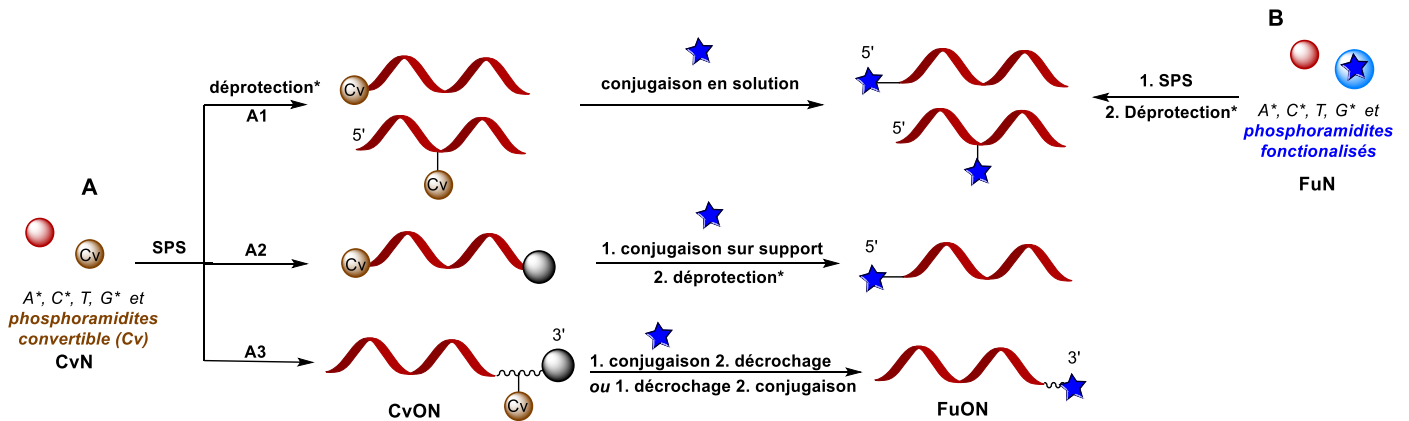
En plus des différentes modifications présentées dans cette partie, la synthèse de PNA (Peptidic Nucleic Acids) doit également être mentionnée. En effet, ces structures dont le phosphate et le sucres sont remplacés par un lien amide présente une stabilisation importante grâce à leur neutralité et leur conformation restreinte.^{130,131} Des hybrides PNA/DNA créés peuvent être reconnus par certaines enzymes comme la RNase H et l'ADN polymérase, et ainsi être de bons candidats pour des applications thérapeutiques.

1.2.3.4. Fonctionnalisation et conjugaison

Jusqu'à présent ont été décrites des modifications structurales sur le squelette même de l'ODN. Dans cette partie seront présentées des méthodes permettant le greffage de fonctions chimiques dans le but d'élargir le répertoire catalytique des ODN.

Pour ce faire, des nucléosides convertibles (CvN, dans le cadre qui nous intéresse de l'utilisation de la méthode aux phosphoramidites) introduits par synthèse supportée possèdent des fonctions permettant la conjugaison post-synthétique des ODN avec des motifs organiques d'intérêt ou différentes biomolécules. Doivent ainsi être différenciées lors de la modification d'oligonucléotides, la **fonctionnalisation** et la **conjugaison** (Figure 18). La **fonctionnalisation** correspond à l'obtention d'un oligonucléotide porteur d'une fonction chimique supplémentaire qui est introduite directement lors de sa synthèse. Cette nouvelle fonction peut être celle d'intérêt ou une fonction intermédiaire, **convertible**, permettant la fixation post-synthèse sur l'oligonucléotide d'un autre motif (Figure 20).^{132,133} Grâce à une réaction chimique choisie, l'ON fonctionnalisé d'intérêt peut ainsi être obtenu à partir de cette fonction convertible. Il s'agit dans ce second cas de **conjugaison**.

Sont ainsi distingués les oligonucléotides convertibles (**CvON**), des oligonucléotides fonctionnalisés (**FuON**) comme cela est présenté sur la Figure 18.



déprotection* = déprotection et décrochage du support ; A*, C*, G* = phosphoramidites protégés sur la base

Figure 18. Les différentes approches de synthèse pour oligonucléotides fonctionnalisés

A partir de phosphoramidites commerciaux et convertibles (**CvN**), plusieurs stratégies sont envisageables. La conjugaison peut ainsi être effectuée sur l'ODN en solution (Figure 18.A1) ou supporté (Figure 18.A2). La modification ayant également la possibilité d'être introduite à l'extrémité 3' de l'ODN avant ou après séparation du support (Figure 18.A3). Il est également possible d'obtenir directement par synthèse supportée des oligonucléotides fonctionnalisés par le motif d'intérêt, à partir de phosphoramidites commerciaux et de phosphoramidites fonctionnalisés convenablement protégés (Figure 18.B). Cette approche versatile permet la synthèse à façon de **FuON**.

1.2.3.5. Conjugaison des extrémités

De manière post-synthétique ou en incorporant un phosphoramidite modifié en début ou fin de synthèse supporté, les extrémités (3' comme 5') peuvent également être fonctionnalisées. Habituellement, les modifications sur l'extrémité 5' sont introduites *via* un phosphoramidite fonctionnalisé mais elles peuvent également être obtenues grâce à des réactions modifiant l'extrémité du brin. L'équipe de Defranq a publié en 2012 un exemple de ce type, leurs travaux décrivant l'obtention d'un ODN 5'-phosphate obtenu par dégradation de l'extrémité 5' de l'ODN précédemment obtenu.¹³⁴ L'équipe de Kool a également travaillé en ce sens pour obtenir la formation d'un CvON 5'-iodo, à l'aide d'une méthode simple en une étape à partir de l'oligonucléotide 5'-OH toujours fixé à son support de synthèse.¹³⁵ Cette approche permet d'obtenir rapidement l'introduction d'un motif électrophile. Toutes les modifications des extrémités permettent ainsi de moduler les interactions entre oligonucléotides et protéines, mais également d'influencer la distribution dans les tissus dans le cadre d'applications thérapeutiques (selon la lipophilie du groupement greffé ou les éventuelles propriétés permettant du ciblage par exemple).

Les types de modifications présentés précédemment peuvent être combinés au sein d'un même oligonucléotide dans le but d'associer différentes propriétés, comme l'ont fait Matteucci et coll.⁹² L'association d'un lien phosphorothioate à une base modifiée en position 5 par un groupement propyne a permis l'obtention d'oligonucléotides ayant une meilleure affinité avec l'ARN et un potentiel d'inhibiteur antisens accru.

1.2.3.6. Modification post-synthétique d'oligonucléotides convertibles

De nombreuses réactions ont été développées pour permettre la fonctionnalisation post-synthèse supportée (SPS) et sont notamment décrites dans une revue publiée en 2021 par notre équipe.¹³⁶ La Figure 19 présente, sans vouloir détailler exhaustivement les méthodes existantes, quelques exemples représentatifs de la littérature concernant la synthèse de **FuON** à partir de différents ODN convertibles. La ligation de Staudinger est une méthode qui permet la formation d'une liaison amide, à partir d'un composé portant un atome de phosphore au degré d'oxydation P(III) et d'un oligonucléotide portant une fonction azoture. Cette méthode est par exemple décrite comme permettant l'introduction post-synthétique d'un fluorophore sur un ODN.^{137,138} La fonctionnalisation par formation de lien amide, très largement utilisée peut également permettre la ligation de deux brins *via* la création d'un macrocycle.¹³⁹ Ce type de liaison peut être formé sur les ODN aussi bien grâce à la ligation de Staudinger que par l'utilisation de dérivés porteurs du groupement *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) activé.¹⁴⁰

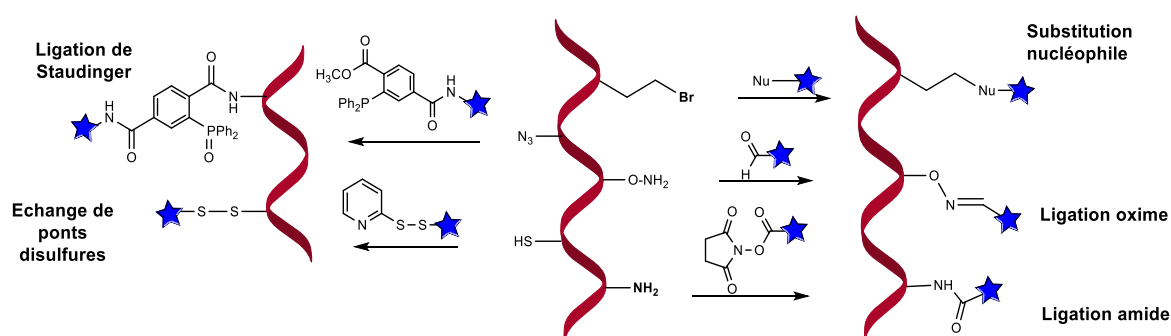


Figure 19. Méthodes de ligations post-synthétique pour la conjugaison d'ODN

Utilisée moins fréquemment que la liaison amide, la fonction oxime permet à partir d'un ODN porteur d'une (ou plusieurs) fonctions oxyamine et d'un partenaire aldéhyde d'obtenir sa conjugaison avec un motif d'intérêt ou encore sa cyclisation.¹⁴¹⁻¹⁴³

Après une réaction d'échange thiol-disulfure, de petites molécules ou des liens aux propriétés d'auto-immolation sont liés *via* un pont disulfure à l'ODN. Cette approche a été utilisée pour la co-délivrance d'un siRNA et d'une drogue anticancéreuse.¹⁴⁴ Sont également décrits dans la littérature des exemples de ponts disulfures utilisés pour lier deux brins complémentaires, ou encore pour stabiliser la formation de structures secondaires, entre autres applications.^{115,145}

De nombreuses méthodes de conjugaison existent donc et présentent l'avantage d'être majoritairement orthogonales les unes aux autres. Elles peuvent ainsi être associées au sein d'une même séquence et également permettre de combiner différentes applications (contrainte ou structuration, biodistribution, vectorisation, détection etc...). En complément des méthodes mentionnées précédemment, les techniques de chimie click sont également très plébiscitées pour la fonctionnalisation post-synthétique d'oligonucléotides.

1.2.3.6.1. Chimie Click et fonctionnalisation des oligonucléotides

Au début du mois d'octobre, le prix Nobel de Chimie a été décerné à C. Bertozzi, B. Sharpless et M. Meldal pour leurs implications dans le développement de la « chimie click », qui se révèle particulièrement plébiscitée pour la fonctionnalisation post synthétique d'acides nucléiques.¹⁴⁶ Parmi les réactions regroupées sous le terme de « chimie click », la plus couramment utilisée, notamment en chimie des acides nucléiques, est la Cycloaddition Azoture-Alcyne catalysée par le Cuivre (CuAAC). En effet, la fonction alcyne, généralement présente sur l'ODN, tolère bien le cycle de synthèse supportée

sans nécessiter de groupement protecteur et est orthogonale aux autres fonctions convertibles communément utilisées. Ce motif alcyne est également bien toléré par les polymérase lors qu'il est incorporé sur des nucléosides triphosphates dans le cadre d'une synthèse par voie enzymatique.¹⁴⁷

Sa démocratisation est due à une facilité de mise en œuvre, à sa biocompatibilité et à des temps de réactions courts, critères déterminants pour des applications biologiques. Les linkers utilisés ont également évolués pour s'adapter aux besoins des applications (plus ou moins longs, flexibles ou hydrophiles).¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

L'équipe de Carell a notamment développé une stratégie de réaction *click* séquentielle.¹⁵⁰ Rendant orthogonales les trois fonctions alcynes incorporées par un jeu de protections, elle permet d'introduire, à partir de trois phosphoramidites convertibles incorporés dans une séquence, trois sondes fluorescentes différentes. Démontrant sa versatilité, la CuAAC a également permis *via* la formation d'un cycle triazole, la connexion de deux brins d'oligonucléotides complémentaires dans le but d'augmenter la stabilité des structures obtenues.^{151,152}

Depuis, elle s'est rapidement imposée dans le domaine.¹⁵³⁻¹⁵⁵ Des ODN fonctionnalisés par des fluorophores¹⁵⁵, des sondes,¹⁵⁶ ou encore fixés à des plateformes¹⁵⁷ ou des nanoparticules¹⁵⁸ ont pu être ainsi obtenus. Cependant, les approches *in vivo*, ont nécessité une adaptation de la méthode pour permettre de s'affranchir du cuivre, toxique pour les cellules et interférant avec le métabolisme biologique.

Ainsi, les travaux de Bertozzi se sont révélés cruciaux pour la transposition de la chimie *click in vivo*. Son équipe a mis au point au début des années 2000 une cycloaddition [3+2] dont la force motrice est basée sur le relâchement. S'appuyant sur des squelettes cyclo-octyne et en absence totale de catalyseur, la SPAAC (Strain Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition) d'abord a permis l'étude de glycans à la surface des cellules, avant de trouver sa place à son tour dans le domaine de la fonctionnalisation d'oligonucléotides.¹⁵⁹ Grâce à l'utilisation de différents alcynes dits tendus (portés par des cyclo-octynes issues de la fusion de plusieurs cycles ; DIBO (dibenzocyclooctyne) entre autres)¹⁶⁰⁻¹⁶², la SPAAC a rendu possible à son tour la fonctionnalisation des CvONs par des fluorophores,¹⁶⁰ et par différents ligands ainsi que la ligation de brins complémentaires d'un duplex,^{163,164}

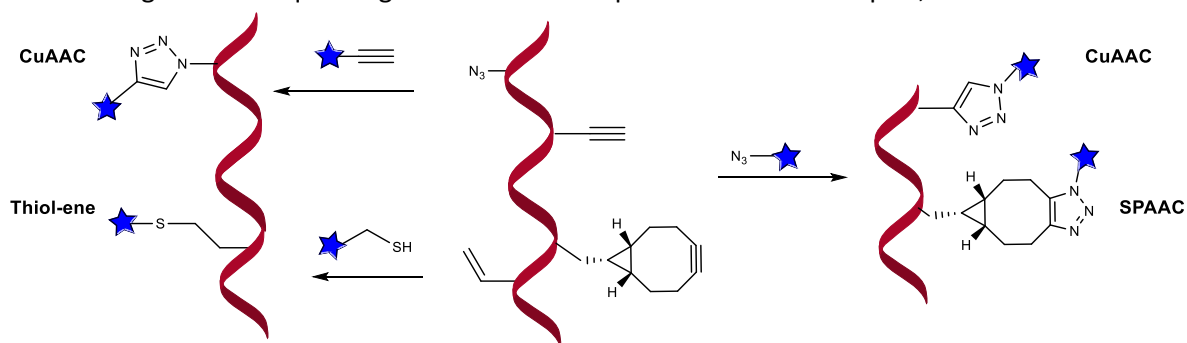


Figure 20. Réaction de chimie *click* pour l'obtention d'oligonucléotides fonctionnalisés

Il est important de mentionner d'autres réactions de « chimie *click* » qui n'utilisent pas les métaux tels que la réaction de type thiol-ène également employées dans le domaine des acides nucléiques (Figure 20).¹⁶⁵ Récemment, dans le but de pouvoir réaliser des réactions à l'intérieur d'organismes vivants, une réaction de chimie *click* catalysée par la lumière a été mise au point. Elle permet de notamment de réaliser des cyclisations 1,3-dipolaire grâce à une activation UV. Ont ainsi pu être obtenus le cross-link de deux brins ou encore le greffage de groupements d'intérêt.¹⁶⁶ Plus récemment, la méthode dite SuFex (pour Sulfur-Fluoride Exchange), est venue enrichir l'éventail des méthodes bio-orthogonales de ligation utilisées sur les ODN.¹⁶⁷ Dans un exemple décrit par Sharpless

et coll., cette réaction permet la bioconjugaison d'ODN avec des protéines par l'intermédiaire d'un lien sulfamide.

1.2.4. Synthèse enzymatique (à partir de nucléosides triphosphates)

Au niveau cellulaire, l'ADN comme l'ARN sont synthétisés dans le noyau par des enzymes, spécifiquement des polymérases. Leur synthèse s'effectue de 5' vers 3' à partir de nucléosides triphosphates (NTP ou dNTP en série ADN).¹⁶⁸ Des acides nucléiques (ribo- comme desoxyribo-) synthétiques peuvent être obtenus par une méthode enzymatique en s'inspirant du processus biologique de synthèse et de réplication des acides nucléiques.¹⁶⁹

Appelées PCR (Polymérase Chain Reaction - réaction en chaîne par polymérase) ou RCA (Rolling Circle Amplification - réplication circulaire de l'ADN), ces méthodes d'amplification de séquences d'acides nucléiques sont basées sur l'utilisation de polymérases thermostables, telles que la Taq polymérase (stable jusqu'à 100°C). Cette caractéristique les rend particulièrement adaptées à ce type d'applications. En effet, elles conservent leurs capacités enzymatiques malgré les cycles de température inhérents au processus, qui a ainsi pu être automatisé. Après dénaturation des deux brins et après la phase d'hybridation avec des amorces spécifiques, la synthèse a lieu à partir de (d)NTP (Figure 21).^{170,171} Ce type d'approche permet d'obtenir rapidement à partir d'une séquence de départ 2ⁿ copies de la séquence cible.

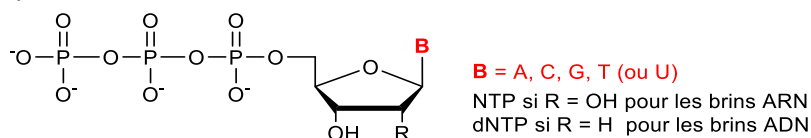


Figure 21. Nucléosides triphosphates (d)NTP utilisés par la polymérase pour la synthèse d'ODN par voie enzymatique

En travaillant à partir de nucléotides portant des modifications, des séquences non naturelles peuvent être obtenues, et ce grâce à l'utilisation de (d)NTP porteurs de modifications. Il s'agit donc de fonctionnaliser les nucléosides triphosphates par la modification d'intérêt et de s'assurer que le synthon obtenu soit bien toléré par les polymérases.¹⁷² Des méthodes de synthèse de (d)NTP existent depuis les années 80 et sont bien maîtrisées. La voie usuelle d'obtention de (d)NTP a été mise au point par Ludwig et Eckstein, qui lui ont donné son nom, et permet d'introduire des modifications sur la base ou le sucre des nucléosides triphosphates (Schéma 8).^{172,173} La synthèse d'un (d)NTP est réalisée en trois étapes à partir du nucléoside correspondant. La position 5' du nucléoside est phosphitylée à l'aide de chlorure de salicylchlorophosphite permettant l'obtention d'un nouvel intermédiaire salicylphosphite. Celui-ci réagit ensuite avec le pyrophosphate (PPi) pour former un intermédiaire cyclique. Les deux dernières étapes consistent en une oxydation et une déprotection qui permettent l'obtention du (d)NTP désiré. Après purification, les nucléotides ainsi obtenus, (porteurs ou non de modifications) peuvent être utilisés comme substrats pour la synthèse d'oligonucléotides *via* les polymérases.

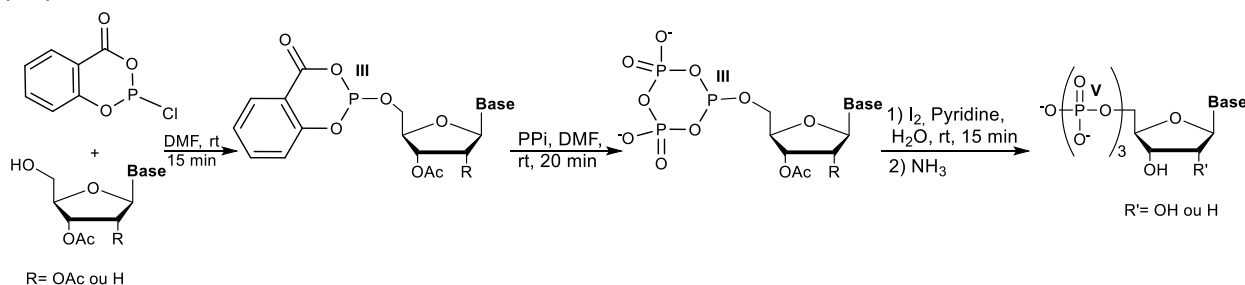


Schéma 8. Méthode de Ludwig et Eckstein pour la synthèse des nucléosides triphosphates

La modification d'ODN permet ainsi d'étendre leur répertoire catalytique et de leur conférer des propriétés catalytiques possédées naturellement par d'autres biomolécules et plus particulièrement les enzymes. Nos travaux portant sur des mimes de protéases à sérine, nous présentons dans cette seconde partie, l'état de la littérature sur les systèmes développés pour mimer l'activité de ces enzymes.

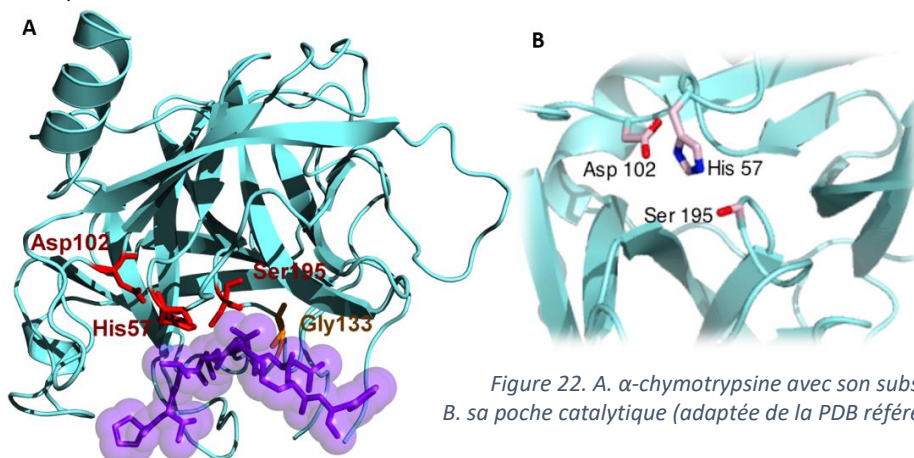
2. Les protéases

2.1. Définition et généralités

Les protéases (ou peptidases) sont des enzymes appartenant au large groupe des enzymes hydrolytiques (ou hydrolases). Elles ont la capacité à réaliser la dégradation de protéines en hydrolysant le lien peptidique qui relie les acides aminés entre eux. Plusieurs sous-familles existent telles que les métalloprotéases, les protéases à sérine, les protéases à thréonine, les protéases à cystéine et les protéases à aspartate, leur dénomination respective étant basée sur le nom de l'acide aminé responsable de l'hydrolyse. Si ces enzymes ont théoriquement la capacité à hydrolyser n'importe quel lien amide, en réalité, les coupures sont observées plus spécifiquement chez certains substrats que d'autres.^{175,176} Leur poche catalytique contient plusieurs sous-sites ayant pour fonction d'interagir avec la protéine à dégrader et de reconnaître une courte séquence d'acides aminés.¹⁷⁷ Présentes chez des organismes eucaryotes comme procaryotes, les protéases sont impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques agissant comme facteurs de coagulation, dans la spermatogénèse ou encore dans la réponse immunitaire en étant impliquées dans l'activation de l'apoptose cellulaire.^{177,178} L' α -chymotrypsine, quant à elle, fait partie des protéases jouant un rôle important dans la digestion.¹⁷⁷ La famille des protéases à sérine, dont le fonctionnement est détaillé ci-après, représente environ un tiers des protéases connues et tire son nom de la présence d'un résidu sérine (Ser) au cœur de son site catalytique.

2.2. Le cas des protéases à sérine

Une des protéases à sérine la plus étudiée est l' α -chymotrypsine. Synthétisée par le pancréas, cette enzyme de digestion fait partie des 178 protéases à sérine retrouvées chez l'Homme (sur un total de 699 protéases).



Elle est constituée de 245 acides aminés structurés en deux tonneaux β (Figure 22. A.).¹⁷⁷ Sa poche catalytique contient la triade catalytique caractéristique des protéases à sérine comportant une sérine (Ser), un résidu histidine (His) et un résidu acide aspartique (Asp), comme présenté sur la Figure 22. B.).

Le mécanisme d'action de ce type de protéase est basé sur la coopération entre les chaînes latérales de ces trois résidus (Schéma 9). Le noyau imidazole de l'histidine, grâce à une liaison hydrogène avec le carboxylate de l'acide aspartique, agit comme une base générale plus forte, à même de déprotoner l'hydroxyle de la sérine. Cette dernière, rendue beaucoup plus nucléophile peut alors attaquer sur le groupement carbonyle du lien amide pour conduire à la formation d'un intermédiaire tétraédrique chargé négativement. Cet intermédiaire est stabilisé par la présence de deux donneurs de liaisons hydrogène NH de la Glycine 193 et de la Ser 195 du squelette de l'enzyme. Ce réseau constitue le trou de l'oxyanion et permet la délocalisation de la charge négative néo-formée ainsi que la réduction de l'énergie d'activation de l'état de transition. La présence d'un aspartate et d'une arginine à proximité apporte également une stabilisation électrostatique des charges en présence. En parallèle, la charge positive de l'imidazole est également stabilisée *via* une liaison hydrogène. Le noyau imidazole protoné agissant comme un catalyseur acide général, favorise le départ de l'extrémité N_{term} protonée du substrat. L'intermédiaire acyl-enzyme obtenu est attaqué par une molécule d'eau activée par le noyau imidazole *via* un mécanisme de base générale menant à la formation d'un nouvel intermédiaire tétraédrique qui conduit finalement à la libération de la partie C_{ter} du substrat et à l'enzyme régénérée.

Ce mécanisme de catalyse covalente permet donc de favoriser l'hydrolyse en abaissant la barrière énergétique grâce au passage par les deux intermédiaires tétraédriques covalents stabilisés par un jeu de liaisons hydrogène.

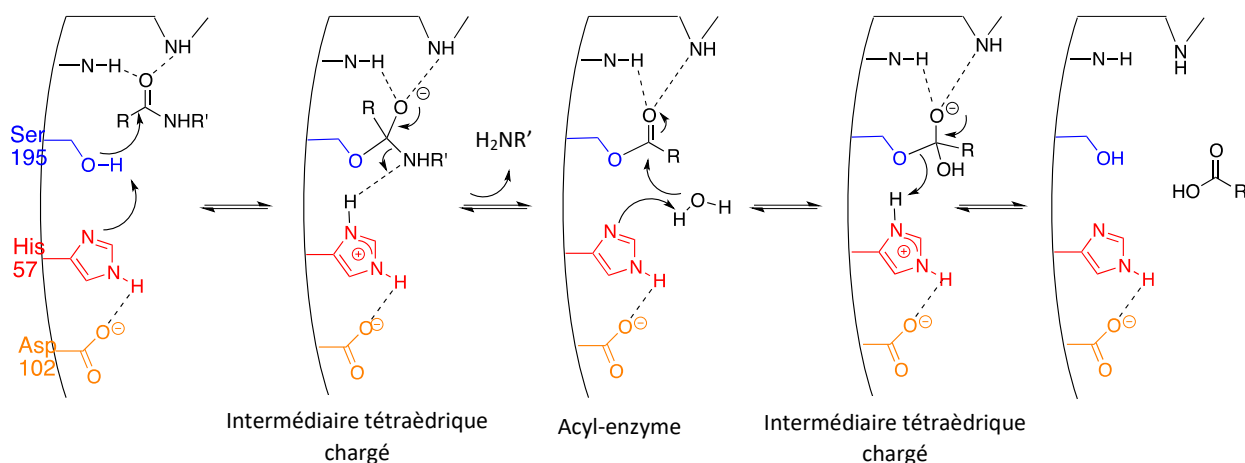


Schéma 9. Mécanisme d'action des protéases à sérine

Les travaux réalisés sur différents inhibiteurs de ces protéases à sérine ont permis de confirmer et de préciser leur mécanisme d'action. Des inhibiteurs permettant d'inactiver la protéase *via* la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme stable, ont par exemple, permis de visualiser les différentes interactions impliquées dans la formation des intermédiaires. De plus, des inhibiteurs d'enzyme de type analogues de l'état de transition confirment bien la formation des intermédiaires tétraédriques.^{177,179}

Grâce à la coopération décrite précédemment entre les différents acides aminés du site actif, les protéases ont la capacité à catalyser *in vivo* les réactions d'hydrolyse de liaison amide, augmentant d'un facteur 10^{10} la vitesse de réaction dans le cas de l' α -chymotrypsine.¹⁷⁷ L'activité enzymatique est mesurée par le turnover, ou constante catalytique (k_{cat}), qui correspond au nombre de molécules de substrat qui peuvent être hydrolysées par une mole d'enzyme par seconde. Dans le cas de l' α -chymotrypsine, le k_{cat} mesuré est de 100 s^{-1} . L'efficacité catalytique est décrite par le rapport k_{cat}/k_m , comparant la rapidité de l'enzyme (illustrée par le k_{cat}) à l'affinité (K_m). L' α -chymotrypsine présente un k_{cat}/k_m de $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Les protéases possèdent également une capacité de reconnaissance qui permet l'hydrolyse spécifique de substrats auxquels la protéase est dédiée.^{175,176,178} Les protéases montrent en effet une préférence pour certains substrats, en fonction des types d'acides aminés présents à proximité du site de coupure. Cette préférence provient de la forme de la poche catalytique et des acides aminés présents dans ses sous-sites.¹⁷⁵ Ces sous-sites, décrits par la nomenclature de Schechter et Berger (Figure 23), sont notés S et numérotés de 1 à 3 (vers l'extrémité N_{term}) et de 1' à 3' (vers l'extrémité C_{term}) à partir de la liaison hydrolysée par l'enzyme. Ils correspondent chacun à la zone de l'enzyme interagissant avec une chaîne latérale donnée à proximité du site d'hydrolyse.¹⁸⁰ Ainsi, certaines enzymes seront spécifiques de substrats possédant en P₁ ou P_{1'} un résidu donné qui guide le substrat dans la poche du site de coupure, la structure de l' α -chymotrypsine induisant une préférence pour une arginine ou un acide aminé aromatique à proximité du site de coupure.

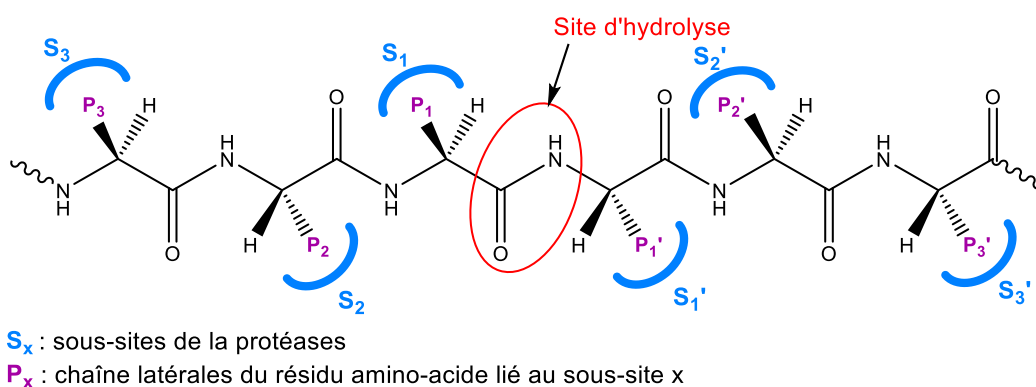


Figure 23. Description des sous-sites des protéases selon la nomenclature de Schechter et Berger

Cette spécificité explique le grand nombre de différentes protéases existantes dédiées à différentes fonctions biologiques. L'implication ubiquitaire des protéases dans l'organisme justifie l'intérêt qui leur est accordé, notamment par les chimistes qui cherchent à en mimer l'activité. Une revue sur le sujet a d'ailleurs été publiée en 2019, recensant de nombreux exemples de catalyseurs synthétiques, dont des mimes de protéases.¹⁸¹ Dans le cadre des processus enzymatiques utilisés par l'industrie, 60% des enzymes vendues sont des protéases, justifiant la nécessité de créer des systèmes permettant de tendre vers une activité similaire. Basés dans un premier temps sur des squelettes chimiques simples, des travaux se développent également sur des assemblages supramoléculaires tri-dimensionnels dans le but de se rapprocher au plus près des propriétés présentées par les enzymes. Il s'agit donc également de jouer sur l'hydrophobicité de l'environnement du catalyseur dans le but de créer des mimes susceptibles d'être compétitifs. Différents exemples de structures décrites dans la littérature comme mimes de protéases sont présentés dans le paragraphe suivant.

2.3. Mimes de protéases

2.3.1. Mimes de métalloprotéases

Les métalloprotéases naturelles sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de liaisons peptidiques grâce à un (ou plusieurs) ion métallique présent au cœur de leur site catalytique. L'ion métallique (Fe³⁺, Cu²⁺, Pt²⁺ ou encore Pd²⁺) accentue la polarisation du carbonyle du lien amide et favorise ainsi l'attaque par un ion hydroxyle, première étape de l'hydrolyse du peptide.

De nombreux exemples de mimes de métalloprotéases cherchant à reproduire cette activité catalytique sont présents dans la littérature.¹⁸²⁻¹⁸⁴ Kumar *et al.* ont notamment développés des complexes de cobalt Co(III) responsables de l'hydrolyse des lysozymes.¹⁸⁵ L'équipe de Suh a également décrit de nombreux mimes utilisant notamment des oxatriazacyclododécane pour complexer l'ion Cu²⁺.¹⁸⁶ Plusieurs équipes ont également développé des mimes consistant en une structure polymérique (polystyrène par exemple) sur laquelle peuvent être greffés des groupements organiques

complexant un ion métallique. Ces métalloprotéases synthétiques ont généralement des activités catalytiques assez basses à moins qu'elles ne soient directement attachées aux liaisons amide à hydrolyser. Ainsi, la concentration effective en substrat est augmentée et par voie de conséquence l'efficacité du catalyseur accrue. Un mème de métalloprotéases décrit en 2005, illustre bien ces différents paramètres par l'utilisation d'un groupement cyclène pour complexer du cuivre au degré d'oxydation II (Cu^{2+}) dans le site catalytique porteur d'une protéine cible (Figure 24).¹⁸⁷ Pour cela, le catalyseur porte une fonction aldéhyde sur laquelle peut réagir la fonction amine d'un résidu Lysine de la protéine à hydrolyser induisant la formation d'une imine. Cela permet, en rapprochant ainsi le substrat du cyclène, d'augmenter la concentration effective en catalyseur et d'améliorer l'efficacité de l'hydrolyse. Testée sur différentes protéines, l'activité protéolytique de cette structure est malgré cela relativement faible ($k_{\text{cat}} = 25 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$).

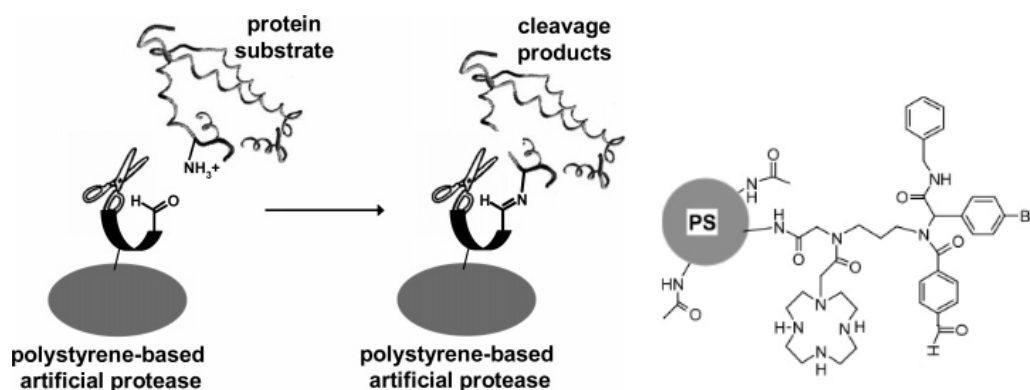


Figure 24. Mème de métalloprotéase portant un Cu^{2+} complexé par un cyclène - adapté de Yoo et al.¹⁸⁷

Plus récemment, Ly *et al.* proposent une série de mèmes de type polyoxométallate complexant du zirconium (IV).¹⁸⁸ Ces mèmes présentent un intérêt particulier puisqu'ils ont la spécificité d'hydrolyser des liens « Asp-X », c'est-à-dire un lien amide proche d'un résidu un acide aspartique. Cette capacité d'hydrolyse séquence-dépendante les rapproche des protéases naturelles, tout en présentant un avantage supplémentaire puisque peu de protéases ont une spécificité liée à la présence d'un acide aspartique en P_1 .

2.3.2. Mème de protéases à sérine (ou cystéine)

2.3.2.1. Mèmes organocatalytiques

Décidant de s'affranchir complètement du squelette peptidique, de nombreuses équipes ont envisagé une approche tendant vers la synthèse de composés organiques tri-fonctionnalisés.

Un des premiers exemples de mèmes de protéase à sérine a été publié par l'équipe de Cram en 1986 (Figure 25).¹⁸⁹ Il s'agit d'un mème rassemblant les principales caractéristiques des protéases à sérine : une pseudo poche catalytique capable de complexer le substrat et des fonctions chimiques correspondant à celles présentes sur les chaînes latérales des acides aminés de la triade naturelle. Cet exemple décrit un mème plutôt efficace puisque le k_{cat} obtenu est de l'ordre de 10^{11} s^{-1} . Des inconvénients assez importants contrebalancent en revanche ce résultat intéressant. En effet, la reconnaissance d'un substrat par ce mème nécessite la synthèse d'un nouveau composé pour chaque substrat potentiel, avec la mise en œuvre d'une trentaine d'étapes.

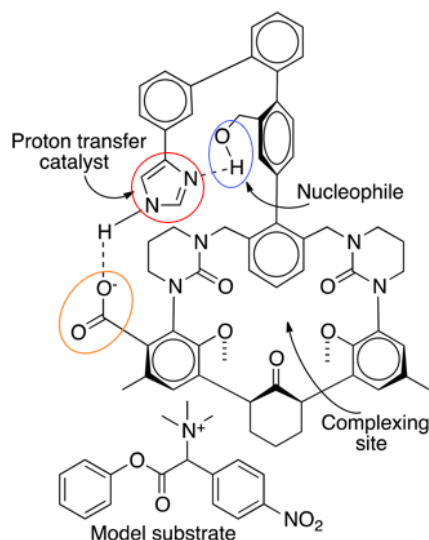


Figure 25. Mîme de transacylase - adaptée de Cram *et al.*¹⁸⁹

En 2008, un second mîme de protéase de type organocatalyseur a été décrit par Ema *et al.*¹⁹⁰ Plusieurs structures trifonctionnelles ont été synthétisées présentant différentes combinaisons associant selon les cas un motif pyridine, une fonction hydroxyle et une fonction (thio)urée (Figure 26). La capacité à catalyser une réaction de transestérification de ces différents mîmes potentiels a ensuite été évaluée et comparée. La structure (**1b**) présente la meilleure activité catalytique avec une augmentation de l'ordre de 10^6 de la vitesse de réaction. Ce composé porte un cycle pyridine, destiné à jouer le rôle de base générale, une fonction hydroxyle agissant comme nucléophile et deux donneurs de protons, issus de la fonction urée, reproduisant le trou oxyanion. Un des partenaires de la triade naturelle est manquant car il n'y a pas ici de substitut à l'acide aspartique. Il est intéressant de constater que dans cette étude le meilleur résultat provient de la structure regroupant les fonctions de la triade, ce qui révèle bien la nécessité de la coopération entre ces groupements pour obtenir une réaction optimale. Cependant, il faut noter dans cet exemple, la présence des groupements CF_3 , électroattracteurs, qui augmentent probablement la propension de la thiourée comme motif donneur de liaisons hydrogène.

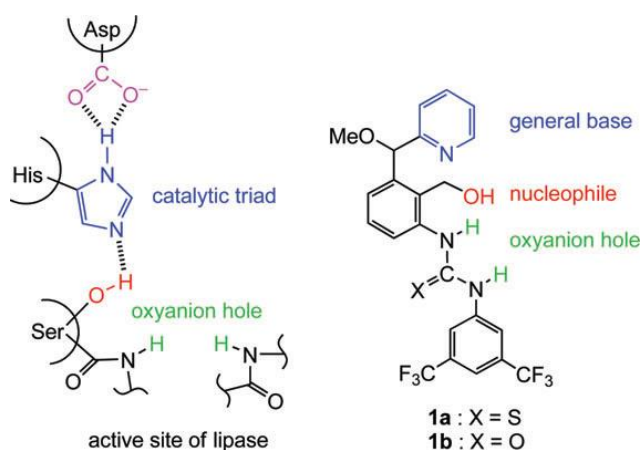


Figure 26. Mîme de type organocatalyseur – adaptée de par Ema *et al.*¹⁹⁰

Garrido-González *et al.* publient en 2020 leur travaux sur des mimes de chymotrypsine et d'hydrolases *N*-terminales, des enzymes protéolytiques possédant, à la place de la paire histidine-aspartate des protéases à sérine, la fonction amine terminale d'une sérine, thréonine ou cystéine.¹⁹¹ De façon assez similaire à l'approche décrites par Ema *et al.*, ils proposent des organocatalyseurs construits dans le but de regrouper plusieurs motifs clés : des donneurs de liaisons hydrogène pour mimer le trou de l'oxyanion, un motif nucléophile, une amine tertiaire en guise de base générale et finalement un noyau aromatique pour rigidifier la structure et faciliter la synthèse. Plusieurs composés ont ainsi été obtenus et leur activité catalytique a notamment été mesurée sur la réaction de transestérification de l'acétate de vinyle. Le composé qui a la meilleure activité catalytique est présenté Figure 27. Sa structure regroupe comme souhaité un mime de trou de l'oxyanion, un motif pyrrolidine capable de fonctionner comme une base et une fonction hydroxyle comme nucléophile.

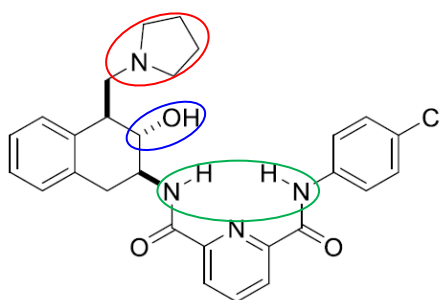


Figure 27. Organocatalyseur de 1^{ère} génération – adaptée de Garrido-González *et al.*¹⁹¹

Cette étude a été complétée en 2021 par le développement d'organocatalyseurs de 2^{ème} et 3^{èmes} générations avec l'incorporation en position 8 du squelette naphthalène de groupement sulfonamide.¹⁹²

Les travaux menés sur la synthèse de mimes de types organocatalyseurs mettent en évidence la difficulté de regrouper par voie synthétique un grand nombre de motifs réactifs sur une petite molécule. Ainsi, le squelette peptidique a longtemps constitué une structure prometteuse. En effet, dès l'utilisation de courts peptides, comme un dimère, jusqu'à 5 cinq groupements fonctionnels peuvent être introduits.

2.3.2.2. Mimes au squelette peptidique

Dans le but d'obtenir des mimes de protéases réduits à un motif minimal mais fonctionnel, plusieurs équipes ont travaillé sur la possibilité d'utiliser le dipeptide Sérine-Histidine (Ser-His) comme catalyseur, constituant le synthon le plus compact portant les trois groupes clés de la triade catalytique. Une publication datant de 2000 proposait en effet ce dipeptide comme catalyseur de la coupure de la liaison peptidique dégradant une protéine modèle, la BSA (bovine serum albumine).¹⁹³ Ces travaux, par Li *et al.*, ont été contredit en 2016 dans une publication démontrant, grâce à des contrôles adéquats, l'absence d'activité hydrolytique du peptide sur différents substrats fluorogéniques.¹⁹⁴

Ces travaux, comme ceux menés sur des petits organocatalyseurs, mettent en évidence la nécessité d'une bonne organisation tridimensionnelle des fonctions en présence pour permettre l'activité catalytique. Si la Nature utilise des enzymes pour permettre cette pré-organisation fonctionnelle grâce à leur repliement, l'utilisation de squelettes peptidiques synthétiques pourrait permettre d'arriver à un tel niveau de structuration.

Dans le but de travailler sur un squelette protéique simplifié, plus facile d'accès par voie synthétique, Atassi et Manshouri décrivent par exemple en 1993 une enzyme de synthèse (pepzyme), à la séquence relativement courte de 29 acides aminés. Cependant, les résultats d'hydrolyse obtenus n'ont jamais pu être reproduits, remettant en cause le fonctionnement du mime. ¹⁹⁵

Plus récemment, les outils de modélisation moléculaire ont également permis de guider la synthèse de nouveaux mimes d'enzymes peptidiques entièrement synthétiques. Ces travaux s'inspirent du mode d'action des protéases à cystéine. Ces dernières, présentent dans leur poche catalytique une triade similaire à celle des protéases à sérine, constituée d'un acide glutamique (Glu), d'une histidine (His) et d'une cystéine (Cys). Le noyau imidazole de l'histidine joue le même rôle d'acide et de base générale que dans le mécanisme d'action des protéases à sérine et la fonction thiol de la cystéine est en charge de l'attaque nucléophile sur le carbonyle. En 2012, l'équipe publie ainsi un exemple de « théozyme » (enzyme conçue grâce à la modélisation et au calcul théorique des distances de liaison). ¹⁹⁶ Lors de la conception du « théozyme », la triade a été simplifiée en dyade cystéine-histidine (Cys-His) associée à un trou oxyanion constitué de deux NH du squelette peptidique. Plusieurs séquences d'acides aminés ont été étudiées par le calcul pour répondre aux différents critères. Les séquences sélectionnées ont été synthétisées et leur activité catalytique évaluées sur différents substrats (ester de coumarine, de tyrosine et de *p*-nitrophényle). Bien que la vitesse d'hydrolyse obtenue dans le meilleur des cas soit 3.7×10^3 supérieure à celle de la réaction non catalysée (sur un substrat *p*-nitrophényle), la valeur de k_{cat}/k_m obtenue est assez faible de $400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ comparée à $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, valeur obtenue pour la papaïne, protéase à cystéine de référence.

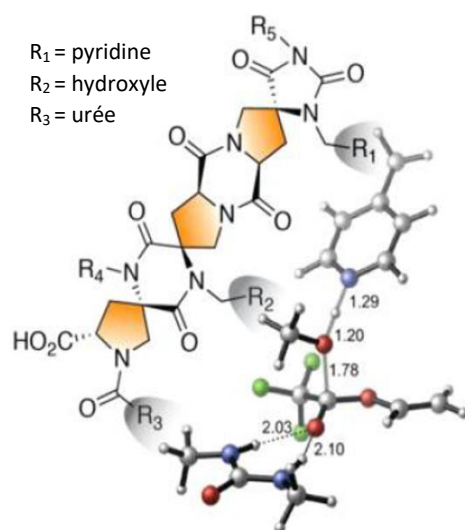


Figure 28. Spirologozymes – adaptée de Kheirabadi et al.¹⁹⁷

La même année, Kheirabadi *et al.* publient à leur tour des travaux portant sur des théozymes, et plus spécifiquement sur les spirologozymes rigides qui sont des assemblages de bis-acides aminés (acides aminés portant deux fonctions acide et deux fonctions amine) qui permettent d'organiser les différents groupements (R) en échelle (Figure 28).¹⁹⁷ Deux approches ont été envisagées en parallèle, une reproduisant les trois groupements de la triade usuelle des protéases à sérine, l'autre simplifiant le site catalytique par l'utilisation d'une dyade, la paire carboxylate-imidazole étant remplacée par un groupement pyridine dont le pK_a équivaut à celui de l'imidazole activé par le carboxylate ($pK_a \sim 7$). La méthanolyse du trifluoroacetate vinyle a été utilisée pour évaluer l'activité catalytique des différents mimes et révèle que ce spirologozyme bifonctionnel portant la dyade est le plus efficace, permettant une réaction $2,7 \times 10^3$ plus rapide que lorsqu'elle n'est pas catalysée.

Dès les années 2000, les structures peptidiques considérées pour la synthèse de mimes de protéases se sont diversifiées et des structures dendrimériques ont été envisagées pour mimer des protéases. En effet, leur synthèse est facilement accessible *via* une approche combinatoire par de la répétition des motifs qui les constituent. Ces structures symétriques, constituées d'une arborescence répétant une unité monomérique à partir de leur cœur, peuvent être de type peptidique ou encore être fonctionnalisées par des groupes d'intérêts.¹⁹⁸ L'équipe de Raymond a travaillé sur le sujet proposant des dendrimères peptidiques portant des résidus Asp, Ser et His. Leurs structures sont assemblées grâce à un réseau de ponts disulfures (Figure 29).^{199–201} L'activité catalytique mesurée augmente proportionnellement au nombre de niveaux de ramification du dendrimère et ainsi au

nombre de motif histidine par structure. Le dendrimère de quatrième génération, testé sur un substrat 1-acyloxy-pyrene-3,6,8-trisulfonate révèle une efficacité $1,4 \times 10^5$ supérieure à celle du 4-méthylimidazole utilisé comme référence dans leurs travaux.²⁰⁰ Cependant, la multi-présentation d'un motif catalytique peut se révéler moins efficace qu'un site catalytique unique mais situé au cœur d'une structure dendrimérique, compacte et hydrophobe. Ces résultats mettent en évidence l'importance de différents facteurs, (présence du cœur catalytique, hydrophobicité, compacité...) et la difficulté de les intégrer au sein d'un seul système.²⁰¹

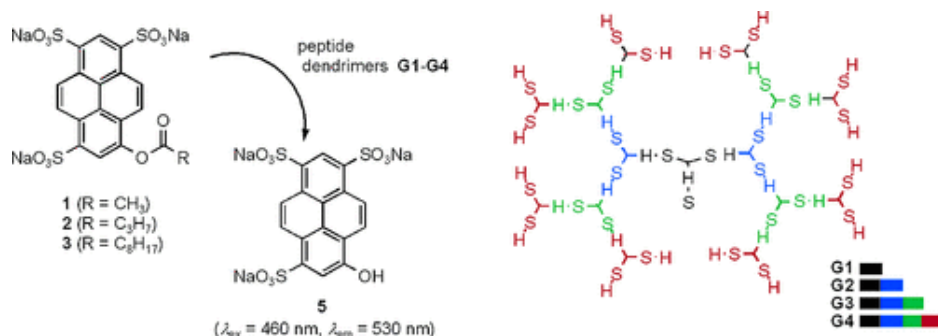


Figure 29. Quatre générations de dendrimères (G1-G4) plurifonctionnalisés et hydrolyse du substrat fluorogène 1-acyloxy-pyrene-3,6,8-trisulfonate – adaptée de Reymond et al.²⁰⁰

En 2016, un nouvel exemple de mime de protéase à cystéine a été publié (Figure 30).^{202,203} Il s'agit d'une protéine heptamérique, qualifiée de protéine « Frankenstein » car elle a été obtenue *de novo* (qui ne possède pas d'équivalent dans la nature). Son architecture a été conçue *in silico* grâce à un algorithme permettant l'obtention d'hélices α capables de s'auto-assembler, chacune présentant à sa surface la triade Cys-His-Glu (triade caractéristique des protéases à cystéine), ainsi orientée vers le cœur hydrophobe de la structure. L'activité hydrolytique de cette structure a été testée sur l'acétate de *p*-nitrophényle (*p*NPA), relativement facile à hydrolyser, et une constante catalytique k_{cat}/k_{uncat} de l'ordre de 10^4 a pu être observée. Comme attendu, la présence des trois résidus est indispensable à l'hydrolyse, l'absence de l'un d'eux pouvant mener à une perte totale de l'activité enzymatique.

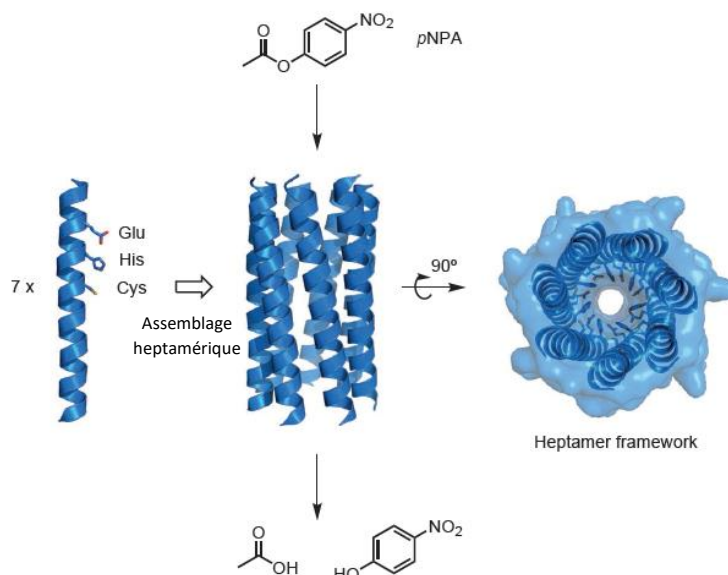


Figure 30. Protéase "Frankenstein" développée par Woolson et col.²⁰³

Il est important de noter que ce mime n'a pas la capacité d'hydrolyser des liens amide, plus stables, mais qu'il représente un résultat prometteur dans le domaine des mimes de protéases par l'agencement supramoléculaire de cette approche.

D'autres mimes, conçus à partir d'un squelette peptidique ont été décrits, notamment par Wong *et al.* en 2016 qui présentent le premier mime peptidique de protéase à sérine ayant une activité amidolytique.²⁰⁴ Ces travaux présentent une structure peptidique de type amyloïde contenant les trois résidus de la triade des protéases à sérine. Comme précédemment, la structuration tridimensionnelle apparaît comme cruciale pour l'obtention de mimes efficaces. Dans cet exemple, un assemblage de feuillets β , associés de manière anti-parallèle, permet de présenter à proximité les différents partenaires. L'activité amidolytique de ce mime a été évaluée sur des substrats amide de *p*-nitroaniline et le k_{cat} estimé est de l'ordre de $9 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ pour le plus petit substrat utilisé (*p*-nitrophényle de la L-alanine). Il s'agit donc d'un résultat encourageant bien que ses applications soient limitées à l'hydrolyse de substrats suffisamment petits pour pouvoir se placer entre les feuillets.

2.3.2.3. Mimes de types surfactants

Considérant la nécessité de travailler sur des assemblages macromoléculaires pour faciliter la rencontre des partenaires, les surfactants présentent un squelette attractif. De par leur capacité à s'assembler en micelle, ils créent un environnement hydrophobe qui rappelle celui présent chez les enzymes. De plus, ce type d'assemblage permet de travailler à la fois avec des interactions intra- et inter-moléculaires.

Etudiés depuis les années 1970, les surfactants possèdent la capacité à s'autoassembler grâce à leur structure amphiphile. Dans l'eau, les chaînes alkyles s'organisent pour former un cœur hydrophobe et les têtes polaires, hydrophiles, se retrouvent en surface de l'assemblage. Dans le cadre des travaux sur les mimes de protéases, les fonctions constituant la tête polaire peuvent correspondre à un motif imidazole, le plus fréquemment, mais également aux autres fonctions de la triade catalytique (hydroxyle, carboxylate ou encore donneurs de proton). Jusqu'au début des années 80, plusieurs équipes ont travaillé sur des systèmes de co-micelles, dans lesquelles deux types de surfactants s'assemblent. C'est le cas de trois des exemples présentés Figure 31. A et B.^{205,206} Kunitake *et al.* proposent notamment un surfactant bifonctionnel portant un imidazole ainsi qu'une fonction hydroxamate, cette dernière jouant le rôle de la fonction hydroxyle (Figure 31.A).²⁰⁵

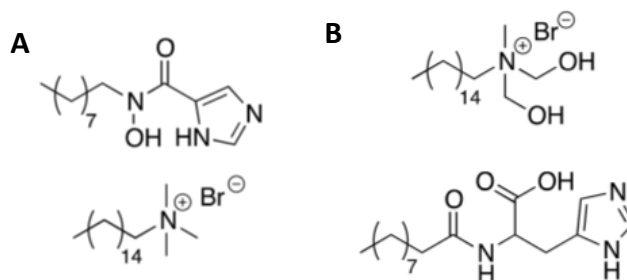


Figure 31. Exemples de surfactants s'assemblant en co-micelles - adaptée de Kunitake *et al.*^{205,206}

Associé au bromure de cetyltriméthylammonium, les deux surfactants s'assemblent en une structure co-micellaire. Lors de l'évaluation catalytique avec le *p*NPA comme substrat, le turnover affiché par ce système est supérieur à celui de l' α -chymotrypsine. De plus, son activité hydrolytique est meilleure que celle de l'imidazole (utilisé comme catalyseur organique de référence). L'assemblage en micelle révèle également sa pertinence, augmentant l'activité d'un facteur 100 par rapport à l'action du surfactant monomérique. Ihara *et al.* ont également publié des structures de ce type assemblées à partir de deux monomères portant respectivement deux et trois fonctions de la triade (Figure 31. B).²⁰⁶ Cependant, l'hydrolyse du *p*PNA comme celle de l'hexanoate de *p*-nitrophényle présente des résultats décevants, bien inférieurs aux constantes catalytiques de l' α -chymotrypsine.

D'autres équipes ont publié des surfactants plurifonctionnels s'assemblant toujours en micelle mais ne contenant qu'un seul type de monomère.²⁰⁷⁻²⁰⁹ Tonellato et coll. par exemple, ont proposé des surfactants portant un groupement imidazole associé, soit à une fonction acide, soit à une fonction hydroxyle (Figure 32).²⁰⁹ Les micelles ainsi formées ont également été évaluées sur des esters de *p*-nitrophényle, révélant des constantes catalytiques de l'ordre de $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Les travaux réalisés sur le mécanisme d'action de ces différents mimes, et particulièrement sur les interactions observées entre les différentes fonctions, mettent en évidence l'importance de la coopération entre les partenaires.

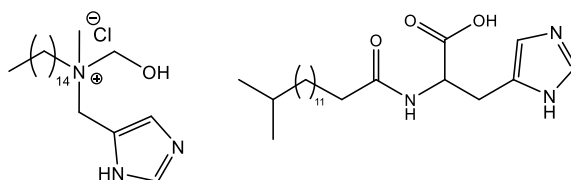


Figure 32. Surfactants plurifonctionnels développés – adaptée de Tonellato et coll. ²⁰⁹

Des lipopeptides, possédant des capacités d'autoassemblage similaires à celles des surfactants décrits précédemment, ont été proposés par Dejognat et coll. en 2015.²¹⁰ Ils sont constitués d'une longue chaîne apolaire et d'une extrémité polaire formée d'un tripeptide (Figure 33). Plusieurs structures ont été étudiées en faisant varier la séquence du tripeptide selon différentes combinaisons d'histidine, glycine et sérine. Ces variations de séquences permettent d'introduire un, deux ou trois groupes fonctionnels de la triade catalytique des protéases à sérine, la fonction acide apparaissant dans les peptides où la tête polaire est à l'extrémité C_{term} de la séquence. Les monomères obtenus s'assemblent en agrégats, et sous cette forme, ils présentent une meilleure activité catalytique que leur pendant monomérique. Les peptides présentés Figure 33 sont ceux ayant montré la meilleure vitesse de réaction, les valeurs obtenues étant très proches (respectivement 314 et $343 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). En revanche, il est difficile de conclure quant à la nécessité de la présence de la fonction hydroxyle, la catalyse étant probablement réalisée par le motif imidazole.

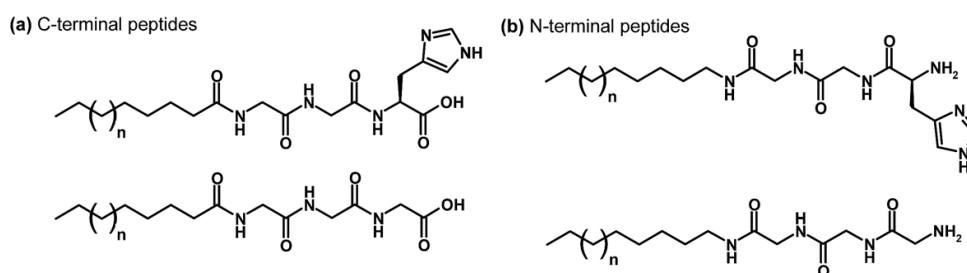


Figure 33. Lipopeptides fonctionnalisés – adaptée de Dejognat et al. ²¹⁰

2.3.2.4. Mimes de types nanostructures

Bien qu'encourageants, les résultats obtenus par les approches utilisant de petites molécules, ou encore des surfactants, n'atteignent pas les valeurs enzymatiques. Ainsi, d'autres types de structurations ont été envisagées. Avec l'avènement des nanostructures dans les années 2010, celles-ci se placent comme des squelettes prometteurs pour la création de mimes de protéases permettant un haut niveau de fonctionnalisation en termes de nombre de sites catalytiques potentiels.

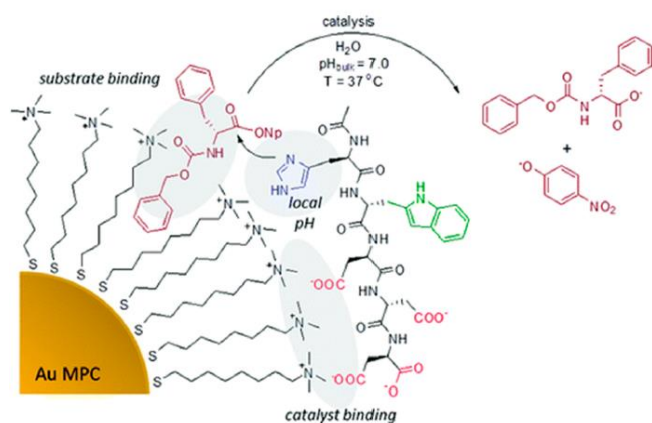


Figure 34. Complexe nanoparticule d'or-peptides – adaptée de Zaramella *et al.*²¹¹

En 2012, Zaramella *et al.* décrivent par exemple une approche impliquant une nanoparticule d'or complexée à de courts peptides permettant l'hydrolyse d'esters de *p*-nitrophényle.²¹¹ Les peptides interagissent de manière électrostatique avec les ions ammonium fixés à la particule d'or (Figure 34). Le substrat à hydrolyser s'intercale entre les chaînes alkyles, se plaçant ainsi à proximité du peptide et statistiquement du résidu catalytique, responsable de l'hydrolyse.

Malgré la volonté de recréer un micro-environnement proche de celui des enzymes, les résultats obtenus pour l'hydrolyse d'un ester de *p*-nitrophényle sont faibles, la vitesse d'hydrolyse du substrat étant seulement multipliée par 100. D'autres approches supportées ont été envisagées, notamment par Nothling *et al.* en 2017.²¹² Sur une résine de Merrifield fonctionnalisée par des groupements azotures, est introduit de manière multivalente par réaction de CuAAC une brique trifonctionnalisée portant des fonctions correspondant aux chaînes latérales des résidus His, Ser et Asp (Figure 35). Ces travaux présentent également l'utilisation de briques ne portant pas systématiquement toutes les fonctions, certaines étant masquées par des groupements protecteurs ou simplement absentes du synthon. Cette approche leur a permis de montrer la nécessité de la présence et de la collaboration des trois fonctions susmentionnées et d'évaluer l'importance relative de chaque groupement impliqué.

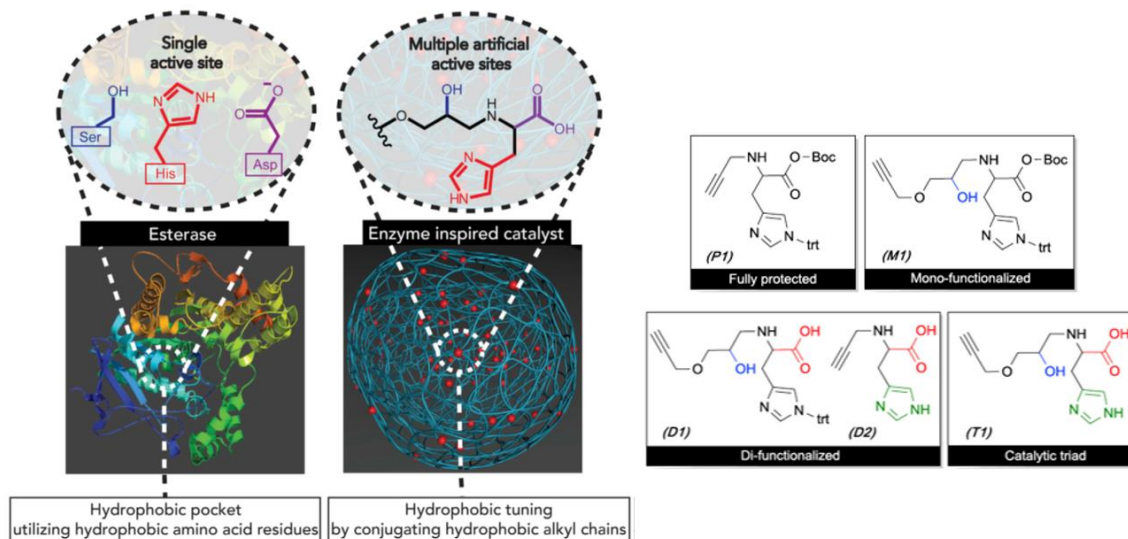


Figure 35. Résine de Merrifield fonctionnalisée par CuAAC – adaptée de Nothling *et al.*²¹⁸

Les résultats obtenus en termes d'activité catalytique, testée sur un ester de *p*-nitrophényle, reste modeste, la vitesse de réaction d'hydrolyse étant seulement multipliée par 50. Cependant, cette approche est prometteuse puisque la brique tri-fonctionnalisée peut être introduite sur différents types de supports.

2.3.2.5. Mimes nucléiques

2.3.2.5.1. Des acides nucléiques comme mimes de protéases ?

De par leurs propriétés structurales et leurs capacités d'autoassemblages, qui permettent notamment un repliement programmable et reproductible des séquences, les acides nucléiques, ARN comme ADN, apparaissent comme des candidats intéressants pour la synthèse de mimes de protéases. En effet, la partie responsable de catalyser la réaction d'hydrolyse au sein du ribosome est de nature ribonucléique.²¹³ Formellement, la réaction catalysée est une aminolyse d'ester d'acyle porté par la chaîne peptidique qui conduit à la formation d'une liaison amide. Selon le principe de micro-réversibilité, il semble donc que l'aptitude à réaliser la réaction inverse, l'hydrolyse de ces mêmes liaisons peptidiques, puisse être attendue de la part des acides nucléiques. Partant de ces constats, plusieurs équipes ont travaillé sur des mimes ayant ce type de structure *via* deux approches, l'une enzymatique, l'autre chimique.

2.3.2.5.2. Approche enzymatique

L'obtention d'acides nucléiques pouvant se comporter comme des mimes de protéases à sérine peut être réalisée à partir de (d)NTP par voie enzymatique. En effet, ces derniers sont des substrats d'ADN polymérase mutantes capables de les intégrer lors de l'amplification de l'ADN par PCR. Les séquences ainsi obtenues sont ensuite sélectionnées *in vitro* par la méthode SELEX. Chaque (d)NTP modifié est introduit sans discrimination, à chaque position qu'aurait occupé son analogue naturel. Cette approche, puissante, permet donc de cibler un grand nombre de séquences et d'explorer un vaste espace de topologie et de séquences.

Ameta et Jäschke ont ainsi développé une approche SELEX leur permettant de sélectionner des séquences RNAzymes à même de mimer la première étape de l'hydrolyse réalisée par les protéases. Introduit lors du processus SELEX, une séquence peptidique couplée à l'inhibiteur réversible de l'enzyme, permet la sélection d'une RNAzyme spécifiquement contre cette cible. Celui-ci présente comme attendu de nombreuses structures secondaires et le rôle particulier de la fonction N₇ d'une guanosine (G₂₂₂) a été souligné.²¹⁴

Selon un principe similaire à la technique du SELEX, les travaux de Hollenstein ont porté sur la fonctionnalisation de nucléosides triphosphates et sur l'évaluation de la capacité des polymérases à les reconnaître et les incorporer.²¹⁵ Ainsi, dans un premier temps la fonctionnalisation de (d)NTP au niveau de leur base (en position 7 pour les purines et 5 sur les pyrimidines) est réalisée. Dans le but de mimer les chaînes latérales des acides aminés Ser, His et Asp, des groupements organiques portant à leur extrémité un des trois motifs hydroxyle, acide carboxylique et imidazole y sont introduits. Les (d)NTP obtenus sont bien tolérés par les polymérases qui les incorporent efficacement dans des oligonucléotides.

L'équipe de Silverman travaille, quant à elle, depuis le début des années 2000 à la mise au point de mimes de protéases nucléiques à l'aide de cette approche.²¹⁶⁻²²⁰ Leurs travaux décrivent l'utilisation du SELEX pour isoler des ODN capables de réaliser la coupure d'un lien amide incorporé au sein d'un brin et présenté face à une boucle contenant une séquence aléatoire de nucléotides. Leurs premiers résultats révèlent l'obtention d'un DNAzyme à même de couper, non pas la liaison amide souhaitée, mais une liaison phosphodiester voisine. Ce problème a nécessité la mise au point d'un système de recapture pour permettre de s'assurer d'obtenir véritablement des DNAzymes dotés d'une activité amidolytique.

Si les premiers DNAzymes décrits ne contenaient pas de modifications et conduisent uniquement à la coupure du lien ester et amide aromatique, l'équipe, a par la suite, introduit des nucléosides triphosphates modifiés par des fonctions amine, carboxyle et hydroxyle en position 5 de l'uridine.^{216,217} Ces modifications, destinées à mimer les groupements de la triade catalytique, sont bien supportés par les polymérases ce qui a permis l'obtention de DNAzymes capables de réaliser la coupure de lien ester (Figure 36. A et B) puis d'amides aromatiques. Ce n'est qu'en 2016 que l'hydrolyse du lien amide simple (Figure 36.C.) est démontrée.²¹⁷

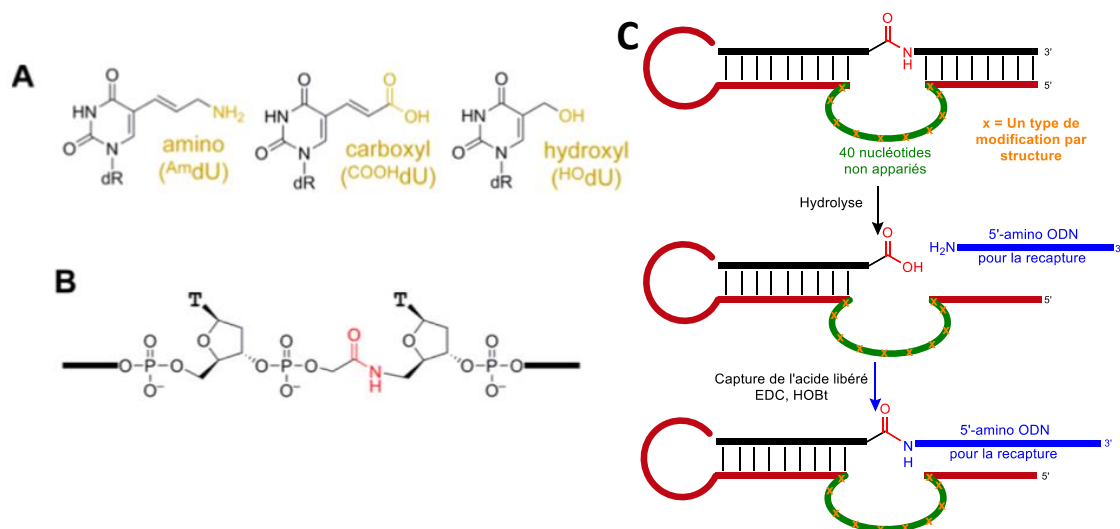


Figure 36. DNAzymes capables d'hydrolyser un lien amide intégré à leur structure – adaptée de Silverman et coll.²¹⁷

Les résultats décrits par cette équipe mettent également en avant l'une des failles de la méthode SELEX qui peut se montrer délicate à mettre en œuvre. En effet, lors du second tour d'évolution SELEX avec des substrats modifiés,²¹⁷ le contrôle négatif non modifié a révélé une activité catalytique, séquence qui n'avait pas été isolée lors des premières études.²¹⁶ Cette approche possède également un défaut majeur, puisqu'il n'est pas possible de réaliser des cycles d'évolution SELEX avec les trois modifications d'intérêt en parallèle.

Bien que présentant le grand avantage de donner accès à un large espace chimique grâce à l'incorporation aléatoire des dNTPs, ce caractère aléatoire peut aussi se révéler être un inconvénient car l'absence de contrôle des positions d'incorporation des modifications ne permet pas le développement rationnel d'un mime catalytique fonctionnel. Ainsi, en contournant cette problématique, les travaux basés sur la chimie des phosphoramidites présentent un grand intérêt puisqu'ils permettent de choisir à façon la position de la modification.

2.3.2.5.3. Approche phosphoramidite

Les travaux de l'équipe de Madder ont porté sur la synthèse de mimes acides nucléiques à partir de phosphoramidites présentant des modifications mimant les acides aminés de la triade catalytique naturelle (Figure 37).²²¹ Les modifications, fixées en position 2' du ribose par l'intermédiaire d'un lien amide, correspondent à une fonction hydroxyle, un noyau imidazole ou une fonction acide, protégées de façon à tolérer le cycle de synthèse supportée. Les trois phosphoramidites modifiés sont ainsi incorporés par synthèse sur support solide (SPS) dans deux oligonucléotides complémentaires. Ces deux ODN, assemblés ensuite en duplex portent, au cœur de l'hélice et à des positions définies, les trois partenaires de la triade synthétique. Si, à ce jour, aucune activité catalytique n'a été démontrée pour cette structure, les modifications incorporées au sein du duplex semblent avoir la

possibilité d'interagir puisqu'il a été observé, selon leur positionnement dans la séquence, une stabilisation ou une déstabilisation de la structure.²²²

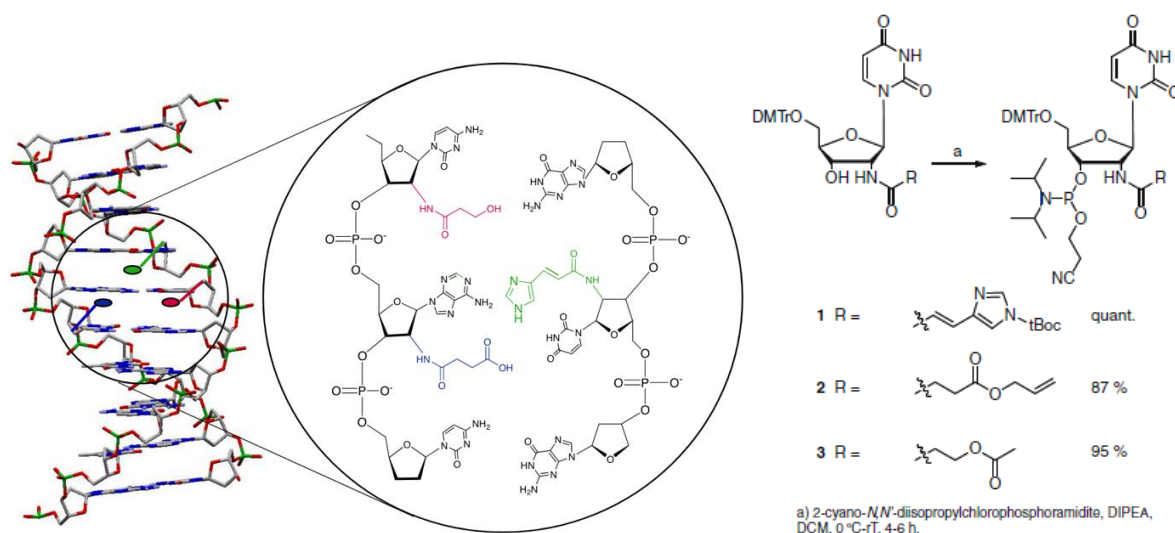


Figure 37. Duplex portant trois modifications – adaptée de Madder et coll.²²¹

Procédant d'une manière similaire, Xu *et al.* décrivent en 2013 la synthèse d'ODN au sein desquels est incorporé plusieurs fois un phosphoramidite modifié, portant un motif imidazole en position 5 de la désoxythymidine.²²³ L'étude par dénaturation thermique de la stabilité des différents duplexes ainsi formés a mis en évidence l'importance de la position des modifications au sein de la double hélice et de l'éventuelle coopération entre les différentes fonctions imidazole. En effet, les meilleurs résultats obtenus pour l'hydrolyse du substrat *p*NPA proviennent des duplexes portant trois modifications (deux sur un brin et une sur son complémentaire). Particulièrement, le duplex le plus efficace est celui dont les trois modifications sont positionnées dans le grand sillon, ce qui leur permet d'être orientées d'une manière qui favorise leur coopération. Les résultats d'hydrolyse ($k_{\text{cat}} = 3.91 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ soit 123 fois plus rapide que la réaction non catalysée) restent malgré tout modérés.

L'inconvénient principal d'une approche nucléique impliquant un duplex provient de la rigidité de la double hélice. De plus, cet agencement ne permet pas de mimer la reconnaissance d'un substrat, propriété d'importance des protéases naturelles. Basés sur une approche aptazyme, les travaux de l'équipe de Gorin en 2018 proposent la conjugaison d'un aptamère de l'acide cholique à un petit catalyseur imidazole, ce qui permet de pallier l'absence de poche catalytique (Figure 38).²²⁴ L'utilisation de cet aptamère permet de réaliser l'hydrolyse d'un ester d'ombelliférone positionné sur le substrat. L'aptamère (Ap1) considéré présente une structuration tri-dimensionnelle importante, comportant deux structures tige-boucle se rejoignant pour former une jonction trois voies.

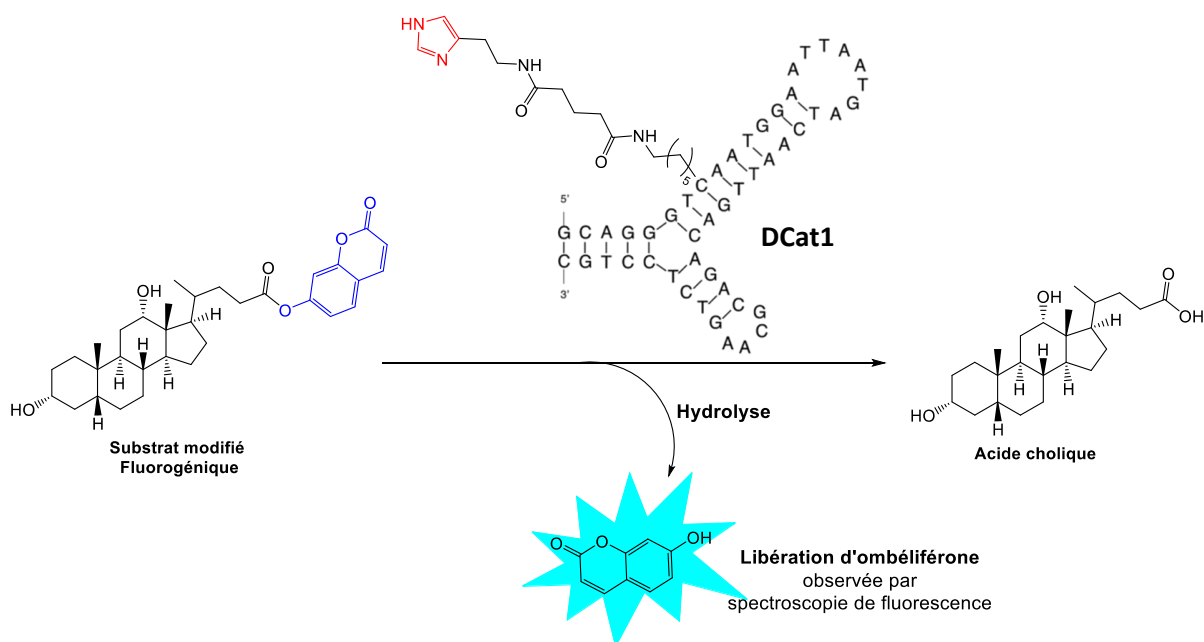


Figure 38. Principe de l'approche aptazyme : hydrolyse d'un substrat fluorogénique par l'aptazyme DCat1

L'étude met en évidence d'une part, la sélectivité de l'hydrolyse, grâce à la structuration de l'aptamère spécifiquement autour de son substrat, et d'autre part l'importance du choix du positionnement du noyau imidazole sur la structure (plus ou moins proche du site de reconnaissance du substrat). En effet, plusieurs positions pour l'introduction du motif imidazole ont été explorées, plus ou moins proches du site de liaison du substrat, au cœur de la jonction 3 voies. La meilleure structure (DCat1, Figure 38.) présente un $k_{cat} = 0.8 \text{ h}^{-1}$ (soit $2\,880 \text{ s}^{-1}$) valeur faible comparée aux résultats obtenus pour des enzymes naturelles mais très prometteuse comparée à celles obtenues généralement par des DNazymes.

Basée sur l'utilisation de phosphoramidites convertibles qui seront décrits au chapitre III, l'assemblage d'une jonction trois voies tri-fonctionnalisée par des motifs mimes de chaînes latérales des acides aminés Ser, His et Asp a été proposé par l'équipe en 2016 (Figure 39).²²⁵ L'intérêt de la jonction 3 voies (3WJ, pour three way junction) réside dans la création d'une pseudo-poche en son cœur non apparié, susceptible de mettre à proximité les unes des autres trois fonctions mimant ainsi une triade catalytique. La synthèse et la fonctionnalisation par CuAAC d'ODN, aux séquences choisies pour l'assemblage de cette 3WJ, a permis l'obtention d'un système portant en son cœur les trois motifs imidazole, carboxylate et hydroxyle.

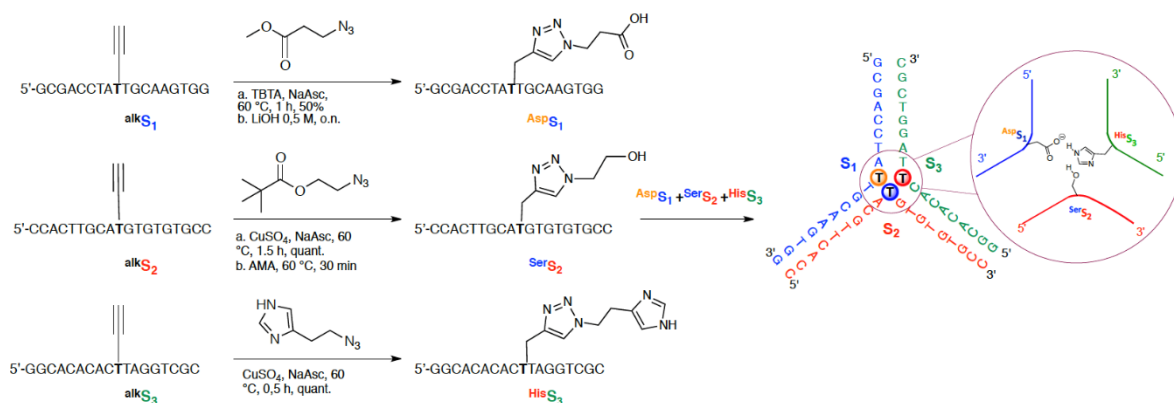


Figure 39. Assemblage d'une jonction trois voies décorées par des motifs mimes d'acides aminés²²⁵

Cette étude révélant la faible perturbation induite par les petits motifs introduits (pas de variation de T_m entre la structure *wild-type* de référence et l'assemblage tri-fonctionnalisé), a également permis de conclure que la distance présente au cœur de la jonction trois voies ne permet pas la collaboration des trois partenaires pour réaliser l'hydrolyse d'un substrat acétate de *p*-nitrophényle.

Ces deux derniers exemples présentent des approches dont l'objectif est la synthèse d'aptazymes par l'introduction de petits organocatalyseurs sur des structures secondaires. Les résultats présentés dans ce manuscrit décrivent la conception de nouveaux mimes nucléiques de protéases à sérine à partir d'autres squelettes nucléiques.

Des travaux, décrits au chapitre II, ont notamment permis l'obtention d'organocatalyseurs trifonctionnalisés qui permettront de palier le problème de la distance entre les fonctions d'intérêt, rencontré dans le cadre de l'assemblage de la jonction trois voies.

Bibliographie du chapitre I

1. Orgel, L. A Simpler Nucleic Acid. *Science* **290**, 1306–1307 (2000).
2. Neidle, S. The Building-Blocks of DNA and RNA. in *Principles of Nucleic Acid Structure* 20–37 (Elsevier, 2008). doi:10.1016/B978-012369507-9.50003-0.
3. Mathé, C. & Périgaud, C. Recent Approaches in the Synthesis of Conformationally Restricted Nucleoside Analogues. *Eur. J. Org. Chem.*, 1489–1505 (2008).
4. Shing, P. & Carter, M. DNA Structure: Alphabet Soup for the Cellular Soul. in *DNA Replication-Current Advances* (ed. Seligmann, H.) (InTech, 2011).
5. Pauling, L. & Corey, R. B. A Proposed Structure For The Nucleic Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **39**, 84–97 (1953).
6. Franklin, R. E. & Gosling, R. G. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature* **171**, 740–741 (1953).
7. Pray, L. A. Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick. (2013).
8. Hoogsteen, K. The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallogr.* **16**, 907–916 (1963).
9. Robinson, J., Raguseo, F., Nuccio, S. P., Liano, D. & Di Antonio, M. DNA G-quadruplex structures: more than simple roadblocks to transcription? *Nucleic Acids Res.* **49**, 8419–8431 (2021).
10. Spink, C. H. & Chaires, J. B. Effects of Hydration, Ion Release, and Excluded Volume on the Melting of Triplex and Duplex DNA[†]. *Biochemistry* **38**, 496–508 (1999).
11. Murray, J. B., Seyhan, A. A., Walter, N. G., Burke, J. M. & Scott, W. G. The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem. Biol.* **5**, 587–595 (1998).
12. Bikard, D., Loot, C., Baharoglu, Z. & Mazel, D. Folded DNA in Action: Hairpin Formation and Biological Functions in Prokaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 570–588 (2010).
13. Neidle, S. Nonstandard and Higher-Order DNA Structures: DNA–DNA Recognition. in *Principles of Nucleic Acid Structure* 81–131 (Elsevier, 2008).
14. Nowakowski, J., Shim, P. J., Stout, C. D. & Joyce, G. F. Alternative conformations of a nucleic acid four-way junction. *J. Mol. Biol.* **300**, 93–102 (2000).
15. Varshney, D., Spiegel, J., Zyner, K., Tannahill, D. & Balasubramanian, S. The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 459–474 (2020);
16. Piraux, G. *et al.* New Ruthenium-Based Probes for Selective G-Quadruplex Targeting. *Chem. - Eur. J.* **23**, 11872–11880 (2017).
17. Yum, J. H., Park, S. & Sugiyama, H. G-quadruplexes as versatile scaffolds for catalysis. *Org. Biomol. Chem.* **17**, 9547–9561 (2019).
18. Tintoré, M., Eritja, R. & Fábrega, C. DNA Nanoarchitectures: Steps towards Biological Applications. *ChemBioChem* **15**, 1374–1390 (2014).
19. Dey, S. *et al.* DNA origami. *Nat. Rev. Methods Primer* **1**, 13-51 (2021).
20. Nangreave, J., Han, D., Liu, Y. & Yan, H. DNA origami: a history and current perspective. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**, 608–615 (2010).
21. Goodman, R. P., Berry, R. M. & Turberfield, A. J. The single-step synthesis of a DNA tetrahedron Electronic supplementary information (ESI) available: stoichiometry control. *Chem. Commun.* 1372 (2004).
22. Goodman, R. P. Rapid Chiral Assembly of Rigid DNA Building Blocks for Molecular Nanofabrication. *Science* **310**, 1661–1665 (2005).
23. Goodman, R. P. *et al.* Reconfigurable, braced, three-dimensional DNA nanostructures. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 93–96 (2008).
24. He, Y. *et al.* Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra. *Nature* **452**, 198–201 (2008).
25. Zhang, C. *et al.* Exterior modification of a DNA tetrahedron. *Chem. Commun.* **46**, 6792 (2010).

26. Erben, C. M., Goodman, R. P. & Turberfield, A. J. Single-Molecule Protein Encapsulation in a Rigid DNA Cage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 7414–7417 (2006).
27. Lacroix, A., Vengut-Climent, E., de Rochambeau, D. & Sleiman, H. F. Uptake and Fate of Fluorescently Labeled DNA Nanostructures in Cellular Environments: A Cautionary Tale. *ACS Cent. Sci.* (2019).
28. Xia, Z. *et al.* Tumor-Penetrating Peptide-Modified DNA Tetrahedron for Targeting Drug Delivery. *Biochemistry* **55**, 1326–1331 (2016).
29. Zhan, Y. *et al.* DNA-Based Nanomedicine with Targeting and Enhancement of Therapeutic Efficacy of Breast Cancer Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 15354–15365 (2019).
30. Yang, J. *et al.* Self-Assembled Double-Bundle DNA Tetrahedron for Efficient Antisense Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 23693–23699 (2018).
31. Ramakrishnan, V. Unraveling the Structure of the Ribosome (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 4355–4380 (2010).
32. Cech, T. R. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from Tetrahymena. *Biosci. Rep.* **10**, 239–261 (1990).
33. Altman, S. Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Biosci. Rep.* **10**, 317–337 (1990).
34. Ariza-Mateos, A., Nuthanakanti, A. & Serganov, A. Riboswitch Mechanisms: New Tricks for an Old Dog. *Biochem. Mosc.* **86**, 962–975 (2021).
35. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).
36. Wilson, D. S. & Szostak, J. W. In Vitro Selection of Functional Nucleic Acids. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 611–647 (1999).
37. Joyce, G. F. In vitro evolution of nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 331–336 (1994).
38. Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. & Yarus, M. DIVERSITY OF OLIGONUCLEOTIDE FUNCTIONS. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 763–797 (1995).
39. Famulok, M., Hartig, J. S. & Mayer, G. *Chem. Rev.* **107**, 3715 (2007).
40. Shum, K.-T., Zhou, J. & Rossi, J. Aptamer-Based Therapeutics: New Approaches to Combat Human Viral Diseases. *Pharmaceuticals* **6**, 1507–1542 (2013).
41. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510 (1990).
42. Toulmé, J.-J. *et al.* Les aptamères : du concept à l’outil. *Médecine Nucl.* **31**, 478–484 (2007).
43. Sasanfar, M. & Szostak, J. W. An RNA motif that binds ATP. *Nature* **364**, 550–553 (1993).
44. Dunn, M. R., Jimenez, R. M. & Chaput, J. C. Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat. Rev. Chem.* **1**, 0076 (2017).
45. Keefe, A. D., Pai, S. & Ellington, A. Aptamers as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 537–550 (2010).
46. Lin, Y., Qiu, Q., Gill, S. C. & Jayasena, S. D. Modified RNA sequence pools for *in vitro* selection. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5229–5234 (1994).
47. Bilik, K. U. *et al.* In-vitro and in-vivo antagonistic action of an anti-amylin Spiegelmer. *NeuroReport* **18**, 1855–1859 (2007).
48. Kang, J., Lee, M. S., Copland, J. A., Luxon, B. A. & Gorenstein, D. G. Combinatorial selection of a single stranded DNA thioaptamer targeting TGF- β 1 protein. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 1835–1839 (2008).
49. Wan, W. B. & Seth, P. P. The Medicinal Chemistry of Therapeutic Oligonucleotides. *J. Med. Chem.* **59**, 9645–9667 (2016).
50. Ma, L. & Liu, J. Catalytic Nucleic Acids: Biochemistry, Chemical Biology, Biosensors, and Nanotechnology. *iScience* **23**, 100815 (2020).
51. Peracchi, A. DNA Catalysis: Potential, Limitations, Open Questions. **7**, 1316–1322 (2005).
52. McConnell, E. M. *et al.* Biosensing with DNAzymes. *Chem. Soc. Rev.* **50**, 8954–8994 (2021).
53. Hollenstein, M. DNA Catalysis: The Chemical Repertoire of DNAzymes. *Molecules* **20**, 20777–20804 (2015).
54. Breaker, R. R. & Joyce, G. F. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem. Biol.* **1**, 223–229 (1994).

55. Achenbach, J., Chiuman, W., Cruz, R. & Li, Y. DNAzymes: From Creation In Vitro to Application In Vivo. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **5**, 321–336 (2004).
56. Silverman, S. K. Catalytic DNA: Scope, Applications, and Biochemistry of Deoxyribozymes. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 595–609 (2016).
57. Luo, G. *et al.* Metal Ion-Terpyridine-Functionalized L-Tyrosinamide Aptamers: Nucleoapzymes for Oxygen Insertion into C-H Bonds and the Transformation of L-Tyrosinamide into Amidodopachrome. *Adv. Funct. Mater.* **29**, 1901484 (2019).
58. Meng, M. & Ducho, C. Oligonucleotide analogues with cationic backbone linkages. *Beilstein J. Org. Chem.* **14**, 1293–1308 (2018).
59. Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 279–289 (1990).
60. Yamamoto, T., Nakatani, M., Narukawa, K. & Obika, S. Antisense drug discovery and development. *Future Med. Chem.* **3**, 339–365 (2011).
61. Hoyne, P. R., Edwards, L. M., Viari, A. & Maher, L. J. Searching genomes for sequences with the potential to form intrastrand triple helices. *J. Mol. Biol.* **302**, 797–809 (2000).
62. Zaghoul, E. M. *et al.* Optimizing anti-gene oligonucleotide 'Zorro-LNA' for improved strand invasion into duplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **39**, 1142–1154 (2011).
63. Michelson, A. M. & Todd, A. R. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *J. Chem. Soc.* **0**, 2632–2638 (1955).
64. Reese, C. B. Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **3**, 3851 (2005).
65. Hall, R. H., Todd, A. & Webb, R. F. 644. Nucleotides. Part XLI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates. *J. Chem. Soc. Resumed* 3291 (1957).
66. Khorana, H. G., Razzell, W. E., Gilham, P. T., Tener, G. M. & Pol, E. H. syntheses of dideoxyribonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1002–1003 (1957).
67. Brown, D. M. A Brief History of Oligonucleotide Synthesis. in *Protocols for Oligonucleotides and Analogs* vol. 20 1–18 (Humana Press, 1993).
68. Agarwal, K. L., Yamazaki, A., Cashion, P. J. & Khorana, H. G. Chemical Synthesis of Polynucleotides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **11**, 451–459 (1972).
69. Smith, M., Rammler, D. H., Goldberg, I. H. & Khorana, H. G. Studies on Polynucleotides. XIV. Specific Synthesis of the C₃'-C₅' Interribonucleotide Linkage. Syntheses of Uridyl-(3'→5')-Uridine and Uridyl-(3'→5')-Adenosine. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 430–440 (1962).
70. Eckstein, F. & Rizk, I. Synthesis of Oligonucleotides by Use of Phosphoric Triesters. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **6**, 695–696 (1967).
71. Letsinger, R. L. & Mahadevan, V. Oligonucleotide Synthesis on a Polymer Support. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 3526–3527 (1965).
72. Letsinger, R. L. & Ogilvie, K. K. Nucleotide chemistry. XIII. Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 3350–3355 (1969).
73. Schaller, H., Weimann, G., Lerch, B. & Khorana, H. G. Studies on Polynucleotides. XXIV. The Stepwise Synthesis of Specific Deoxyribopolynucleotides (4). Protected Derivatives of Deoxyribonucleosides and New Syntheses of Deoxyribonucleoside-3' Phosphates. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 3821–3827 (1963).
74. Beaucage, S. L. & Caruthers, M. H. Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **22**, 1859–1862 (1981).
75. Caruthers, M. H. A brief review of DNA and RNA chemical synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 575–580 (2011).
76. Caruthers, M. H. Gene Synthesis Machines: DNA Chemistry and Its Uses. *Science* **230**, 281–285 (1985).
77. Froehler, B. C. & Matteucci, M. D. Nucleoside H-phosphonates: Valuable intermediates in the synthesis of deoxyoligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **27**, 469–472 (1986).

78. Roy, S. & Caruthers, M. Synthesis of DNA/RNA and Their Analogs via Phosphoramidite and H-Phosphonate Chemistries. *Molecules* **18**, 14268–14284 (2013).
79. Hughes, R. A. & Ellington, A. D. Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, 3812 (2017).
80. Matteucci, M. D. & Caruthers, M. H. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 3185–3191 (1981).
81. Somoza, Á. Protecting groups for RNA synthesis: an increasing need for selective preparative methods. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 2668 (2008).
82. Knouse, K. W. *et al.* Unlocking P(V): Reagents for chiral phosphorothioate synthesis. *Science* **361**, 1234–1238 (2018).
83. Baran, P. *et al.* A P(V)-Platform for Oligonucleotide Synthesis. *Science* **6560**, 1265–1270 (2021).
84. Knouse, K. W. *et al.* Nature Chose Phosphates and Chemists Should Too: How Emerging P(V) Methods Can Augment Existing Strategies. *ACS Cent. Sci.* **7**, 1473–1485 (2021).
85. Iwamoto, N. *et al.* Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* **35**, 845–851 (2017).
86. McKenzie, L. K., El-Khoury, R., Thorpe, J. D., Damha, M. J. & Hollenstein, M. Recent progress in non-native nucleic acid modifications. *Chem. Soc. Rev.* **50**, 5126–5164 (2021).
87. Matyašovský, J. & Hocek, M. 2-Substituted 2'-deoxyinosine 5'-triphosphates as substrates for polymerase synthesis of minor-groove-modified DNA and effects on restriction endonuclease cleavage. *Org. Biomol. Chem.* **18**, 255–262 (2020).
88. Stawiński, J. & Thelin, M. 3H-1,2-benzothiaselenol-3-one. A new selenizing reagent for nucleoside H-phosphonate and H-phosphonothioate diesters. *Tetrahedron Lett.* **33**, 7255–7258 (11).
89. Hollenstein, M. Nucleoside Triphosphates — Building Blocks for the Modification of Nucleic Acids. *Molecules* **17**, 13569–13591 (2012).
90. Roberts, T. C., Langer, R. & Wood, M. J. A. Advances in oligonucleotide drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **19**, 673–694 (2020).
91. Xu, B., Devi, G. & Shao, F. Regulation of telomeric i-motif stability by 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine modification. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 5646–5651 (2015).
92. Wagner, R. *et al.* Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines. *Science* **260**, 1510–1513 (1993).
93. Buhr, C. Oligodeoxynucleotides containing C-7 propyne analogs of 7-deaza-2'-deoxyguanosine and 7-deaza-2'-deoxyadenosine. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2974–2980 (1996).
94. Lamm, G. M. *et al.* Antisense probes containing 2-aminoadenosine allow efficient depletion of U5 snRNP from HeLa splicing extracts. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3193–3198 (1991).
95. Østergaard, M. E. *et al.* Allele-Selective Inhibition of Mutant Huntingtin with 2-Thio- and C5-Triazolylphenyl-Deoxythymidine-Modified Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* **25**, 266–274 (2015).
96. Cain, R. J. & Glick, G. D. The effect of cross-links on the conformational dynamics of duplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **25**, 836–842 (1997).
97. Manoharan, M., Ramasamy, K. S., Mohan, V. & Cook, P. D. Oligonucleotides bearing cationic groups: N2-(3-aminopropyl)deoxyguanosine. Synthesis, enhanced binding properties and conjugation chemistry. *Tetrahedron Lett.* **37**, 7675–7678 (1996).
98. Ramasamy, K. S. *et al.* Remarkable enhancement of binding affinity of Heterocycle-modified DNA to DNA and RNA. Synthesis, characterization and biophysical evaluation of N2-imidazolylpropylguanine and N2-imidazolylpropyl-2-aminoadenine modified oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* **35**, 215–218 (1994).
99. Lee, H.-S. *et al.* Abasic pivot substitution harnesses target specificity of RNA interference. *Nat. Commun.* **6**, 10154 (2015).
100. Accornero, F., Ross, R. L. & Alfonzo, J. D. From canonical to modified nucleotides: balancing translation and metabolism. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **55**, 525–540 (2020).

101. Shen, X. & Corey, D. R. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* **46**, 1584–1600 (2018).
102. Eckstein, F. Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides: What Is Their Origin and What Is Unique About Them? *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **10**, 117–121 (2000).
103. Faria, M. *et al.* Phosphoramidate oligonucleotides as potent antisense molecules in cells and in vivo. *Nat. Biotechnol.* **19**, 40–44 (2001).
104. Schultz, R. G. & Gryaznov, S. M. Oligo-2'-Fluoro-2'-Deoxynucleotide N3'→P5' Phosphoramidates: Synthesis and Properties. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2966–2973 (1996).
105. Miller, P. S. *et al.* Nonionic nucleic acid analogs. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates. *Biochemistry* **18**, 5134–5143 (1979).
106. Meade, B. R. *et al.* Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications. *Nat. Biotechnol.* **32**, 1256–1261 (2014).
107. Santorelli, A. & Gothelf, K. V. Conjugation of chemical handles and functional moieties to DNA during solid phase synthesis with sulfonyl azides. *Nucleic Acids Res.* **50**, 7235–7246 (2022).
108. Shibahara, S. *et al.* Site-directed cleavage of RNA. *Nucleic Acids Res.* **15**, 4403–4415 (1987).
109. Decuypere, E., Lepikhina, A., Halloy, F. & Hall, J. Increased Affinity of 2'-O-(2-Methoxyethyl)-Modified Oligonucleotides to RNA through Conjugation of Spermine at Cytidines. *Helv. Chim. Acta* **102**, (2019).
110. Yu, R. Z. *et al.* Immunogenicity Assessment of Inotersen, a 2'-O-(2-Methoxyethyl) Antisense Oligonucleotide in Animals and Humans: Effect on Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Safety. *Nucleic Acid Ther.* **30**, 265–275 (2020).
111. Holm, A., Hansen, S. N., Klitgaard, H. & Kauppinen, S. Clinical advances of RNA therapeutics for treatment of neurological and neuromuscular diseases. *RNA Biol.* **19**, 594–608 (2022).
112. Manoharan, M. *et al.* Unique Gene-Silencing and Structural Properties of 2'-Fluoro-Modified siRNAs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 2284–2288 (2011).
113. Jones, G. Investigation of some properties of oligodeoxynucleotides containing 4'-thio-2'-deoxynucleotides: duplex hybridization and nuclease sensitivity. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4117–4122 (1996).
114. Leydier, C. *et al.* 4'-Thio-RNA: Synthesis of Mixed Base 4'-ThioOligoribonucleotides, Nuclease Resistance, and Base Pairing Properties with Complementary Single and Double Strand. *Antisense Res. Dev.* **5**, 167–174 (1995).
115. Gauthier, F. *et al.* A 2',2'-disulfide-bridged dinucleotide conformationally locks RNA hairpins. *Org. Biomol. Chem.* **16**, 3181–3188 (2018).
116. Kel'in, A. V. *et al.* Structural Basis of Duplex Thermodynamic Stability and Enhanced Nuclease Resistance of 5'-C-Methyl Pyrimidine-Modified Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* **81**, 2261–2279 (2016).
117. Maverick, M. A., Gaillard, M., Vasseur, J.-J., Debart, F. & Smietana, M. Direct Access to Unique C-5'-acyl Modified Nucleosides through Liebeskind-Srogl Cross Coupling Reaction. *Eur. J. Org. Chem.* (2021).
118. Singh, S. K., Koshkin, A. A., Wengel, J. & Nielsen, P. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem. Commun.* 455–456 (1998).
119. Seth, P. P., Allerson, C. R., Østergaard, M. E. & Swayze, E. E. Structural requirements for hybridization at the 5'-position are different in α -L-LNA as compared to β -D-LNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 296–299 (2012).
120. Leumann, C. J. DNA Analogues: From Supramolecular Principles to Biological Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 841–854 (4).
121. Obika, S. *et al.* Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C_{3'}, -endo sugar pucker. *Tetrahedron Lett.* **38**, 8735–8738 (1997).
122. Lebreton, J., Escudier, J.-M., Arzel, L. & Len, C. Synthesis of Bicyclonucleosides Having a C–C Bridge. *Chem. Rev.* **110**, 3371–3418 (2010).
123. Renneberg, D. & Leumann, C. J. Watson–Crick Base-Pairing Properties of Tricyclo-DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5993–6002 (2002).

124. Dupouy, C. *et al.* Diastereoselective Synthesis of Conformationally Restricted Dinucleotides Featuring Canonical and Noncanonical α/β Torsion Angle Combinations (α,β -D-CNA). *Eur. J. Org. Chem.* 5515–5525 (2006).
125. Dupouy, C., Millard, P., Boissonnet, A. & Escudier, J.-M. α,β -D-CNA preorganization of unpaired loop moiety stabilizes DNA hairpin. *Chem. Commun.* **46**, 5142–5144 (2010).
126. Le Clézio, I., Vigroux, A. & Escudier, J.-M. Diastereoselective and Regioselective Synthesis of Conformationally Restricted Thio-dioxa- and Oxo-oxathiaphosphorinane Dinucleotides Featuring Noncanonical α/β Torsion Angle Combinations (α,β -CNAs). *Eur. J. Org. Chem.* 1935–1941 (2007).
127. Østergaard, M. E., Gerland, B., Escudier, J.-M., Swayze, E. E. & Seth, P. P. Differential Effects on Allele Selective Silencing of Mutant Huntingtin by Two Stereoisomers of α,β -Constrained Nucleic Acid. *ACS Chem. Biol.* **9**, 1975–1979 (2014).
128. Gerland, B. *et al.* Thio- and Seleno-Dioxaphosphorinane-Constrained Dinucleotides (D-CNA): Synthesis and Conformational Study: Thio- and Seleno-Dioxaphosphorinane-Constrained Dinucleotides (D-CNA): Synthesis and Conformational Study. *Eur. J. Org. Chem.*, 1450–1464 (2017).
129. Escudier, J.-M., Payrastra, C., Gerland, B. & Tarrat, N. Convertible and conformationally constrained nucleic acids (C_2 NAs). *Org. Biomol. Chem.* (2019).
130. Uhlmann, E., Peyman, A., Breipohl, G. & Will, D. W. PNA: Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2796–2823 (1998).
131. Nielsen, P. E. & Haaima, G. Peptide nucleic acid (PNA). A DNA mimic with a pseudopeptide backbone. *Chem. Soc. Rev.* **26**, 73–78 (1997).
132. Ferentz, A. E. & Verdine, G. L. The convertible nucleoside approach: structural engineering of nucleic acids by disulfide crosslinking. *Nucleic Acids Mol Biol* **8**, 14–40 (1994).
133. Allerson, C. R., Chen, S. L. & Verdine, G. L. A Chemical Method for Site-Specific Modification of RNA: The Convertible Nucleoside Approach. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 7423–7433 (1997).
134. Sallamand, C., Miscioscia, A., Lartia, R. & Defrancq, E. Phosphorylating Reagent-Free Synthesis of 5'-Phosphate Oligonucleotides by Controlled Oxidative Degradation of Their 5'-End. *Org. Lett.* **14**, 2030–2033 (2012).
135. Miller, G. P. & Kool, E. T. A Simple Method for Electrophilic Functionalization of DNA. *Org. Lett.* **4**, 3599–3601 (2002).
136. Chardet, C., Payrastra, C., Gerland, B. & Escudier, J.-M. Convertible and Constrained Nucleotides: The 2'-Deoxyribose 5'-C-Functionalization Approach, a French Touch. *Molecules* **26**, 5925–5955 (2021).
137. Wang, C. C. Y., Seo, T. S., Li, Z., Ruparel, H. & Ju, J. Site-Specific Fluorescent Labeling of DNA Using Staudinger Ligation. *Bioconjug. Chem.* **14**, 697–701 (2003).
138. Girona-Martínez, A., Neri, D., Samain, F. & Donckele, E. J. DNA-Compatible Diazo-Transfer Reaction in Aqueous Media Suitable for DNA-Encoded Chemical Library Synthesis. *Org. Lett.* **21**, 9555–9558 (2019).
139. Usanov, D. L., Chan, A. I., Maianti, J. P. & Liu, D. R. Second-generation DNA-templated macrocycle libraries for the discovery of bioactive small molecules. *Nat. Chem.* **10**, 704–714 (2018).
140. Oltra, N. S. & Roelfes, G. Modular assembly of novel DNA-based catalysts. *Chem. Commun.* 6039 (2008).
141. Bonnat, L. *et al.* Template-Mediated Stabilization of a DNA G-Quadruplex formed in the HIV-1 Promoter and Comparative Binding Studies. *Chem. – Eur. J.* **23**, 5602–5613 (2017).
142. Noel, M., Clement-Blanc, C., Meyer, A., Vasseur, J.-J. & Morvan, F. Solid Supports for the Synthesis of 3'-Aminoxy Deoxy- or Ribo-oligonucleotides and Their 3'-Conjugation by Oxime Ligation. *J Org Chem* **84**, 14854–14860 (2019).
143. Meyer, A., Vasseur, J.-J., Dumy, P. & Morvan, F. Phthalimide-Oxy Derivatives for 3'- or 5'-Conjugation of Oligonucleotides by Oxime Ligation and Circularization of DNA by 'Bis- or Tris-Click' Oxime Ligation. *Eur J Org Chem* **46**, 6931–6941, (2017).
144. Gauthier, F., Bertrand, J.-R., Vasseur, J.-J., Dupouy, C. & Debart, F. Conjugation of Doxorubicin to siRNA Through Disulfide-based Self-immolative Linkers. *Molecules* **25**, 2714 (2020).

145. Stasińska, A. R., Putaj, P. & Chmielewski, M. K. Disulfide bridge as a linker in nucleic acids' bioconjugation. Part II: A summary of practical applications. *Bioorganic Chem.* **95**, 103518 (2020).
146. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2004–2021 (2001).
147. Panattoni, A., Pohl, R. & Hocek, M. Flexible Alkyne-Linked Thymidine Phosphoramidites and Triphosphates for Chemical or Polymerase Synthesis and Fast Postsynthetic DNA Functionalization through Copper-Catalyzed Alkyne-Azide 1,3-Dipolar Cycloaddition. *Org Lett* **20**, 3962 (2018).
148. Gramlich, P. M. E., Wirges, C. T., Manetto, A. & Carell, T. Postsynthetic DNA Modification through the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 8350–8358 (2008).
149. Graham, D., A. Parkinson, J. & Brown, T. DNA duplexes stabilized by modified monomer residues: synthesis and stability. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 1131–1138 (1998).
150. Gramlich, P. M. E., Warncke, S., Gierlich, J. & Carell, T. Click–Click–Click: Single to Triple Modification of DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 3442–3444 (2008).
151. Kumar, R. *et al.* Template-Directed Oligonucleotide Strand Ligation, Covalent Intramolecular DNA Circularization and Catenation Using Click Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6859–6864 (2007).
152. Kočalka, P., El-Sagheer, A. H. & Brown, T. Rapid and Efficient DNA Strand Cross-Linking by Click Chemistry. *ChemBioChem* **9**, 1280–1285 (2008).
153. Fantoni, N. Z., El-Sagheer, A. H. & Brown, T. A Hitchhiker's Guide to Click-Chemistry with Nucleic Acids. *Chem. Rev.* **121**, 7122–7154 (2021).
154. El-Sagheer, A. H. & Brown, T. CHAPTER 5. Click Chemistry – a Versatile Method for Nucleic Acid Labelling, Cyclisation and Ligation. in *RSC Biomolecular Sciences* (eds. Fox, K. R. & Brown, T.) 119–139 (Royal Society of Chemistry, 2012).
155. El-Sagheer, A. H. & Brown, T. Click chemistry with DNA. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1388 (2010).
156. Gierlich, J., Burley, G. A., Gramlich, P. M. E., Hammond, D. M. & Carell, T. Click Chemistry as a Reliable Method for the High-Density Postsynthetic Functionalization of Alkyne-Modified DNA. *Org. Lett.* **8**, 3639–3642 (2012).
157. Rozkiewicz, D. I. *et al.* Transfer Printing of DNA by “Click” Chemistry. *ChemBioChem* **8**, 1997–2002 (2007).
158. Heather, J. M. & Chain, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **107**, 1–8 (2016).
159. Agard, N. J. & Bertozzi, C. R. Chemical Approaches To Perturb, Profile, and Perceive Glycans. *Acc. Chem. Res.* **42**, 788–797 (2009).
160. Marks, I. S. *et al.* Strain-Promoted “Click” Chemistry for Terminal Labeling of DNA. *Bioconjug. Chem.* **22**, 1259–1263 (2011).
161. Jawalekar, A. M. *et al.* Conjugation of Nucleosides and Oligonucleotides by [3+2] Cycloaddition. *J. Org. Chem.* **73**, 287–290 (2008).
162. Jawalekar, A. *et al.* Oligonucleotide Tagging for Copper-Free Click Conjugation. *Molecules* **18**, 7346–7363 (2013).
163. Shelbourne, M., Chen, X., Brown, T. & El-Sagheer, A. H. Fast copper-free click DNA ligation by the ring-strain promoted alkyne-azide cycloaddition reaction. *Chem. Commun.* **47**, 6257 (2011).
164. Singh, I., Freeman, C., Madder, A., Vyle, J. S. & Heaney, F. Fast RNA conjugations on solid phase by strain-promoted cycloadditions. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 6633 (2012).
165. Lin, P. *et al.* Evaluation of the role of the DNA surface for enhancing the activity of scaffolded enzymes. *Chem. Commun.* **57**, 3925–3928 (2021).
166. Arndt, S. & Wagenknecht, H.-A. “Photoclick” Postsynthetic Modification of DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 14580–14582 (2014).
167. Liu, F. *et al.* Biocompatible SuFEx Click Chemistry: Thionyl Tetrafluoride (SO_F₄)-Derived Connective Hubs for Bioconjugation to DNA and Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 8029–8033 (2019).

168. Stillman, B. Reconsidering DNA Polymerases at the Replication Fork in Eukaryotes. *Mol. Cell* **59**, 139–141 (2015).
169. Flamme, M., McKenzie, L. K., Sarac, I. & Hollenstein, M. Chemical methods for the modification of RNA. *Methods* **161**, 64–82 (2019).
170. Hollenstein, M. Generation of long, fully modified, and serum-resistant oligonucleotides by rolling circle amplification. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 9820–9824 (2015).
171. Ali, M. M. *et al.* Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 3324 (2014).
172. Gierlich, J. *et al.* Synthesis of Highly Modified DNA by a Combination of PCR with Alkyne-Bearing Triphosphates and Click Chemistry. *Chem. - Eur. J.* **13**, 9486–9494 (2007).
173. Ludwig, J. & Eckstein, F. Rapid and efficient synthesis of nucleoside 5'-O-(1-thiotriphosphates), 5'-triphosphates and 2',3'-cyclophosphorothioates using 2-chloro-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-one. *J. Org. Chem.* **54**, 631–635 (1989).
174. Appy, L., Chardet, C., Peyrottes, S. & Roy, B. Synthetic Strategies for Dinucleotides Synthesis. *Molecules* **24**, 4334 (2019).
175. Hooper, N. M. Proteases: a primer. *Essays Biochem.* **38**, 1–8 (2002).
176. Perona, J. J. & Craik, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* **4**, 337–360 (1995).
177. Hedstrom, L. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501–4524 (2002).
178. Di Cera, E. Serine proteases. *IUBMB Life* **61**, 510–515 (2009).
179. Bode, W. & Huber, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. in *EJB Reviews* 43–61 (Springer Berlin Heidelberg, 1993).
180. Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157–162 (1967).
181. Nothling, M. D. *et al.* Synthetic Catalysts Inspired by Hydrolytic Enzymes. *ACS Catal.* **9**, 168–187 (2019).
182. Suh, J. Synthetic Artificial Peptidases and Nucleases Using Macromolecular Catalytic Systems. *Acc. Chem. Res.* **36**, 562–570 (2003).
183. Suh, J. Artificial Metalloproteases and Metallonucleases. in *Comprehensive Inorganic Chemistry II* 779–803 (Elsevier, 2013).
184. Grant, K. & Kassai, M. Major Advances in the Hydrolysis of Peptides and Proteins by Metal Ions and Complexes. *Curr. Org. Chem.* **10**, 1035–1049 (2006).
185. Kumar, C. V., Buranaprapuk, A., Cho, A. & Chaudhari, A. Artificial metallopeptidases: regioselective cleavage of lysozyme. *Chem. Commun.* 597–598 (2000).
186. Jang, S. W. & Suh, J. Proteolytic Activity of Cu(II) Complex of 1-Oxa-4,7,10-triazacyclododecane. *Org. Lett.* **10**, 481–484 (2008).
187. Yoo, S. H., Lee, B. J., Kim, H. & Suh, J. Artificial Metalloprotease with Active Site Comprising Aldehyde Group and Cu(II)Cyclen Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 9593–9602 (2005).
188. Ly, H. G. T. *et al.* Chemical Mimics of Aspartate-Directed Proteases: Predictive and Strictly Specific Hydrolysis of a Globular Protein at Asp-X Sequence Promoted by Polyoxometalate Complexes Rationalized by a Combined Experimental and Theoretical Approach. *Chem. – Eur. J.* **25**, 14370–14381 (2019).
189. Cram, D. J., Lam, P. Y.-S. & Ho, S. P. Synthesis of a Partial Transacylase Mimic. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **471**, 22–40 (1986).
190. Ema, T., Tanida, D., Matsukawa, T. & Sakai, T. Biomimetic trifunctional organocatalyst showing a great acceleration for the transesterification between vinyl ester and alcohol. *Chem. Commun.* 957 (2008).
191. Garrido-González, J. J. *et al.* An Enzyme Model Which Mimics Chymotrypsin and N-Terminal Hydrolases. *ACS Catal.* **10**, 11162–11170 (2020).
192. Garrido-González, J. J. *et al.* Transesterification of Non-Activated Esters Promoted by Small Molecules Mimicking the Active Site of Hydrolases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **61**, 6072 (2022).

193. Li, Y. *et al.* Dipeptide seryl-histidine and related oligopeptides cleave DNA, protein, and a carboxyl ester. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 2675–2680 (2000).
194. MacDonald, M. J., Lavis, L. D., Hilvert, D. & Gellman, S. H. Evaluation of the Ser-His Dipeptide, a Putative Catalyst of Amide and Ester Hydrolysis. *Org. Lett.* **18**, 3518–3521 (2016).
195. Atassi, M. Z. & Manshour, T. Design of peptide enzymes (pepzymes): surface-simulation synthetic peptides that mimic the chymotrypsin and trypsin active sites exhibit the activity and specificity of the respective enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8282–8286 (1993).
196. Richter, F. *et al.* Computational Design of Catalytic Dyads and Oxyanion Holes for Ester Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 16197–16206 (2012).
197. Kheirabadi, M. *et al.* Spiroligozymes for Transesterifications: Design and Relationship of Structure to Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18345–18353 (2012).
198. Astruc, D., Liang, L., Rapakousiou, A. & Ruiz, J. Click Dendrimers and Triazole-Related Aspects: Catalysts, Mechanism, Synthesis, and Functions. A Bridge between Dendritic Architectures and Nanomaterials. *Acc. Chem. Res.* **45**, 630–640 (2012).
199. Douat-Casassus, C., Darbre, T. & Reymond, J.-L. Selective Catalysis with Peptide Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 7817–7826 (2004).
200. Delort, E., Darbre, T. & Reymond, J.-L. A Strong Positive Dendritic Effect in a Peptide Dendrimer-Catalyzed Ester Hydrolysis Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 15642–15643 (2004).
201. Javor, S., Delort, E., Darbre, T. & Reymond, J.-L. A Peptide Dendrimer Enzyme Model with a Single Catalytic Site at the Core. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 13238–13246 (2007).
202. Burton, A. J., Thomson, A. R., Dawson, W. M., Brady, R. L. & Woolfson, D. N. Installing hydrolytic activity into a completely de novo protein framework. *Nat. Chem.* **8**, 837–844 (2016).
203. Makhlynets, O. V. & Korendovych, I. V. Functional Frankensteins. *Nat. Chem.* **8**, 823–824 (2016).
204. Wong, Y.-M., Masunaga, H., Chuah, J.-A., Sudesh, K. & Numata, K. Enzyme-Mimic Peptide Assembly To Achieve Amidolytic Activity. *Biomacromolecules* **17**, 3375–3385 (2016).
205. Kunitake, T., Okahata, Y. & Sakamoto, T. Multifunctional hydrolytic catalyses. 8. Remarkable acceleration of the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate by micellar bifunctional catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7799–7806 (1976).
206. Ihara, Y., Nango, M., Kimura, Y. & Kuroki, N. Multifunctional micellar catalysis as a model of enzyme action. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 1252–1255 (1983).
207. Moss, R. A., Nahas, R. C. & Ramaswami, S. Sequential bifunctional micellar catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 627–629 (1977).
208. Brown, J. M., Elliott, R. L., Griggs, C. G., Helmchen, G. & Nill, G. Selective Micellar Catalysis with Histidinyl Surfactants of Defined Absolute Configuration. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **20**, 890–892 (1981).
209. Anoardi, L., Fornasier, R. & Tonellato, U. Functional micellar catalysis. Part 4. Catalysis of activated ester hydrolysis by surfactant systems as chymotrypsin models. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 260 (1981).
210. Bélières, M., Chouini-Lalanne, N. & Déjugnat, C. Synthesis, self-assembly, and catalytic activity of histidine-based structured lipopeptides for hydrolysis reactions in water. *RSC Adv.* **5**, 35830–35842 (2015).
211. Zaramella, D., Scrimin, P. & Prins, L. J. Self-Assembly of a Catalytic Multivalent Peptide–Nanoparticle Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 8396–8399 (2012).
212. Nothling, M. D. *et al.* Simple Design of an Enzyme-Inspired Supported Catalyst Based on a Catalytic Triad. *Chem* **2**, 732–745 (2017).
213. Cech, T. R. The Ribosome Is a Ribozyme. *Science* **289**, 878–879 (2000).
214. Ameta, S. & Jaschke, A. An RNA catalyst that reacts with a mechanistic inhibitor of serine proteases. *Chem. Sci.* **4**, 957–964 (2013).
215. Hollenstein, M. Deoxynucleoside triphosphates bearing histamine, carboxylic acid, and hydroxyl residues – synthesis and biochemical characterization. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 5162 (2013).

216. Brandsen, B. M., Hesser, A. R., Castner, M. A., Chandra, M. & Silverman, S. K. DNA-Catalyzed Hydrolysis of Esters and Aromatic Amides. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16014–16017 (2013).
217. Zhou, C. *et al.* DNA-Catalyzed Amide Hydrolysis. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 2106–2109 (2016).
218. Silverman, S. K. Pursuing DNA Catalysts for Protein Modification. *Acc. Chem. Res.* **48**, 1369–1379 (2015).
219. Chandra, M., Sachdeva, A. & Silverman, S. K. DNA-catalyzed sequence-specific hydrolysis of DNA. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 718–720 (2009).
220. Silverman, S. K. DNA as a Versatile Chemical Component for Catalysis, Encoding, and Stereocontrol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 7180–7201 (2010).
221. Catry, M. & Madder, A. Synthesis of Functionalised Nucleosides for Incorporation into Nucleic Acid-Based Serine Protease Mimics. *Molecules* **12**, 114–129 (2007).
222. Catry, M. A., Gheerardijn, V. & Madder, A. Surprising duplex stabilisation upon mismatch introduction within triply modified duplexes. *Bioorganic Chem.* **38**, 92–97 (2010).
223. Xu, L., Ji, C., Bai, Y., He, J. & Liu, K. DNA duplex-supported artificial esterase mimicking by cooperative grafting functional groups. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **434**, 516–520 (2013).
224. Flanagan, M. *et al.* A DNA-conjugated small molecule catalyst enzyme mimic for site-selective ester hydrolysis. *Chem. Sci.* **9**, 2105–2112 (2018).
225. Addamiano, C., Gerland, B., Payrastra, C. & Escudier, J.-M. DNA Three Way Junction Core Decorated with Amino Acids-Like Residues-Synthesis and Characterization. *Molecules* **21**, 1082 (2016).

Chapitre II : Synthèse des Tripodes

Les travaux menés au sein de l'équipe ont démontré que l'assemblage *via* une jonction 3 voies de trois oligonucléotides fonctionnalisés respectivement par une fonction alcool, fonction carboxylate ou un noyau imidazole ne permet pas d'interactions productives entre les trois groupements, puisqu'il n'a pas la capacité d'hydrolyser l'acétate de *p*-nitrophényle.

Afin de remédier à cet éloignement spatial trop important, la stratégie envisagée consiste à regrouper les trois fonctions organiques au sein d'une même molécule (**Tripode**). Le but est alors de conjuguer cet organocatalyseur par CuAAC, en une seule étape, *via* son bras azoture à un oligonucléotide convertible propargyle. Une fois organisé au sein d'une structure secondaire de type bulge, ses propriétés d'hydrolyse seront étudiées (Schéma 10). Cette approche convertible est également adaptée à une multi-introduction de ce tripode sur un même brin permettant d'augmenter la concentration effective en catalyseur. Une coopération interne des trois fonctions en plus d'interactions synergiques inter-tripodes peuvent être envisagées en vue d'obtenir un mime de protéase fonctionnel.

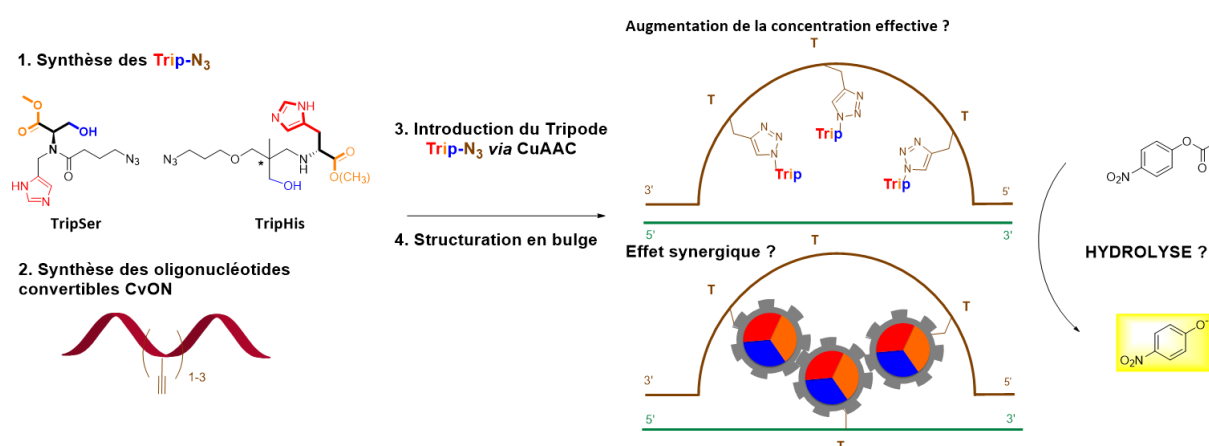


Schéma 10. Principe de l'utilisation d'organocatalyseurs trifonctionnalisés (tripodes) pour la fonctionnalisation d'ODN

Ce chapitre porte sur la conception et la synthèse de deux familles d'organocatalyseurs dont le squelette est basé sur l'acide aminé sérine (**TripSer**) ou histidine (**TripHis**). Les résultats préliminaires portant sur la capacité du **TripHis** à catalyser une réaction de trans-estérification seront également présentés.

1. Synthèse des Tripodes

1.1. Tripode à squelette sérine (TripSer)

1.1.1. Analyse rétrosynthétique

La plateforme sérine permet l'introduction simultanée de deux des trois fonctions d'intérêt (Figure 40). Sa fonction amine primaire permet de poursuivre la fonctionnalisation de la structure en introduisant un bras porteur de la fonction azoture, puis le motif imidazole pour compléter la triade.

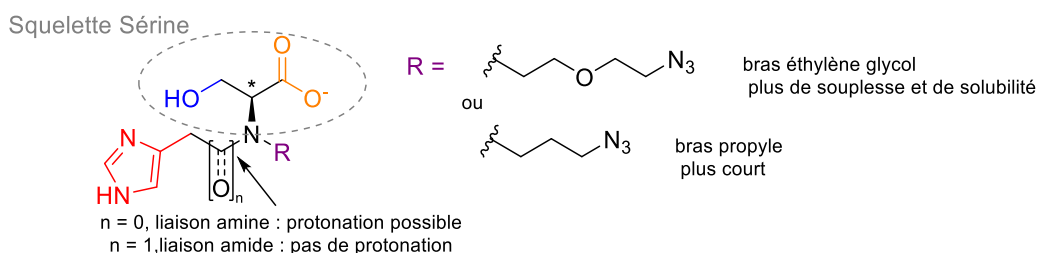


Figure 40. Structure générique envisagée pour le Tripode à squelette sérine

En fonction de la voie de synthèse utilisée, une fonction amine ou amide tertiaire peut être formée. La présence d'une fonction amine, constitue un site de protonation supplémentaire, qui peut se révéler bénéfique au sein de la structure poly-anionique de l'ODN en stabilisant l'intermédiaire tétraédrique chargé négativement. Au contraire, la présence d'une fonction amide, s'affranchit de ce site de protonation et rigidifie la structure.

Enfin, deux bras espaceurs azotures ont été envisagés, un bras éthylène glycol (**EG-N₃**) afin de gagner en flexibilité et en solubilité ou au contraire une chaîne à trois atomes de carbone (**C₃-N₃**) plus courte afin de minimiser la gêne stérique en cas de multi-introduction.

Deux stratégies de synthèse sont alors envisageables. La voie A repose sur l'amination réductrice d'un dérivé protégé de la sérine pour introduire le motif imidazole puis le bras azoture avant les étapes de déprotection finales (Schéma 11).

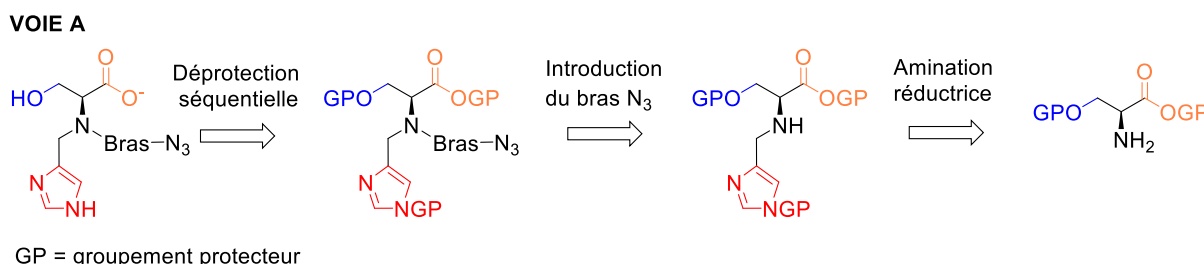


Schéma 11. Analyse rétrosynthétique du tripode "TripSer" - Voie A

La voie B, quant à elle, débute par une substitution nucléophile permettant d'introduire le bras azoture suivi d'une étape d'amination réductrice ou d'un couplage peptidique pour incorporer le motif imidazole (Schéma 12).

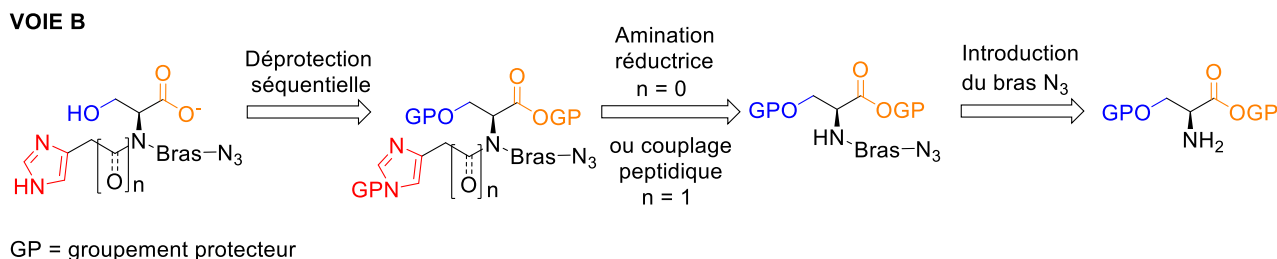


Schéma 12. Analyse rétrosynthétique du tripode "TripSer" - Voie B

Après avoir décrit la synthèse des deux synthons azoture **EG-N₃** et **C₃-N₃**, nous présenterons les résultats obtenus pour l'obtention d'organocatalyseurs de type **TripSer**.

1.1.2. Synthèse des bras azoture

Le premier synthon azoture **EG-N₃ 1** est obtenu en une étape avec un rendement de 23%, suite à la mono-substitution du di-tosylate du diéthylène glycol par l'azoture de sodium (NaN₃, Schéma 13).

Pour obtenir le second synthon **C₃-N₃ 4**, trois étapes sont nécessaires. Le propane-1,3-diol est d'abord mono-tosylé à partir de chlorure de tosylate, en présence de triéthylamine (Et₃N) pour donner le composé **2** avec un rendement de 93%. Le groupement tosylate est ensuite substitué par NaN₃, pour former le composé **3** avec un rendement de 58%. La fonction hydroxyle restante est à son tour tosylée, permettant l'obtention du **C₃-N₃ 4** avec un rendement de 76%.

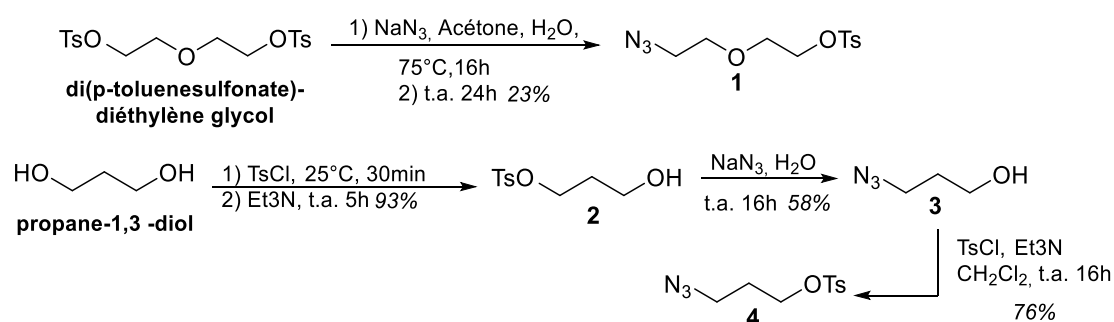


Schéma 13. Synthèse des azotures d'alkyle tosylés **1** et **4**

1.1.3. Voie A

La première étape de la voie A consiste en une réaction d'amination réductrice. Différentes combinaisons de groupements protecteurs ont été employées, présents à la fois sur le synthon sérine et sur le 4-imidazole-carboxy-aldéhyde (Schéma 14

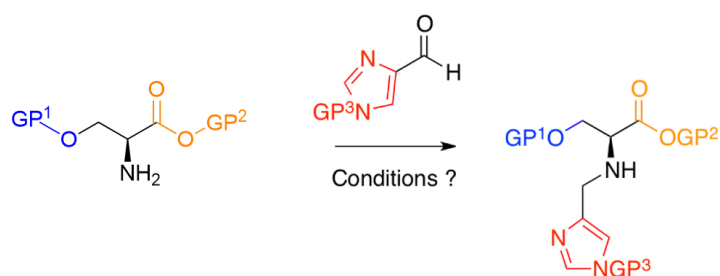


Schéma 14).

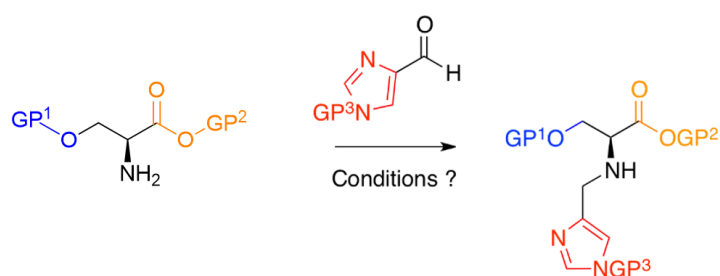


Schéma 14. Première étape de la voie A

Les premiers essais (Tableau 4) ont été menés entre deux synthons protégés, dans le cas de la sérine par deux groupements baso-labiles (un groupement acétate sur l'alcool primaire et un ester de

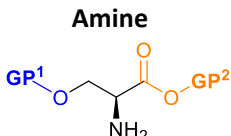
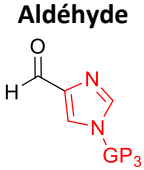
méthyle masquant la fonction carboxylate), et dans le cas du synthon aldéhyde par un pivaloyloxyméthyle (PivOM) sur l'atome d'azote N1. Ces trois groupements, présents sur le produit obtenu, seraient donc déprotégés lors d'une même étape de déprotection finale en conditions basiques.

Les résultats se sont révélés peu concluants lorsque la réaction est réalisée en conditions acides en utilisant le cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN) comme réducteur (entrées 1-2), et ce même lorsque le groupement PivOM est remplacé par le groupement acido-labile Boc (entrée 6).

Il a également été envisagé de libérer la forme amine de sa forme chlorhydrate en conditions basiques avant de réaliser l'étape de réduction de l'imine en présence de NaBH_3CN (entrée 4) ou de borohydrure de sodium (NaBH_4), (entrée 5) sans plus de succès.

D'autres conditions décrites dans la littérature ont ensuite été évaluées sur la sérine libre (entrées 8 et 9) sans conduire au produit attendu. En protégeant les deux synthons par deux groupements acido-labiles (la fonction acide de la sérine masquée par un ester de *tert*-butyle et le motif imidazole par un carbamate de *tert*-butyle), le rendement atteint péniblement les 8% (entrée 7) en utilisant le sodium de borohydrure (NaBH_4) comme réducteur.¹

Tableau 4. Récapitulatif des conditions d'amination réductrice

Entrée	Amine 	Aldéhyde 	Conditions	Rendement
1	GP ¹ = Ac; GP ² = Me	GP ³ = PivOM	1) Acetic Acid, THF, 2h, t.a. 2) NaBH_3CN , 16h, t.a.	12%
2			1) Acetic Acid, THF, 2h, 45°C 2) NaBH_3CN , 16h, t.a.	3%
3			1) MeOH, 1h, t.a. 2) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 16h, t.a.	0%
4			1) DCE, Et ₃ N, 1h, t.a. 2) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 16h, t.a.	0%
5			1) Na_2CO_3 , EtOH, 3h, t.a. 2) NaBH_4 , 16h, t.a.	0%
6			GP ³ = Boc	1) Acetic Acid, THF, 2h, 45°C 2) NaBH_3CN , 16h, t.a.
7	1) Acetic Acid, THF, 2h, t.a. 2) NaBH_3CN , 4h, t.a.	8%		
8	1) Na_2CO_3 , EtOH, 3h, 40°C 2) NaBH_4 , 2h, t.a.	0%		
9	1) Na_2CO_3 , EtOH, 3h, t.a. 2) NaBH_4 , 4h, t.a.	0%		
10	GP ¹ = TBDPS; GP ² = OMe	GP ³ = Trt	1) DCM, 1h, t.a. 2) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 16h, 45°C	32%
11			1) DCE, Et ₃ N 2) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 36h, 35°C	38%
12			1) DCE, Et ₃ N 2) $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 24h, 40°C	20%

Les meilleurs conditions d'amination réductrice sont obtenues à partir du chlorhydrate de l'ester de méthyle de la L-sérine (dont la fonction hydroxyle est protégée par un groupement *tert*-butyldiméthylsilyle (TBDMS)) et du *N*-trityl-4-imidazol-carboxaldéhyde (entrées 10 à 12) en changeant également la nature du réducteur employé.²

Chaque groupement protecteur étant orthogonal, une déprotection séquentielle permettrait d'obtenir des dérivés dont plusieurs fonctions resteraient masquées pour pouvoir évaluer ultérieurement leur contribution relative. Par exemple, le groupement TBDMS peut être déprotégé de manière orthogonale à l'ester de méthyle ou au groupement trityle en présence d'ions fluorure. En revanche, des conditions acides laissent uniquement la fonction ester de méthyle intacte. Cette séquence réactionnelle est présentée Schéma 15.

La fonction hydroxyle du chlorhydrate de l'ester de méthyle de la sérine réagit en présence de TBDMSCl pour conduire au composé **5** avec un rendement quantitatif. Après la formation de l'imine correspondante, l'avancement de sa réduction par le tri-acétoxyborohydrure de sodium (NaBH(OAc)₃) est suivie facilement par CCM avec révélation UV pour conduire au composé **6** avec un rendement de 38%. Cependant, l'étape suivante de substitution nucléophile n'a jamais permis l'obtention du composé **7** et ce malgré de nombreuses tentatives.

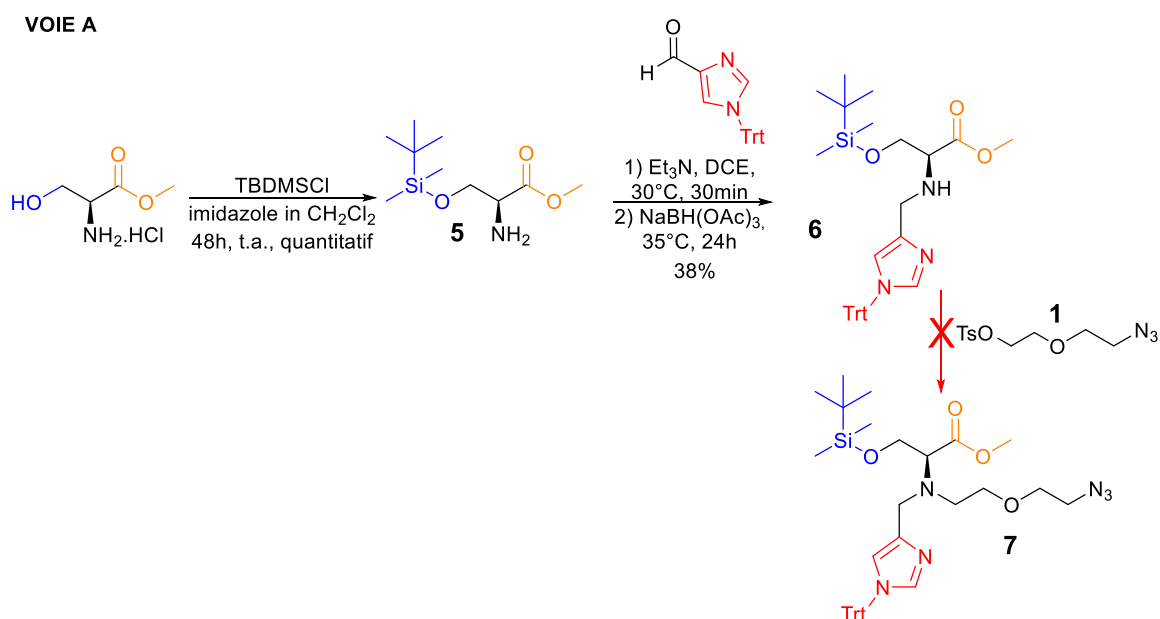
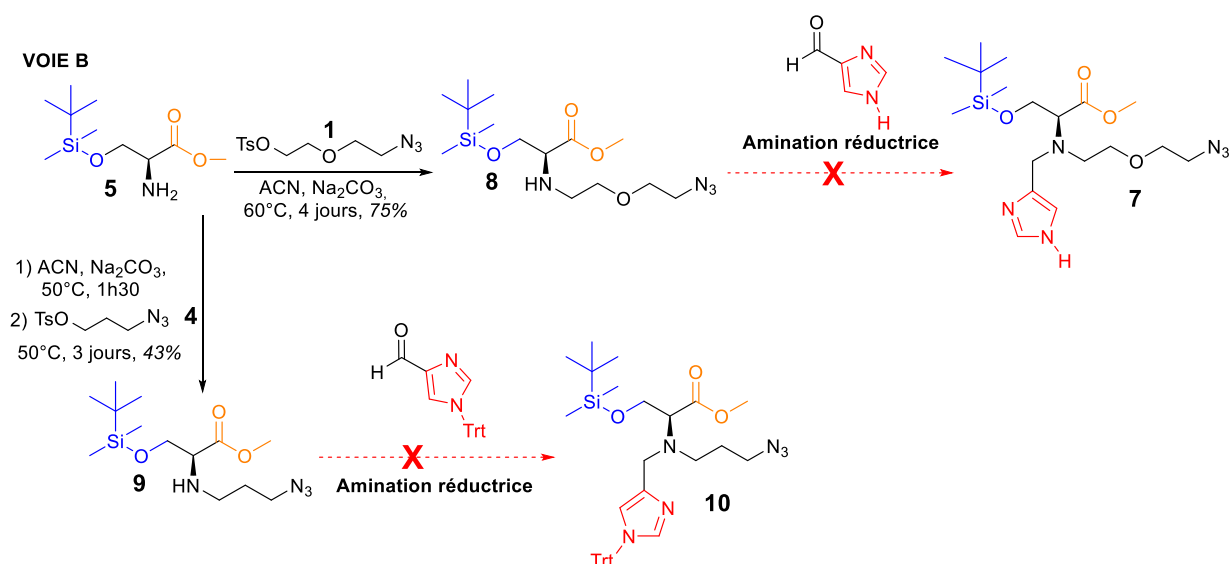


Schéma 15. Voie A pour tenter d'obtenir le *TripSer 7*

La voie A a ainsi été abandonnée et nous avons proposé une alternative, la voie B, dont l'ordre d'introduction des groupements d'intérêt est différent.

1.1.4. Voie B

Grâce à l'expérience acquise lors de la synthèse par la voie A, des conditions de substitution nucléophile ont rapidement été mises en œuvre pour passer du composé **5** au composé **8** (75% de rendement) ou au composé **9** (43%) en introduisant respectivement le bras azoture **1** ou **2** (schéma 15). La présence de la fonction azoture est confirmée par l'analyse par spectroscopie infrarouge avec la présence d'une bande significative à 2096 et à 2097 cm⁻¹ respectivement pour les dérivés **8** et **9**.

Schéma 16. Voie B pour tenter d'obtenir les **TripSer 7** et **10**

Différentes conditions d'amination réductrice impliquant des aldéhydes porteurs d'un motif imidazole (protégé par un groupement trityle ou non) ont ensuite été évaluées sur les composés **8** et **9** dans le but d'obtenir les composés **7** ou **10**.

Les conditions utilisées sont similaires à celles ayant présentées les meilleurs résultats lors de la voie A, en milieu basique, utilisant le NaBH(OAc)₃CN comme réducteur. Si la formation de l'intermédiaire imine semblait être observée par CCM lors du suivi de réaction, les différents protocoles testés pour introduire par amination réductrice le groupement imidazole sur une amine secondaire n'ont pas permis d'obtenir les tripodes protégés souhaités, quel que soit l'aldéhyde utilisé.

La synthèse d'un **TripSer** portant une fonction amine tertiaire, *via* une réaction d'amination réductrice s'avérant donc plus problématique qu'anticipée, la conception d'un **Tripode** contenant une fonction amide tertiaire a alors été envisagée.

Une étape de couplage peptidique entre le composé **8** et l'acide 2-(1*H*-imidazol-4-yl)acétique (**I₄AA**) à l'aide d'hexafluorophosphate de *N,N*-diméthylméthaninium (HATU) comme réactif de couplage conduit au composé **11**, avec un rendement de 37% (Schéma 17). L'analyse par spectrométrie de masse est en accord avec la structure attendue avec la détection de l'ion [M+H⁺] à *m/z* = 455,2. Ce composé présente en spectroscopie de RMN ¹H des signaux caractéristiques permettant de confirmer la bonne incorporation du motif imidazole, notamment deux singulets caractéristiques de ce motif imidazole à 7,80 et 7,01 ppm correspondant à H₁₅ et H₁₃ ainsi qu'un système AB correspondant aux protons H₁₁.

Une dernière étape de déprotection en conditions acides a permis de libérer la fonction alcool et de conduire au chlorhydrate de **TripSer-Me 12** avec un rendement global de 28% en quatre

étapes. Il est à noter que l'utilisation d'ions fluorures ne permet pas d'isoler le composé **12** avec des rendements corrects.

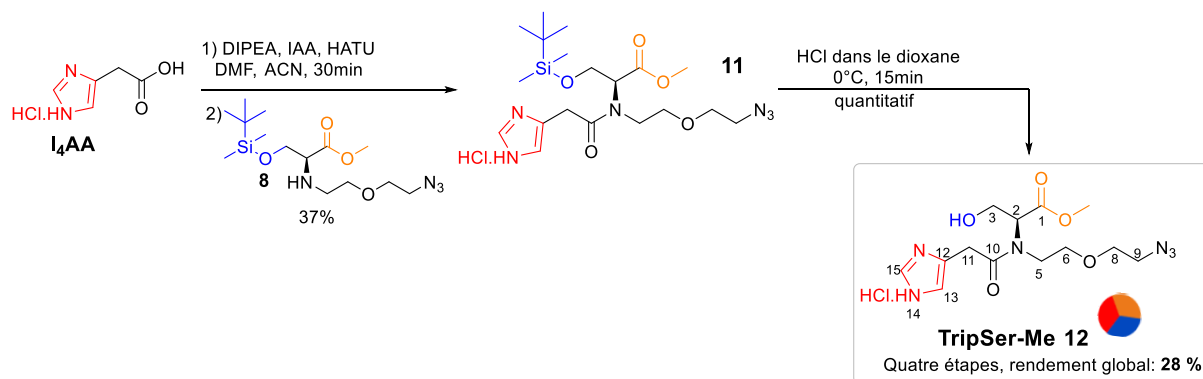


Schéma 17. Synthèse du Tripode **12** à partir du composé **I4AA**

TripSer-Me 12 a été caractérisé par spectrométrie de masse avec l'observation de l'ion $[M+H]^+$ à $m/z = 341,2$. La déprotection du groupement silylé est corroborée par l'analyse en spectroscopie de RMN 1H révélant l'absence des signaux caractéristiques du groupement TBDMS. De plus, les signaux correspondant aux protons H_{15} et H_{13} sont fortement déblindés respectivement à 8,82 et 7,39 ppm, le composé **12** étant sous forme chlorhydrate. Enfin, l'analyse bi-dimensionnelle HMBC en spectroscopie de RMN de **TripSer-Me** indique la présence d'un couplage entre le carbone C_{10} et les protons H_5 du bras EG- N_3 confirmant ainsi la présence de ces deux groupements sur le même atome d'azote N. Cette observation est corroborée par spectroscopie infrarouge par la présence de bandes correspondant aux fonctions ester, amide et azoture.

TripSer-Me 12 présente bien les trois fonctions d'intérêt, alcool, imidazole et ester de méthyle, forme masquée du groupement carboxylate. Ce groupement protecteur a été conservé car le composé s'est révélé plus facile à isoler lors de la purification que son équivalent carboxylate. De plus, une fois le **TripSer-Me** introduit sur le **CvON** d'intérêt, une simple étape de déprotection à la lithine (LiOH) permettra de libérer la fonction carboxylate et d'obtenir le **TripSer** totalement déprotégé, conjugué à un ODN. La quantité finale de **TripSer-Me 12** obtenue (environ 30 mg) est suffisante pour réaliser les premiers essais de conjugaison sur un **CvON**. Cependant, en raison des problèmes de reproductibilité rencontrés lors de la synthèse à plus grande échelle, un second Tripode basé sur un squelette Histidine a été envisagé.

Des travaux publiés en 2020 (dont nous n'avons pas eu connaissance lors de la conception du **TripSer**) présentent un surfactant dont la tête polaire possède une structure très similaire à la nôtre (Figure 41. A et A').³ En effet, Connal et coll., décrivent l'assemblage en micelles de trois surfactants de type alkyle, un à tête tri-fonctionnelle, un alkyle-ammonium et un alkyle-guanidinium (Figure 41. A. et B.) utilisés conjointement et ce afin de mimer de l'activité d'hydrolases. Le premier surfactant est assemblé, comme notre **TripSer**, à partir d'un squelette sérine fonctionnalisé par deux réactions d'amination réductrice successives avec un motif imidazole et une longue chaîne alkyle. Leur mime de protéase est complété par la présence de deux autres co-surfactants, de type guanidinium comme mime du trou de l'oxyanion, et le bromure de cetyltriméthylammonium pour permettre une meilleure solubilité finale de la micelle assemblée. Les capacités hydrolytiques de cette micelle fonctionnalisée ont ensuite été évaluées sur un substrat modèle, le benzoate de *p*-nitrophényle, dont l'hydrolyse a été suivie spectroscopie UV. Les résultats obtenus révèlent qu'en présence du mime micelle, la réaction d'hydrolyse est 16 000 fois plus rapide que celle non catalysée et 7 fois plus rapide celle catalysée par l' α -chymotrypsine (Figure 41. C.).

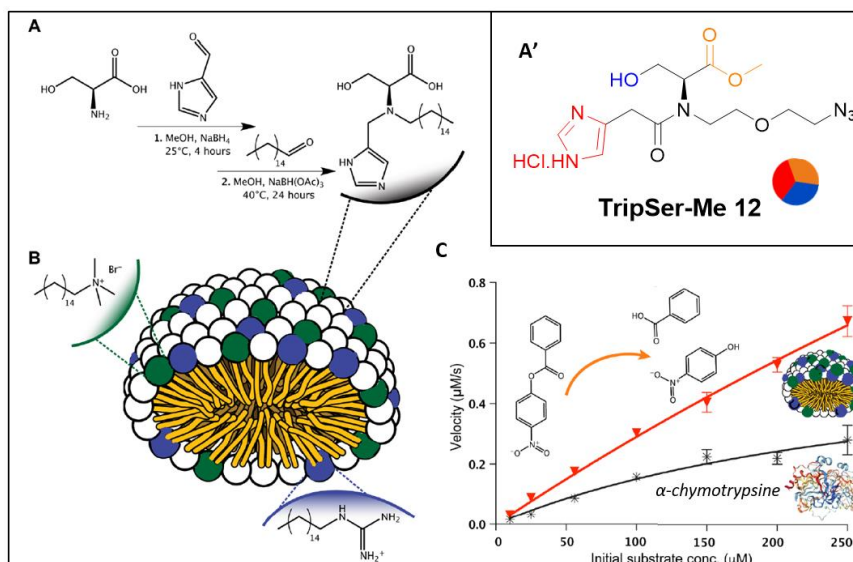


Figure 41. Surfactant multifonctionnel décrit par Connal et coll.³
 A : synthèse du surfactant trifonctionnel de Connal, A' : **TripSer-Me 12** pour comparaison,
 B : assemblage de la structure micellaire, C : hydrolyse du benzoate de p-nitrophényle

Ces excellents résultats confirment la pertinence d'une part d'une approche basée sur l'assemblage de surfactants mais également l'intérêt de regrouper sur un même composé les trois fonctions de la triade catalytique comme nous l'avons envisagé et particulièrement la structure du **TripSer** présentant une amine tertiaire.

Si nos travaux sur le **TripSer** avaient été mis en attente à cause de problèmes de reproductibilité de la voie de synthèse, il sera intéressant de reconsidérer cette structure à l'avenir et d'évaluer notamment l'activité catalytique du **TripSer-Me 12** en solution, non étudiée à ce jour par manque de produit.

1.2. Tripode à squelette histidine (TripHis)

Dans le but de diversifier la famille des organocatalyseurs à notre disposition, la synthèse d'un second **Tripode** a été entreprise tout en s'appuyant sur l'expérience acquise précédemment.

1.2.1. Analyse rétrosynthétique

Cette seconde structure a été conçue à partir cette fois d'un squelette histidine qui présente déjà une fonction imidazole et carboxylate (Figure 42).

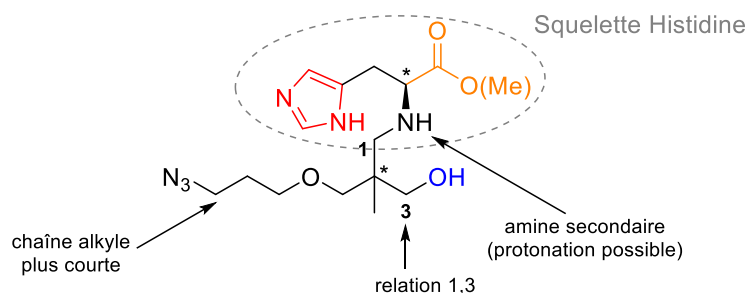


Figure 42. Structure du Tripode à squelette histidine

La synthèse a été réalisée à partir du 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane, plateforme stable pour éviter une dégradation éventuelle et qui présente un enchaînement 1,3-amino alcool qui s'est révélé

clé pour l'activité hydrolytique d'organocatalyseurs décrits par Garrido-González *et al.*^{4,5} Cette équipe a en effet démontré que cette topologie, différente de celle en 1,2 des hydrolases *N*-terminale, est tout aussi (voire plus) efficace.^{4,5}

Comme lors de la conception du **TripSer**, l'introduction d'une fonction amine a été envisagée, dans le but de bénéficier d'un site de protonation supplémentaire. Pour permettre de conserver une structure de petite taille, l'introduction du bras sera réalisée *via* le synthon 3-azido-propyle **C₃-N₃ 4** (Schéma 18).

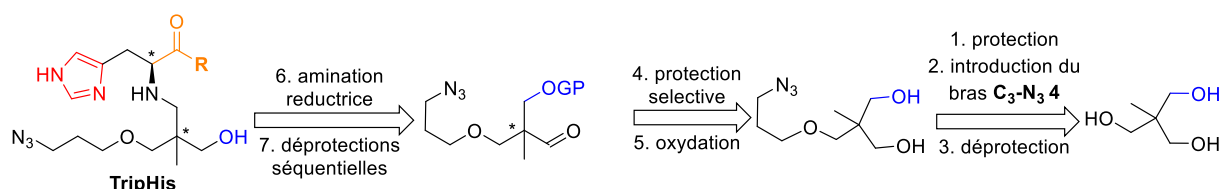


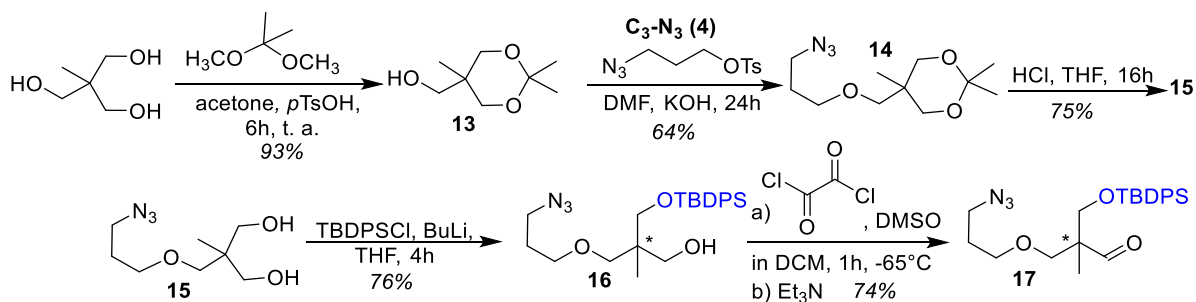
Schéma 18. Analyse rétrosynthétique du tripode "TripHis"

Le synthon de départ, le 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane, présente une structure flexible et porteuse de 3 fonctions hydroxyle primaires fonctionnalisables sélectivement par un jeu pertinent de groupements protecteurs. Afin de s'affranchir des problèmes récurrents rencontrés lors de l'étape clé d'amination réductrice en présence d'une amine secondaire, ce sera l'amine primaire de l'ester de méthyle de l'histidine qui réagira avec une fonction aldéhyde présente sur le synthon carboné. Ce dernier précurseur a été obtenu après oxydation de la dernière fonction hydroxyle libre, les deux fonctions hydroxyle restantes ayant été respectivement sélectivement protégée ou alkylée par le bras azoture.

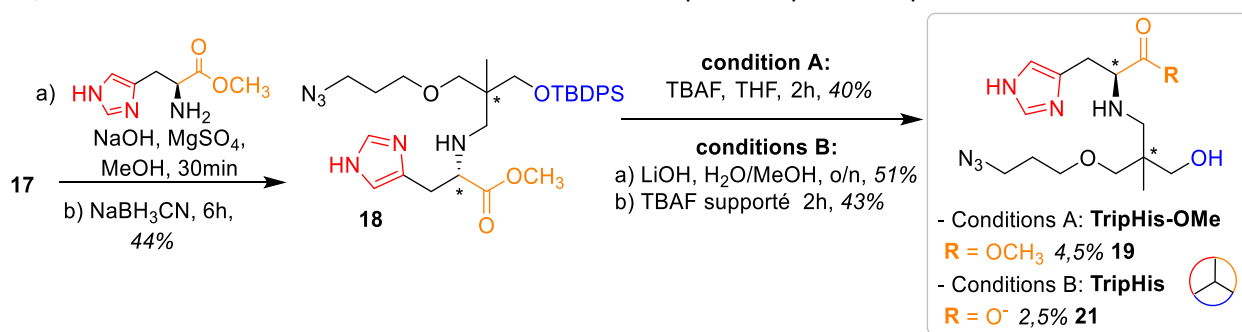
1.2.2. Synthèse

Les trois premières étapes de la synthèse, sont inspirées des travaux de Brissenden *et al.* et ont permis l'accès aux composés **13**, **14** et finalement au diol **15** avec des rendements respectifs de 93%, 64% et 75% (Schéma 19) *via* une séquence de protection-alkylation-déprotection.⁶ L'introduction dans la structure du bras **C₃-N₃ 4** sur le composé **14** est confirmée par la présence de la bande caractéristique du groupement azoture à 2096 cm⁻¹ sur le spectre enregistré par spectroscopie infrarouge. L'analyse par spectrométrie de masse atteste également de l'obtention du composé **15** par la présence de l'ion [M+H⁺] à m/z = 204,2 corroborée par l'absence des signaux des groupements méthyle de l'isopropylidène lors des analyses par spectroscopie de RMN ¹H et ¹³C.

Les deux fonctions hydroxyle du composé **15** sont ensuite différenciées par une protection sélective en présence de chlorure de *tert*-butyldiphénylsilyle (TBDPSCI) et de *n*-butyllithium (BuLi) dans le tétrahydrofurane (THF). Cette étape permet de masquer une des fonctions alcool qui ne sera libérée qu'en fin de synthèse pour contribuer à la triade. Le composé **16** est obtenu avec 76% de rendement sous la forme d'un mélange racémique. La mono-protection est confirmée par les analyses par spectrométrie de masse avec la formation d'un ion [M+H⁺] à m/z = 442,3. La fonction alcool du composé **16** est ensuite oxydée à l'aide d'une réaction de Swern permettant d'obtenir, avec un rendement brut de 74%, l'aldéhyde **17**. Sa structure est confirmée par spectroscopie de RMN ¹H par l'apparition du signal caractéristique du proton aldéhydique à 9,66 ppm.


 Schéma 19. Synthèse du composé **17** à partir du 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane

La sixième étape de cette synthèse (Schéma 20) est une étape d'amination réductrice réalisée avec l'ester de méthyle de l'histidine, permettant l'introduction des deux fonctions manquantes. Le produit **18**, obtenu avec 44% de rendement, correspond ainsi au Tripode d'intérêt dont les fonctions alcool et carboxylate sont masquées. Ce tripode protégé à squelette histidine (**TripHis-Prot**), composé **18**, est ainsi obtenu sous la forme de diastéréoisomères qui n'ont pas été séparés.


 Schéma 20. Synthèse des **TripHis 19** et **21** à partir du composé **17**

Les singulets caractéristiques des protons du noyau imidazole ainsi que les protons de l'ester de méthyle sont observés en RMN confirmant la bonne introduction du motif histidine dans le composé **18**. Les signaux des diastéréoisomères se superposent sur le spectre à l'exception de ceux des protons H_1 en α de la fonction amine qui sont visibles sous la forme de deux systèmes AB (constante de couplage observée $^2J = 11.6$ Hz), correspondant aux deux diastéréoisomères (Figure 43).


 Figure 43. Spectre RMN ^1H (300 MHz dans CDCl_3) du composé **18** entre 3,05 et 2,35 ppm

Deux voies de déprotection ont été mises au point pour conduire aux composés **TripHis-Me 19** et **TripHis 21** avec respectivement des rendements de 4,5% sur 7 étapes et 2,5% sur 8 étapes (Schéma 20).

Le dérivé **TripHis-Me 19** a été obtenu après déprotection par les ions fluorures avec un rendement de 43%. Les analyses par spectroscopie de RMN ^1H confirment la disparition des signaux

aromatiques correspondants au groupement TBDPS et la modification des signaux des deux diastéréoisomères, particulièrement pour les protons H_1 et H_3 . Les signaux des protons H_1 apparaissent à nouveau sous la forme de systèmes AB avec une constante de couplage 2J de 11,5 Hz. Les signaux des protons H_3 sont plus résolus et visibles sous la forme de deux systèmes AB.

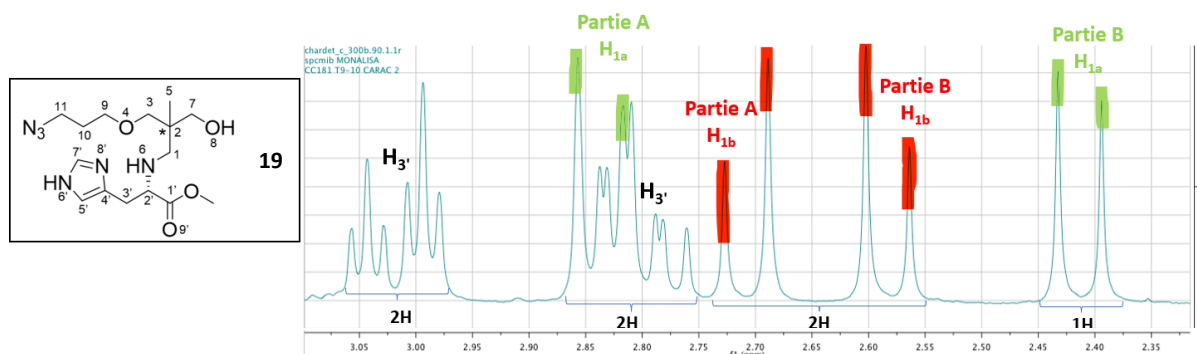


Figure 44. Spectre RMN 1H du composé **19** (300 MHz dans $CDCl_3$) entre 3,05 et 2,35 ppm

Le **TripHis-Me 19** pourra, comme **TripSer-Me 12**, être introduit sur l'oligonucléotide convertible avant sa déprotection à la lithine pour libérer le carboxylate.

Le composé **TripHis 21** correspond au Tripode complètement déprotégé a été obtenu après une longue séquence d'optimisation. Il s'est avéré nécessaire de saponifier tout d'abord la fonction ester de méthyle en présence de lithine (LiOH) pour conduire au dérivé silylé **20**. La déprotection finale a été réalisée de manière supportée afin d'éviter l'utilisation en solution du TBAF et par voie de conséquence les sels d'ammonium de tétrabutyle résiduels, difficiles à séparer du composé **TripHis 21** également très polaire. **TripHis 21** est obtenu sous la forme d'un carboxylate de sodium suite à un échange d'ion sur résine Na^+ Dowex[®] avec un bon rendement de 43%.

Sa structure a été confirmée par spectroscopie de RMN 1H et ^{13}C . Les signaux des deux diastéréoisomères sont résolus, particulièrement au niveau des deux systèmes AB correspondants aux protons H_3 et H_7 , en α du carbone quaternaire C_2 avec des constantes de couplage respectives $^2J = 9,1$ Hz et $^2J = 11,2$ Hz. La disparition du singulet correspondant au groupement méthyle de l'ester confirme également la bonne formation du tripode totalement déprotégé **TripHis 21** corroboré par la détection de l'ion $[M+H]^+$ à un $m/z = 363,3$ par spectrométrie de masse.

En parallèle de leur introduction sur les oligonucléotides (présentée au Chapitre III suivant), les propriétés intrinsèques des **TripHis** comme organocatalyseurs ont été évaluées sur la réaction modèle de transestérification de l'acétate de vinyle décrite dans les travaux de l'équipe de Garido.^{4,5} Les composés **18** et **19** présentant deux ou une fonction(s) masquée(s) vont permettre d'étudier l'influence relative des différentes fonctions sur la catalyse et leur éventuelle interaction.

2. Etude de l'activité catalytique de TripHis

Dans le but de comparer les propriétés catalytiques de nos organocatalyseurs **TripHis** avec celui développé par l'équipe de Garrido-González, une première étude par spectroscopie de RMN 1H permettant d'évaluer l'activité transestérase du **TripHis 21** a été menée. Des tests menés sur l'hydrolyse de substrats de type ester de *p*-nitrophényle et amide de *p*-nitroaniline sont en cours.

Il est en effet intéressant de s'assurer des propriétés catalytiques intrinsèques de ces organocatalyseurs **TripHis** avant l'introduction sur des structures ODN. Ainsi, si une activité catalytique est démontrée, une coopération inter-tripodes ou une efficacité accrue grâce à l'augmentation de la concentration effective pourra être espérée une fois les organocatalyseurs **TripHis** introduits au sein de structures d'oligonucléotides d'intérêt.

La transestérification entre l'acétate de vinyle et le méthanol sert de réaction modèle pour évaluer l'activité catalytique en mimant la première étape du mécanisme d'action des protéases à sérine *via* la formation d'acétaldéhyde (Schéma 21). La méthanolyse permet ensuite de s'approcher d'un scénario similaire de celui de la deuxième étape pendant laquelle un composé acylé est déprotégé, le catalyseur régénéré.

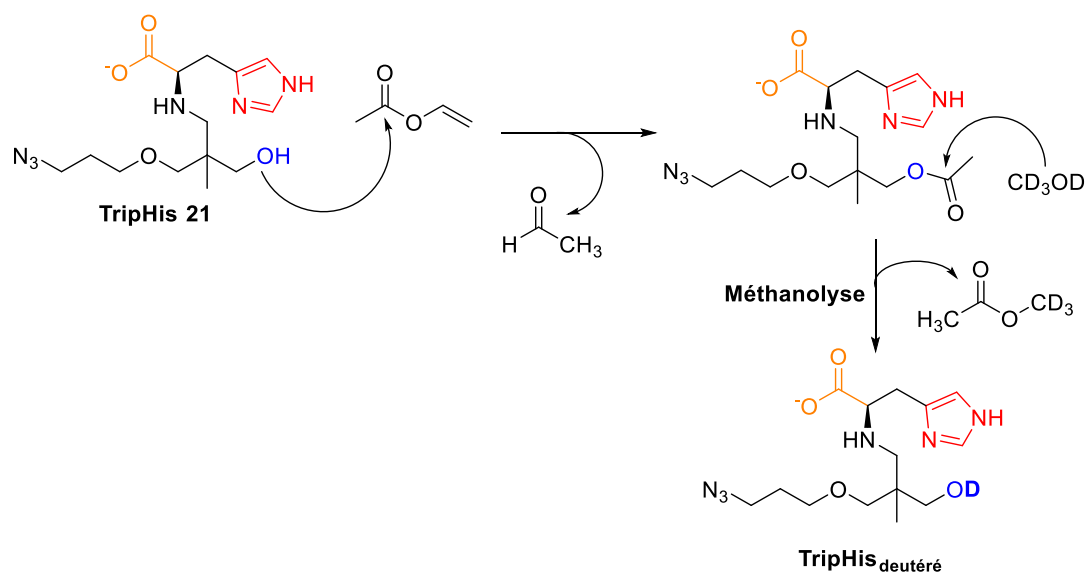


Schéma 21. Mécanisme de transestérification par le composé **TripHis 21**

Pour s'assurer de la nécessité des trois fonctions alcool, imidazole et carboxylate et de la pertinence de notre squelette **TripHis 21**, les activités catalytiques de différents témoins sont également étudiées par spectroscopie de RMN ¹H dans les mêmes conditions. Il s'agit des composés synthétisés **TripHis-Prot 18**, **TripHis-Me 19** ainsi que de l'imidazole et de l'histaminol commerciaux (Figure 45).

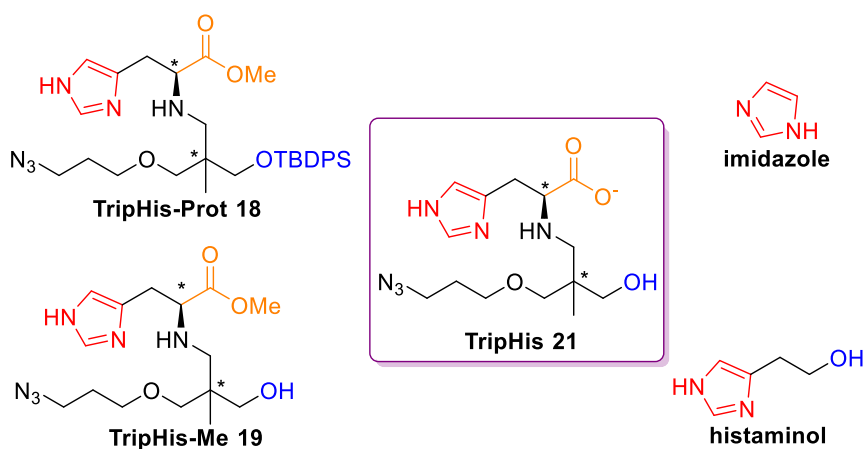


Figure 45. Composés étudiés lors de l'étude de l'activité catalytique du Tripode **21**

TripHis-Prot 18 permet d'évaluer la contribution du noyau imidazole (et de la fonction amine) puisque les deux fonctions carboxylate et hydroxyle sont masquées. De façon similaire, **TripHis-Me 19**, dont seule la fonction carboxylate est masquée, permet d'étudier son implication dans le mécanisme d'action. **TripHis** permet, quant à lui, de considérer l'organocatalyseur au complet et la coopération entre les différentes fonctions d'intérêt.

L'étude, effectuée par spectroscopie de RMN ^1H , se base sur l'observation de la formation des deux produits, l'acétaldéhyde et l'acétate de méthyle lors de la transestérification de l'acétate de vinyle par le méthanol deutéré (Schéma 22). L'acétate de vinyle est placé en solution dans du méthanol deutéré (MeOD), en présence (ou non) d'une quantité catalytique (1%) d'un des composés représentés sur la Figure 45.

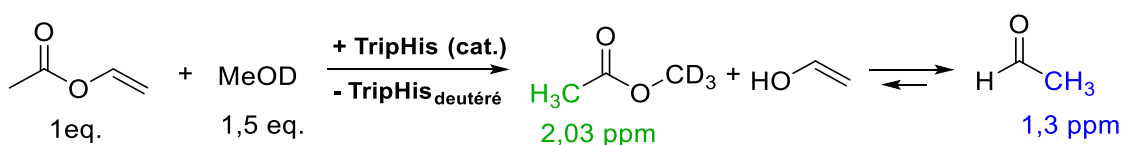
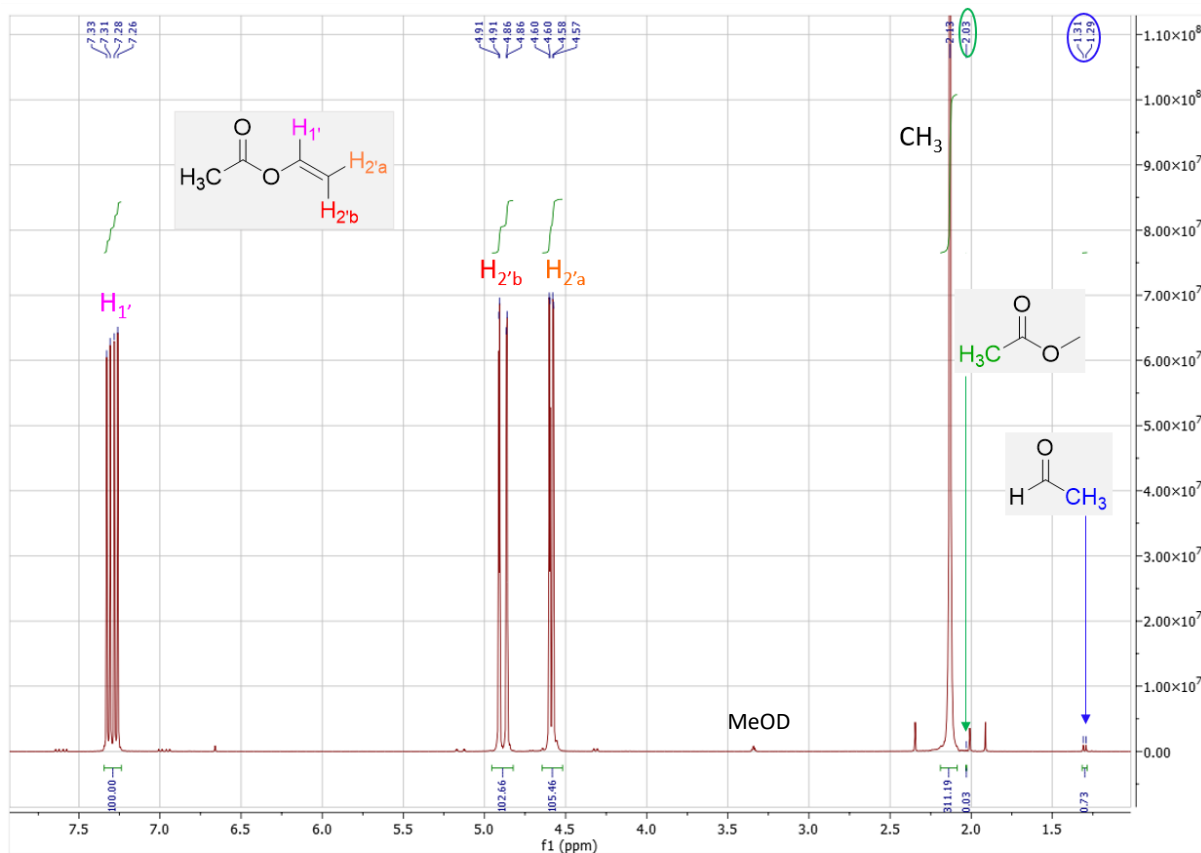


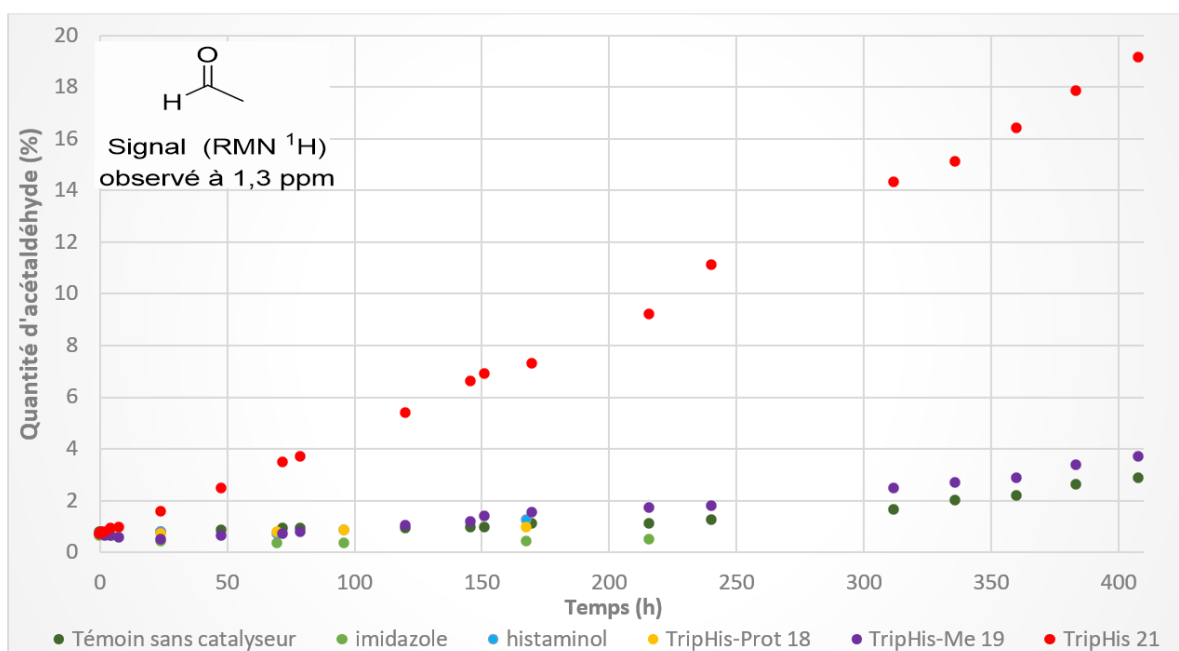
Schéma 22. Transestérification de l'acétate de vinyle catalysée par le Tripode

Les signaux correspondants aux groupements méthyle, respectivement de l'acétaldéhyde (à 1,3 ppm) et de l'acétate de méthyle (à 2,03 ppm) sont observés pour quantifier l'évolution de la réaction (Figure 46). Vu l'excès initial d'acétate de vinyle, les signaux de l'acétaldéhyde et de l'acétate de méthyle, bien moins intenses que ceux de l'acétate de vinyle sont intégrés en pourcentage du signal du proton $\text{H}_{1'}$ de l'acétate de vinyle pour être exploités.



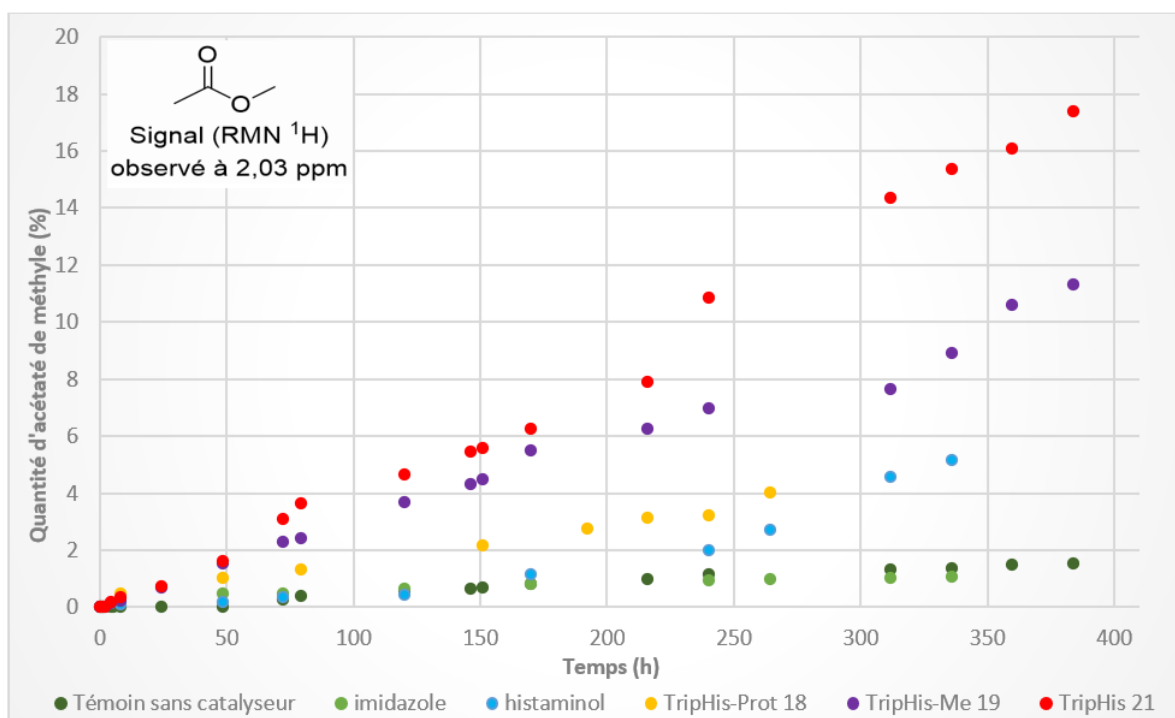
Les réactions en absence de catalyseur, ou en présence de **TriHis-Me 19** et **TripHis 21** ont été étudiées pendant 408 h (soit 17 jours) et celles en présence d'imidazole, d'histaminol et de **TriHis-Prot 18** pendant 216 h (soit 9 jours).

Les résultats présentés sur le Graphique 1 montrent l'évolution en fonction du temps, de l'apparition des signaux ^1H du groupement méthyle de l'acétaldéhyde en présence des différents catalyseurs étudiés. Les résultats obtenus mettent en évidence une différence marquée (d'un facteur 5 à $t = 216$ h) entre la quantité d'acétaldéhyde formée en présence de **TriHis 21** comparée à celle mesurée pour les autres dérivés. En effet, aucun des quatre autres composés testés, aux concentrations utilisées, n'accélèrent cette réaction puisque leur production respective d'acétaldéhyde est au même niveau (faible) que celle observée en absence de catalyseur. En revanche, **TripHis 21** catalyse bien la formation d'acétaldéhyde puisqu'un facteur d'environ 10 est observé à $t = 400$ h comparé à la valeur de référence. Il ressort de cette étude préliminaire que le motif imidazole ne catalyse pas à lui seul cette attaque nucléophile puisque le **TriHis-Prot 18** ne présente pas d'activité catalytique. En revanche, la fonction hydroxyle libre est nécessaire pour restaurer la réactivité et la fonction carboxylate de **TripHis 21** contribue également à une catalyse efficace.



Graphique 1. Étude RMN ^1H de la formation d'acétaldéhyde (quantité exprimée en pourcentage de la quantité d'acétate de vinyle) en présence de différents organocatalyseurs potentiels en fonction du temps

Ces observations sont en partie confirmées par l'analyse complémentaire menée par spectroscopie de RMN ^1H pour suivre la formation de l'acétate de méthyle, produit final de transestérification, les résultats étant présentés sur le Graphique 2.



Graphique 2. Etude RMN ^1H de la formation d'acétate de méthyle (quantité exprimée en pourcentage de la quantité d'acétate de vinyle) en présence de différents organocatalyseurs potentiels en fonction du temps

A nouveau, il est constaté que, dans les conditions utilisées, le motif imidazole seul ne présente pas d'activité sur les 15 premiers jours, la formation d'acétate de méthyle restant identique à celle observée en l'absence de catalyseur. **TrisHisProt 18** (portant un noyau imidazole libre alors que les fonctions hydroxyle et carboxylate sont masquées) ne montre qu'une activité catalytique faible (avec un facteur 3 à $t = 150$ h) représentative de la contribution de la fonction amine tertiaire à la réaction.

En revanche, **TripHis-Me 19**, dont seule la fonction carboxylate est masquée, démontre une activité catalytique plus importante que celle observée précédemment avec un facteur 6 à $t = 150$ h. **TripHis 21** reste cependant l'organocatalyseur le plus efficace (facteur 8 à $t = 150$ h). Cette observation confirme bien que les trois fonctions doivent être présentes pour conduire au catalyseur le plus actif. De plus, il s'agit bien d'une attaque nucléophile réalisée par la fonction hydroxyle (puisque le groupement imidazole seul n'est pas suffisant pour réaliser la catalyse). La fonction carboxylate, quant à elle, semble jouer un rôle plus important dans l'étape de méthanolyse.

Cette réaction reste (très) lente comparée aux organocatalyseurs décrits dans la littérature dans ces conditions expérimentales. En effet, si la catalyse et la sélectivité observées pour l'organocatalyseur **TripHis 21** sont des résultats très encourageants (Figure 47), il reste difficile de quantifier la formation des deux produits d'hydrolyse notamment dans le cas de certains contrôles.

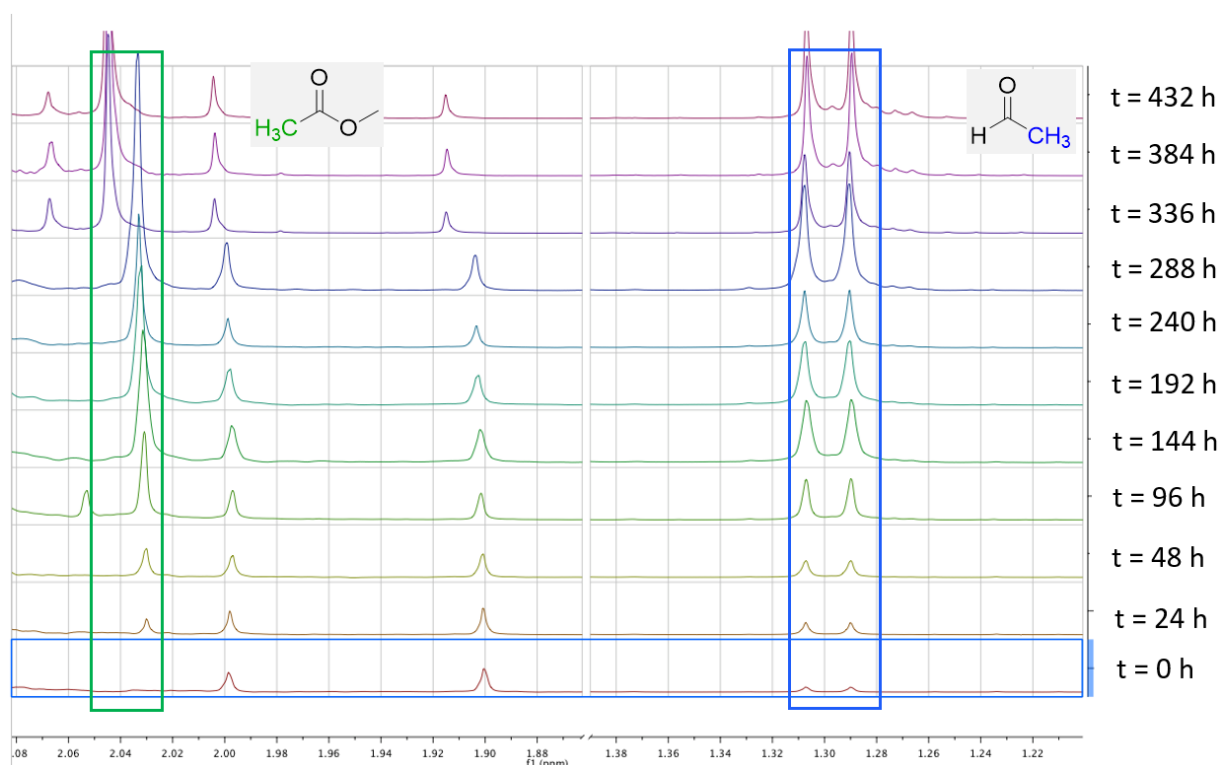


Figure 47. Superposition des signaux observés à 2,03 et 1,30 ppm (acétate de méthyle et acétaldéhyde) lors de l'analyse de l'acétate de vinyle en présence du **TripHis 21** (300 MHz, MeOD)

Leurs faibles intensités comparées aux signaux de l'acétate de vinyle et la difficulté d'intégration des signaux des ¹H du groupement méthyle de l'acétate de méthyle (à 1,30 ppm), en raison de la présence d'autres signaux parasites de même déplacement chimique, compliquent la mesure. Ce dernier paramètre peut notamment fausser les valeurs obtenues.

Ces évaluations ont été mises en œuvre pour estimer préliminairement l'activité catalytique des **TripHis** en utilisant la spectroscopie de RMN mais elles devront être reproduites et leurs vitesses de catalyse respectives déterminées.

L'étude sera prochainement complétée par l'évaluation de composés **TripGly**, dérivés du TripHis ne portant pas de groupement imidazole, qui permettront de conclure sur l'importance respective de la fonction imidazole et de la fonction alcool. Ces précurseurs **TripGly** seraient synthétisés par une réaction d'amination réductrice entre la glycine et le composé **17**. Enfin, des expériences complémentaires seront prochainement menées sur des molécules présentant un ester ou un amide activé.

3. Conclusion

Les travaux présentés dans ce premier chapitre décrivent la synthèse d'organocatalyseurs multi-fonctionnalisés portant une chaîne alkyle azoture pour permettre la fonctionnalisation d'oligonucléotides convertibles (Figure 48).

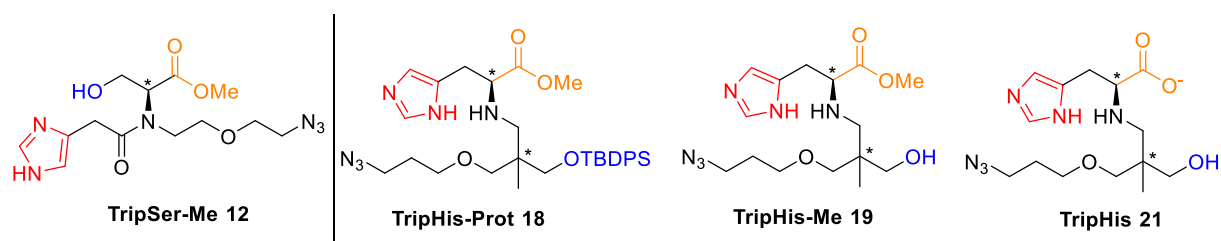


Figure 48. Structures des organocatalyseurs Tripodes synthétisés

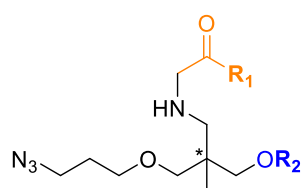
Le **TripSer-Me 12** a été obtenu en 4 étapes à partir de l'ester de méthyle de la sérine avec un rendement global de 28%. Il présente une fonction amide tertiaire introduite par une réaction de couplage. Les conditions d'introduction du motif imidazole devront cependant être optimisées pour conduire à une dernière étape de couplage reproductible. En raison de la faible quantité obtenue, il est conservé sous sa forme ester de méthyle pour être conjugué par CuAAC au sein d'un **CvON**.

Son analogue porteur d'une fonction amine tertiaire n'a, quant à lui, pas pu être obtenu malgré de nombreuses tentatives. Cependant, en se basant sur les travaux récemment publiés par l'équipe de Connal, sa synthèse selon la voie A peut-être revisitée par un jeu d'aminations réductrices successives.³ Son obtention permettrait de compléter la famille des organo-catalyseurs disponibles.

TripHis 21 a été synthétisé en 8 étapes à partir du 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane avec un rendement global de 2,5%. Grâce à un choix de groupements protecteurs orthogonaux, deux catalyseurs **TripHis-Prot 18** et **TripHis-Me 19** ont été également synthétisés.

Les capacités catalytiques de ces trois composés ont pu être étudiées par spectroscopie de RMN ^1H lors d'une réaction modèle de transestérification entre l'acétate de vinyle et le méthanol. Les résultats obtenus ont permis de conclure que les trois fonctions alcool, carboxylate et imidazole présentes sur le catalyseur **TripHis 21** sont nécessaires pour une catalyse la plus efficace possible.

Des études complémentaires (répétabilité, étude dans le méthanol non deutéré...) devront être réalisées pour déterminer les vitesses de réaction et pour définir l'implication respective de chaque fonction. Ce dernier paramètre requiert la synthèse des nouveaux analogues **TripGly** (Figure 49). La capacité de tous ces organocatalyseurs à hydrolyser des esters ou des amides activés sera également évaluée.



$R_1 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{TBDMS}$ TripGly-Prot
 $R_1 = \text{OMe}$; $R_2 = \text{H}$ TripGly-Me
 $R_1 = \text{O}^-$; $R_2 = \text{H}$ TripGly

Figure 49. Tripodes à squelette glycine à synthétiser pour comparaison de l'activité catalytique

Finalement, l'introduction des trois organocatalyseurs décrits dans ce chapitre, **TripSer-Me 12**, **TripHis-Me 19** et **TripHis 21**, sur des **CvON** est décrite dans le chapitre III pour mettre en œuvre l'approche covalente.

Bibliographie du chapitre II

1. Mei, D., Zhang, W. & Li, Y. Improved Enantioselective Synthesis of Protected (3*S*, 4*S*)-4-Amino-3,5-dihydroxypentanoic Acid (ADPA). *Synth. Commun.* **40**, 1099–1105 (2010).
2. Banerjee, A. & Yamamoto, H. Nickel Catalyzed Regio-, Diastereo-, and Enantioselective Cross-Coupling of 3,4-Epoxyalcohol with Aryl Iodides. *Org. Lett.* **19**, 4363–4366 (2017).
3. Nothling, M. D. *et al.* A multifunctional surfactant catalyst inspired by hydrolases. *Sci. Adv.* **6**, 404-416 (2020).
4. Garrido-González, J. J. *et al.* An Enzyme Model Which Mimics Chymotrypsin and *N*-Terminal Hydrolases. *ACS Catal.* **10**, 11162–11170 (2020).
5. Garrido-González, J. J. *et al.* Transesterification of Non-Activated Esters Promoted by Small Molecules Mimicking the Active Site of Hydrolases. *Angew. Chem. Int. Ed.* **61**, 6072 (2022).
6. Brissenden, A. J. & Amsden, B. G. Insights into the polymerization kinetics of thermoresponsive poly(trimethylene carbonate bearing a methoxyethoxy side group). *J. Polym. Sci.* **58**, 2697–2707 (2020).

Chapitre III : Approche covalente

1. Principe de l'approche covalente

Suite à l'obtention de deux Tripodes, organocatalyseurs clickables **TripSer-Me** et **TripHis-Me** (respectivement composés **12** et **19** décrits au chapitre II), il s'agit maintenant de les introduire dans des structures bulge pour assembler un système fonctionnalisé.

Ainsi, dans ce chapitre, sera décrite la stratégie utilisée pour créer une structure oligonucléotidique qui permette de contourner l'absence de poche catalytique des ODNs par la mise en œuvre d'une approche covalente. Afin de mieux mimer l'action d'une protéase, l'objectif est donc de reproduire artificiellement son site actif. La présence de trois fonctions catalytiques rassemblées en un composé organocatalyseur et la création d'une poche catalytique dans laquelle le substrat peut rencontrer le catalyseur sont nécessaires. La structure bulge, évoquée au chapitre II, est choisie pour cette première approche car elle permet précisément la création d'une pseudo poche susceptible de mimer un site actif. Deux brins partiellement complémentaires possédant en leur cœur une zone non appariée peuvent ainsi être fonctionnalisés pour présenter face à face un (ou plusieurs) catalyseur(s) et un (ou plusieurs) substrat(s) à hydrolyser (Figure 50).

Basée sur l'expérience du laboratoire concernant les oligonucléotides convertibles (**CvON**) et fonctionnalisés (**FuON**), la démarche consiste en la fonctionnalisation d'oligonucléotides dont les séquences sont conçues pour permettre l'assemblage d'une structure bulge. En complément de l'approche décrite au chapitre II qui s'appuyait sur la multi-présentation de l'organocatalyseur au sein de la structure, nous nous attachons à mimer au mieux l'action du site actif, *via* un bulge permettant de mettre en contact rapproché l'organocatalyseur et le substrat activé. Cette approche permet ainsi d'augmenter la concentration effective en organocatalyseur tout en créant une poche de reconnaissance artificielle.

Les **CvON** sont obtenus par synthèse supportée. Ils peuvent ensuite être fonctionnalisés par un système organocatalytique ou un motif que nous qualifierons de substrat, en utilisant une réaction de "chimie click".

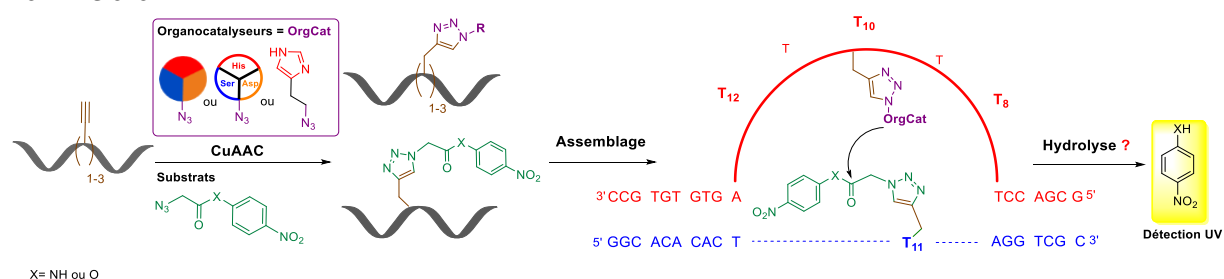


Figure 50. Approche covalente - Bulge fonctionnalisé (X= NH ou O)

Ce substrat (représenté en vert) a pour rôle de faciliter l'évaluation de l'activité catalytique du Tripode au cœur de la structure bulge. Pour cela, il comporte plusieurs groupements clés, mis en avant sur la Figure 51. La fonction azoture permet la réaction de CuAAC sur le **CvON** d'intérêt. La fonction amide ou ester au centre du composé constitue la fonction à hydrolyser et le motif *p*-nitrophénol ou *p*-nitroaniline libéré permet de réaliser un suivi UV de l'hydrolyse en mesurant la quantité de chromophore produite. Trois longueurs de chaîne carbonée ont été envisagées, pour permettre de moduler la distance ester/amide-organocatalyseurs.

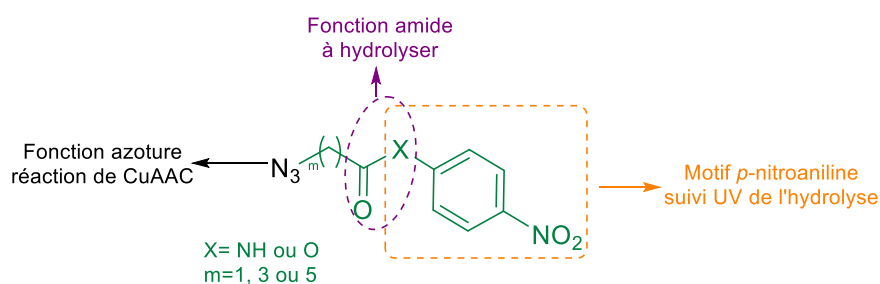
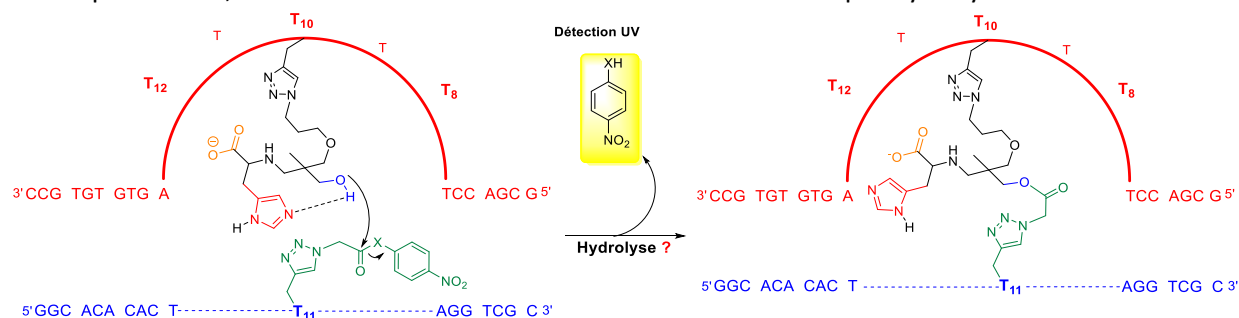


Figure 51. Structure générique des substrats azoture

Présentés sur des brins d'ODN se faisant face, les organocatalyseurs introduits ont la possibilité d'interagir avec le substrat et de réaliser la première étape de l'hydrolyse de son lien amide ou ester. Comme illustré Figure 52, lors de la formation d'un bulge assemblé à partir de deux **FuON** portant respectivement un **TripHis** et un substrat activé la fonction alcool de l'organocatalyseur peut réagir sur la fonction amide ou ester et le chromophore. Ainsi, un lien covalent (ou crosslink) sera formé entre les deux brins du bulge. L'hydrolyse pourra être mesurée par spectroscopie UV mais également par spectrométrie de masse (MS) et gel d'électrophorèse pour confirmer la formation d'une structure de masse plus élevée, résultant de la formation du lien covalent s'il n'est pas hydrolysé.

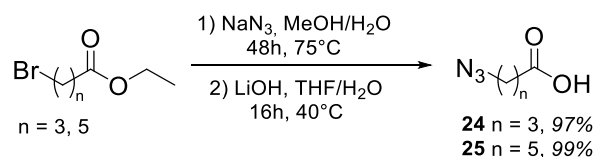
Figure 52. Crosslink des brins du bulge lors de l'hydrolyse du substrat par le **TripHis** (X= NH ou O)

Hormis les Tripodes décrits au Chapitre II, il a fallu synthétiser tous les partenaires pour permettre l'assemblage et l'étude de ces bulges. La synthèse des azotures des différents substrats chromogéniques sera détaillée dans un premier temps. L'obtention, la caractérisation des **CvON** puis leur fonctionnalisation par CuAAC par des substrats et tripodes sera ensuite explicitée. L'assemblage de bulges fonctionnalisés à partir de ces **FuON** sera décrite ainsi que leur étude par dénaturation thermique. Pour conclure cette étude, l'activité catalytique de deux bulges fonctionnalisés sera évaluée par la mise en place d'un test d'hydrolyse en solution.

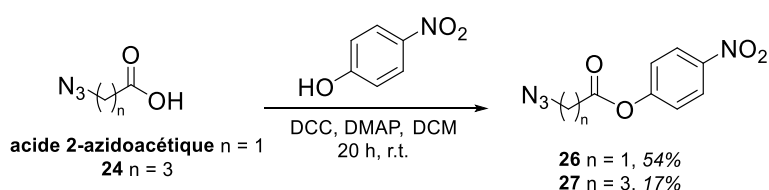
2. Synthèse des substrats chromogéniques

La synthèse des substrats ester ou amide comportant 1, 3 ou 5 atomes de carbone a été réalisée à partir des différents intermédiaires azido-acide (Schéma 23).

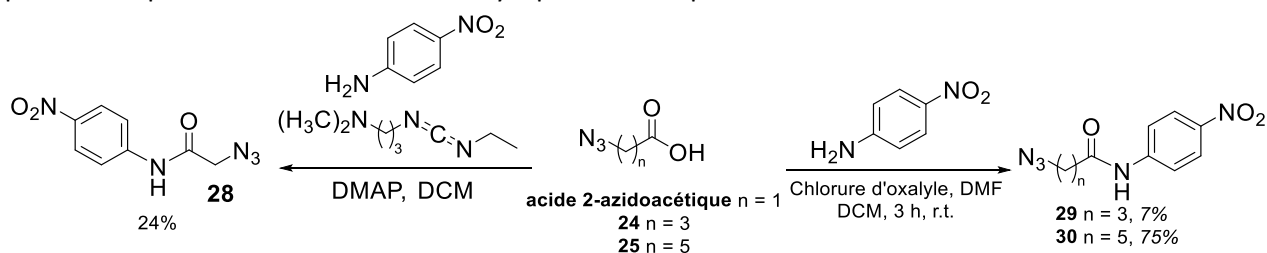
Pour les dérivés portant une chaîne composée d'un atome de carbone (C_1), la synthèse est réalisée à partir de l'acide 2-azido-acétique commercial. Pour les chaînes à trois (C_3) et cinq (C_5) atomes de carbone, les précurseurs **24** (acide 4-azidobutanoïque) et **25** (acide 6-azidohexanoïque) ont été synthétisés en deux étapes à partir du 4-bromobutanoate d'éthyle ou du 6-bromohexanoate d'éthyle. La première étape consiste en une substitution nucléophile à l'aide de NaN_3 pour introduire la fonction azoture. La seconde étape est un traitement à la lithine pour déprotéger l'ester d'éthyle des composés **22** et **23** et ainsi libérer la fonction acide. Les composés **24** et **25** ont ainsi été obtenus avec des rendements de 97% et 99% respectivement (Schéma 23).

Schéma 23. Synthèse des intermédiaires acide 4-azidobutanoïque **24** et 6-azidohexanoïque **25**

A partir des azidoacides **24** et **25**, une étape de couplage a été réalisée avec le *p*-nitrophénol en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) comme activateur. Les composés **26** (**C₁-ester**) et **27** (**C₁-ester**) ont ainsi pu être obtenus avec des rendements de 54% et 17% (Schéma 24). Ainsi, les cinq substrats, trois amides portant respectivement un bras à 1, 3 et 5 atomes de carbones et deux esters ont été synthétisés.

Schéma 24. Voie de synthèse des substrats **C₁**-, **C₃**- et **C₅**-ester à partir des intermédiaires azotures

Les substrats **C₁**-, **C₃**- et **C₅**-amide **28**, **29** et **30** sont obtenus par couplage de la *p*-nitroaniline sur l'acide 2-azido-acétique, avec des rendements respectifs de 24%, 7% et 75% (Schéma 25). L'activation de fonction acide est réalisée à l'aide de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide pour le composé **28** et du chlorure d'oxalyle pour les composés **29** et **30**.

Schéma 25. Voie de synthèse des substrats **C₁**-, **C₃**- et **C₅**-amide à partir des intermédiaires azotures

Les faibles rendements observés pour certains de ces composés n'ont pas été améliorés car les quantités obtenues étaient suffisantes pour la poursuite du projet et ceux-ci ont pu être utilisés dans des réactions de CuAAC sur les oligonucléotides convertibles porteurs d'une fonction propargyle.

3. Synthèse des bulges ⁵B₁ fonctionnalisés

3.1. Séquences

Le premier bulge a été assemblé à partir de séquences développées au sein du laboratoire (Figure 53).¹ Les brins α et β sont complémentaires uniquement aux extrémités permettant la formation d'un bulge de six bases non appariées au cœur de la structure et réparties entre les deux brins. Ce bulge est désigné ⁵B₁ en référence au nombre de bases non appariées au sein de la boucle : cinq formants la boucle et une faisant face au cœur du brin complémentaire. La présence de cinq thymidines non appariées au sein de cette boucle permet de considérer plusieurs positions, commutables selon les assemblages souhaités, pour incorporer les partenaires correspondant à nos organocatalyseurs-mimes de site actif de protéases ou à un substrat d'intérêt.

Ces deux séquences ont l'avantage d'être constituées d'un nombre de bases restreints (inférieur à 25 bases) ce qui assure leur synthèse avec d'excellents rendements grâce à un synthétiseur d'oligonucléotides. Des brins de cette longueur sont également analysables, avec une résolution convenable, par chromatographie HPLC en phase inverse et par spectrométrie de masse à l'aide un spectromètre MALDI-TOF Waters Micro MX, dont dispose le laboratoire.



Figure 53. Séquences des brins α et β (numérotation des bases de 5' en 3') et schématisation du Bulge 5-1

Sur le brin α (ou brin porteur de la boucle), trois positions sont envisagées pour l'introduction de modifications, soit T₈, T₁₀ et T₁₂. Il a été décidé d'alterner l'incorporation des modifications afin de minimiser la gêne stérique entre les groupements introduits par réaction de CuAAC. De plus, l'incorporation successive de deux phosphoramidites convertibles lors de la synthèse supportée peut s'avérer moins efficace et nécessiter l'adaptation du programme sur le synthétiseur. Les trois positions peuvent ainsi être modifiées simultanément sur un même brin ou non.

A des fins de simplification des figures, les structures bulges pourront être symbolisées selon la représentation de la Figure 53.

3.2. Synthèse des brins convertibles CvON

3.2.1. Synthèse des phosphoramidites convertibles

La synthèse des oligonucléotides convertibles a été réalisée à partir de phosphoramidites commerciaux et d'un phosphoramidite convertible (Schéma 26). Il s'agit d'un dérivé de thymidine portant une fonction propargyle en position 5' qui est obtenue en 8 étapes à partir de thymidine commerciale à l'aide d'une méthode développée au sein de l'équipe.¹ La synthèse est réalisée à l'échelle de quelques dizaines de grammes. Après trois étapes de protection-déprotection, la fonction hydroxyle en position 5' est oxydée en aldéhyde pour permettre ensuite d'introduire la fonction propargyle *via* une réaction de Barbier. Le composé **35** est obtenu sous la forme de deux diastéréoisomères *S/R* en ratio 70:30. Il est possible de poursuivre la synthèse à partir du mélange des diastéréoisomères **35** et ainsi d'obtenir un mélange de phosphoramidites 5'-*S/R*-propargyle ou de séparer les diastéréoisomères **35-S** et **35-R**.

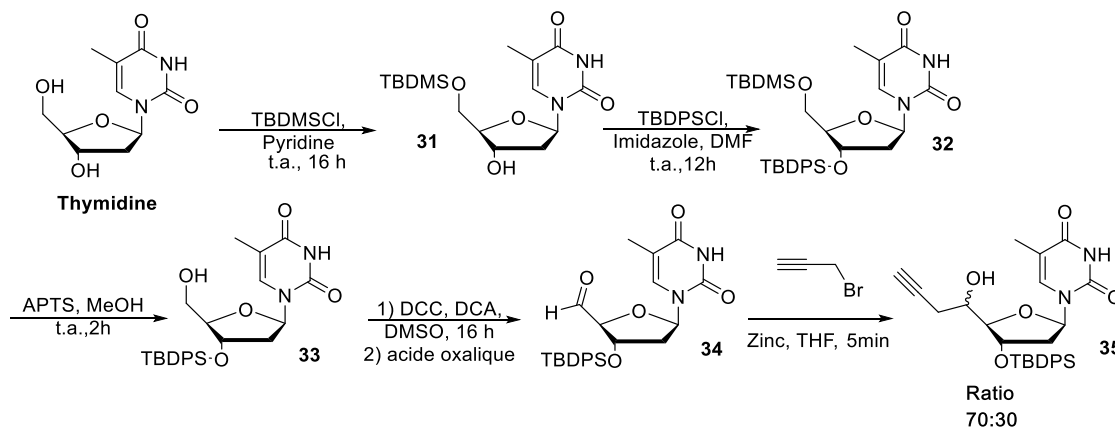


Schéma 26. Voie de synthèse de l'intermédiaire nucléoside 5'-C-propargyle **35**

Dans le cas de nos travaux, si des premiers essais avaient été entrepris à partir du mélange de phosphoramidites, il a rapidement été décidé de travailler uniquement à partir de **CvON** porteur d'une fonction propargyle de stéréochimie *S*. Pour cela, le composé **35-S** a été séparé par chromatographie préparative sur colonne de silice. La séparation des deux diastéréoisomères étant difficile ($\Delta R_f < 0,1$), la méthode de purification implique des injections successives de fractions du mélange. Pour réaliser la purification de 10 g de **35-S/R**, des injections séquentielles à des concentrations de 200 mg.mL⁻¹ ont ainsi été réalisées jusqu'à permettre la séparation des deux diastéréoisomères. Le composé **35-S** a ensuite pu être utilisé dans la suite de la synthèse (Schéma 27). Trois étapes sont alors nécessaires pour obtenir le phosphoramidite d'intérêt, la protection de la position 5' par le chlorure de diméthoxytrityle, conduisant au composé **36**, la déprotection de la position 3' par des ions fluorure pour donner **37** et finalement la phosphitylation en 3' qui donne accès au phosphoramidite 5'-C-propargyle final **38**.

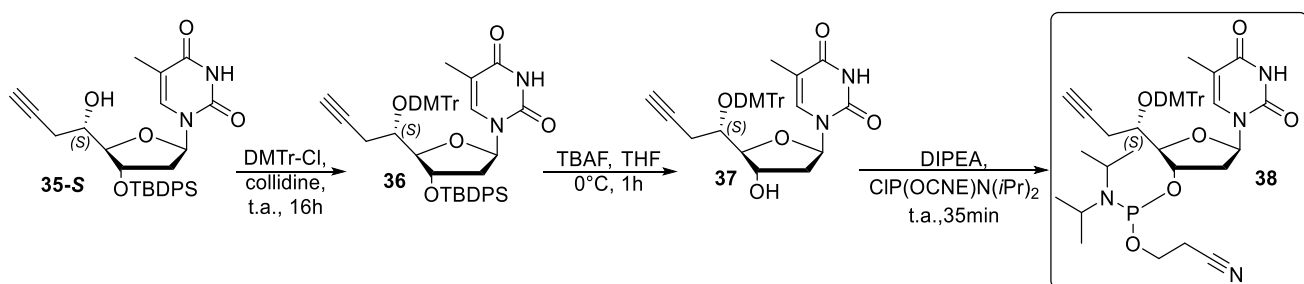


Schéma 27. Obtention du phosphoramidite 5'-S-propargyle **38**

3.2.2. Synthèse des oligonucléotides convertibles CvON

Pour chaque séquence du **CvON** obtenue, un ODN non modifié (dit wild-type, **wt**) de même séquence a été synthétisé et sert de référence pour toutes les analyses et études UV. Le phosphoramidite **38** décrit précédemment a ensuite été introduit par synthèse supportée entre une et trois fois par brin dans les séquences **α** et **β** (Tableau 5) avec des rendements quantitatifs comparables aux rendements de synthèse des brins wild-type. Ainsi, il a été décidé de nommer les **CvON** en indiquant le type de séquence (**α** ou **β**) suivi de la position du nucléotide porteur du bras alcyne (par exemple **α-10alk** indiquant l'introduction sur le brin **α** en position 10 d'un motif propargyle).

Tableau 5. Séquences des oligonucléotides convertibles

Noms	Séquence et site d'incorporation de la fonction propargyle (en gras)	Nombre de fonctions convertibles
α-10alk	5'-GCG ACC TTT T₁₀ TT AGT GTG TGC C-3'	1
α-8,12alk	5'-GCG ACC TT₈ T TTT₁₂ AGT GTG TGC C-3'	2
α-8,10,12alk	5'-GCG ACC TT₈ T T₁₀ TT₁₂ AGT GTG TGC C-3'	3
β-11alk	5'-GGC ACA CAC TT₁₁ A GGT CGC C-3'	1

Les différents **CvON** ont été obtenus à l'échelle de 200 nmol et ont ensuite été caractérisés par RP-HPLC et MALDI. Les résultats en HPLC obtenus montrent que l'incorporation d'un motif propargyle, fonction apolaire, augmente le temps de rétention par rapport au temps de rétention de l'ODN **wt** de référence (Figure 54 pour le brin **β**).

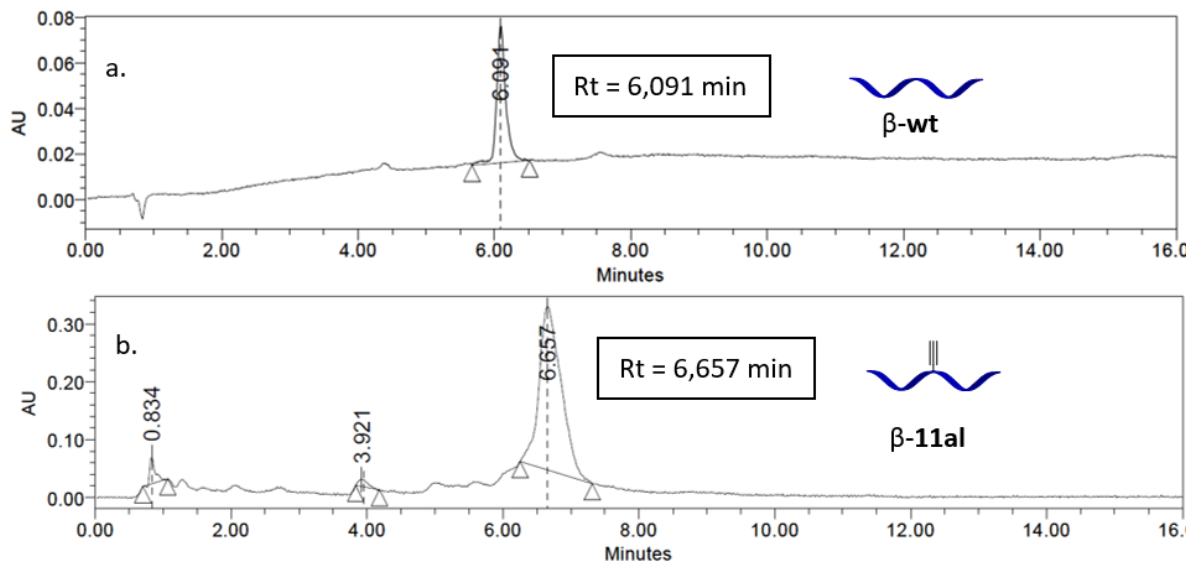


Figure 54. Chromatogrammes RP-HPLC des oligonucléotides : a. β -wt ; b. β -11alk ;
 Gradient de 95% d'un éluant A à 85% d'un éluant A dans B (A: tampon TEAA 0.05 M, pH 7.0; B: CH_3CN)

Ce phénomène est confirmé lors de l'augmentation du nombre de fonction propargyle introduites sur un même ODN (Figure 55 pour le brin α).

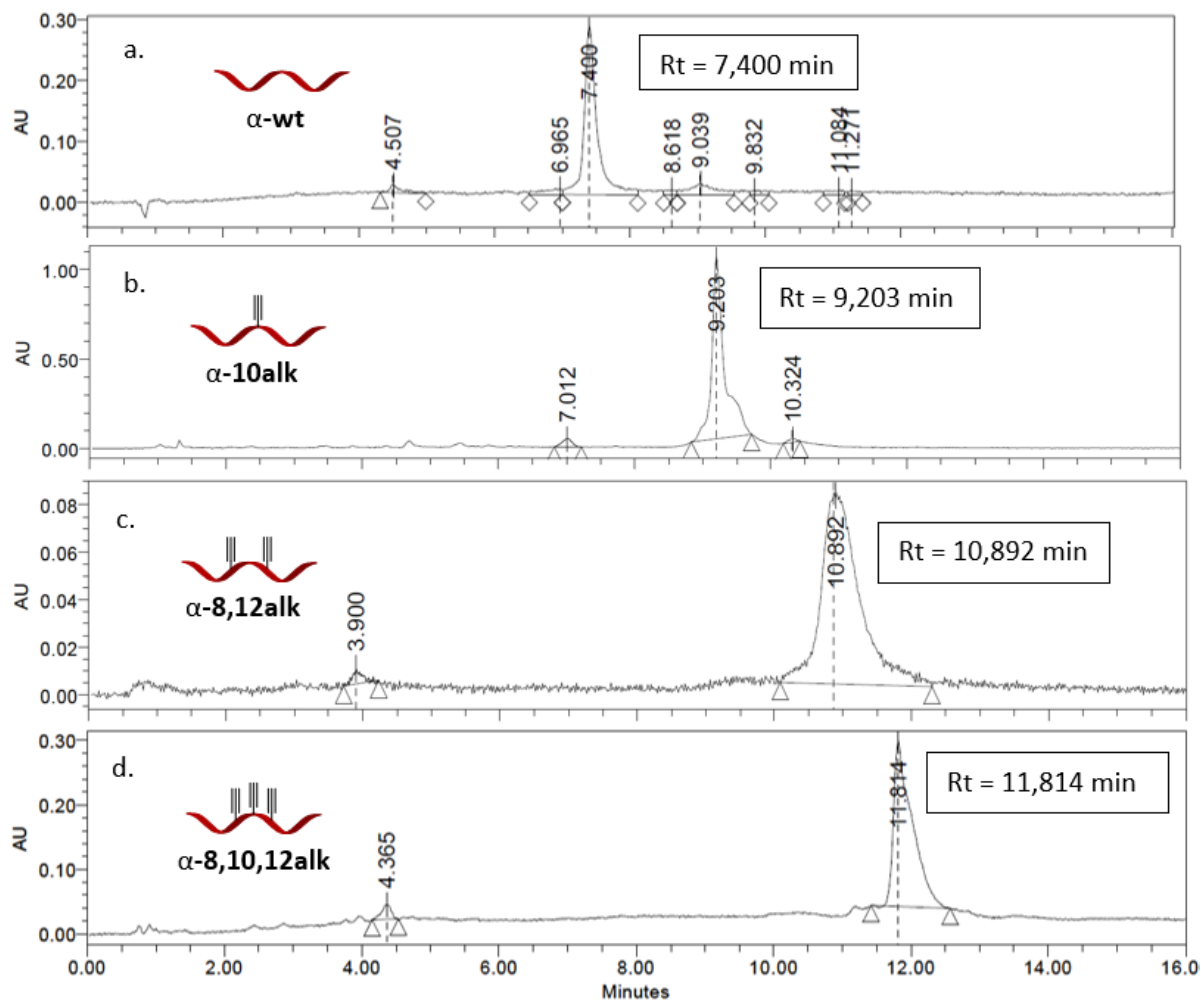


Figure 55. Chromatogrammes RP-HPLC des oligonucléotides : a. α -wt ; b. α -10alk ; c. α -8,12alk ; d. α -8,10,12alk ;
 Gradient de 95% d'un éluant A à 85% d'un éluant A dans B (A: tampon TEAA 0.05 M, pH 7.0; B: CH_3CN)

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF en utilisant l'acide 3-hydroxypicolinique (HPA) comme matrice. Les résultats (Figure 56) confirment une bonne incorporation des phosphoramidites **38**, puisqu'une incrémentation de masse de 39 Da correspondant à la masse du motif propargyle en position 5' est observée sur les brins α comme β .

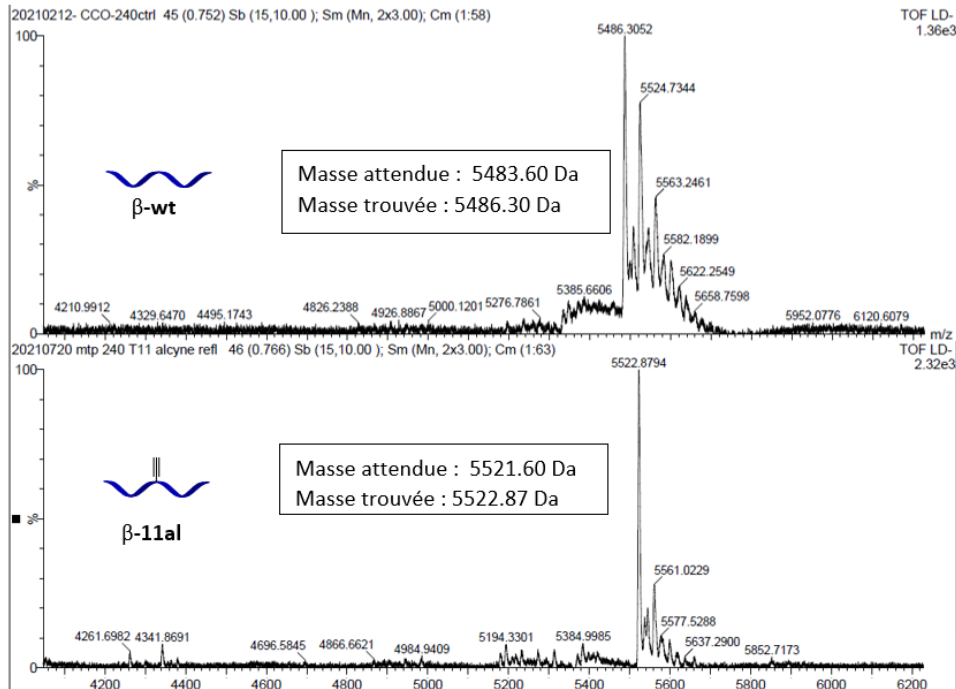


Figure 56. Spectres MALDI des oligonucléotides : a. β -wt ; b. β -11alk, brut

Lors de l'analyse d'ODN de masses supérieures à 6000 Da, si la résolution du MALDI à notre disposition ne permet pas d'obtenir un résultat d'analyse avec haute résolution, les spectres obtenus confirment tout de même la synthèse des ODN désirés (Figure 57).

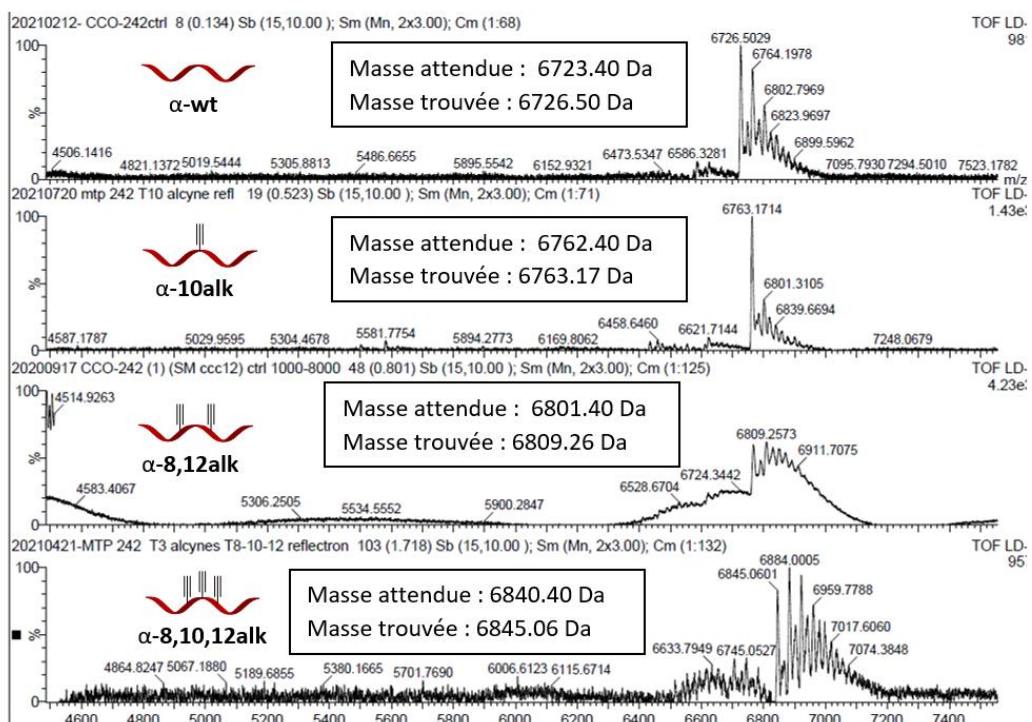


Figure 57. Spectres MALDI des oligonucléotides - a. α -wt ; b. α -10alk ; c. α -8,12alk. ; d. α -8,10,12alk

3.2.3. Obtention des oligonucléotides fonctionnalisés FuON

Les brins convertibles obtenus ont ensuite été impliqués dans des réactions de type CuAAC (Schéma 28) avec comme partenaires azotures soit l'un des organocatalyseurs à disposition (**Tripodes 12** ou **21** ou le composé 4-(2-azidoéthyl)-1*H*-imidazole **Im-N₃**, soit un des substrats activés présentés précédemment (paragraphe 2.). Comme cela a été présenté dans le chapitre I, l'introduction d'un motif imidazole a déjà été utilisé, au sein de l'équipe, lors de l'assemblage de la jonction trois voies trifonctionnalisée, ou, par l'équipe de Gorin, lors de la fonctionnalisation d'un aptamère.^{1,2} Dans les travaux que nous présenterons dans ce chapitre, le rôle des **FuON** porteurs d'un motif imidazole est de servir de témoin de l'activité catalytique des tripodes introduits.

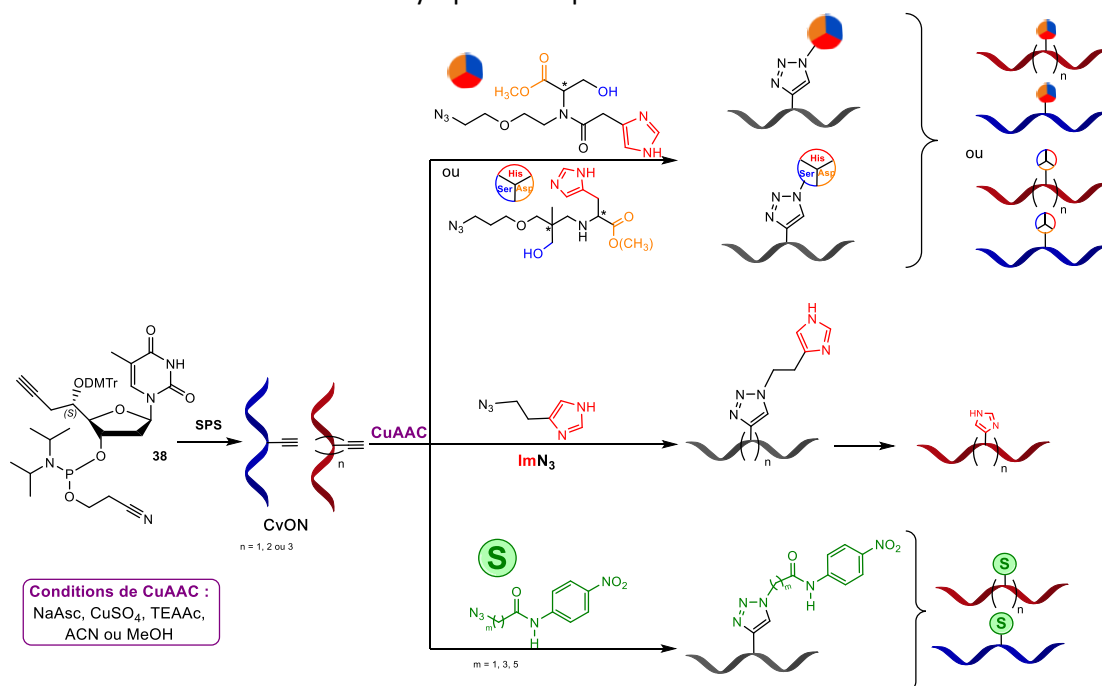


Schéma 28. Réactions de type CuAAC sur les ODN convertibles pour obtenir une bibliothèque d'ODN fonctionnalisés

Nous utilisons ici comme source de cuivre du sulfate de cuivre (CuSO₄), dans lequel le cuivre est au degré d'oxydation II. Il est réduit en présence d'ascorbate de sodium (NaAsc) dans l'eau. Du tampon acétate de triéthylammonium (TEAAc) est utilisé lors de la réaction et sert de ligand du cuivre I. Les conditions utilisées pour la fonctionnalisation des ODN sont celles utilisées usuellement au sein du laboratoire pour réaliser des réactions de CuAAC sur des oligonucléotides convertibles : 2 équivalents de CuSO₄, 10 équivalents de NaAsc, 3 équivalents d'azoture par fonction propargyle, en solution dans un mélange acétonitrile (ou méthanol), eau, tampon TEAAc.¹ Les protocoles de synthèse complets sont détaillés en partie expérimentale (§2.1, page 178).

Les premières réactions de CuAAC sur les ODN convertibles ont été réalisées sur le brin β avec les différents substrats décrits au paragraphe 2. Ces premiers essais ont permis de mettre en évidence l'instabilité des substrats ester de *p*-nitrophényle (4-nitrophenyl 2-azidoacetate, composé **26**, désigné substrat **C₁-ester** et 4-nitrophenyl 2-azidobutanoate, composé **27**, désigné substrat **C₃-ester**) dans les conditions réactionnelles, leur hydrolyse complète étant observée durant la réaction. Le cas du substrat **C₁-ester** est présenté sur le Schéma 29. En effet, si le **FuON** désiré **C** est bien formé et observé lors du suivi par spectrométrie de masse MALDI, après l'étape de dessalage par élution à l'aide de tampon TEAAc sur colonne Sephadex (G-25), seule la masse de l'ODN **B** est observée. Il s'agit du produit d'hydrolyse de l'ODN **C**, fonctionnalisé par le substrat **C₁-ester**.

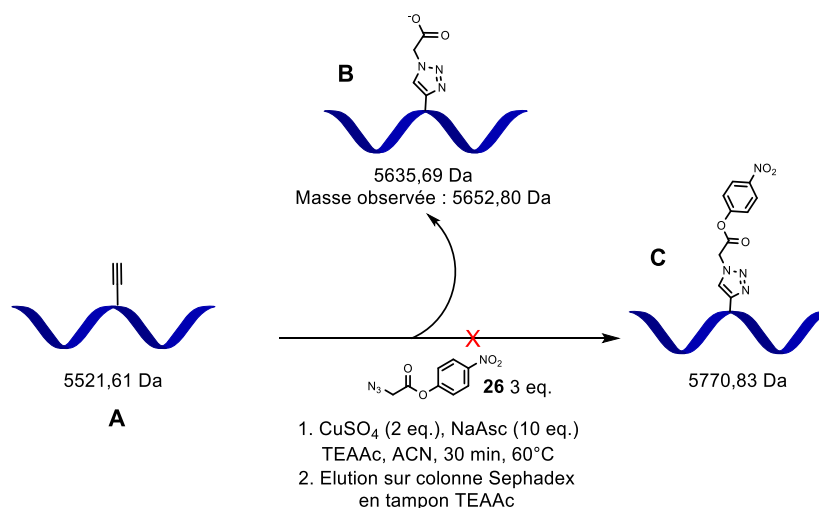


Schéma 29. Hydrolyse du résidu **26** (C1-ester) lors de son introduction sur l'ODN

Dans le cas du substrat **C₃-ester 27**, lors de l'analyse du milieu réactionnel par spectrométrie de masse MALDI, dès une demi-heure de réaction dans l'acétonitrile, deux ODN peuvent être observés, l'ODN de départ **β-11alk** et le produit issu de l'hydrolyse du **FuON** désiré. Les deux substrats **C₁-ester 26** et **C₃-ester 27** n'étant visiblement pas stable dans les conditions de réactions, leur utilisation a été abandonnée.

Les azotures des substrats amide de *p*-nitroaniline (**C₁-**, **C₃-** et **C₅-amide**) ont, quant à eux, montré une bonne réactivité et une stabilité suffisante pour mener à bien la réaction de CuAAC et les analyses, notamment HPLC (en milieu tamponné TEAAc, pH=7). Le substrat **C₁-amide (28)** a été introduit dans un premier temps sur le brin β dans les conditions standards. Pour les substrats **C₃-** et **C₅-amide (29)** et **(30)**, les conditions sont similaires mais un second ajout de CuSO₄, NaAsc et d'azoture a été nécessaire au bout d'une heure pour parachever la réaction. Le substrat **C₁-amide** a ensuite été incorporé en une ou deux positions sur le brin de séquence α dans les conditions standards, dans le but de travailler dans un premier temps avec le substrat le plus compact. Ainsi, cinq **FuON** porteur d'un substrat amide ont été obtenus.

Le **TripSer-Me (12)**, a été ensuite introduit une fois sur le β, ainsi que deux (sur les positions T₈-T₁₂ et sur les positions T₈-T₁₀) et trois fois sur le brin α. Lors de la triple incorporation, il a été nécessaire de réduire la quantité de cuivre et le temps de réaction. En effet, dans les premiers essais, après une heure de réaction et en utilisant 2 équivalents de CuSO₄ par fonction propargyle, soit 6 équivalents par ODN, l'oligonucléotide était dégradé, seuls des courts fragments étaient observables après réaction par spectrométrie de masse MALDI. Au total, quatre **FuON** porteur du **TripSer-Me** ont été synthétisés.

Le second Tripode **TripHis-Me 19**, à squelette histidine, a été introduit une seule fois sur le brin α et une seule fois sur le brin β. En parallèle, un **FuON-His³**, plus compact que les tripodes, a été synthétisé par l'incorporation de 3 dérivés 4-azido-alkyle imidazole sur le brin α. La bibliothèque d'oligonucléotides **FuON** obtenue est représentée sur la Figure 58.

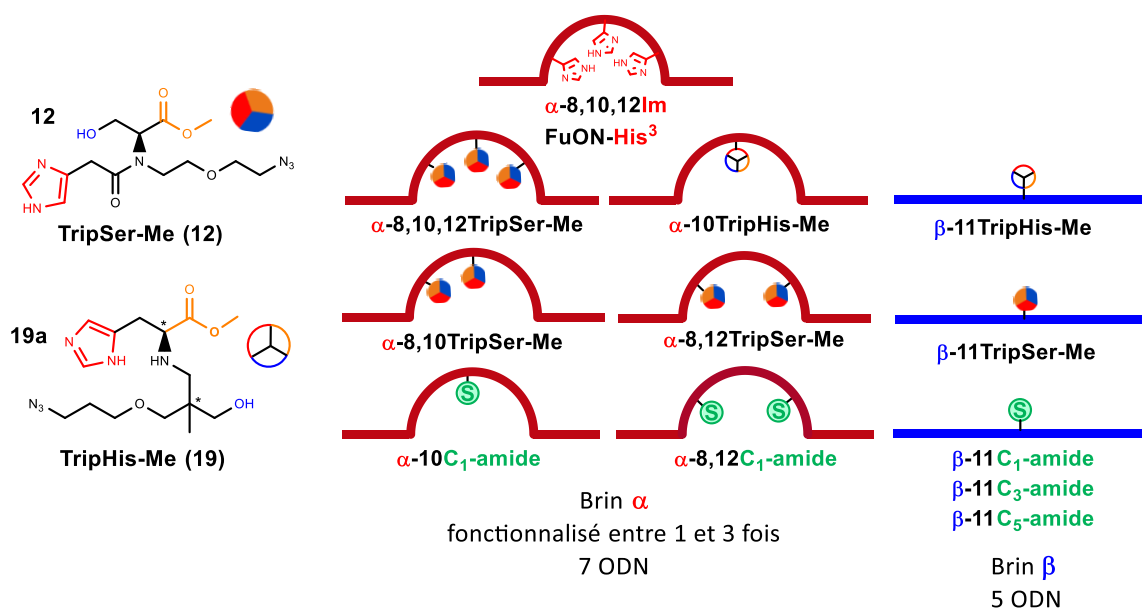


Figure 58. Représentation des 12 FuON obtenus par CuAAC

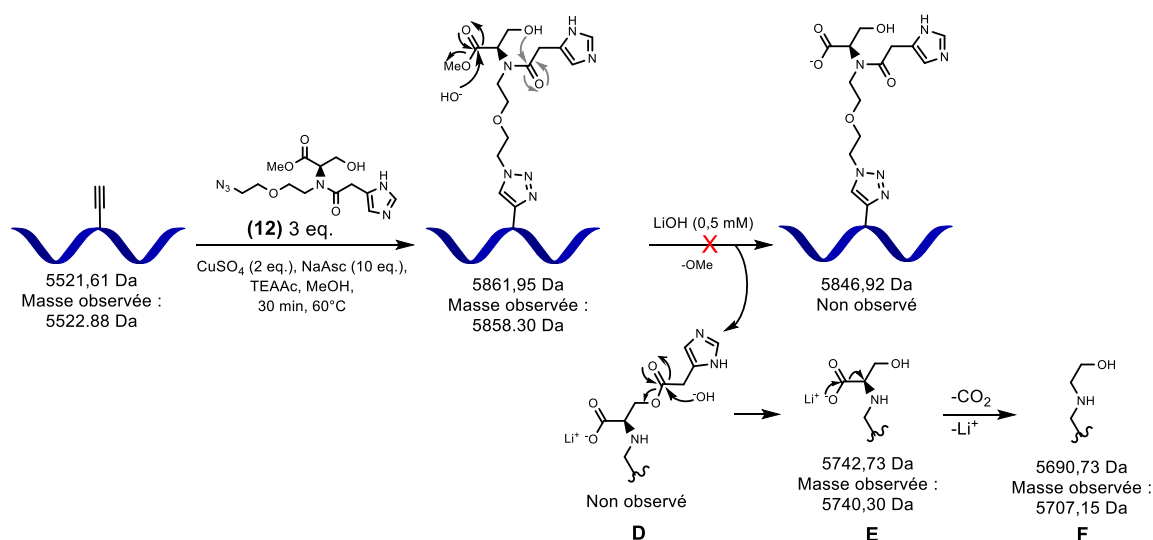
A partir de la bibliothèque de FuON obtenues, 19 combinaisons sont possibles pour l'assemblage de bulges ⁵B₁ fonctionnalisés.

3.2.4. Déprotection des FuON-Tripode en conditions basiques

Une fois les tripodes TripSer-Me ou TripHis-Me introduits sur l'oligonucléotide, la fonction carboxylate des Tripodes doit être libérée grâce à un traitement à la lithine afin d'obtenir un tripode fonctionnel.

3.2.4.1. Déprotection de FuON- TripSer-Me

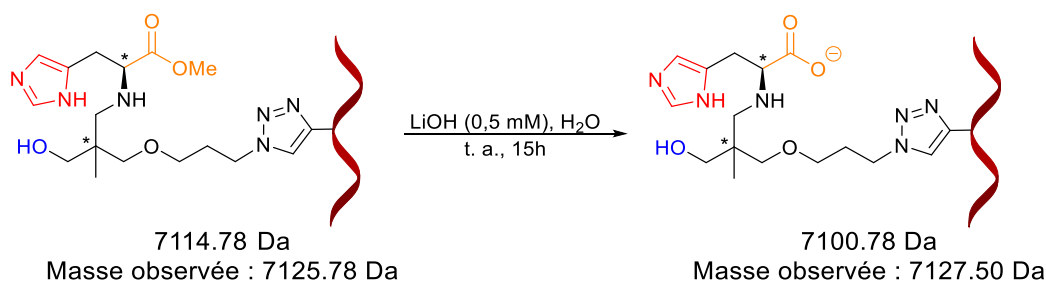
Un traitement à la lithine sur le brin β -11TripSer-Me a ainsi été effectué. Lors de l'analyse de la solution obtenue après ce traitement, les résultats de spectrométrie de masse MALDI n'ont pas permis d'observer le produit d'intérêt attendu à $m/z = 5846,9$ Da mais deux ODN de masse inférieure. Nous en avons conclu que le TripSer-Me n'est pas stable dans ces conditions basiques. L'hydrolyse directe de la fonction amide en présence de LiOH est supposée peu probable mais ne peut être totalement écartée, la stabilité du TripSer-Me seul en conditions basiques n'ayant pas été évaluée en raison de la faible quantité à disposition. Cependant, nous supposons que la fonction hydroxyle du TripSer-Me devient assez nucléophile dans ces conditions pour attaquer de façon intramoléculaire la fonction amide, conduisant au transfert du motif alkyl-imidazole et à la formation d'une fonction ester sur cette position (Schéma 30). Si cet intermédiaire **D** n'est pas observé, en revanche, le FuON **E** résultant de son hydrolyse est observé à 5740,30 Da. Le FuON **F** résultant de la décarboxylation de **E** est également observé à 5707,15 Da. Enfin, un mécanisme impliquant la fonction carboxylate pour conduire à un anhydride dont l'hydrolyse induirait la formation des ODN **E** puis **F** ne peut pas être écarté.


 Schéma 30. Étude de la dégradation du FuON β -11TripSer-Me

Le Tripode **TripHis-Me 19** apparaissant alors plus prometteur à ce stade du projet et les travaux de Nothling sur une structure similaire (mentionnées au chapitre I) n'ayant pas à l'époque été portée à notre connaissance, les expériences avec le **Tripode 12** n'ont pas été poursuivies.³

1.1.1.1. Déprotection de FuON- TripHis-Me

Dans le cas du **Tripode 19**, la problématique s'est avérée différente. Ce dernier semblait bien supporter le traitement de la lithine (Schéma 31). Cependant, la résolution de l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF à notre disposition rend difficile l'analyse des ODN obtenus post traitement lithine, en raison de la faible différence de masse (14 Da), entre l'ester de méthyle et le carboxylate d'intérêt. De plus, les analyses sur des masses supérieures à 6000 Da, sont en limite de détection de notre spectromètre MALDI-TOF. L'analyse d'un co-dépôt des ODN α -10TripHis-Me et α -10TripHis n'a pas non plus permis de confirmer ni une différence de masse, ni une absence de réaction.


 Schéma 31. Traitement LiOH de l'ODN α -10TripHis-Me

Les analyses HPLC ne se sont pas révélées plus utiles dans ce cas, car aucune différence de temps de rétention n'a été observée malgré la charge additionnelle sur l'ODN final. C'est pour contourner ce problème que le **TripHis 21** a été synthétisé.

Malheureusement, ce dernier s'est montré plus difficile à introduire par la réaction de CuAAC, probablement à cause de la présence d'une fonction carboxylate supplémentaire susceptible de complexer les ions cuivre. Dans le cas du **TripSer-Me 12** ou du **TripHis-Me 19**, seule la fonction

imidazole risquait de piéger une partie des ions cuivre engagés, mais une fois le carboxylate libéré **TripHis 21**, sa présence s'est également avérée problématique.

Des essais ont alors été réalisés en utilisant de plus larges excès de CuSO_4 (4 ou 6 équivalents contre 2 usuellement), en augmentant le temps de réaction (jusqu'à 16h) ou encore la température de réaction (jusqu'à 80°C). Dans le but de limiter la complexation du cuivre par l'azoture à clicker, l'utilisation comme ligand du complexe TBTA (Tris(benzyltriazolylmethyl)amine, ajouté aux conditions usuelles à hauteur de 1,3 eq.¹) a été testée mais n'a pas conduit non plus au résultat attendu.

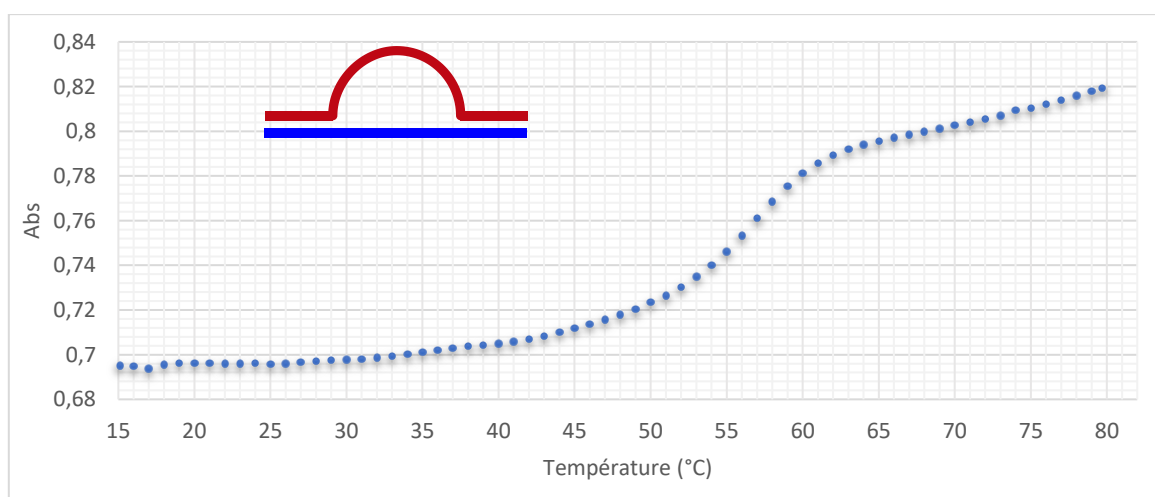
1.2. Assemblage du Bulge ⁵B₁ fonctionnalisé

1.2.1. Etude physicochimique du Bulge ⁵B₁ fonctionnalisé

Une fois synthétisés et caractérisés par spectrométrie de masse et HPLC, les **FuON** obtenus ont été mis en présence, deux à deux pour assembler des bulges. Les brins de séquences α portant des substrats ont été mis en présence en quantité équimolaire de ceux de séquence β portant un ou plusieurs Tripodes, et inversement dans le but de former des bulges présentant sur un brin, un ou des catalyseurs, et sur son complémentaire, un ou des substrats.

Les brins ainsi associés en solution sont étudiés par dénaturation thermique pour s'assurer de la formation des structures désirées. Ces études ont été menées à l'aide d'un spectromètre UV pour soumettre nos structures, en solution dans un tampon phosphate, à une rampe de température définie. Après des premiers tests de contrôle pour estimer la rampe de température idéale, il a été choisi d'utiliser une rampe variant entre 15 et 80°C , la température de fusion (T_m) du **Bulge ⁵B₁-wt**, de référence, étant de 57°C .


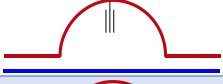
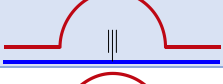
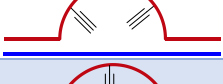
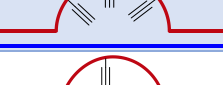
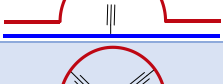
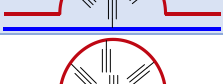
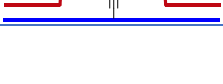
Le Graphique 3 montre l'allure des courbes de T_m pour le **Bulge ⁵B₁-wt**. Les brins fonctionnalisés sont placés en proportions équimolaires en solution dans un tampon à des concentrations calculées pour obtenir une absorbance entre 0,6 et 2.



Graphique 3. Courbe de T_m de référence pour le Bulge ⁵B₁ mesurée entre 15 et 80°C ; tampon : 200 mM NaCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, EDTA 1 Mm, pH=7

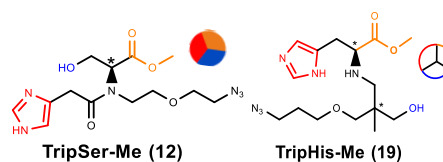
Les valeurs obtenues à partir de l'assemblage des brins convertibles (Tableau 6) révèlent une bonne tolérance de cette petite modification, puisque la variation de T_m est inférieure ou égale à $0,5^\circ\text{C}$. Ce résultat ne peut pas être considérée comme la preuve d'une quelconque stabilisation ou déstabilisation, l'écart restant dans la marge d'erreur.

Tableau 6. Valeurs de T_m mesurées pour les bulges convertibles

Entrée	Structure	Séquence et position des modifications	T_m (ΔT_m °C)
1		α 5'-GCG ACC TTT TTT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	57
2		α 5'-GCG ACC TTT T₁₀ TT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	56,5 (-0,5)
3		α 5'-GCG ACC TTT TTT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT₁₁ A GGT CGC-3'	57 (0)
4		α 5'-GCG ACC TT₈ T TT₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	56,5 (-0,5)
5		α 5'-GCG ACC TT₈ T T₁₀ TT₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	56,5 (-0,5)
6		α 5'-GCG ACC TTT T₁₀ TT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT₁₁ A GGT CGC-3'	57 (0)
7		α 5'-GCG ACC TT₈ T TT₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT₁₁ A GGT CGC-3'	57,5 (+0,5)
8		α 5'-GCG ACC TT₈ T T₁₀ TT₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT₁₁ A GGT CGC-3'	57,5 (+0,5)

Les valeurs obtenues dans le cas des bulges fonctionnalisés sont reportées dans le Tableau 7. Les bulges contenant une seule fonction (Tripode ou Substrat), quelle que soit la position et le brin portant la modification se forment bien mais une déstabilisation de plusieurs degrés apparaît déjà, $\Delta T_m = -26^\circ\text{C}$ pour le **substrat C₁-amide 28** introduit respectivement sur les brins α et β (entrées 1 et 3) ainsi que -31°C lorsque le **TripSer-Me 12** est introduit sur le brin β (entrée 4). Lorsque le **TripHis-Me 19** est introduit sur les brins α et β , il est bien mieux toléré par la structure, avec une déstabilisation de seulement $-5,5^\circ\text{C}$ sur le brin β et de -2°C pour le brin α (entrées 2 et 5). Cela montre une bien meilleure stabilité de la structure que lors de l'introduction des composés **TripSer-Me 12** ou **substrat**. Dans cette séquence, la boucle est uniquement composée de bases T hydrophobes, le **TripHis-Me 19**, plus hydrophile, a ainsi sans doute tendance à s'orienter vers l'extérieur de la structure, induisant ainsi moins de déstabilisation. Au contraire, le substrat, hydrophobe, s'oriente probablement vers le cœur de la boucle, perturbant peut être alors l'assemblage.

Tableau 7. Valeurs de T_m mesurées pour les Bulges 5B_1 fonctionnalisés
 *structure ne présentant pas une courbe de T_m exploitable



Entrée	Référence Bulge	Séquence et position des modifications	T_m (°C)
1		α 5'-GCG ACC TTT T ₁₀ TT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	31
2		α 5'-GCG ACC TTT T ₁₀ TT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	55
3		α 5'-GCG ACC TTT T ₁₀ TT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	31
4		α 5'-GCG ACC TTT TTT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT ₁₁ A GGT CGC-3'	26
5		α 5'-GCG ACC TTT TTT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT ₁₁ A GGT CGC-3'	51,5
6		α 5'-GCG ACC TT ₈ T TTT ₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	X*
7		α 5'-GCG ACC TT ₈ T TTT ₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	X*
8		α 5'-GCG ACC TT ₈ T T ₁₀ TT ₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	X*
9		α 5'-GCG ACC TTT T ₁₀ TT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT ₁₁ A GGT CGC-3'	X*
10		α 5'-GCG ACC TTT T ₁₀ TT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT ₁₁ A GGT CGC-3'	X*
11		α 5'-GCG ACC TT ₈ T TTT ₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT ₁₁ A GGT CGC-3'	X*
12		α 5'-GCG ACC TT ₈ T TTT ₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT ₁₁ A GGT CGC-3'	X*
13		α 5'-GCG ACC TT ₈ T TTT ₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TT ₁₁ A GGT CGC-3'	X*
14		α 5'-GCG ACC TT ₈ T T ₁₀ TT ₁₂ AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	X*

Si les résultats précédents semblaient encourageants pour l'incorporation de plusieurs modifications dans le bulge, dès l'introduction de deux motifs, que ce soit sur le même brin ou un sur chaque brin, l'assemblage ne se révèle pas stable. En effet, même lorsque la valeur de T_m mesurée est faible comparée à la référence, les courbes obtenues correspondent bien à l'allure à des courbes de T_m usuelles (sigmoïde aux deux paliers marqués) et permettent l'obtention d'une valeur de T_m (Tableau 3, entrées : 1, 2, 3). Dans les derniers cas, les profils obtenus sont plus irréguliers semblant révéler un mauvais appariement ou un appariement partiel des brins (entrée : 6 à 14). Une valeur de T_m peut toujours être extrapolée à partir des dérivées obtenues mais n'a pas de sens véritable.

Les résultats de l'étude par dénaturation thermique des différents **Bulges** 5B_1 fonctionnalisés révèlent clairement que ceux-ci ne se forment pas complètement. La taille de la boucle est sans doute trop petite pour tolérer les modifications ce qui peut résulter en des bulges semi-formés (appariés sur une seule extrémité) ou des brins complètement non appariés.

1.2.2. Etudes complémentaires de dénaturation thermique

Dans le cas de notre approche, un bulge partiellement apparié (sur une seule extrémité par exemple) ne représente pas forcément un point complètement négatif. En effet, si le bulge oscille entre un état complètement structuré (apparié sur les deux extrémités) et un état demi-apparié, cela peut permettre d'assurer un certain dynamisme, un certain *turn-over*, permettant au système d'avoir une meilleure efficacité. Ainsi, il faut s'assurer des conformations prises par le **Bulge** ⁵B₁ pour étudier une hydrolyse potentielle et pouvoir améliorer la structure. Pour pouvoir conclure avec précision sur le cas des bulges dont les courbes de T_m semblaient irrégulières, une série de nouveaux brins a été synthétisé pour réaliser une étude comparative. Dans une partie des cas, les brins sont tronqués sur une extrémité (après la zone de la boucle) et dans l'autre, leur séquence sur l'une de leurs extrémités est mélangée (scrambled). L'analyse de leur appariement par dénaturation thermique lorsque placé face aux brins **α-wt** ou **β-wt** permettra d'élucider s'il s'agit d'un appariement partiel, sur une extrémité seulement ou si le bulge ne se forme pas du tout.

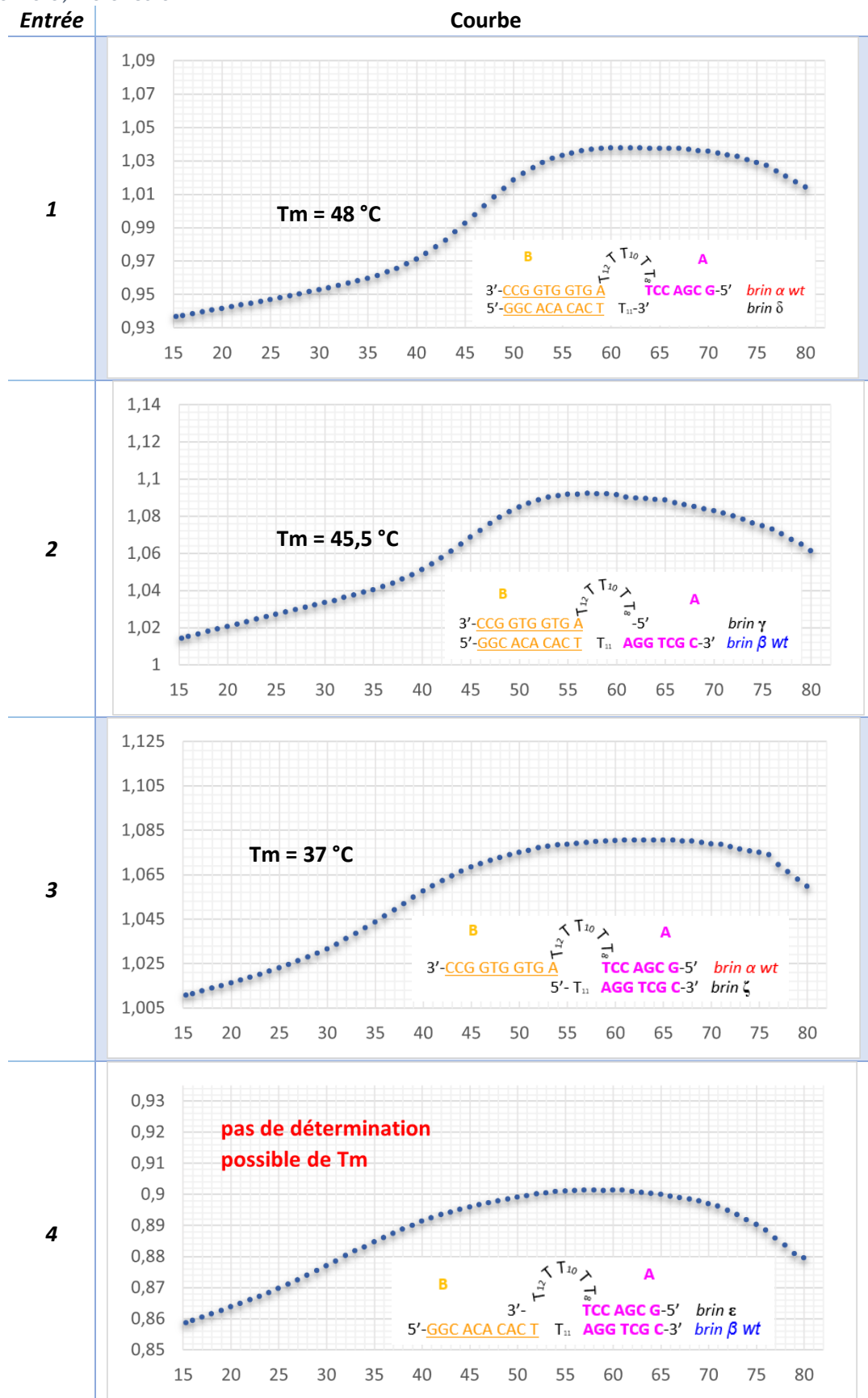
Tableau 8. Séquences des brins tronqués et scrambled

Nom	Séquence	Type
γ	3'-CCG GTG GTG A ^{TT} TTT-5'	α tronqué en A
δ	5'-GGC ACA CAC T ^{T-3'}	β tronqué en A
ε	3'-TTT TT ^T CCA GCG-5'	α tronqué en B
ζ	A GGT CGC-3'	β tronqué en B
η	3'-CCG GTG GTG A ^{TT TTT} GTA CCG C-5'	α scrambled en A
θ	5'-GGC ACA CAC T ^T CATG GCG-3'	β scrambled en A
ι	3'-CTA GTG TGC G ^{TT TTT} T CC AGC G-5'	α scrambled en B
κ	5'-GAT CAC ACG C ^T A GGT CGC-3'	β scrambled en B

Une fois synthétisées et analysées les nouvelles séquences tronquées ou scrambled sont combinées avec les séquences des brins α ou β wild-type et analysés par dénaturation thermique. Les courbes et valeurs de T_m obtenues sont répertoriées dans les Tableaux 9 et 10.

Le Tableau 9 présente les résultats obtenus avec les brins tronqués. Les entrées 1 et 2 montrent respectivement les résultats obtenus lorsque la partie A est manquante sur le brin β ou sur le brin α . Dans les deux cas, une sigmoïde nette peut être observée, présentant deux paliers et un point d'inflexion lisible. Ainsi, une valeur de T_m peut être lue, respectivement 48°C et $45,5^\circ\text{C}$ dans le cas du brin β ou du brin α tronqué (entrées 1 et 2). Ces valeurs sont évidemment plus basses que les 57°C de référence du **Bulge** $^5\text{B}_1$ puisqu'il n'y a ici qu'un appariement partiel de la structure. Lorsque le brin β est tronqué en B, l'appariement semble avoir lieu mais la valeur de T_m obtenue est significativement plus basse que les précédentes, 37°C contre 48° dans le cas du brin β tronqué en A (Tableau 9, entrée 3). Dans le dernier cas, où le brin α est tronqué en B, le résultat observé montre une courbe peu marquée où seul est lisible le palier initial, révélant sans doute un appariement-déappariement permanent des deux brins. Les extrémités A et B étant de longueurs différentes, la partie A comportant 7 bases complémentaires là où la partie B en comporte 10, il paraît cohérent d'observer que le non appariement de la zone B soit délétère à un assemblage des deux brins en un bulge stable. De plus quand la partie B est non appariée, celle-ci peut induire un plus large encombrement stérique.

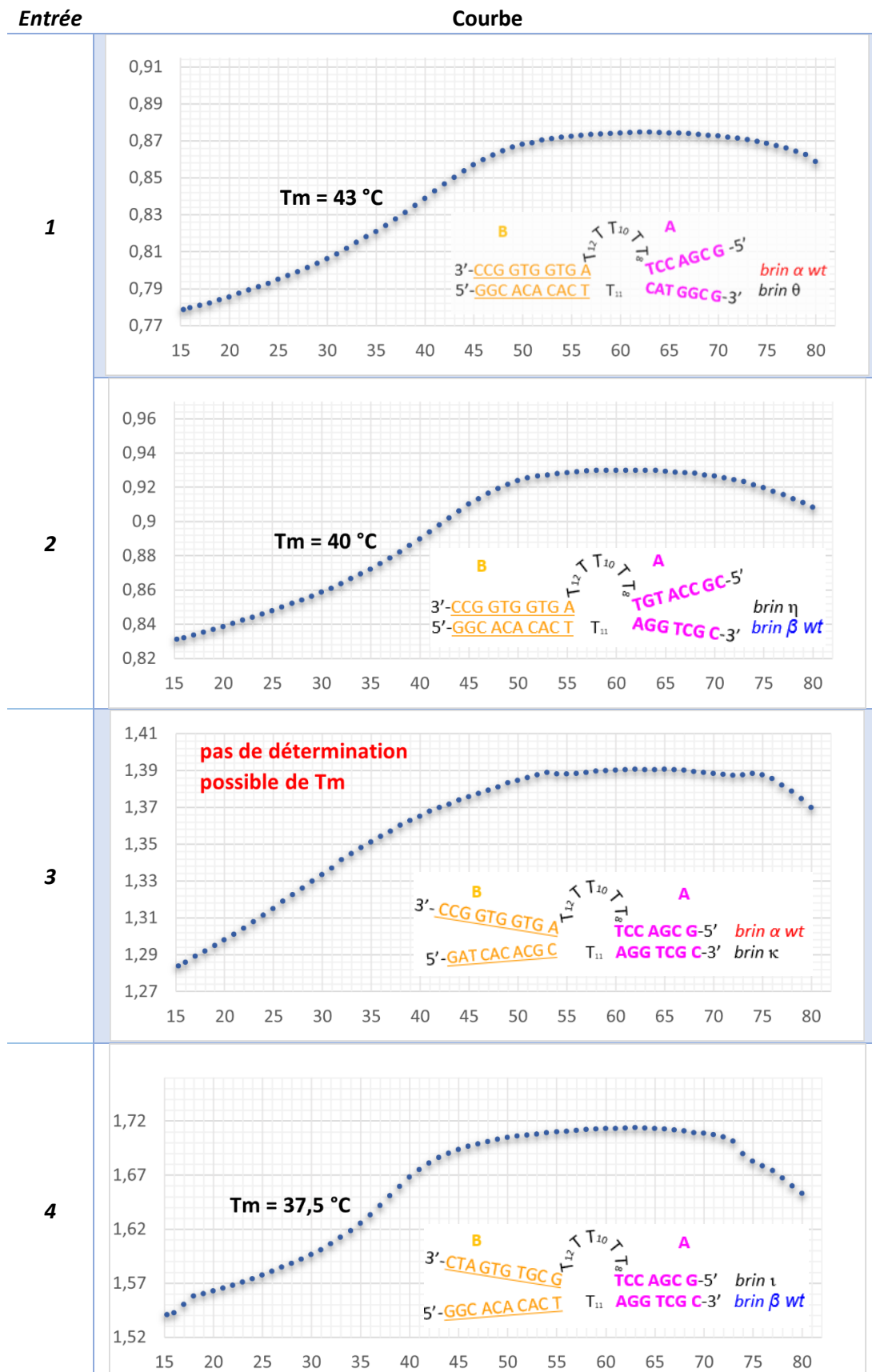
Tableau 9. Courbes de T_m des séquences tronquées (Abscisse : Température (°C) ; Ordonnée : Absorbance)
 • 80°C - 15°C ; • 15°C - 80°C



Le Tableau 10 répertorie de la même manière les résultats de l'étude de dénaturation thermique menée sur des bulges partiellement assemblés à partir de brins dont la séquence d'une des extrémités est mélangées, dite « scrambled ». Les entrées 1 et 2 du Tableau 10 montrent des sigmoïdes marquées et des valeurs de T_m semblant révéler un bon appariement des extrémités complémentaires dans le cas où seule l'extrémité A est rendue non complémentaire et où l'extrémité B est appariée. Les valeurs de T_m obtenues sont respectivement de 43°C et 40°C. Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues dans le cas des brins tronqués équivalents (tronqués en A, appariés en B) conséquences de l'encombrement provoqué par les deux extrémités A non appariées quand elles se retrouvent proches l'une de l'autre. L'entrée 3 montre le cas dans lequel le brin β est modifié et rendu complémentaire sur son extrémité B : la courbe obtenue n'atteint pas de palier révélant sans doute un appariement-désappariement permanent des deux brins. Finalement, lorsque le brin α est modifié sur son extrémité B (entrée 4), la courbe de T_m montre une stabilité très relative de l'assemblage ($T_m = 37,5^\circ\text{C}$) peut-être due à la complémentarité partielle de la partie B des séquences présentées l'une à l'autre.

Tableau 10. Courbes de T_m des séquences scrambled

Abscisse : Température (°C) ; Ordonnée : Absorbance – • 80°C - 15°C ; • 15°C - 80°C



Les expériences avec les brins dits « scrambled » se rapprochent le plus de notre cas d'étude puisque les séquences sont de même longueur ce qui permet de prendre en compte le mouvement de l'extrémité d'un brin non apparié. L'allure caractéristique observée sur la courbe présentée à l'entrée 3 du Tableau 10, correspond à celle obtenue dans les cas où les **Bulge** 5B_1 fonctionnalisés ne s'assemblaient pas. Cela tend à confirmer la formation d'un appariement partiel des brins fonctionnalisés.

Dans les deux cas (extrémités tronquées ou modifiées), cette étude confirme que les extrémités complémentaires des brins α et β sont trop courtes pour permettre de stabiliser la structure bulge quand des modifications de taille importante y sont incorporées à cause de la gêne stérique engendrée.

2. Assemblage des Bulges 5B_3 , 7B_1 et 7B_3 fonctionnalisés

2.1.1. Synthèse des CvON

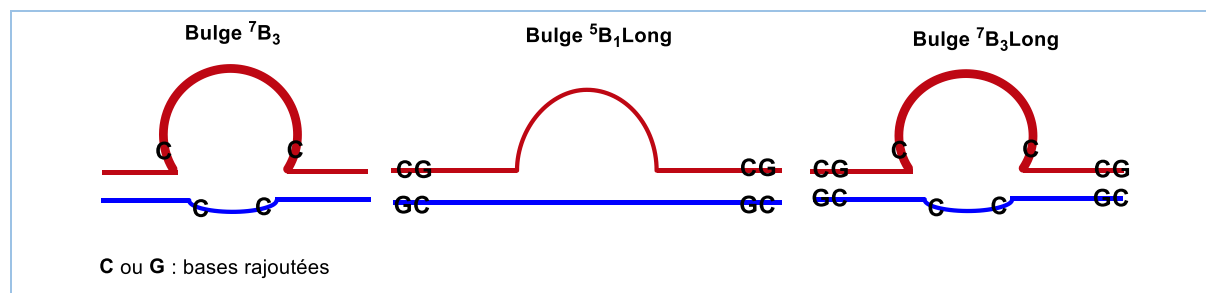
Les résultats obtenus lors de l'étude du **Bulge** 5B_1 ont révélé que cette structure n'a pas la stabilité nécessaire pour tolérer plusieurs modifications au sein de la boucle. L'objectif de cette approche étant de présenter face à face au sein d'une boucle un substrat et un organocatalyseur, il est nécessaire de synthétiser de nouvelles séquences permettant d'assembler un bulge capable de tolérer nos modifications.

Les nouvelles séquences synthétisées sont de 3 types, répertoriées dans le Tableau 11. Le premier des trois nouveaux types de bulge étudiés comporte une boucle agrandie, deux cytosines (C) ont été ajoutées à la séquence de chaque brin avant et après la zone non appariées de la séquence, les nouveaux brins obtenus λ et μ correspondent respectivement aux brins α et β dont la boucle a été agrandie.

Le second type consiste en un bulge dont les extrémités ont été allongées en 5' et en 3' pour chaque brin par une paire de base guanine-cytosine (GC), étendant l'appariement global de la nouvelle structure de 4 paires de bases au total. Les nouveaux brins sont désignés ν (pour le brin α) et ξ (pour β).

Finalement le troisième type de bulge associe ces deux types de modifications pour créer un bulge dont à la fois la boucle est élargie et les extrémités étendues pour espérer combiner une meilleure tolérance des modifications grâce à la souplesse augmentée de la boucle et une plus grande stabilité, grâce à de plus longues extrémités appariées. Ces différentes séquences vont permettre l'assemblage de nouveaux bulges. Le **Bulge** 7B_3 , dont seule la boucle est agrandie, le **Bulge** $^5B_1\text{Long}$, dont seules les extrémités sont étendues, et finalement le **Bulge** $^7B_3\text{Long}$ dont la boucle est agrandie et les extrémités étendues ont été synthétisés. Des bulges hybrides seront également décrits par le biais de cette dénomination, la mention "Long" étant accolée pour les bulges dont les brins ont été étendus de part et d'autre.

Tableau 11. Séquences des nouveaux brins étendus, dans la boucle et/ou aux extrémités



Ref	Séquence rallongée (bases ajoutées <u>X</u>)	Type
λ	λ 5'-GCG ACC <u>TCT</u> TTT <u>TCA</u> GTG TGT GCC-3'	Boucle agrandie sur α
μ	μ 5'-GGC ACA CAC <u>TCT</u> <u>CAG</u> GTC GC-3'	Boucle agrandie sur β
ν	ν 5'- <u>CGG</u> CGA CCT TTT TTA GTG TGT GCC <u>CG</u> -3'	Extrémités rallongées sur α
ξ	ξ 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT TAG GTC <u>GCC</u> <u>G</u> -3'	Extrémités rallongées sur β
\omicron	\omicron 5'- <u>CGG</u> CGA CCT <u>CTT</u> TTT <u>CAG</u> TGT GTG <u>CCC</u> <u>G</u> -3'	Boucle et extrémités rallongées sur α
π	π 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT <u>CTC</u> AGG TCG <u>CCG</u> -3'	Boucle et extrémités rallongées sur β

Comme précédemment, les nouvelles séquences ont d'abord été synthétisées sans modifications puis avec des fonctions propargyle aux positions d'intérêt, toujours par synthèse supportée automatisée et à l'aide du phosphoramidite convertible **38** avec des rendements quantitatifs. Leurs caractéristiques, en spectrométrie de masse MALDI-TOF et chromatographie HPLC, sont regroupées dans la partie expérimentale (§1, page 176). Au total, 22 bulges différents peuvent ensuite être assemblés en combinant les brins **wt** et **CvON** correspondant aux séquences présentées dans le Tableau 11 et les brins α -**wt** et β -**wt**.

Les bulges assemblés comportent au maximum une fonction propargyle par brin, ainsi $^{7alk}B_1$ indique par exemple la présence d'une fonction propargyle au cœur de la boucle du bulge 7B_1 , et la notation $^7B_{1alk}$ une fonction propargyle dans la zone non appariée face à la boucle.

2.1.2. Assemblage et études de dénaturation thermique des bulges étendus


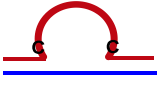
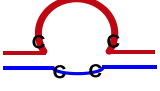
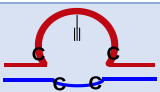

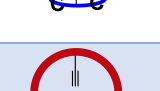
Différents bulges ont été assemblés et étudiés par dénaturation thermique suivant les rampes de température décrites précédemment.

Dans le Tableau 12, sont présentés les résultats obtenus lors de l'assemblage de bulges à partir de brins dont la boucle est agrandie. Si les résultats obtenus pour les bulges **Bulge** 7B_1 et 5B_3 donnent des valeurs de T_m de 53°C ou 55°C (entrée 2 et 3), ils ne montrent toujours pas une stabilité suffisante, en regard du **Bulge** 5B_1 présentant une valeur de T_m de 57°C (entrée 1). Le **Bulge** 7B_3 présente également une bien moins grande stabilité, une différence de valeur de T_m de -5°C (entrée 4 comparée à l'entrée 1).

L'introduction d'une fonction propargyle dans les **Bulges** 7B_3 , sur le brin de la boucle (entrée 5) comme sur son complémentaire (entrée 6) a montré comme précédemment une faible influence sur la stabilité de la structure puisqu'une légère stabilisation (+1°C) est observée dans le cas de $^{7alk}B_3$, alors qu'aucun effet n'est observé pour $^7B_{3alk}$. Le **Bulge** $^{7alk}B_{3alk}$ assemblé à partir des deux brins porteurs d'un groupement propargyle, subit de façon cohérente une stabilisation similaire de +1°C (entrée 7).

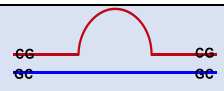
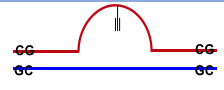
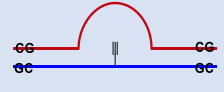
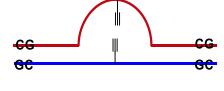
L'augmentation seule de la taille de la boucle n'induisant pas une stabilité suffisante, ces séquences n'ont pas été considérées pour la suite et n'ont pas été fonctionnalisées.

Tableau 12. Valeurs de T_m mesurées pour les *Bulge* 7B_3

Entrée	Noms	Structure Bulge	Séquence et position des modifications	T_m (°C)
1	5B_1 -wt		α 5'-GCG ACC TTT TTT AGT GTG TGC C-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	57 (Bulge 5B_1 -wt)
2	7B_1 -wt		λ 5'-GCG ACC TCT TTT TCA GTG TGT GCC-3' β 5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	53
3	5B_3 -wt		α 5'-GCG ACC TTT TTT AGT GTG TGC C-3' μ 5'-GGC ACA CAC TCT CAG GTC GC-3'	55
4	7B_3 -wt		λ 5'-GCG ACC TCT TTT TCA GTG TGT GCC-3' μ 5'-GGC ACA CAC TCT CAG GTC GC-3'	52
5	7alkB_3		λ 5'-GCG ACC TCT TTT TCA GTG TGT GCC-3' μ 5'-GGC ACA CAC TCT CAG GTC GC-3'	53
6	${}^7B_{3alk}$		λ 5'-GCG ACC TCT TTT TCA GTG TGT GCC-3' μ 5'-GGC ACA CAC TCT CAG GTC GC-3'	52
7	${}^7alkB_{3alk}$		λ 5'-GCG ACC TCT TTT TCA GTG TGT GCC-3' μ 5'-GGC ACA CAC TCT CAG GTC GC-3'	53

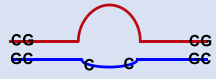
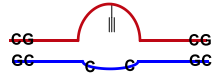
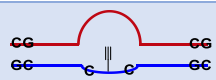
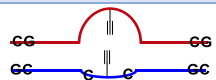
Dans le Tableau 13, les entrées 1 à 4 présentent les résultats obtenus lorsque les extrémités des brins sont étendues. La valeur de T_m mesurée pour la séquence wild-type du **Bulge** 5B_1 Long constitue un résultat attendu et prometteur puisqu'il est de 68,5°C (entrée 1). Dans les cas où sont introduites une ou deux fonctions propargyle, la stabilité globale de la structure n'est pas modifiée (entrées 2 à 4).

Tableau 13. Valeurs de T_m mesurées pour les *Bulge* 5B_1 Long

Entrée	Noms	Structure Bulge	Séquence et position des modifications	T_m (°C)
1	5B_1 long		ν 5'-CGG CGA CCT TTT TTA GTG TGT GCC CG-3' ξ 5'-CGG GCA CAC ACT TAG GTC GCC G-3'	68,5
2	${}^{5alk}B_1$ long		ν 5'-CGG CGA CCT TTT TTA GTG TGT GCC CG-3' ξ 5'-CGG GCA CAC ACT TAG GTC GCC G-3'	68
3	${}^5B_{1alk}$ long		ν 5'-CGG CGA CCT TTT TTA GTG TGT GCC CG-3' ξ 5'-CGG GCA CAC ACT T ₁₃ AG GTC GCC G-3'	68
4	${}^{5alk}B_{1alk}$ long		ν 5'-CGG CGA CCT TTT TTA GTG TGT GCC CG-3' ξ 5'-CGG GCA CAC ACT T ₁₃ AG GTC GCC G-3'	68




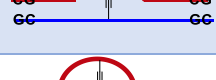
Des bulges mixtes ont finalement été assemblés, leurs brins possédant tous une extension des extrémités mais la boucle n'étant rallongée que sur l'un des brins. Les résultats sont présentés dans les Tableau 14 et Tableau 15. Le **Bulge** ⁵**B₃Long-wt** (Tableau 14) présente une valeur de T_m de 67°C (entrée 1). Lors de l'assemblage de ⁵**B₃Long** (entrée 2), de ⁵**B₃alkLong** (entrée 3) ou ⁵**B₃alkLong** (entrée 4), la variation de valeur de T_m reste faible (+1°C) ou inexistante, révélant une bonne tolérance à la modification de la part de la structure.

Tableau 14. Valeurs de T_m mesurées pour les **Bulge** ⁵**B₃Long**

Entrée	Noms	Structure Bulge	Séquence et position des modifications	T _m (°C)
1	⁵ B₃long		ν 5'- <u>CGG</u> CGA CCT TTT TTA GTG TGT GCC <u>CG</u> -3' π 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT <u>CTC</u> AGG TCG <u>CCG</u> -3'	67
2	⁵ B₃alklong		ν 5'- <u>CGG</u> CGA CCT TTT T₁₂ TTA GTG TGT GCC <u>CG</u> -3' π 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT <u>CTC</u> AGG TCG <u>CCG</u> -3'	68
3	⁵ B₃alklong		ν 5'- <u>CGG</u> CGA CCT TTT TTA GTG TGT GCC <u>CG</u> -3' π 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT CT₁₄C AGG TCG <u>CCG</u> -3'	67
4	⁵ B₃alklong		ν 5'- <u>CGG</u> CGA CCT TTT T₁₂ TTA GTG TGT GCC <u>CG</u> -3' π 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT CT₁₄C AGG TCG <u>CCG</u> -3'	68

Dans le cas du **Bulge** ⁷**B₁Long** (Tableau 15), la valeur de T_m de référence est de 67°C également (entrée 1). ⁷**B₁long** révèle une perte de stabilité par rapport au **wt** (entrée 2, ΔT_m= -2,5°C) alors que ⁷**B₁alklong** montre une légère stabilisation (entrée 3, ΔT_m= +1°C). Dans le cas de ⁷**B₁alklong** (entrée 23), les deux effets opposés observés sur ce bulge se compensent partiellement (entrée 4, ΔT_m= -0,5°C) ce qui permet au **Bulge** ⁷**B₁Long** comportant deux motifs convertibles de conserver une bonne stabilité.

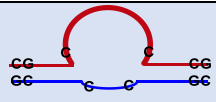
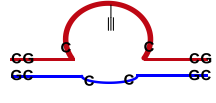
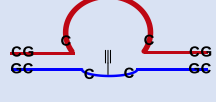
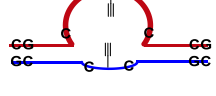
Tableau 15. Valeurs de T_m mesurées pour les **Bulge** ⁷**B₁Long**

Entrée	Noms	Structure Bulge	Séquence et position des modifications	T _m (°C)
1	⁷ B₁long		ο 5'- <u>CGG</u> CGA CCT CTT TTT CAG TGT GTG <u>CCC G</u> -3' ξ 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT TAG GTC <u>GCC G</u> -3'	67
2	⁷ B₁alklong		ο 5'- <u>CGG</u> CGA CCT CTT T₁₂ TT CAG TGT GTG <u>CCC G</u> -3' ξ 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT TAG GTC <u>GCC G</u> -3'	64,5
3	⁷ B₁alklong		ο 5'- <u>CGG</u> CGA CCT CTT TTT CAG TGT GTG <u>CCC G</u> -3' ξ 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT T₁₃ AG GTC <u>GCC G</u> -3'	68
4	⁷ B₁alklong		ο 5'- <u>CGG</u> CGA CCT CTT T₁₂ TT CAG TGT GTG <u>CCC G</u> -3' ξ 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT T₁₃ AG GTC <u>GCC G</u> -3'	66,5

Les bulges combinant une boucle agrandie et des brins aux extrémités étendues ont finalement été étudiés (Tableau 16). Le **Bulge** ⁷**B₃Long** (entrée 1) présente une valeur de T_m de 65,5°C, résultat également encourageant du fait que cette valeur est maintenue quand pour ⁷**B₃alklong** (entrée

2, $\Delta T_m = 0^\circ\text{C}$), ou ${}^7\text{B}_{3\text{alk}}\text{long}$ (entrée 3, $+0,5^\circ\text{C}$), et également pour ${}^{7\text{alk}}\text{B}_{3\text{alk}}\text{long}$, contenant les deux propargyle (entrée 4, $+0,5^\circ\text{C}$).

Tableau 16. Valeurs de T_m mesurées pour les *Bulge* ${}^7\text{B}_3\text{Long}$

Entrée	Noms	Structure Bulge	Séquence et position des modifications	T_m ($^\circ\text{C}$)
1	${}^7\text{B}_3\text{long}$		o 5'- <u>CGG</u> CGA CCT CTT TTT CAG TGT GTG <u>CCC</u> G-3' π 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT <u>CTC</u> AGG TCG <u>CCG</u> -3'	65,5
2	${}^{7\text{alk}}\text{B}_3\text{long}$		o 5'- <u>CGG</u> CGA CCT CTT T₁₃ TT CAG TGT GTG <u>CCC</u> G-3' π 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT <u>CTC</u> AGG TCG <u>CCG</u> -3'	65,5
3	${}^7\text{B}_{3\text{alk}}\text{long}$		o 5'- <u>CGG</u> CGA CCT CTT TTT CAG TGT GTG <u>CCC</u> G-3' π 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT CT₁₄ C AGG TCG <u>CCG</u> -3'	66
4	${}^{7\text{alk}}\text{B}_{3\text{alk}}\text{long}$		o 5'- <u>CGG</u> CGA CCT CTT T₁₃ TT CAG TGT GTG <u>CCC</u> G-3' π 5'- <u>CGG</u> GCA CAC ACT CT₁₄ C AGG TCG <u>CCG</u> -3'	65,8

Globalement, l'extension des extrémités permet visiblement une bonne stabilisation des structures, même lorsque la boucle est agrandie de 2 ou 4 nucléotides, ce qui apparaît prometteur pour l'introduction de modifications en son sein. Ainsi, les structures de type **Bulge** ${}^5\text{B}_1\text{Long}$, ${}^7\text{B}_1\text{Long}$, ${}^7\text{B}_3\text{Long}$, et ${}^5\text{B}_3\text{Long}$ (Figure 59) ayant révélées des résultats prometteurs, les brins correspondants à ces structures (séquences **o**, **π**, **v** et **ξ**, Tableau 11) seront à l'avenir fonctionnalisés par le **TripHis-Me (19)** et le substrat **C₁-amide 28** pour permettre l'assemblage de brins fonctionnalisés.

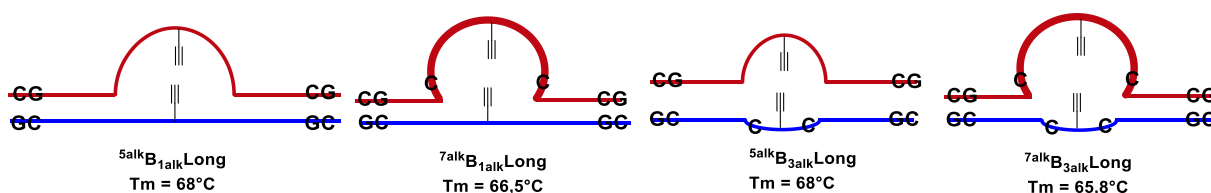


Figure 59. Structure des *Bulges* convertibles retenus pour fonctionnalisation

3. Premiers tests d'hydrolyse

N'ayant pu obtenir à ce stade des structures stables présentant face à face au sein d'un bulge, un substrat à hydrolyser et un organocatalyseur, il a été envisagé de mettre en place un test d'hydrolyse d'un substrat en solution. Des composés similaires aux substrats azotures **C₁-amide** ou **-ester 28** et **26**, l'acétate de *p*-nitrophényle et l'acétate de *p*-nitroanilide, ont été présentés en solution pour évaluer des structures portant un des organocatalyseurs.

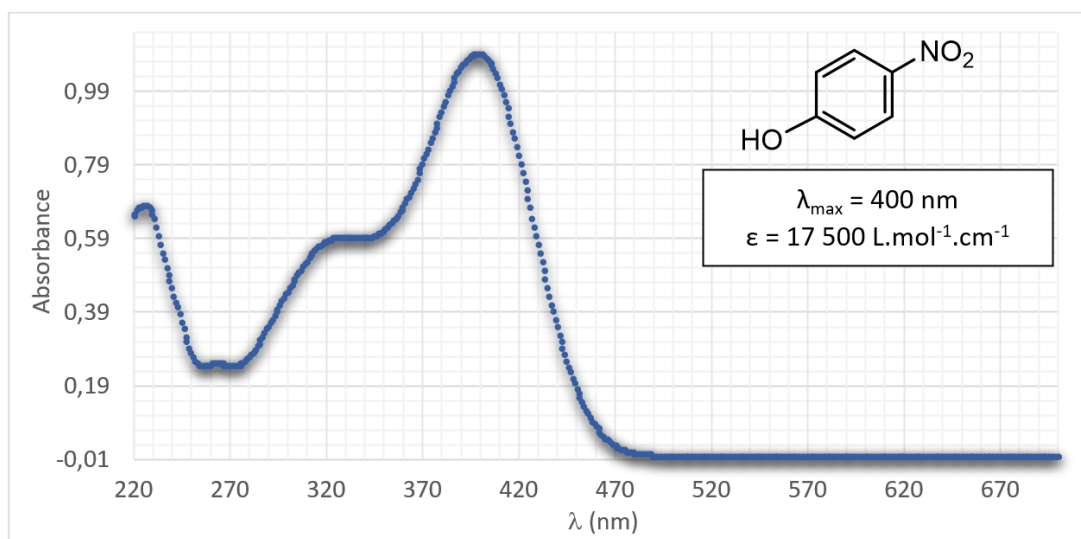
Lors des études spectroscopiques réalisées pour évaluer l'activité catalytique d'un système, il faut dans un premier temps de s'assurer de travailler à une concentration suffisante pour permettre

la détection correcte du signal du produit d'hydrolyse. Toutes les mesures d'absorbance décrites dans ce paragraphe sont effectuées dans un tampon phosphate.

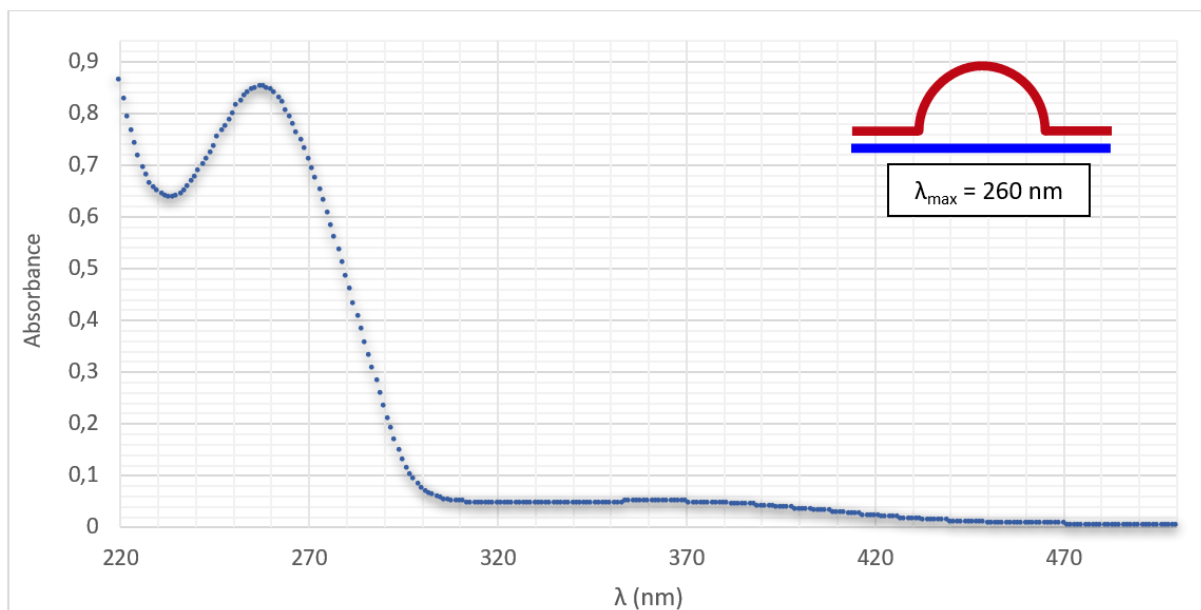
2.2.1.1. Etude UV de l'acétate de *p*-nitrophénol et du *p*-nitrophénol

Le spectre de l'acétate de *p*-nitrophényle, présenté en partie expérimentale (§3.2.1, page 182), révèle une absorbance maximale à 275 nm. L'inconvénient de cette longueur d'onde (λ) est qu'elle est proche de la longueur d'onde d'observation des ODN, 260 nm, et ainsi ne permettra pas de doser aisément la concentration en acétate de *p*-nitrophénol. Il faudra donc se focaliser sur l'augmentation de la concentration en *p*-nitrophénol, plutôt que sur la décroissance de celle en acétate de *p*-nitrophénol pour permettre une mesure fiable de l'hydrolyse.

Le spectre du *p*-nitrophénol (*p*NP), Graphique 4, révèle deux pics d'absorbance un à 320 nm et un second à 400 nm. Ils correspondent aux deux formes, protonée et non déprotonée, du *p*-nitrophénol qui coexistent en solution à pH=7 (le pK_a de la fonction étant de 7,08). Pour étudier rigoureusement et de façon reproductible une quantité de *p*NP, l'absorbance sera mesurée au point isobestique à 348 nm. En effet, à cette longueur d'onde, quel que soit le pH, l'absorbance sera spécifique à une concentration donnée.⁴



Dans le cas de l'utilisation de l'acétate de *p*-nitrophényle comme substrat, le λ_{max} mesuré étant suffisamment éloigné du λ_{max} du *p*-nitrophénol, il s'agit ensuite de s'assurer de la concentration minimale en *p*-nitrophénol pour permettre sa détection en présence d'un ODN. Dans les conditions usuelles, pour une concentration en ODN (environ 5 μ M pour les séquences d'intérêt) permettant de mesurer à 260 nm une absorbance d'environ 1, l'absorbance à 348 nm (λ_{max} d'analyse pour le *p*-nitrophénol) est de 0,048.

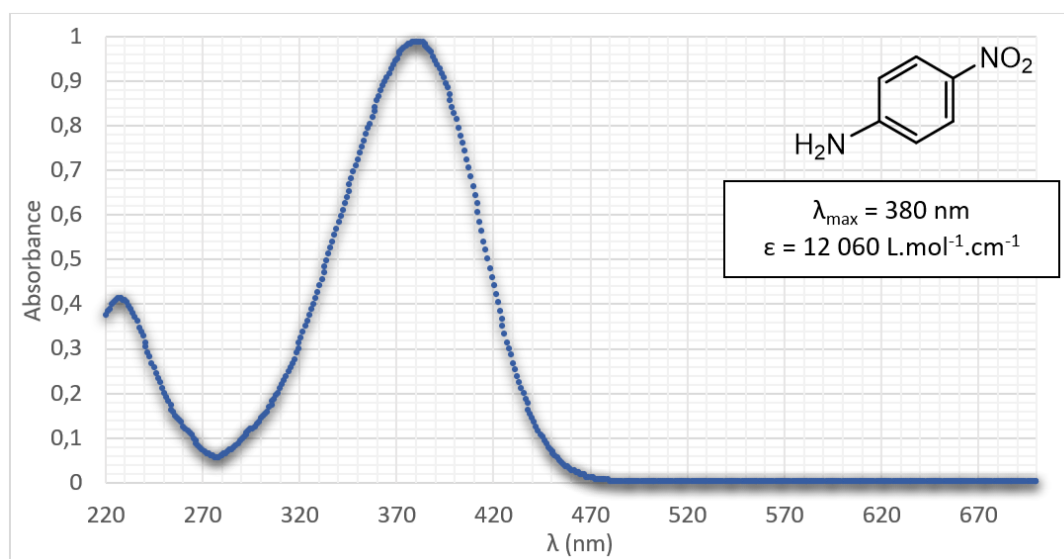


Graphique 5. Mesure d'absorbance en 220 et 500 nm pour le bulge-*w*t (Concentration totale en ODN 5 μ M); tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7

2.2.1.2. Etude UV de l'acétate de *p*-nitroaniline et du *p*-nitroaniline

Le spectre du substrat acétate de *p*-nitroanilide (*p*NAA), révèle un pic d'absorbance à 318 nm (partie expérimentale §3.2.1, page 182). Un maximum à cette longueur d'onde n'interférera pas significativement avec l'absorbance des ODN, mesurée à 260 nm.

L'analyse de la *p*-nitroaniline (*p*NA), révèle un maximum d'absorbance à 380 nm (Graphique 6), longueur d'onde suffisamment éloignée de 260 nm et de 318 nm pour permettre aux absorbances des ODN et de l'acétate de *p*-nitroanilide de ne pas trop influencer sur celle de la *p*-nitroaniline lorsqu'ils sont en présence.

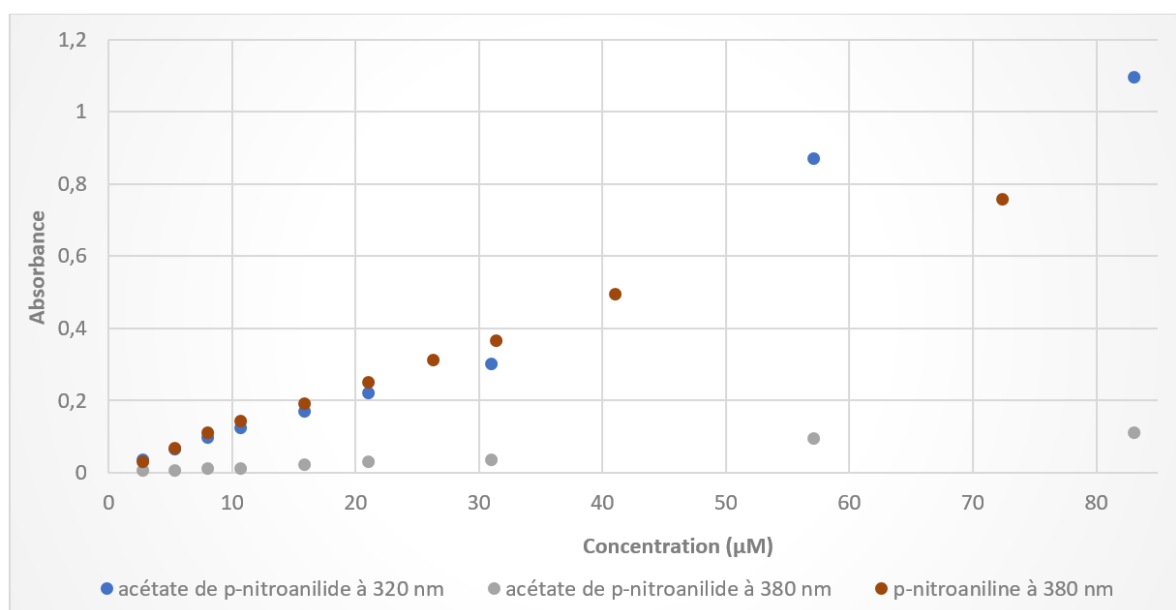


Graphique 6. Spectre d'absorbance de la *p*-nitroaniline (72 μ M) entre 220 et 700 nm

L'utilisation de l'acétate de *p*-nitroaniline comme substrat ne présentera pas de problème de longueur d'onde d'absorbance, les λ_{max} mesurées étant suffisamment éloignés du λ_{max} des ODN. Il s'agit

ensuite de s'assurer de la concentration minimale nécessaire pour permettre sa détection en présence d'un ODN.

La mesure de l'absorbance à différentes concentrations de *p*-nitroaniline et d'acétate de *p*-nitroanilide a donc été réalisée. Les valeurs obtenues pour les λ_{\max} des deux composés sont présentées sur le Graphique 7. A 380 nm, une différence significative peut être observée entre les valeurs d'absorbance mesurées pour les deux composés, l'acétate de *p*-nitroanilide et la *p*-nitroaniline. Celle-ci est détectable de façon très significative ($\Delta_{\text{Abs}} > 0,2$) en présence d'acétate de *p*-nitroaniline à partir de 20 μM . Cette étude a également permis de recalculer les coefficients d'extinction molaire ϵ des deux composés mais également de confirmer la bonne solubilité des substrats et des produits d'hydrolyse dans nos conditions de tampons aux différentes concentrations, des problèmes de solubilité étant apparus lors de la préparation de solution mère plus concentrées.



Graphique 7. Mesure de l'absorbance de l'acétate de *p*-nitroanilide et de la *p*-nitroaniline ; tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7

Dans les conditions usuelles appliquées pour notre étude (environ 5 μM d'ODN en solution dans le tampon phosphate, Graphique 8), l'absorbance à 380 nm d'un (ou plusieurs) ODN est de 0,046. Il s'agit donc de dépasser cette valeur d'absorbance pour pouvoir observer une concentration en *p*-nitroaniline, ce qui est le cas dès qu'une concentration de *p*-nitroaniline supérieure à 2,65 μM est présente dans la solution (Graphique 5).

2.2.1.3. Tests d'hydrolyse en solution

S'il n'a pas été possible de présenter un substrat à un Tripode au sein du **Bulge** $^5\text{B}_1$, un test d'hydrolyse a malgré tout été effectué en solution sur la structure portant un tripode sur le brin supérieur (Tableau 7, entrée 2), celui-ci présentant la meilleure valeur de T_m pour une structure fonctionnalisée par un Tripode. L'une des structures contenant trois motifs imidazole (Tableau 7, entrée 14) a également été évalué.

Le bulge ne présentant pas une grande stabilité thermique, il est cependant intéressant d'évaluer son potentiel catalytique, un système dynamique possédant un appariement transitoire permettrait peut-être de favoriser l'hydrolyse.

Les ODN ont été placés en solution dans du tampon phosphate (conditions utilisées pour réaliser les mesures de T_m) puis un excès, soit d'acétate de *p*-nitrophényle, soit d'acétate de *p*-nitroanilide ($40 \mu\text{M}$) a été ajouté (Figure 60).

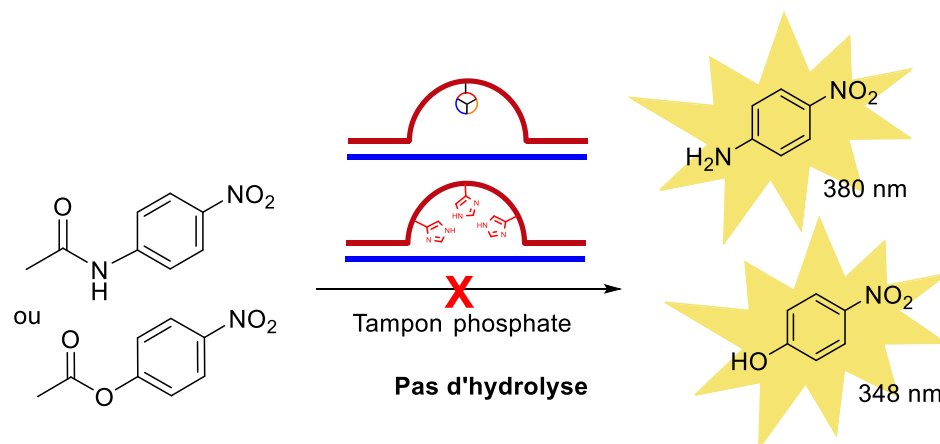


Figure 60. Test d'hydrolyse en solution par un bulge fonctionnalisé

Les mesures d'absorbance ont ensuite été effectuées régulièrement, respectivement à 380 nm et 348 nm, pendant 40h. En parallèle, les mêmes mesures ont été réalisées sur des cuves témoins contenant uniquement de l'acétate de *p*-nitrophényle ou de l'acétate de *p*-nitroanilide seuls dans du tampon pour mesurer l'hydrolyse basale des substrats. Aucune différence n'a été observée entre les cuves d'analyse et de référence. Ces résultats, bien que décevants, ont permis de mettre au point les conditions de la méthode. De nouveaux tests pour évaluer l'activité catalytique des systèmes créés seront réalisés à partir des **FuON** aux séquences rallongées dès lors que ceux-ci seront obtenus.

4. Conclusions

Les travaux présentés dans ce chapitre décrivent la mise en œuvre de l'approche "covalente" dans le but de créer des mimes de protéase à Sérine de type Bulge.

La première partie des travaux réalisés dans le cadre de cette approche correspond à la synthèse des différents partenaires nécessaire à la réaction de CuAAC. En complément des **Tripodes 12** et **19** décrits au chapitre II, des azotures substrats ont été synthétisés. Ceux-ci comportent une liaison ester ou amide, qui peut être hydrolysée par un organocatalyseur qui lui sera présenté dans le cadre de cette approche. Un motif chromogénique est alors libéré lors de l'hydrolyse et permet donc son observation par spectroscopie UV.

Une fois les partenaires azotures obtenus, les oligonucléotides convertibles porteurs d'une ou plusieurs fonctions propargyle ont été synthétisés à partir d'un phosphoramidite convertible 5'-C-propargyle développé au sein de l'équipe. Ces **CvON** ont ensuite été caractérisés par spectrométrie MALDI-TOF et par chromatographie HPLC avant d'être engagés dans une réaction de CuAAC. Ainsi, une bibliothèque de douze **FuON**, conçus pour l'assemblage du **Bulge** $^5\text{B}_1$ portant, soit un organocatalyseur, soit un substrat, a été obtenue et chaque ODN a été caractérisé.

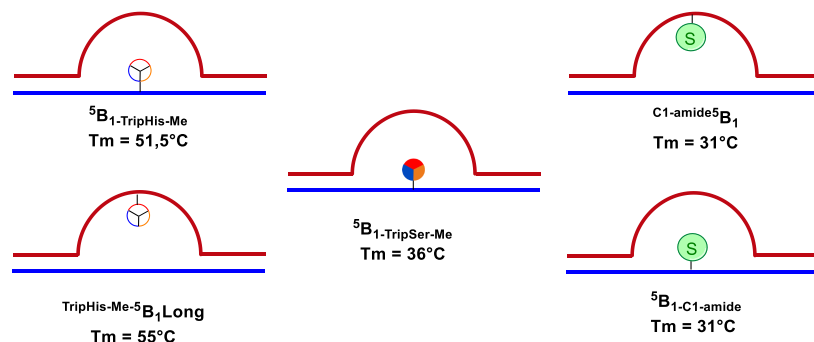
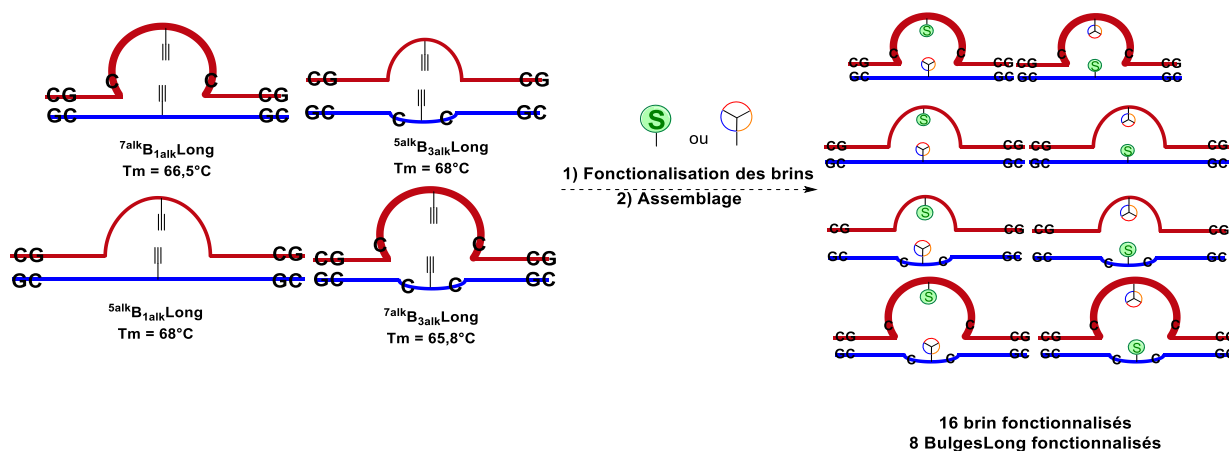


Figure 61. Bulges 5B_1 fonctionnalisés assemblés et valeurs de T_m mesurées

Différentes structures de type **Bulge** 5B_1 fonctionnalisés ont ensuite été assemblées et étudiées par dénaturation thermique. Les résultats de cette étude ont révélé que la boucle du **Bulge** 5B_1 est trop petite pour contenir plusieurs modifications, d'autant plus lorsqu'elles sont réparties entre les deux brins. Cette structure ne nous a donc pas permis comme nous le souhaitions de présenter un substrat à un organocatalyseur au sein d'une boucle.

Pour pallier ce problème, de nouvelles séquences ont été conçues pour permettre d'assembler des Bulges dont la boucle est agrandie et/ou dont les extrémités sont étendues, dans le but d'obtenir des structures possédant une plus grande stabilité thermique plus à même de tolérer l'introduction de modifications. Ainsi, différents bulges **wt** et convertibles ont été assemblés et étudiés pour sélectionner les séquences d'intérêt à fonctionnaliser. Les **Bulges** 5B_1 Long, 7B_1 Long, 7B_3 Long, et 5B_3 Long apparaissent comme particulièrement prometteurs et leurs brins correspondants sont donc en cours de fonctionnalisation.



16 brin fonctionnalisés
8 BulgesLong fonctionnalisés

Figure 62. Récapitulatif des structures bulges les plus stables et de leur fonctionnalisation à venir

Enfin, des tests d'hydrolyse en solution ont été réalisés sur des **Bulge** 5B_1 mono ou trifonctionnalisés respectivement par le tripode **TripHis-Me** ou un motif imidazole. Puisque l'approche covalente n'a pas pu être évaluée *via* une structure présentant face à face un **FuON-Tripode** et un **FuON-substrat**, un test a été mis au point à partir d'un substrat acétate de *p*-nitrophényle ou acétate de *p*-nitroaniline. La mise en place de ces tests a permis au préalable de réaliser différentes mesures d'absorbance pour obtenir les conditions optimales de mesure. Les deux **Bulges** 5B_1 monofonctionnalisés par le **TripHis-Me** ou trifonctionnalisés par un motif imidazole n'ont cependant pas démontré d'activité catalytique.

Ainsi, l'approche covalente apparaît comme une approche prometteuse mais qui reste à optimiser pour obtenir des structures de taille assez restreinte possédant une stabilité thermique leur permettant de tolérer l'introduction d'au moins deux modifications au sein de la boucle.

Pour continuer de tendre vers des mimes de protéases à sérine complet, la fonctionnalisation de séquence aptamère dans le cadre d'une approche aptazyme est présentée au chapitre suivant.

Bibliographie du chapitre III

1. Addamiano, C., Gerland, B., Payrastra, C. & Escudier, J.-M. DNA Three Way Junction Core Decorated with Amino Acids-Like Residues-Synthesis and Characterization. *Molecules* **21**, 1082 (2016).
2. Flanagan, M. *et al.* A DNA-conjugated small molecule catalyst enzyme mimic for site-selective ester hydrolysis. *Chem. Sci.* **9**, 2105-2112 (2018).
3. Nothling, M. D. *et al.* A multifunctional surfactant catalyst inspired by hydrolases. *Sci. Adv.* **6**, 404-416 (2020).
4. Peng, Y., Fu, S., Liu, H. & Lucia, L. A. Accurately Determining Esterase Activity via the Isosbestic Point of p-Nitrophenol. *BioResources* **11**, 10099–10111 (2016).

Chapitre IV : Approche Aptazyme

1. L'approche Aptazyme

L'approche covalente présentée au chapitre précédent repose sur l'utilisation de bulges afin de rapprocher artificiellement un organocatalyseur (**TripSer** ou **TripHis**) et un substrat activé. Cependant, il s'agit d'une preuve de concept qui permet surtout d'étudier l'activité catalytique des Tripodes lorsqu'ils sont portés par des ODN. Cette approche n'est pas transposable à un modèle biologique ce qui en limite la pertinence.

Par analogie avec l'approche de Gorin *et al.*, dans laquelle une fonction imidazole était introduite sur un aptamère de l'acide cholique, et ce, dans le but de réaliser l'hydrolyse de cette cible modifiée par une fonction ester chromogénique, il est intéressant de s'appuyer sur les propriétés de reconnaissance des aptamères pour créer des mimes de protéases à sérine à même de reconnaître leur propre substrat.¹ Appliqué à la dégradation d'une protéine pathogène, un mime de protéase de type aptazyme constituerait un outil thérapeutique prometteur, pour dégrader la protéine en contournant les phénomènes de résistance.

En se basant, comme dans le cadre de l'approche covalente (Chapitre III), sur l'utilisation de phosphoramidites convertibles, il est possible d'introduire dans une séquence, à des positions choisies, des fonctions propargyle qui peuvent être ensuite conjuguées par des organocatalyseurs (motif imidazole ou **Tripode**) permettant l'obtention de candidats aptazymes (Schéma 32.1). Une fois la séquence aptamère fonctionnalisée, son substrat, modifié par un groupement chromogénique, peut lui être présenté afin d'induire la structuration de l'aptamère (Schéma 32.2) et d'évaluer l'activité hydrolytique de l'aptazyme par spectroscopie UV (Schéma 32.3).

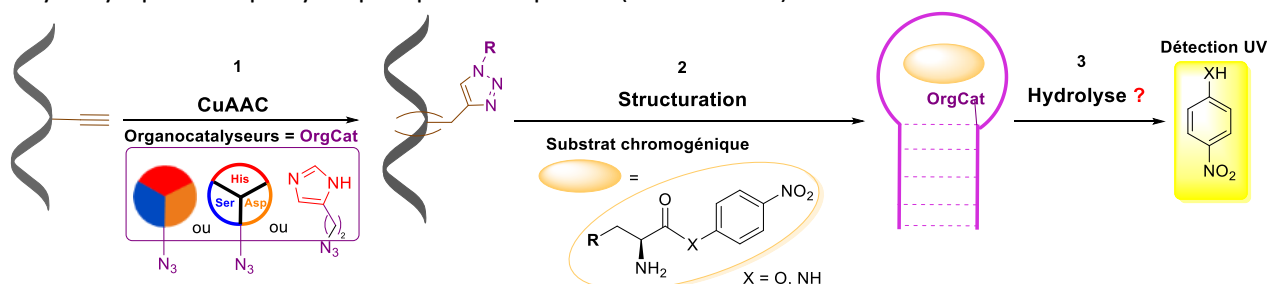


Schéma 32. Principe de l'approche aptazyme

Ce chapitre sera consacré aux travaux réalisés pour développer un aptazyme synthétique. Après avoir décrit les critères dictant le choix de l'aptamère sélectionné, des études de dichroïsme seront effectuées sur cet oligonucléotide pour évaluer ses propriétés de restructuration en présence de différents substrats (chromogéniques ou non). L'obtention de quatre **CvON** propargyle, chacun modifié à une position précise, sera ensuite décrite, suivie de leur fonctionnalisation par un motif organocatalytique. Après caractérisation de ces **FuON**, leur stabilité et leur capacité de restructuration autour des substrats précédemment sélectionnés seront évaluées respectivement par des études de dénaturation thermique ou par dichroïsme circulaire. Pour conclure ce chapitre, des tests d'hydrolyses seront reportés pour apprécier l'activité catalytique de ces différents aptazymes.

2. Choix de l'aptamère

Notre choix s'est porté sur une série de quatre aptamères sélectionnés et décrits pour reconnaître spécifiquement une petite molécule, le L-argininamide (**Arm**). Il s'agit de séquences unimoléculaires, de taille facilement accessible par synthèse automatisée (entre 20 et 30 bases) et

analysables dans les limites des techniques à notre disposition au laboratoire telles que l'HPLC ou la spectrométrie MALDI-TOF. Elles présentent l'avantage d'être bien caractérisées dans la littérature. Les séquences sont recensées dans le Tableau 17 :

Tableau 17. Séquences des aptamères ciblant l'argininamide

Entrée	Référence PDB	Taille	Séquence
1	1OLD ²	24 mer	5'-GAT CGA AAC GTA GCG CCT TCG ATC-3'
2	1DB6 ³	22 mer	5'-CGA CCA ACG TGT CGC CTG GTC G-3'
3	2ARG ⁴	30 mer	5' TGA CCA GGG CAA ACG GTA GGT GAG TGG TCA-3'
4	LAA ⁵	28 mer	5'-GAA TTG GGC AAA CGG TAG GTG AGA ATT C-3'

2.2. La séquence 1OLD

L'aptamère étudié a pour référence **1OLD** (entrée 1, Tableau 17). Décrit en 1996 par Patel et Lin, il s'agit du premier exemple d'aptamères capable de lier un substrat acide aminé.² Sa cible, le L-argininamide (en jaune sur la Figure 63) interagit donc avec la séquence au cœur de la boucle d'une structure hairpin repliée. Les interactions substrat-aptamère, non-covalentes, sont essentiellement des liaisons hydrogène. Il est important de noter que les différentes études ne décrivent aucune interaction directe du substrat avec le squelette phosphate, résultat quelque peu contre-intuitif étant donné la présence d'un motif guanidinium sur le substrat, questionnant ainsi sur la spécificité de la reconnaissance. Une modeste constante d'affinité $K_d = 176 \mu\text{M}$ confirme cependant cette spécificité.⁶

Lorsqu'étudié par dichroïsme circulaire, l'ajustement induit de l'aptamère **1OLD** autour d'**Arm** peut être facilement observé par la décroissance du signal dichroïque à 280 nm, phénomène qui sera exploité dans le cadre de ce chapitre pour s'assurer de la reconnaissance du **FuON** pour sa cible.

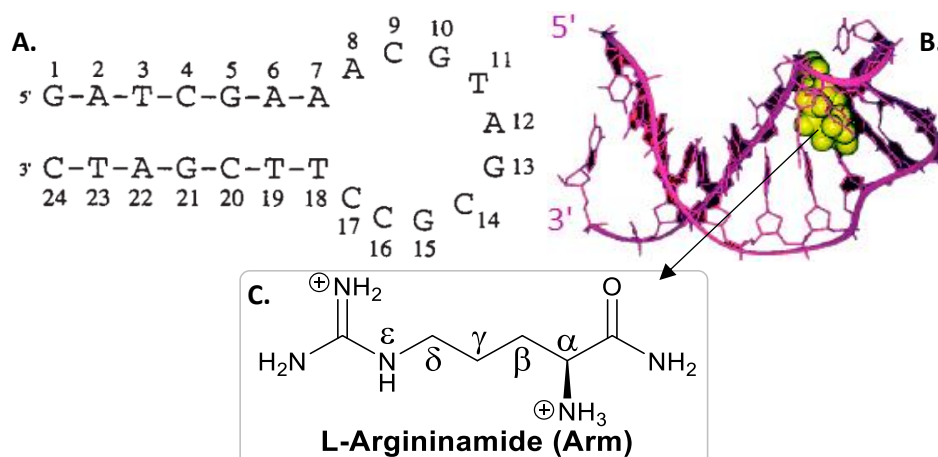


Figure 63. A. Séquence de l'aptamère **1OLD** ; B. Représentation 3D liée à l'argininamide^{2,3} ; C. Structure de l'argininamide, substrat de **1OLD**

Si la structure de l'aptamère a été résolue par spectroscopie de RMN en présence d'**Arm**, le repliement de l'oligonucléotide n'est pas assez défini en l'absence du substrat pour en permettre la caractérisation.^{2,3} En effet, des analyses NOESY de la séquence **1OLD** et de séquences dont certaines positions du site de liaison sont mutées ont permis de déterminer quelles bases sont impliquées dans la reconnaissance du substrat. Dix bases sont ainsi identifiées comme étant plus particulièrement impliquées dans les interactions avec l'argininamide et sont recensées sur la Figure 64 .

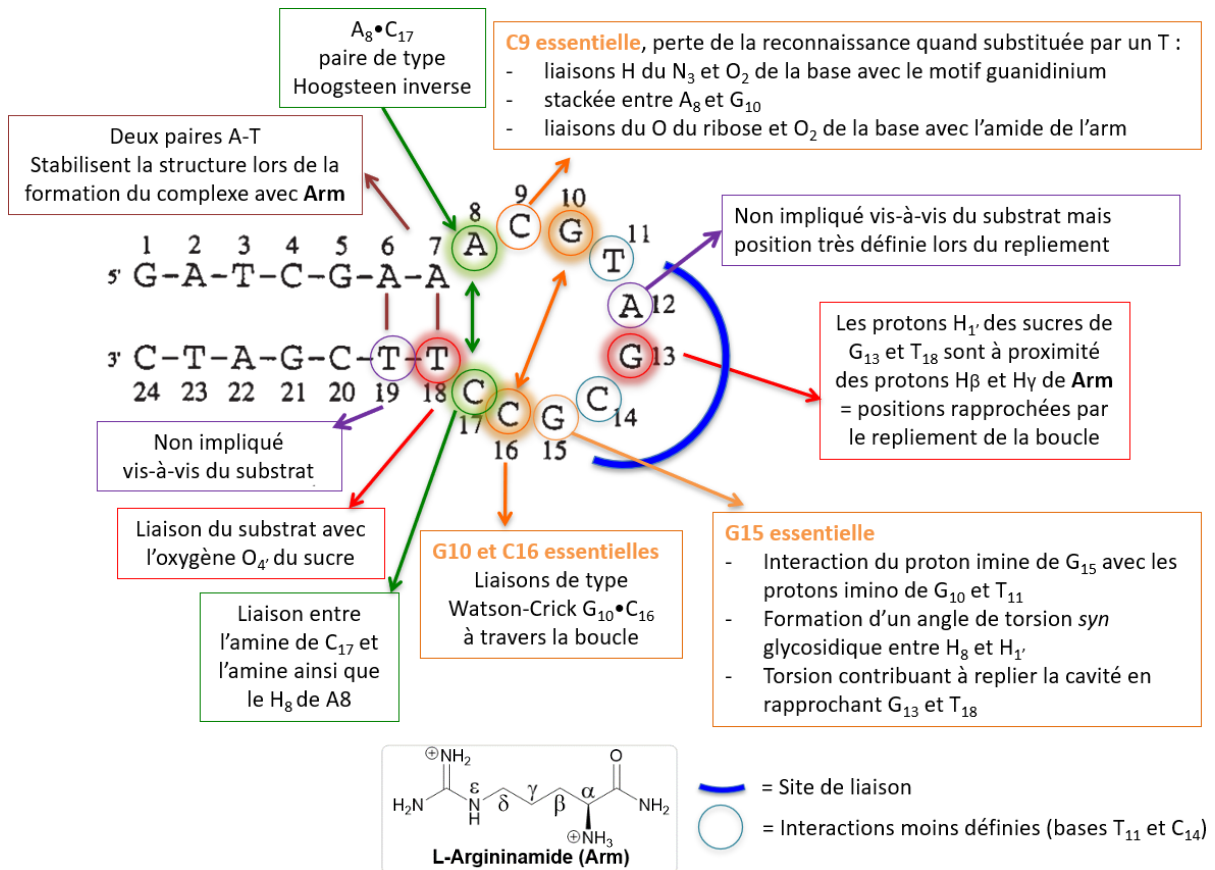


Figure 64. Implication des différentes bases de l'aptamère dans la reconnaissance du substrat argininamide (Arm)

En effet, si certaines bases sont décrites comme ayant peu ou aucune interaction avec le substrat **Arm** (T₁₁, A₁₂, C₁₄ et T₁₉), certaines positions sont au contraire directement responsables du repliement du site de liaison et ne doivent ainsi pas être modifiées pour que la reconnaissance soit maintenue.

Deux positions critiques (en vert), A₈•C₁₇ forment une paire de base *via* des liaisons de type Hoogsteen inverse. Les interactions de Watson et Crick entre la paire G₁₀•C₁₆ (en orange) régissent la bonne fermeture de la boucle et doivent être maintenues pour permettre la reconnaissance du substrat. La cytosine en position 9 est notamment une des bases clés car elle interagit d'une part avec le motif guanidinium d'Arm *via* l'atome d'azote N₃ et l'atome d'oxygène O₂ de sa base et, d'autre part, avec la fonction amide *via* les atomes d'oxygène O₄ du sucre et O₂. Le repliement de la boucle vers la tige et autour de l'argininamide est également confirmé lors de l'analyse NOESY par la proximité spatiale entre les protons H_{1'} des sucres de G₁₃ et T₁₈ et les protons H_β et H_γ du substrat (Figure 65).

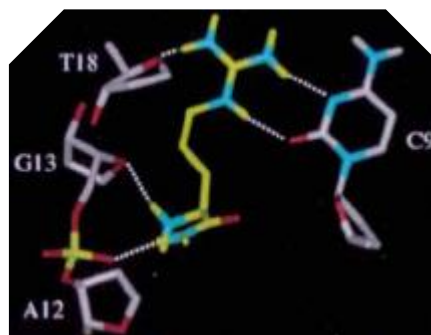


Figure 65. Interactions entre les bases G₁₃, T₁₈ et l'argininamide (adapté de Robertson et al.³)

Ces travaux ont ainsi été d'une grande utilité dans le choix des positions à fonctionnaliser ces dernières ne devant pas perturber les interactions avec le substrat tout en étant suffisamment proches pour pouvoir favoriser une éventuelle hydrolyse.

2.3. Le substrat Arm et ses dérivés

La L-argininamide présente comme avantage d'être un dérivé d'acide aminé comportant une fonction amide (certes primaire) mais facilement fonctionnalisable pour servir de site d'hydrolyse. Ainsi, ce composé peut être modifié pour porter un chromophore permettant le suivi de l'amidolyse. Plusieurs structures de substrats, chromogéniques ou non, ont été utilisées dans cette étude (Figure 66). L'ester de méthyle de la L-arginine (**ArgOMe**), la L-arginine (**Arg**) et l'agmatine (**Agm**) sont les dérivés les plus proches en structure d'**Arm**. Si **ArgOMe** présente une même charge globale que **Arm**, la fonction carboxylate de **Arg** pourrait avoir un effet néfaste sur la reconnaissance par l'aptamère poly-anionique. L'**Agm** présente, une charge positive sur sa fonction amine, qui pourra avoir une bonne influence sur ses interactions avec le substrat. Deux substrats chromogéniques amides sont également considérés, un dérivé du *p*-nitroanilide (**ArmpNA**) et un dérivé de la coumarine (**Arg-AMC**) afin de suivre l'hydrolyse respectivement par spectroscopie UV ou de fluorescence.

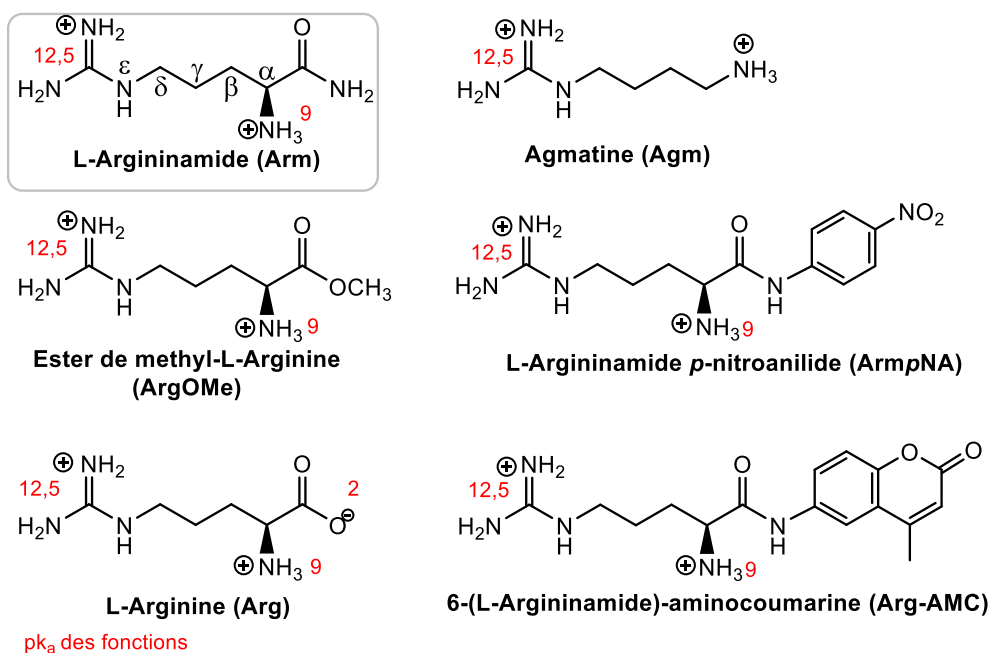
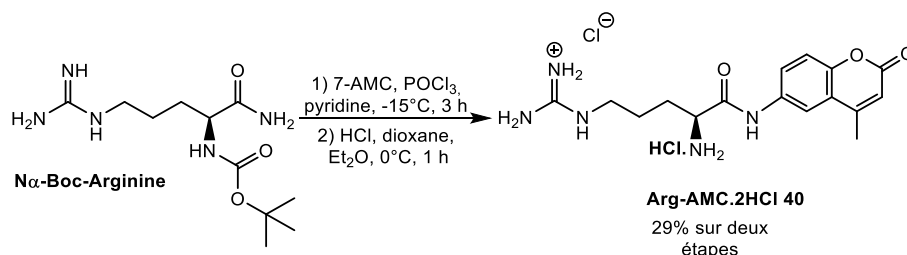


Figure 66. L-Argininamide et dérivés modifiés à pH = 7

Tous ces composés sont commerciaux à l'exception du dérivé **Arg-AMC**. Ce dernier a été synthétisé en deux étapes à partir de la 7-amino-4-méthyl-coumarine (7-AMC) et la N α -Boc-arginine suivant un protocole décrit dans la littérature (Schéma 33).⁷ Après un couplage en présence de POCl₃, le groupement Boc présent sur le composé N α -Boc-arginine-AMC **39** formé est déprotégé en conditions acides. Arg-AMC **40** est ainsi obtenu avec un rendement global de 29% et sa structure confirmée par des analyses de RMN et de spectrométrie de masse avec la détection de l'ion [M+H]⁺ à m/z = 332,17.

Schéma 33. Synthèse d'Arg-AMC 40 à partir de la N α -Boc-arginine

Deux autres dérivés de l'arginine, modifiés en position C_{term} par un ester de coumarine ou de *p*-nitrophénol avaient également été envisagés comme substrats potentiels. Cependant, leur synthèse n'a pas pu être menée à bien, ces esters activés s'étant révélés trop instables durant les étapes de purification.

L'ensemble de ces substrats a ensuite été étudié en présence de l'oligonucléotide **1OLD** pour évaluer leur influence sur la restructuration de l'aptamère et pouvoir ensuite comparer ces résultats à ceux obtenus lors des études menées en présence des aptazymes synthétisés.

3. Etude de l'aptamère 1OLD-wt par dichroïsme circulaire

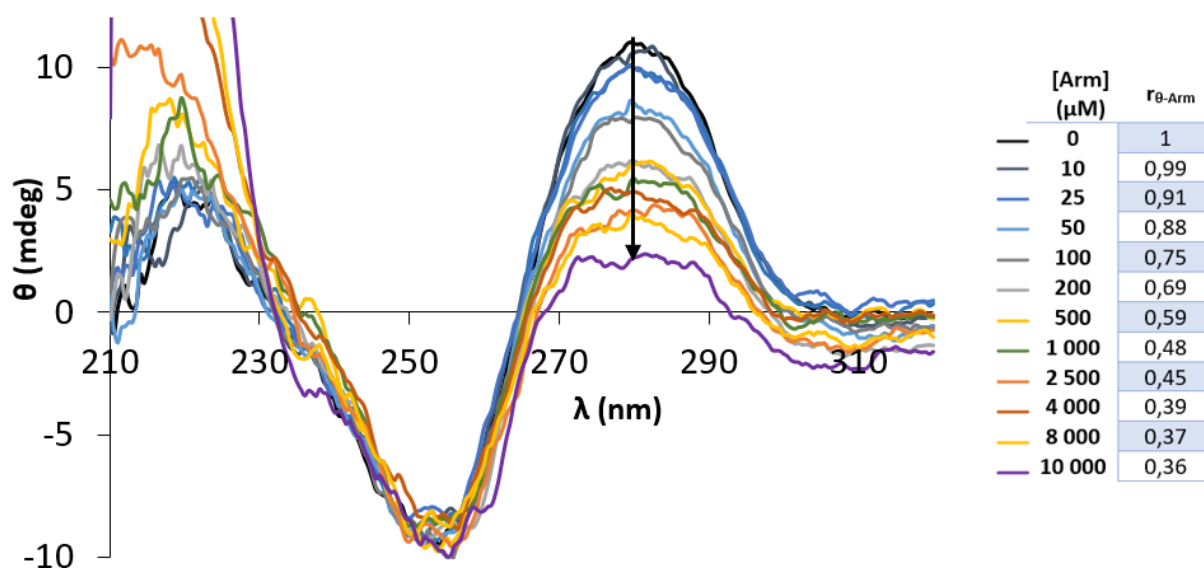
Ainsi, une série d'analyses dichroïques a été réalisée sur l'aptamère **1OLD-wt** pour servir de référence lors de l'évaluation de l'effet des modifications introduites sur le substrat et/ou l'aptamère sur la structuration finale des aptazymes.

La mesure de dichroïsme circulaire (DC) est une méthode de choix pour l'analyse structurale des oligonucléotides, permettant d'obtenir des informations sur les structures secondaires que peut adopter l'ADN (hélice A, B ou Z).⁸ Il s'agit de mesurer la différence d'absorption de la lumière polarisée circulairement de droite à gauche par un composé chiral, optiquement actif. La grandeur mesurée est l'ellipticité, notée θ , et exprimée en degrés. Dans le cadre de l'étude d'aptamères, cette méthode permet de détecter un réarrangement structural induit par la liaison de l'ODN à son substrat.

3.1. Aptamère 1OLD et Arm

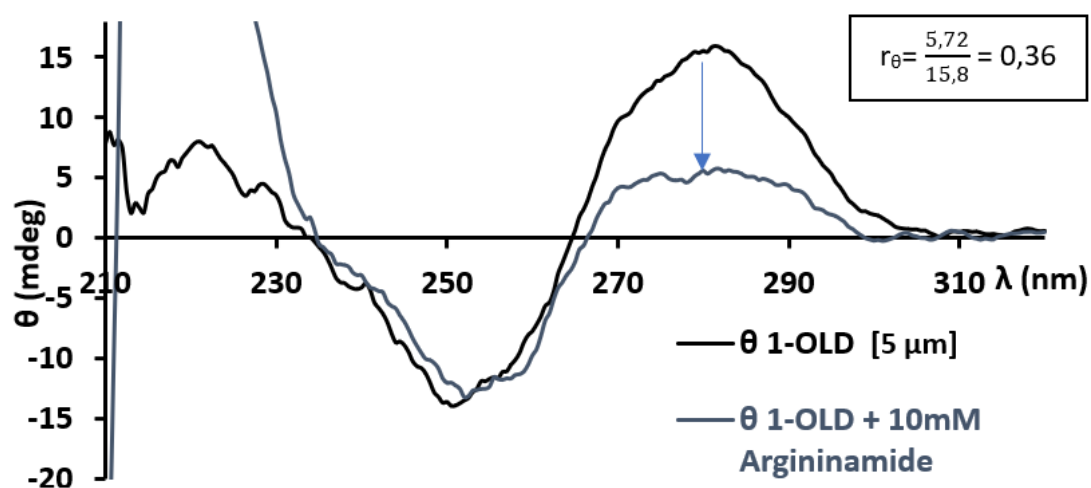
L'aptamère **1OLD** a la particularité de présenter un changement caractéristique de signature dichroïque lors de sa structuration autour de l'argininamide. L'évaluation qualitative de ce réarrangement conformationnel de la structure est réalisée par une simple mesure de signal dichroïque.⁹ Pour caractériser la séquence **1OLD** avant sa modification (**1OLD-wt**), les premières mesures s'appuient sur celles décrites par Bishop *et al.*⁹ Pour permettre la comparaison de deux spectres de DC et l'évolution du signal à 280 nm, quelle que soit la concentration en ODN et le substrat d'étude, le ratio $r_\theta = \frac{\theta(\text{ODN+substrat})}{\theta(\text{ODN seul})}$ est calculé. Les deux valeurs de DC étant mesurées en millidegrés (mdeg), le ratio r_θ est sans unité. Plus la valeur de r_θ est basse, plus la différence de DC est grande, et ainsi plus le changement structural de l'aptamère est marqué.

Afin d'étudier l'affinité de l'aptamère pour **Arm**, des mesures de DC ont été réalisées à partir d'une solution de **1OLD-wt** à différentes concentrations de substrat et les résultats obtenus sont présentés sur le Graphique 9. Comme attendu lors de l'ajustement induit en présence de substrat, le signal positif diminue pour tendre vers 0, ce qui correspond à une perte d'empilement des bases et un changement du degré d'hydratation de la structure.¹⁰



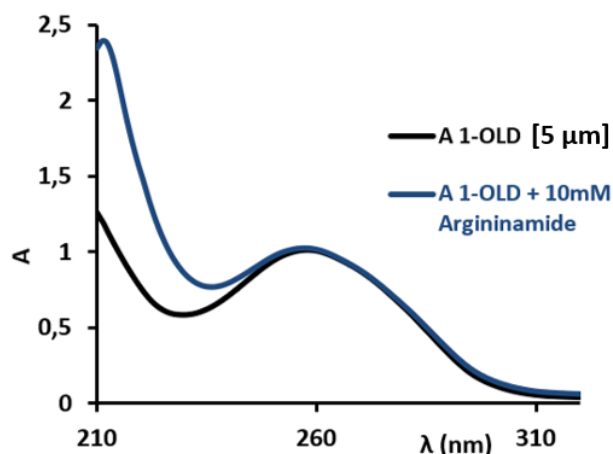
Graphique 8. Variation du signal dichroïque d'une solution d'**1OLD-wt** (5 μM) à différentes concentrations d'Arm ; tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7.

Les valeurs de r_θ calculées à partir des valeurs de θ à 280 nm serviront de référence. La décroissance progressive du signal dichroïque à 280 nm est très nette et en accord avec la littérature.^{9,10} Ainsi, pour concentration en substrat de 10 μM, une valeur de r_θ de l'ordre de 0,36 révèle donc pour un substrat donné une interaction similaire à celle observée lors de la reconnaissance de l'Arm par **1OLD-wt**. Une représentation simplifiée (Graphique 9) sera utilisée pour décrire les études dichroïques caractérisant l'interaction de **1OLD-wt** avec les différents substrats modifiés.



Graphique 9. Etude par dichroïsme circulaire de la reconnaissance de l'argininamide par **1OLD** ; tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7.

Les mesures de DC avec le substrat **Arm** permettent des résultats très fiables, celui-ci n'absorbant pas à 280 nm. En effet, l'absorbance de la solution à cette longueur d'onde n'est pas perturbée, ce qui peut être confirmé par la superposition des spectres UV obtenus avant et après ajout du substrat dans la solution (Graphique 10).

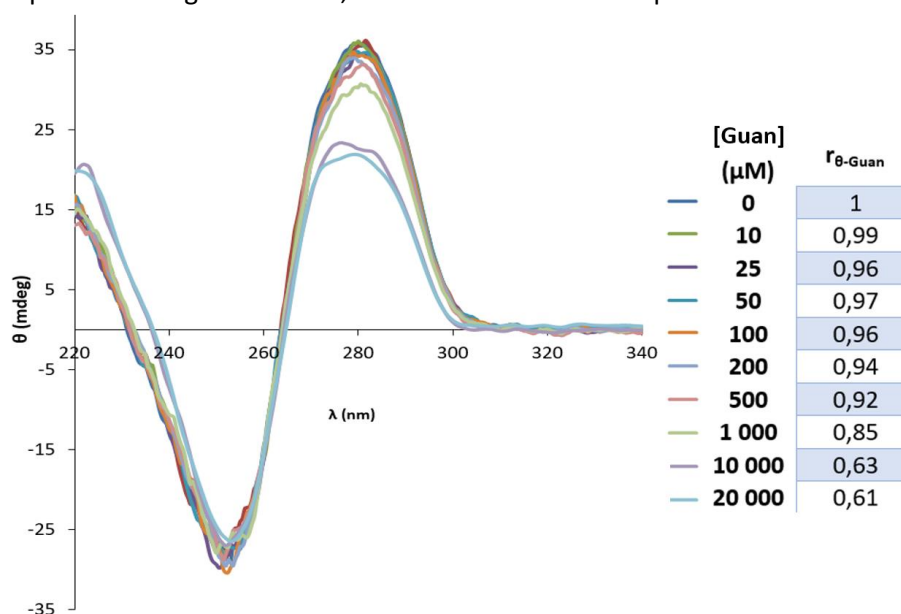


Graphique 10. Comparaison des absorbances des solutions **1OLD** et **1OLD+Argininamide 10mM**

La superposition des spectres d'absorbances avant et après ajout des différents substrats a été tracée et est présentée en partie expérimentale (§3.2.3, page 183). Les résultats se révèlent similaires à ceux du Graphique 10, démontrant que l'absorbance de l'ODN seul n'est perturbée par aucun des substrats modifiés.

3.2. Evaluation de la spécificité de l'interaction **1OLD**-substrat

Pour confirmer la spécificité de l'aptamère **1OLD** pour son substrat **Arm**, et ainsi s'assurer de la spécificité de la reconnaissance des substrats, une étude par DC a été réalisée avec du chlorure de guanidinium (**Guan**, Graphique 11). L'effet d'interactions électrostatiques, entre les motifs **Guan** et le squelette phosphate de l'oligonucléotide, sur la structuration de l'aptamère sera ainsi étudié.



Graphique 11. Variation du signal dichroïque d'une solution d'**1OLD-wt** (5 μM) à différentes concentrations de **Guan** ; tampon NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7.

Les résultats obtenus permettent de conclure que **Guan** n'induit une structuration de l'aptamère qu'à des concentrations très élevées. En effet, les rapports r_{θ} restent inférieurs à 0,85 jusqu'à une concentration de 1 mM (contre 0,45 pour **Arm**) pour se stabiliser à 0,61 à une concentration de 20 mM. Il apparaît donc qu'à un r_{θ} supérieur ou égal à 0,60 la reconnaissance n'est plus spécifique et que seule la contribution électrostatique du groupement guanidinium est observée.

3.3. Etude par DC de l'ajustement induit par les substrats dérivés de l'argininamide sur l'aptamère 1OLD

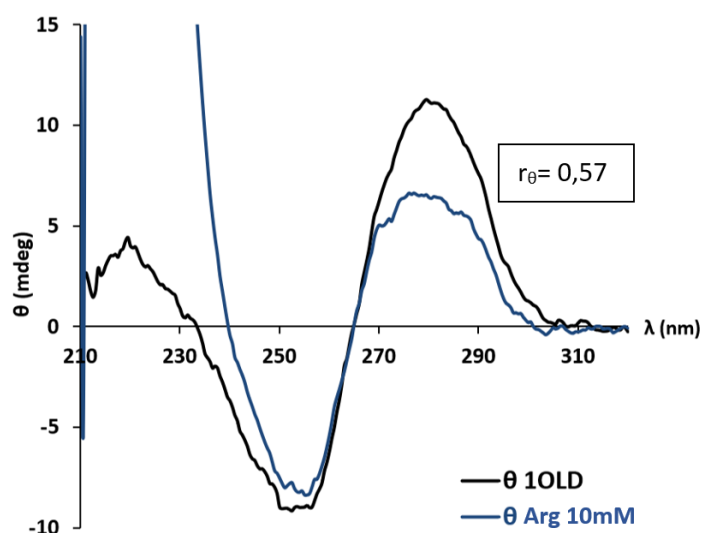
La répercussion sur la structuration de l'aptamère **1OLD-wt** par des substrats dérivés de **Arm** précédemment mentionnés a également été étudiée. Les mesures ont été effectuées dans des conditions similaires à celles réalisées avec **Arm**. Le comportement de **1OLD-wt** face à ces différents substrats permettra de mieux appréhender ceux des **CvON** et **FuON** d'intérêt.

Le premier substrat étudié, l'ester de méthyle de l'arginine, présente à 10 mM une valeur de r_θ de 0,34, très proche de celle de **Arm** (0,36) à cette même concentration. **Arg-OMe** est également un bon substrat pour l'aptamère **1OLD-wt**, comme cela pouvait être attendu, sa structure présentant une extrémité C_{term} neutre très similaire à celle de **Arm**.

Dans le cas de l'Agmatine, le résultat obtenu est comparable à celui observé pour **Arm** puisque la valeur de r_θ calculée est 0,37 (écart de r_θ de 0,01). En effet, **Agm** présente la même charge globale que **Arm**.

Les signaux de DC obtenus pour les substrats **Agm** et **Arg-OMe** sont donnés en partie expérimentale (§3.2.4, page 184).

En revanche, l'arginine présente quant à elle, dans les mêmes conditions, un r_θ de 0,57. L'écart de r_θ entre cette valeur et celle mesurée pour **Arm**, est notable (écart de 0,21) malgré une faible différence de structure. Cela provient probablement de la présence d'une fonction carboxylate sur **Arg**, dont la charge négative à pH = 7 est susceptible d'induire une répulsion électronique à proximité du squelette phosphate poly-anionique.



Graphique 12. Mesure de DC lors de l'interaction entre **1OLD-wt wt** (5 μ M) et Arg ; tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7.

La moins bonne affinité de **1OLD-wt** pour l'arginine que pour son substrat naturel est un point intéressant dans le cadre de notre étude, l'arginine étant le produit d'hydrolyse de **Arm** (ou de l'un de ses dérivés).

Dans le cas de l'étude avec le substrat chromogénique **ArgpNA**, la mesure du signal dichroïque du composé, sans ODN, a d'abord été réalisée (spectres UV et DC donnés en partie expérimentale (§3.2.4, page 184)). Sa signature dichroïque est bruitée, peu nette et est maximale à 310,5 nm avec une valeur $\theta = 14,8$ mdeg. L'existence d'un signal dichroïque propre à **ArgpNA** pourra causer une perturbation du signal de DC mesurée pour l'aptamère.

En effet, le signal dichroïque obtenu lors de la mesure initiale, avec une haute concentration (10 mM) de substrat, présente un rapport signal sur bruit très mauvais causé par l'absorbance basale du substrat et sa chiralité. Cela ne permet pas d'obtenir une valeur θ interprétable après ajout du substrat.

Différentes concentrations en oligonucléotides et en substrat ont été testées pour pallier ce problème et il a été observé que le signal n'est réellement exploitable qu'à partir d'une concentration en ODN supérieure ou égale à celle en substrat. Ainsi, les mesures présentées (partie expérimentale (§3.2.5, page 185)) ont été effectuées à partir d'une solution à 10 μM de **1OLD-wt** avant et après ajout de 10 μM de substrat. Comme attendu en raison de la faible quantité de substrat ajoutée, le r_θ obtenu est de 0,88, supérieur à celui de référence.

De façon similaire, **Arg-AMC** a un signal dichroïque propre qui, à nouveau, cause une perturbation du signal de DC mesurée pour l'aptamère (spectres UV et DC donnés en partie expérimentale (§3.2.4, page 184 et §3.2.6, page 186) et les premiers résultats obtenus à 10 mM de substrat n'étaient pas exploitables. Il a ainsi été nécessaire de travailler à partir d'une solution à 10 μM de l'ODN **1OLD-wt**, avant et après ajout de 10 μM de substrat. Le r_θ obtenu (d'une valeur de 0,90) reflète à nouveau une mauvaise restructuration, pouvant également résulter de la faible concentration en substrat.

Afin de compléter cette étude, des mesures complémentaires de DC ont été effectuées pour les substrats **ArmpNA** et **Arg-AMC** et les valeurs de r_θ sont comparées à celles obtenues dans le cas du substrat **Arm** et du guanidinium (Tableau 18).

Tableau 18. Comparatif des r_θ ($\lambda = 280\text{nm}$) obtenues par mesures DC à différentes concentrations avec *Arm*, *Guan*, *ArmpNA* et *Arg-AMC*

[substrat] (μM)	$r_{\theta\text{-Arm}}$	$r_{\theta\text{-Guan}}$	$r_{\theta\text{-ArmpNA}}$	$r_{\theta\text{-Arg-AMC}}$
0	1	1	1	1
10	0,99	0,99	0,88	0,91
25	0,91	0,96	0,81	0,86
50	0,88	0,97	0,75	0,87
100	0,75	0,96	0,74	0,92
200	0,69	0,94	0,79	0,86
500	0,59	0,92	0,75	non déterminé
10 mM	0,36	0,63	non déterminé	non déterminé

Au-delà de concentrations respectives de 200 et 500 mM de substrat pour les composés **ArmpNA** et **Arg-AMC**, il n'est pas possible d'obtenir des résultats interprétables. Les valeurs r_θ obtenues pour les deux substrats, inférieures à celles obtenues en présence de chlorure de guanidinium, permettent de conclure que la fixation du substrat n'est pas spécifique. Au vu de ces résultats, le substrat **ArmpNA**, est toutefois choisi pour réaliser les études dichroïques suivantes en présence de aptazymes ainsi que les tests d'hydrolyse.

Les résultats de cette étude par dichroïsme circulaire concernent la nature des interactions des différents dérivés de l'**Arm** avec l'aptamère **1OLD** et sont résumés dans le Tableau 19. Ils révèlent donc une très bonne fixation par l'aptamère des substrats **ArgOMe** ($r_{\theta} = 0,34$) et **Agm** ($r_{\theta} = 0,37$), similaire à celle obtenue avec **Arm** (0,36). Dans le cas de **Arg**, la reconnaissance est moins bonne, la valeur de r_{θ} observée (0,57) étant bien supérieure à celle de **Arm** et proche de celle obtenue pour le chlorure de guanidinium. L'aptamère **1OLD** possède donc une reconnaissance moins spécifique pour le substrat **Arg**. Dans le cas des substrats **ArmpNA** et **Arg-AMC** il est plus difficile de conclure, les mesures n'ayant été effectuées qu'à de faibles concentrations.

Tableau 19. Récapitulatif des valeurs de r_{θ} pour les différents substrats considérés ($\lambda = 280\text{nm}$)

	Arm	Guan	ArgOMe	Agm	Arg	ArmpNA	Arg-AMC
r_{θ} (200 μM)	0,69	0,94	non déterminé	non déterminé	non déterminé	0,79	0,86
r_{θ} (10 mM)	0,36	0,63	0,34	0,37	0,57	non déterminé	non déterminé

4. Synthèse et fonctionnalisation de l'aptamère 1OLD

Après cette étude préliminaire réalisée pour avoir une meilleure connaissance des propriétés de la structure **1OLD**, nous aborderons ici la synthèse et la fonctionnalisation par CuAAC de différentes positions de la séquence **1OLD** par des organocatalyseurs (dérivé de l'histamine, **TripSer** ou **TripHis**, Figure 67) afin d'évaluer leur ajustement induit autour d'un substrat et son éventuelle hydrolyse.

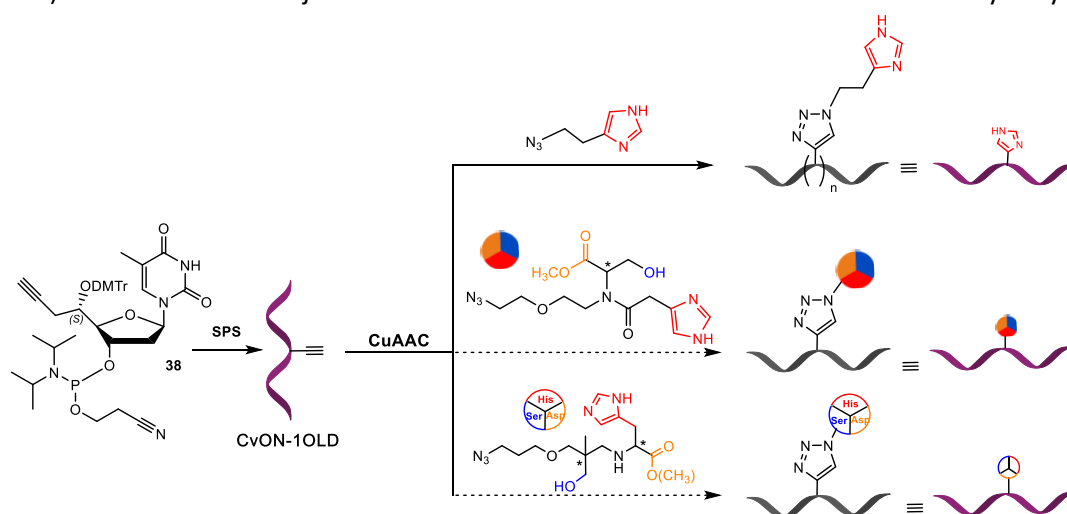


Figure 67. Fonctionnalisation des **CvON-1OLD** avec différents organocatalyseurs par CuAAC

4.1. Synthèse des CvON-1OLD

L'étude très complète (décrite au début de ce chapitre) menée par Lin et al. sur les interactions entre les bases de la séquences **1OLD** et l'**Arm** a permis de guider le choix des positions à modifier sur la séquence **1OLD-wt**. Dans notre approche, l'objectif est d'introduire des nucléotides convertibles à des positions de la séquence qui ne compromettent pas le repliement de l'aptamère et la reconnaissance du substrat. Il s'agit cependant de choisir des positions suffisamment proches du substrat lors de la structuration pour permettre l'interaction avec l'organocatalyseur introduit.

Les phosphoramidites convertibles propargyle utilisés portant une base thymine, quatre positions sont apparues comme prometteuses, T₃, T₁₁, T₁₉ et T₂₃ après analyse des données de la littérature (Figure 68).

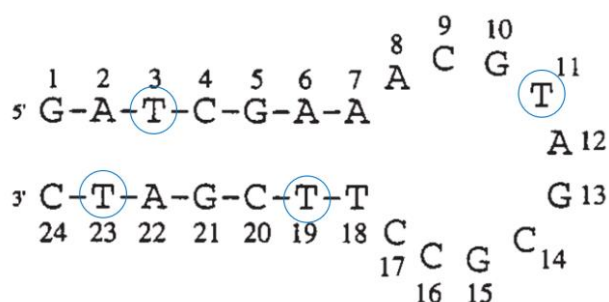


Figure 68. Positions considérées pour l'introduction de modifications

En effet, les positions T₃ et T₂₃ sont situées dans la tige et ne devraient pas perturber la structure si elles sont modifiées, n'ayant théoriquement pas d'interaction avec le substrat. De plus, des travaux de Madder et coll. indiquent que l'introduction d'un noyau imidazole en position 5 de la base T₃ par l'intermédiaire d'un bras éthylaminocarbonyle induit un changement conformationnel stabilisant ($\Delta T_m = + 6^\circ\text{C}$).¹¹ Ce résultat est encourageant pour notre approche.

Les positions T₁₁ et T₁₉ sont respectivement au cœur de la boucle ou à proximité du repliement, ce qui permet de s'assurer d'une proximité relative avec le substrat, mais ne sont pas impliquées directement dans sa reconnaissance (Figure 64). La modification de chacune de ces positions a ainsi été envisagée avec pour objectif de trouver le bon compromis entre proximité du substrat avec l'organocatalyseur et maintien de la reconnaissance. Les brins convertibles synthétisés sont présentés dans le Tableau 20.

Tableau 20. Séquence des **CvON-1OLD** synthétisés

Nom	Séquence et site d'incorporation de la fonction propargyle (en gras)
1OLD-wt	5'-GAT CGA AAC GTA GCG CCT TCG ATC-3'
1OLD-3alk	5'-GAT ₃ CGA AAC GTA GCG CCT TCG ATC-3'
1OLD-11alk	5'-GAT CGA AAC GT ₁₁ A GCG CCT TCG ATC-3'
1OLD-19alk	5'-GAT CGA AAC GTA GCG CCT T ₁₉ CG ATC-3'
1OLD-23alk	5'-GAT CGA AAC GTA GCG CCT TCG AT ₂₃ C-3'

La synthèse des oligonucléotides convertibles a été menée à partir de phosphoramidites commerciaux et du phosphoramidite convertible 5'-(S)-C-propargyle **38** décrit au Chapitre III en utilisant un synthétiseur d'oligonucléotide.

4.2. Synthèse des brins fonctionnalisés

Les oligonucléotides convertibles obtenus ont ensuite été impliqués dans des réactions de CuAAC avec **Im-N₃** décrit dans le chapitre III (Schéma 34). Ce composé est utilisé comme organocatalyseur de référence. Ayant l'intérêt d'être compact, il permet d'étudier l'effet de l'introduction d'une fonction sur l'aptamère **1OLD-wt**. Il sert donc de témoin préalable à l'introduction des **Tripodes**, susceptibles

de désorganiser la structure en raison de d'une gêne stérique plus importante. Les conditions usuelles de CuAAC, sont utilisées et conduisent à la formation des quatre **FuON-1OLD** correspondants.

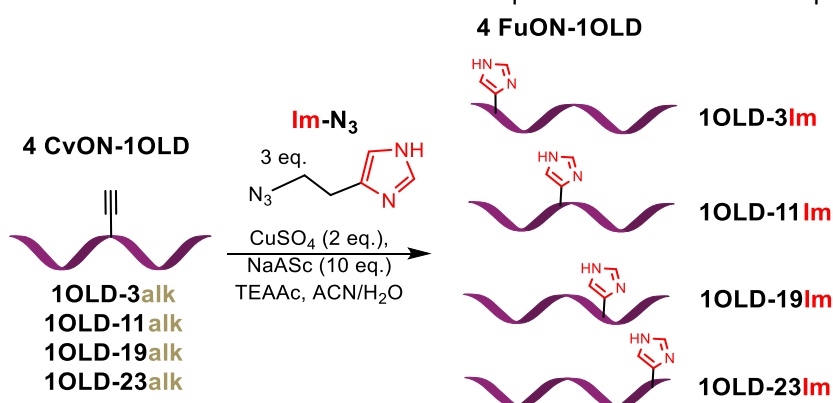


Schéma 34. Synthèse des **FuON-1OLD**

Ces derniers ont ensuite été caractérisés par RP-HPLC et spectrométrie MALDI-TOF dans les conditions décrites en partie expérimentale (page 155).

4.3. Caractérisation des CvON-1OLD et FuON-1OLD par HPLC

Les temps de rétention obtenus lors des analyses HPLC (Figure 69) pour les quatre **CvON** sont identiques. L'augmentation du temps de rétention de 1,6 minutes (comparé à celui obtenu pour l'oligonucléotide **1OLD-wt**) est dû à l'incorporation d'un motif apolaire, confirmant la présence d'une fonction propargyle (Figure 69.a.).

Lors de la réaction de CuAAC, la présence du motif imidazole, plus polaire, cause une diminution du temps de rétention de 1,4 minute (Figure 69.c.) par rapport à celui de l'ODN convertible. Les temps de rétention mesurés pour les **CvON** et **FuON** non répertoriés dans la Figure 69 sont présentés dans la partie expérimentale (§2.2., Table 5, page 180).

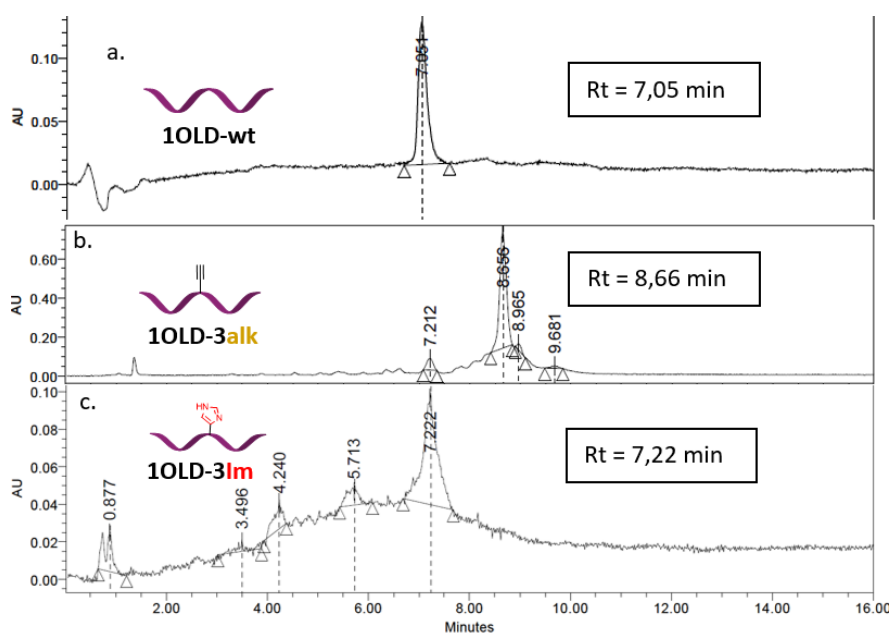


Figure 69. Chromatogrammes HPLC : a. **1OLD-wt** ; b. **1OLD-3alk**, brut ; c. **1OLD-3Im**, brut ; Gradient de 95% d'un éluant A à 85% d'un éluant A dans B (A : tampon TEAA 0.05 M, pH 7.0; B : CH₃CN)

4.4. Caractérisation des CvON-1OLD et FuON-1OLD par MALDI-TOF

Le spectromètre MALDI à notre disposition possède une résolution modérée pour l'analyse d'ODN de masses supérieures à 6000 Da. Cependant, il a été possible de confirmer la synthèse des ODN synthétisés (Figure 70). Les spectres de masse de l'ODN **wt** (Figure 70. a.) et des **CvON** (Figure 70.b.) confirment bien l'incorporation du phosphoramidite convertible, une incrémentation de masse de 39 Da, correspondant au motif propargyle étant observée. La formation du **FuON 1OLD-3Im** peut également être confirmée.

Les valeurs obtenues pour les analyses de masse des autres **CvON** et **FuON** sont rassemblées dans la partie expérimentale.

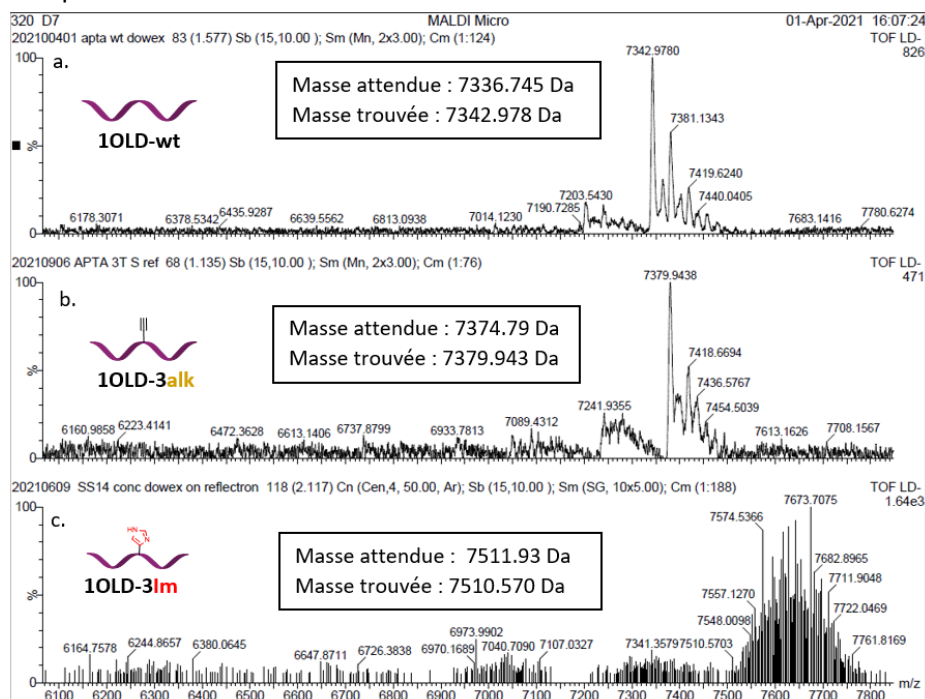


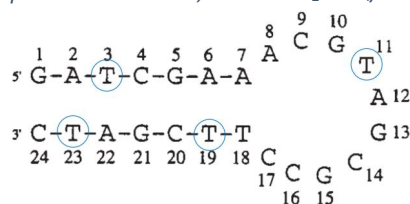
Figure 70. Spectres MALDI: a. **1OLD-wt**; b. **1OLD-3alk**, brut ; c. **1OLD-3Im**.


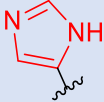
4.5. Etudes de dénaturation thermique

Les différents **CvON** comme **FuON** ont ensuite été étudiés par dénaturation thermique. Les valeurs de T_m obtenues ont été comparées à celle de **1OLD-wt** (entrée 1, Tableau 21). La valeur de T_m mesurée à 50,3°C pour **1OLD-wt** est en accord avec la littérature.⁹ Bishop *et al.* précisent également que la stabilité de la structure hairpin assemblée en l'absence de substrat provient uniquement des interactions d'appariement dans la partie tige et non d'un pré-repliement au niveau de la boucle.

Ces mesures de valeurs de T_m ont été mesurées en l'absence de substrat **Arm** dans le but d'étudier la perturbation induite par les modifications incorporées sur l'appariement des bases.

Tableau 21. Valeurs de T_m mesurées pour les ODN convertibles et fonctionnalisés dérivés de la séquence **1OLD** ; Mesures effectuées entre 15 et 80°C ; tampon : 200 mM NaCl, 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, EDTA 1 mM, pH=7



Entrée	Type d'ODN	Référence	Valeur de T_m mesurée	Δm (°C)
1	ODN wild-type	1OLD-wt	50,3°C	référence
2	CvON 	1OLD-3alk	46,3°C	-4
3		1OLD-11alk	48,5°C	-1,8
4		1OLD-19alk	49°C	-1,3
5		1OLD-23alk	45,8°C	-4,5
6		FuON 	1OLD-3Im	45,8°C
7	1OLD-11Im		45,3°C	-5
8	1OLD-19Im		47,5°C	-2,8
9	1OLD-23Im		45,5°C	-4,8

Les valeurs de T_m obtenues pour **1OLD-3alk** ($\Delta T_m = -4^\circ\text{C}$) et **1OLD-23alk** ($\Delta T_m = -4,5^\circ\text{C}$) révèlent une déstabilisation marquée (entrées 2 et 5, Tableau 21). Une modification au niveau de la tige compromet donc la stabilité de l'hairpin, ce qui est confirmé par les valeurs de T_m obtenues avec **1OLD-3Im** ($\Delta T_m = -4,5^\circ\text{C}$, entrée 6) et **1OLD-23Im** ($\Delta T_m = -4,8^\circ\text{C}$, entrée 9). Cependant, la conjugaison d'un groupement plus volumineux n'induit pas de déstabilisation plus marquée.

L'introduction d'une fonction propargyle au sein de la boucle est moins déstabilisante que cela soit en son cœur (**1OLD-11alk**, $\Delta T_m = -1,8^\circ\text{C}$, entrée 3) ou à l'entrée (**1OLD-19alk**, $\Delta T_m = -1,3^\circ\text{C}$, entrée 4). La boucle, moins définie, semble mieux s'accommoder de cette modification par un groupement peu encombrant. Ce comportement se confirme uniquement pour l'ODN **1OLD-19Im** avec une valeur de T_m inférieure à la référence de 2,8°C (entrée 8) et à celle de **1OLD-19alk**, de 1,3°C. Cela représente une perte de stabilité modérée en comparaison de celle causée par la modification à d'autres positions. En effet, la perte de stabilité révélée par **1OLD-11Im** (entrée 7) est la plus importante avec une différence de -5°C avec **1OLD-wt** et de $-3,2^\circ\text{C}$ avec **1OLD-11alk**. Cette constatation peut provenir du fait que le nucléotide T_{11} se trouve dans la boucle et que la conjugaison du motif imidazole induise une gêne stérique trop importante.

L'absence de stabilisation, attendue à la suite à l'incorporation du groupement imidazole chargé positivement, n'est pas en accord avec les résultats obtenus par Madder et coll. mentionnés précédemment (§4.1. de ce chapitre).¹¹ Ces derniers observent une stabilisation de $+6^\circ\text{C}$ lors de l'introduction d'un motif similaire en position T_3 . Cependant, dans le cas de leurs travaux, le motif imidazole est introduit en position 5 de la base, position qui oriente généralement vers le grand sillon. En revanche, la stéréochimie 5'-C-(S) dirige, dans le cadre d'un duplex, le motif conjugué vers le petit

sillon, cette orientation se révélant apparemment moins favorable. Enfin, Madder et coll. mettent en évidence au sein de ce même article qu'un échange des paires de bases C₄-G₂₁ et G₅-C₂₀ est plus stabilisant pour la structure. Il sera alors intéressant d'étudier si cette modification de séquence permet de stabiliser **1OLD-3Im** pour mieux tolérer la présence du motif imidazole porté en position 5' du sucre.

Enfin, ces mesures de dénaturation thermique seront à répéter en présence d'**Arm** pour conclure concernant l'effet des modifications sur l'interaction entre les groupements introduits et le substrat.

4.3.1. Dichroïsme circulaire

Pour contrôler le maintien de l'ajustement induit des **CvON-1OLD** et des **FuON-1OLD** en présence du L-argininamide et ainsi analyser les répercussions de la présence de la modification en différentes positions, des mesures par DC avec les substrats **Arm** et **ArmpNA** ont été réalisées.

4.3.1.1. Contrôle de la reconnaissance de l'Arm

Les courbes dichroïques sont obtenus après ajout de différentes concentrations d'argininamide à une solution d'aptamères **1OLD-alk** ou **1OLD-Im** à 10 μM et en calculant le r_{θ} correspondant pour une concentration donnée.

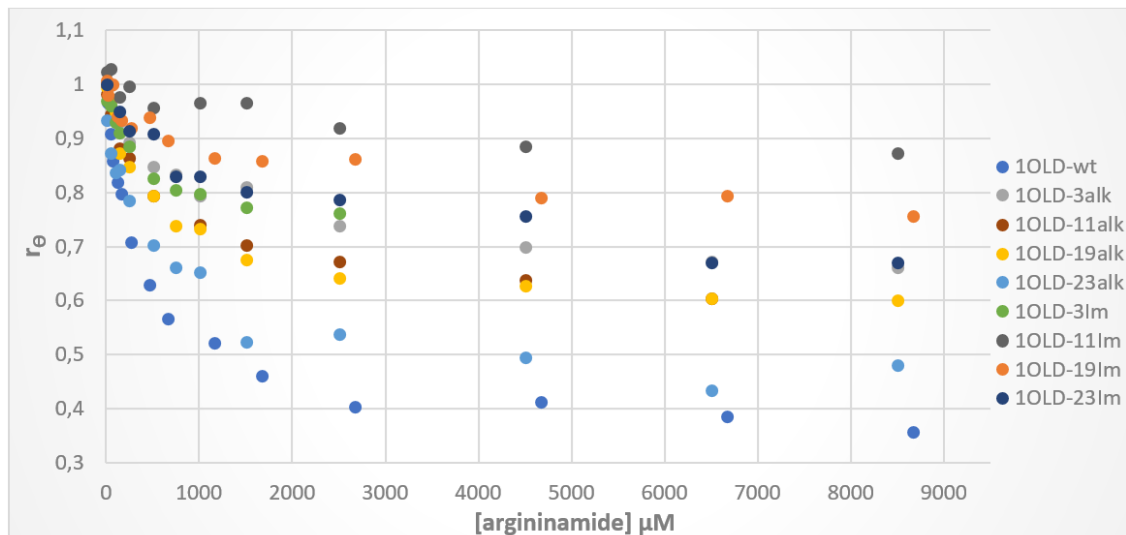
Dans le cas des **CvON**, les valeurs de r_{θ} obtenues (de l'ordre de 0,65) montrent que lorsqu'une fonction propargyle est incorporée en position T₃, T₁₁ ou T₁₉, la reconnaissance du substrat **Arm** est significativement perturbée (Tableau 22). La comparaison entre les **1OLD-11alk** et **19alk** et leur pendants fonctionnalisés révèlent une perte de reconnaissance assez modérée. Ceci laisse supposer que cette dernière provient plus d'une perturbation de l'appariement des bases lors du repliement de la structure que d'une véritable gêne au niveau de la liaison avec le substrat. Dans le cas de **1OLD-11Im**, la présence du motif imidazole altère significativement le processus de reconnaissance du substrat, la valeur de r_{θ} calculée étant à peine inférieure à 0,90. Ce résultat est cohérent avec la forte déstabilisation observée par l'étude des T_m, confirmant que la position 11 est trop proche du site de repliement pour tolérer la modification.

Tableau 22. Comparaison des valeurs de r_{θ} calculées pour les **CvON** et **FuON** ($\lambda = 280$ nm); [ODN] = 10 μM ; valeur de r_{θ} quand [Arm] = 4,5 mM

	1OLD-wt	1OLD-3alk	1OLD-11alk	1OLD-19alk	1OLD-23alk
r_{θ}^*	0,40	0,70	0,64	0,63	0,50
	1OLD-wt	1OLD-3Im	1OLD-11Im	1OLD-19Im	1OLD-23Im
r_{θ}^*	0,40	0,76	0,89	0,79	0,76

Au contraire, dans le cas de **1OLD-23alk**, le r_{θ} observé est proche de celui de l'aptamère de référence **1OLD-wt**, indiquant que l'ajustement induit a lieu correctement. En revanche, si le motif propargyle était bien toléré en position T₂₃, la valeur de r_{θ} obtenue pour **1OLD-23Im** augmente d'environ 0,3 point, se rapprochant ainsi de celles obtenues pour les autres ODN fonctionnalisés ($r_{\theta} = 0,76$).

Cette perte de reconnaissance observée sur tous les **FuON-1OLD** est confirmée quelle que soit la concentration en substrat **Arm** (Graphique 13). En effet, lorsque la concentration en **Arm** dépasse 5 mM, l'ajout de substrat n'a plus d'effet sur l'ajustement induit observé.

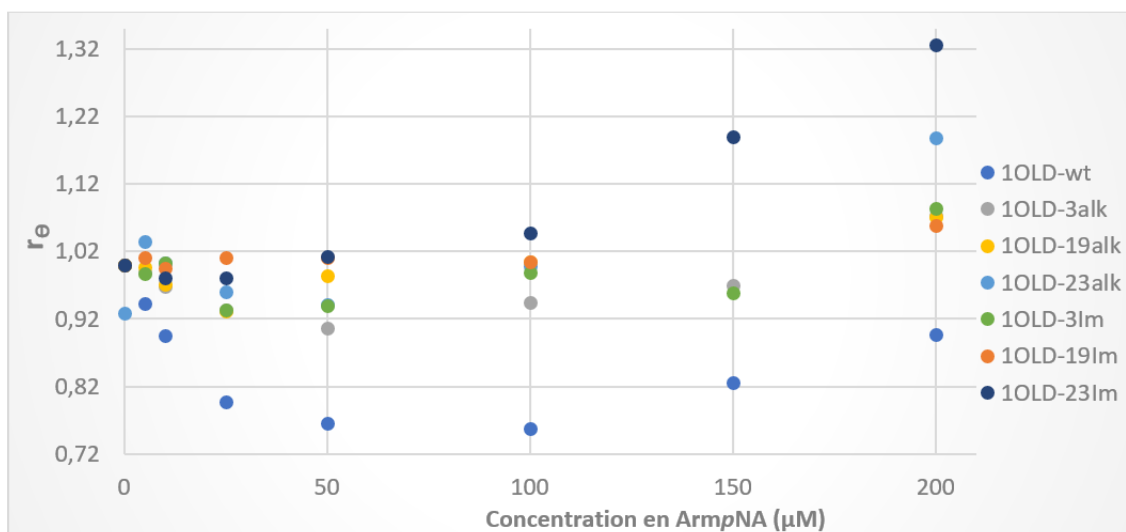


Graphique 13. Evolution de r_θ en fonction de la concentration en substrat Argininamide ($\lambda = 280 \text{ nm}$); tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, $\text{pH}=7$.

4.3.1.1. Contrôle de la reconnaissance d'ArmpNA

La même étude a ensuite été réalisée avec le substrat **ArmpNA** dont la concentration maximale est limitée à 200 μM pour perturber à minima le signal dichroïque des aptamères **1OLD-alk** ou **1OLD-Im** présentant une concentration de 10 μM .

Le Graphique 14 présente ainsi les résultats obtenus à différentes concentrations d'**ArmpNA**.



Graphique 14. Evolution de r_θ en fonction de la concentration en substrat ArmpNA ($\lambda = 280 \text{ nm}$); tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, $\text{pH}=7$.

Les résultats obtenus pour les trois **CvON 1OLD-alk** révèlent déjà une perte de structuration importante, qui est très similaire d'un ODN à l'autre (Tableau 23). En effet, à 100 μM , toutes les valeurs de r_θ obtenues sont comprises entre 0,9 et 1, largement supérieures à celle de la référence **1OLD-wt**. Cette tendance est d'autant plus accentuée pour les quatre aptazymes avec des valeurs de r_θ confirmant une forte perturbation de la restructuration.

Tableau 23. Comparaison des valeurs de r_{θ} calculées pour les **CvON** et **FuON** ($\lambda = 280 \text{ nm}$); $[\text{ODN}] = 10 \mu\text{M}$; valeur de r_{θ} quand $[\text{ArmpNA}] = 100 \mu\text{M}$

	1OLD-wt	1OLD-3al	1OLD-19al	1OLD-23al
r_{θ}	0,76	0,94	1,00	0,999
	1OLD-wt	1OLD-3Im	1OLD-19Im	1OLD-23Im
r_{θ}	0,76	0,99	1,00	1,04

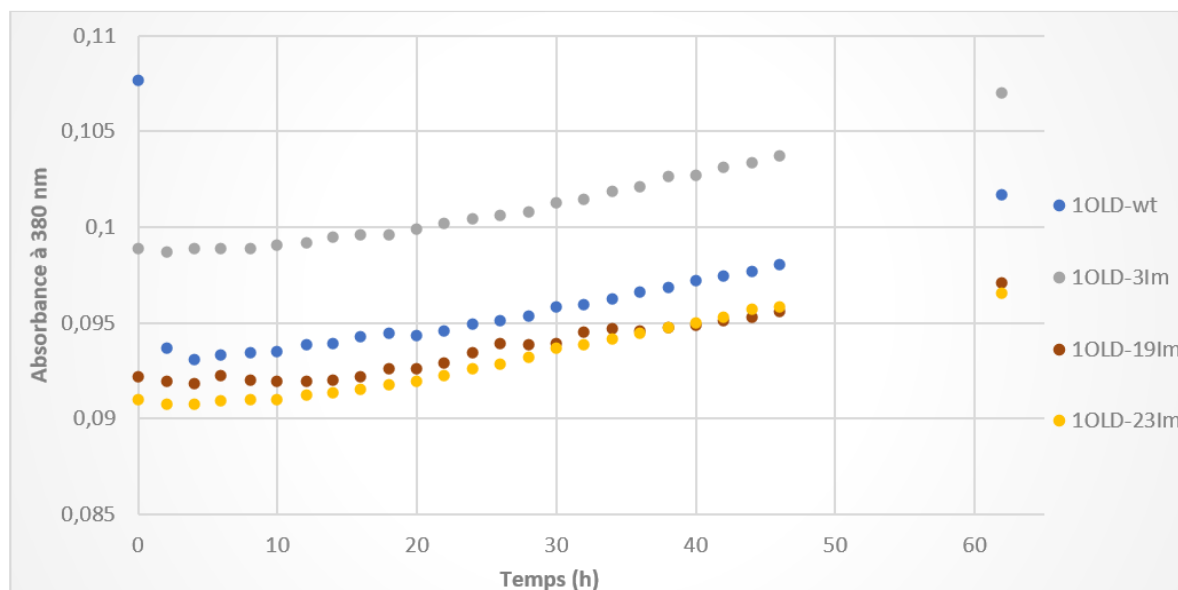
Il semble donc que la séquence **1OLD** soit trop courte pour l'approche envisagée puisque les modifications même minimales (alcyne et le motif imidazole) perturbent déjà la stabilité de l'aptazyme et la structuration autour de ces substrats. La conjugaison de groupements plus encombrants tels que les Tripodes ne ferait qu'accentuer ce problème.

Enfin, dans le but de parachever cette étude, des tests d'hydrolyses ont été effectués. L'ester de type **ArgpNA** n'ayant pas pu être obtenu, ces tests ont été réalisés en présence d'**ArmpNA**.

4.3.4. Tests d'hydrolyse

Les différents tests d'hydrolyse ont uniquement été effectués sur les oligonucléotides **1OLD-3Im**, **1OLD-19Im** ou **1OLD-23Im** et sont basés sur l'observation de la formation de *p*-nitroaniline à 380 nm.

Pour cela sont étudiés en parallèle les ODN **1OLD-wt**, **1OLD-3Im**, **1OLD-19Im** et **1OLD-23Im** à une concentration de 20 μM , l'**1OLD-11Im** n'ayant pas été testé. Les solutions sont portées à 80°C et ramenées à 20°C par une rampe de température à 0,5°C/min pour permettre à tous les oligonucléotides d'être structurés de façon équivalente. Le substrat **ArmpNA** est ensuite ajouté à une concentration finale de 100 μM . La mesure de l'absorbance à 380 nm est alors effectuée toutes les deux heures pendant 46 heures. Les cuves sont ensuite maintenues à 20°C et une mesure finale est effectuée après 62h. Les résultats obtenus pour ces quatre ODN sont regroupés dans le Graphique 15. L'hydrolyse de l'**ArmpNA** se produit en présence des trois aptazymes, comme indiquée par la légère augmentation de l'absorbance à 380 nm. Cependant, la quantité produite de *p*-nitroaniline est quasi identique avec ou sans motif catalytique sur l'ODN, l'hydrolyse observée pour les 4 ODN correspondant à l'hydrolyse basale.



Graphique 15. Suivi de l'absorbance à 380 nm pour étude de l'hydrolyse de ArmpNA par les aptazymes ; Tampon phosphate NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0,1 mM pH=7

Nous pouvons ainsi conclure que pour ces 3 candidats aptazymes seule l'hydrolyse basale est visible après 62h. Considérant les résultats de l'étude de l'interaction du substrat **ArmpNA** et des différents aptazymes, il est possible que la reconnaissance du substrat par les différents ODN **1OLD-Im** ne permette pas d'amener à proximité du substrat le petit organocatalyseur ce qui explique l'absence d'activité catalytique. De plus, cet organocatalyseur, présentant certes une gêne stérique moindre mais ne possède pas propriétés catalytiques suffisantes pour permettre la coupure de la liaison amide.

5. Conclusion

Dans ce chapitre, la synthèse et la caractérisation des aptazymes-**1OLD** sont décrites ainsi que les études physico-chimiques menées afin de confirmer le maintien de leur restructuration autour des dérivés de type argininamide avant d'évaluer leur stabilité et leurs capacités d'hydrolyse.

Après avoir commenté la nature des cibles capables d'interagir avec l'aptamère **1OLD**, et en particulier celle des deux substrats modifiés **ArmpNA** et **Arg-AMC** (dont la synthèse est détaillée), la capacité de **1OLD** à se restructurer en leur présence a été évaluée par dichroïsme circulaire. Cette étude a permis de confirmer les valeurs de r_0 attendues en cas d'ajustement induit pour **Arm** (0,36), **Arg** (0,57) et **ArgOMe** (0,34) ou pour une interaction non spécifique avec **Guan** (0,63).

Les mesures sont réalisées à des concentrations plus faibles pour **ArmpNA** et **Arg-AMC**, les deux composés possédant une signature dichroïque qui perturbe l'analyse DC de leur interaction avec **1OLD-wt**. Les valeurs de r_0 pour **ArmpNA** (0,79) et **Arg-AMC** (0,86) ne sont pas concluantes mais semblent toutefois indiquer que la liaison entre ces substrats et l'aptamère non modifié est (très) peu spécifique.

Quatre **CvONs**, (**1OLD-3alk**, **1OLD-11alk**, **1OLD-19alk**, **1OLD-23alk**) ont été synthétisés en substituant une position T par le 5'-C-(S)-phosphoramidite propargyle **38**. Chaque **CvON** a ensuite été fonctionnalisé par CuAAC à l'aide du dérivé **Im-N₃** pour conduire aux **FuONs** correspondants. En effet,

l'utilisation de **Im-N₃** permet d'estimer l'influence d'une modification plus compacte que les **Tripodes** sur la restructuration induite afin d'anticiper le comportement de catalyseurs plus volumineux. Les ODN obtenus ont été caractérisés puis étudiés par dénaturation thermique.

Les valeurs de T_m obtenues montrent que l'introduction des motif propargyle ou imidazole est déstabilisante, quelle que soit leur position, dans la boucle (T_{11}) ou à sa base (T_{19}) ou dans la tige (position T_3 et T_{23}). La présence de la modification en position T_{11} induit une déstabilisation forte ($\Delta T_m = -5^\circ\text{C}$) tout comme celle observée pour T_3 ($\Delta T_m = -4,5^\circ\text{C}$). Enfin, cette étude de dénaturation thermique doit être répétée dans des conditions saturantes de **Arm** forçant la restructuration des **FuON**.

Des études par DC menées sur les **CvON-1OLD** et **FuON-1OLD** en présence de **Arm** et de **ArgpNA** révèlent que le motif imidazole perturbe, malgré sa petite taille, la restructuration. Alors que **1OLD-23alk** maintient ses propriétés de restructuration en présence de **Arm** avec un r_θ (0,49) proche de la valeur référence (0,40), **ArgpNA** ne se fixe, ni sur **CvONs**, ni sur les **FuONs**. Malgré la perte importante de reconnaissance observée et un noyau imidazole non réactif face à une liaison amide, un test d'hydrolyse a été mis en place. Aucun des **FuON-1OLD** n'a présenté d'activité catalytique.

Pour posséder une méthode permettant de suivre l'éventuelle hydrolyse d'un substrat ester ou amide non chromogénique par un **FuON-1OLD**, il sera intéressant de s'inspirer des résultats obtenus par DC. Par exemple, le produit d'hydrolyse **Arg** présente une moins bonne affinité avec l'aptamère que le substrat **ArgOMe**. Suivre l'augmentation de signal dichroïque (et ainsi de r_θ) au cours du temps pourrait permettre le cas échéant d'évaluer l'hydrolyse de l'un de ces deux substrats et la formation de l'arginine (Figure 71).

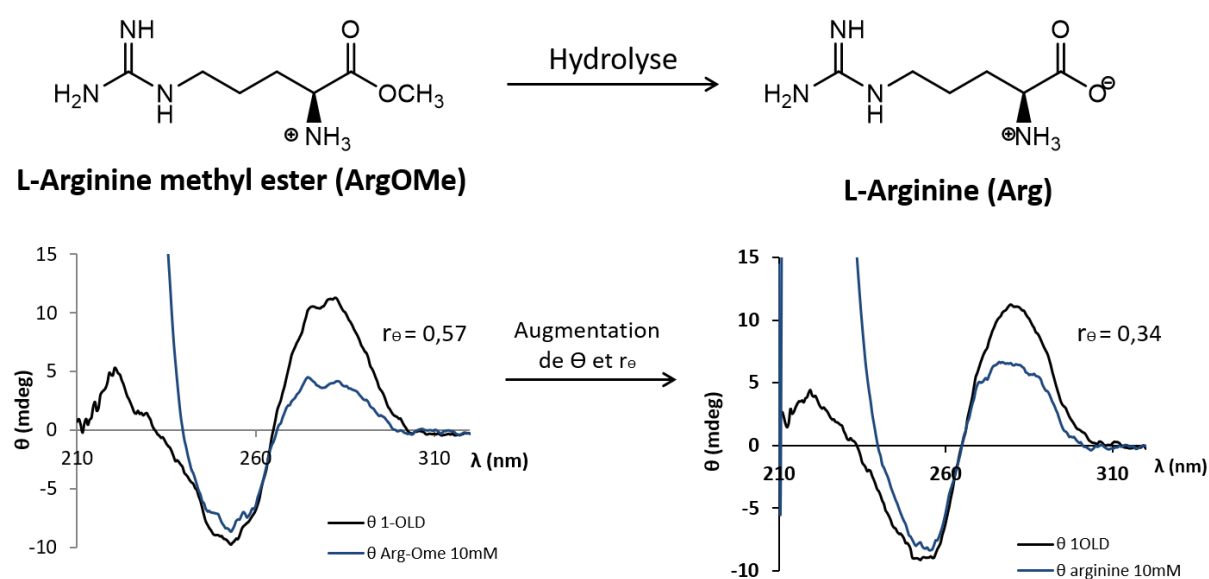


Figure 71. Suivi par DC de l'hydrolyse de l'ArgOMe par les aptazymes

Enfin, le motif imidazole, quelle que soit sa position d'introduction, semble induire une perturbation importante de la structuration. Cette déstabilisation laisse présager que la conjugaison par des **Tripodes** plus volumineux ne soit pas adaptée pour cet aptamère **1OLD**.

Un second aptamère LAA du L-Argininamide plus adapté est envisagé pour développer cette approche aptazyme (Figure 72).⁵ Il contient quatre bases de plus que **1OLD** et sa structuration peut être observée grâce à l'utilisation de fluorophores ligands du petit sillon.

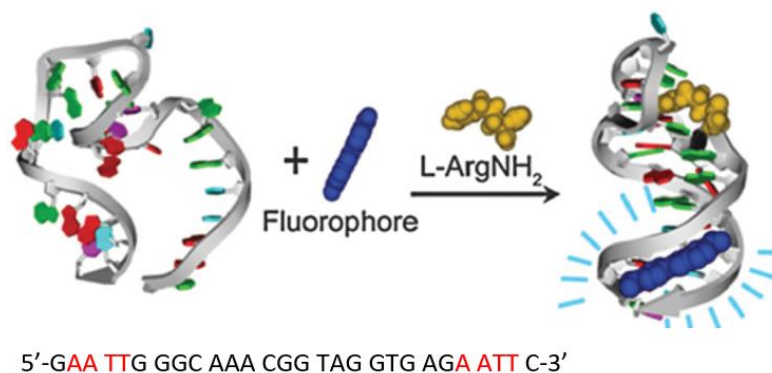


Figure 72. Présentation de la séquence et de la structuration de l'aptamère LAA (figure adaptée de Zhu et al.).⁵

Sa séquence indique la présence de quatre positions T qui peuvent être substituées par le nucléotide convertible. Cet aptamère est donc un bon candidat car il présente également l'intérêt de moins englober le substrat au niveau du site de reconnaissance, permettant d'envisager un meilleur maintien de la reconnaissance lors de l'introduction de modifications proches du site de liaison.

Bibliographie du chapitre IV :

1. Flanagan, M. *et al.* A DNA-conjugated small molecule catalyst enzyme mimic for site-selective ester hydrolysis. *Chem. Sci.* **9**, 2105-2112 (2018).
2. Lin, C. H. & Patel, D. J. Encapsulating an amino acid in a DNA fold. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 1046 (1996).
3. Robertson, S. A., Harada, K., Frankel, A. D. & Wemmer, D. E. Structure determination and binding kinetics of a DNA aptamer-argininamide complex. *Biochemistry* **39**, 946-54 (2000).
4. Lin, C. H., Wang, W., Jones, R. A. & Patel, D. J. Formation of an amino-acid-binding pocket through adaptive zippering-up of a large DNA hairpin loop. *Chem. Biol.* **5**, 555-572 (1998).
5. Zhu, Z., Yang, C., Zhou, X. & Qin, J. Label-free aptamer-based sensors for L-argininamide by using nucleic acid minor groove binding dyes. *Chem. Commun.* **47**, 3192 (2011).
6. Bottari, F. *et al.* Do Aptamers Always Bind? The Need for a Multifaceted Analytical Approach When Demonstrating Binding Affinity between Aptamer and Low Molecular Weight Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 19622-19630 (2020).
7. van Berkel, S. S., van der Lee, B., van Delft, F. L. & Rutjes, F. P. J. T. A macrocyclic coumarin-containing tripeptide via CuAAC chemistry. *Chem. Commun.* 4272 (2009).
8. Kypr, J., Kejnovska, I., Renciuik, D. & Vorlickova, M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1713-1725 (2009).
9. Bishop, G. R. *et al.* Energetic basis of molecular recognition in a DNA aptamer. *Biophys. Chem.* **126**, 165-175 (2007).
10. Liu, L., Stepanian, L., Dubins, D. N. & Chalikian, T. V. Binding of L-Argininamide to a DNA Aptamer: A Volumetric Study. *J. Phys. Chem. B* **122**, 7647-7653 (2018).
11. Verdonck, L. *et al.* Tethered imidazole mediated duplex stabilization and its potential for aptamer stabilization. *Nucleic Acids Res.* **46**, 11671-11686 (2018).

Conclusion générale et perspectives

En s'appuyant sur le savoir-faire du laboratoire et sur les résultats précédents portant sur une jonction trois voies, premier pas de notre équipe vers les mimes de protéases, les travaux décrits dans ce manuscrit portent sur la conception et la synthèse d'oligonucléotides fonctionnalisés présentant à des positions précises, soit des organocatalyseurs trifonctionnalisés (**Tripodes**) en charge de l'hydrolyse de la fonction amide, soit des substrats chromogéniques activés. Ces FuONs sont alors organisés *via* les structures secondaires de l'ADN, permettant la mise en présence des substrats et des **Tripodes** afin d'étudier l'activité catalytique de ces derniers.

Nous avons dans un premier temps pu obtenir des organocatalyseurs tri-fonctionnalisés (**TripSer** et **TripHis**, décrits au chapitre II, Figure 48) qui permettent de rapprocher les trois fonctions clés de la triade catalytique des protéases à sérine.

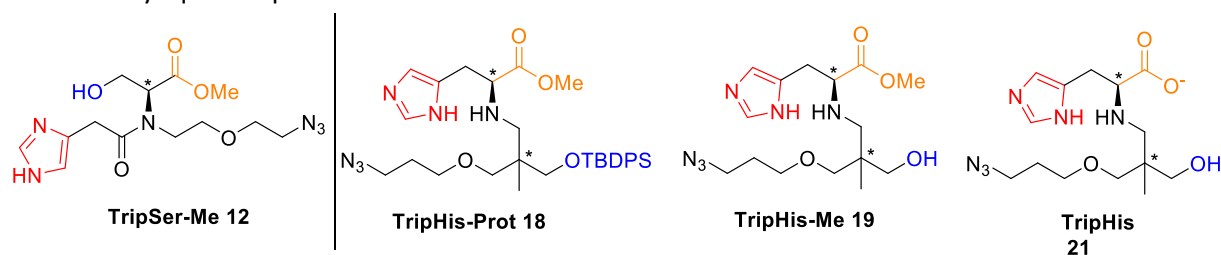


Figure 48. Structures des organocatalyseurs Tripodes

Le **TripSer-Me 12**, dont la synthèse reste à optimiser, a été obtenu en 4 étapes à partir de l'ester de méthyle de la sérine avec un rendement global de 28%. A la lumière de travaux récents sur une structure similaire, il sera très intéressant obtenir le composé présentant la forme carboxylate libre et d'évaluer l'activité catalytique de ces deux **Tripodes** à squelette sérine. La synthèse d'un dérivé porteur d'une fonction amine au lieu de l'amide permettrait également d'étendre la bibliothèque d'organocatalyseurs dont nous disposons et d'obtenir plus d'informations sur l'influence d'un site de protonation supplémentaire sur le catalyseur.

Le **TripHis 21** a été synthétisé en 8 étapes à partir du 1,1,1-tris(hydroxyméthyl)éthane avec un rendement global de 2,5%. Grâce à un choix pertinent de groupements protecteurs orthogonaux, deux catalyseurs **TripHis-Prot 18** et **TripHis-Me 19** ont été obtenus. Ces derniers permettent, lors de l'évaluation de l'activité catalytique du **TripHis 21** qui a été menée, d'étudier séparément l'effet de la présence des différentes fonctions. En effet, les capacités catalytiques des composés **TripHis 21**, **TripHis-Prot 18** et **TripHis-Me 19** ont pu être étudiées par spectroscopie de RMN ^1H dans le cadre d'une réaction de transestérification entre l'acétate de vinyle et le méthanol. Les résultats obtenus ont permis de conclure que les trois fonctions alcool, carboxylate et imidazole présentes sur le catalyseur **TripHis 21** sont nécessaires pour une hydrolyse la plus efficace possible. Un composé dérivé du **TripHis**, un **TripGly** sera également synthétisé pour préciser le rôle des fonctions hydroxyle et carboxylate.

Cette étude, sera à reproduire pour préciser et confirmer leurs propriétés. Elle sera également étendue au tripode **TripSer-Me 12** et ses dérivés. Enfin, la capacité de tous ces organocatalyseurs à hydrolyser des substrats esters ou amides activés sera également évaluée.

Ces composés portent également une fonction azoture afin de permettre leur incorporation par CuAAC sur des CvON porteurs de fonctions propargyle. Ainsi, une bibliothèque de CvON permettant l'assemblage de structures bulge a été synthétisée et ses brins ont ensuite été conjugués par des organocatalyseurs (**Tripodes** ou Im-N₃) et des substrats chromogéniques (chapitre III). Les FuONs obtenus, assemblés en bulges, peuvent mimer la poche de reconnaissance des enzymes, en rapprochant de manière artificielle les deux partenaires, organocatalyseur et substrat. L'utilisation des composés **Tripodes** dans ce type de structures secondaires permet alors d'envisager à la fois une

coopération intra-tripode, entre les trois fonctions de la triade, mais également inter-tripodes, grâce à la possibilité de leur multiple incorporation sur les séquences.

Différents bulges, dont varient la taille de la boucle et des extrémités appariées, ont pu être assemblés et leur stabilité étudiée, dans le but de sélectionner les structures tolérant bien les modifications. Les premières séquences utilisées, qui permettaient d'obtenir une boucle de 6 bases non appariées au cœur du bulge, n'ont pas donné accès à des structures fonctionnalisées assez stables (Figure 58). Cependant, des bulges fonctionnalisés uniquement par des organocatalyseurs (un **TripHis-Me** ou trois motif imidazole face à un ODN non modifié) ont été évalués sur des substrats chromogéniques en solution.

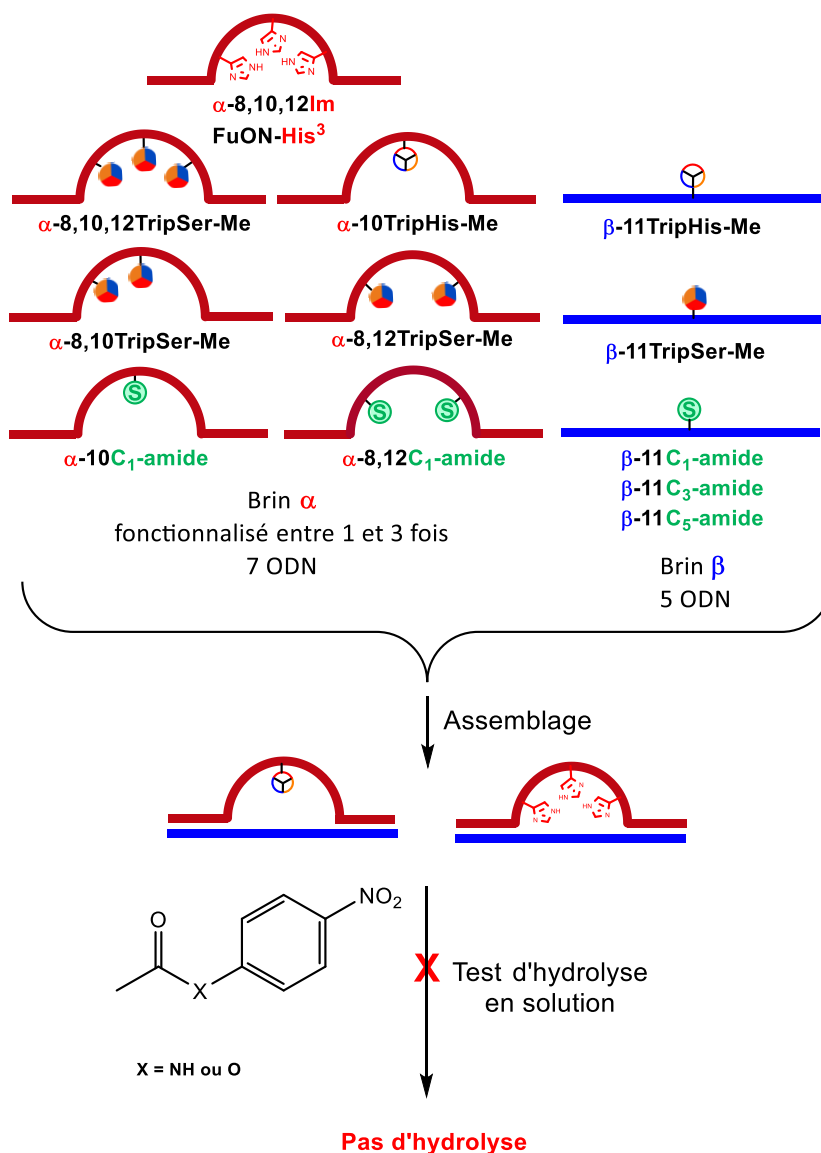


Schéma 35. Représentation des 12 FuON obtenus par CuAAC, assemblage et tests d'hydrolyse

Si aucune activité catalytique n'a été mise en évidence, ces tests ont permis la mise au point des conditions d'études qui seront utilisées lors de l'obtention de bulges fonctionnalisés.

Bien que le bulge idéal, permettant la présentation d'un substrat à un **Tripode** au sein de la boucle non appariée, n'ait pas encore été obtenu, plusieurs séquences étendues (agrandissement de la boucle et allongement de chaque extrémité des brins) ont été envisagées. Les CvONs correspondants sont en

cours de fonctionnalisation par les **Tripodes** ou les substrats. Seize bulges fonctionnalisés seront assemblés (Figure 65) et leurs activités catalytiques évaluées.

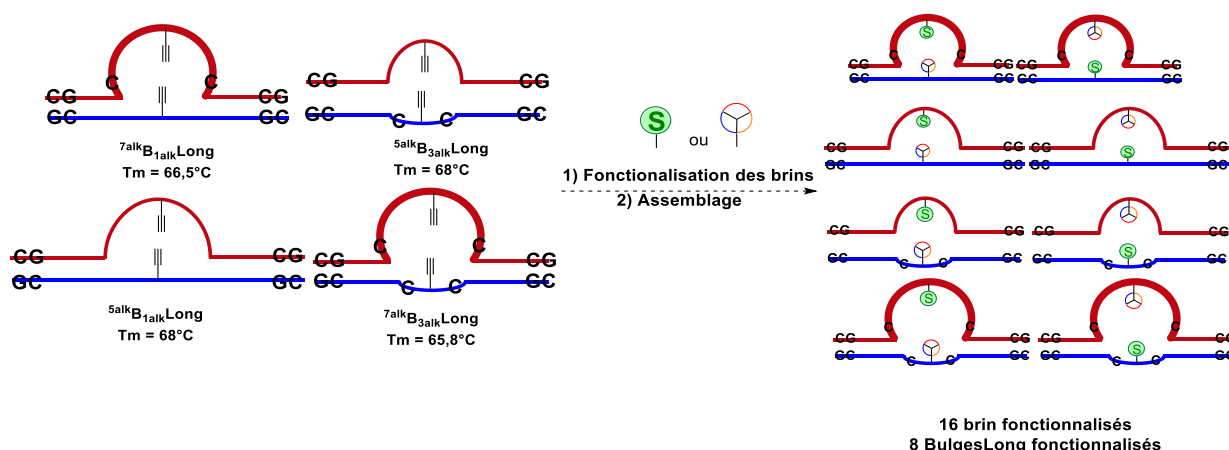


Figure 65. Récapitulatif des structures bulges les plus stables et de leur fonctionnalisation à venir

Ces structures ont d'ores et déjà présentés une stabilité thermique très prometteuse, largement supérieure à celle obtenue lors de l'assemblage du bulge 5B_1 .

En parallèle et selon le même principe de fonctionnalisation d'ODNs, une seconde approche basée sur l'utilisation d'un aptamère de l'argininamide a été mise en place pour conduire à l'obtention d'aptazymes capables de reconnaître un substrat et de l'hydrolyser (chapitre IV). L'aptamère **1OLD**, choisi pour sa courte séquence a, dans un premier temps, été étudié par dichroïsme circulaire pour permettre une meilleure connaissance de ses propriétés.

En nous basant sur les données de la littérature, quatre sites de modification ont ensuite été choisis pour leur positionnement dans la structure, ces nucléotides étant proches du site de liaison sans être directement impliqués dans les interactions ODN-substrat. L'incorporation de modifications à ces positions pourrait alors être tolérée.

Des CvON portant des fonctions propargyle aux positions sélectionnées ont été synthétisés et fonctionnalisés par un petit motif imidazole. Celui-ci, plus compact que les **Tripodes**, a permis dans un premier temps d'évaluer l'effet d'une petite modification sur la structure.

Les FuONs obtenus ont été étudiés par dichroïsme circulaire en présence de l'argininamide et d'un substrat chromogénique, **ArgpNA**, pour conclure sur la viabilité de la modification sur ces positions et sur l'éventuelle activité catalytique du substrat. Cependant, une perturbation importante de la reconnaissance du substrat est observée pour les quatre aptazymes, quel que soit le site de la modification (dans la tige, en entrée ou au cœur de la boucle). De plus, les tests d'hydrolyse réalisés à l'aide de **ArgpNA** n'ont pas montré d'activité catalytique. La structure **1OLD** choisie apparaît donc comme trop petite pour tolérer la présence des **Tripodes**, modifications plus encombrantes que le simple noyau imidazole.

A l'avenir, cette approche pourrait donc être transposée sur des séquences d'aptamère plus grandes, notamment l'aptamère LAA évoqué au début de ce chapitre (Figure 72). Cet aptamère présente également l'intérêt de moins englober le substrat au niveau du site de reconnaissance, ce qui pourrait éventuellement permettre un meilleur maintien de la reconnaissance lors de l'introduction de modifications proches du site de liaison.

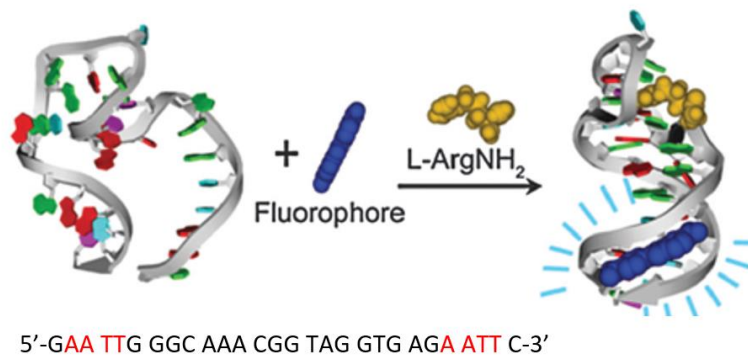


Figure 72. Présentation de la séquence et de la structuration de l'aptamère LAA (figure adaptée de Zhu et al.)

Finalement, le développement des **Tripodes** permettra de tendre vers une approche multivalente. En effet, la multi-fonctionnalisation de tétraèdres d'ADN (comme ceux décrits par Mao et al.) (Figure 12) par l'un de nos **Tripodes** permettrait la création d'un catalyseur multivalent augmentant la concentration effective en organocatalyseurs.

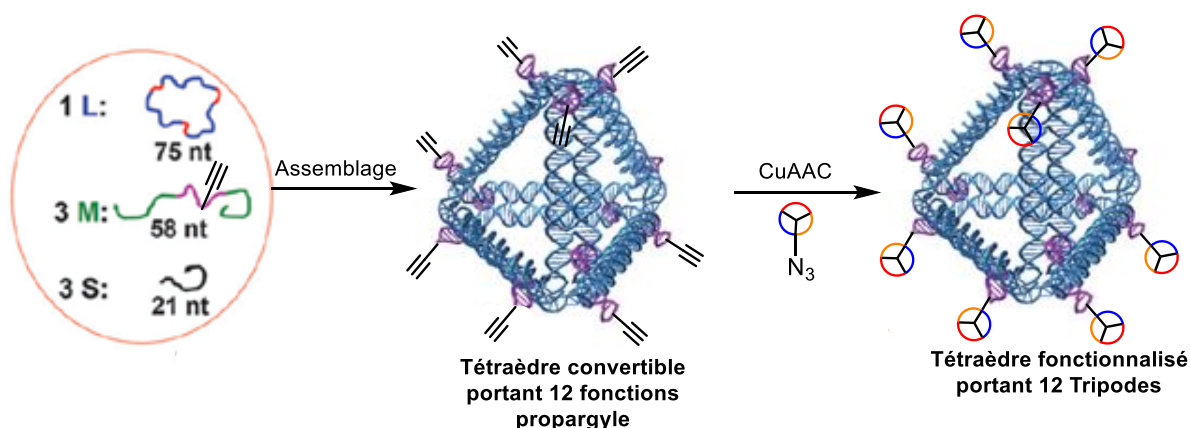


Schéma 36. Tétrahédre modifié par des hairpins²⁴

La séquence utilisée pour le brin moyen, responsable de la formation des hairpins orientés vers l'extérieur du tétraédre, contient quatre thymines dans la boucle de l'hairpin et serait donc particulièrement adaptée à l'introduction de nos phosphoramidites porteurs d'une fonction propargyle. Elle permettrait d'introduction d'une fonction propargyle par boucle et, une fois fonctionnalisée, la présentation de trois **Tripodes** par sommet, susceptibles de coopérer.

Experimental Part

Experimental part

All reactions described as “under anhydrous conditions” were performed using argon as an inert gas. Oligonucleotides syntheses were performed on oligonucleotides synthesizers either ABI 394 or K&A H-6. The acetonitrile used for these syntheses was of anhydrous grade (Fisher).

Thin layer chromatography (TLC) was performed using plates made from silica on aluminum DC-Fertigfolien Alugram Xtra SIL G/UV254 (0,2 mm) MachereyANagel, observed under UV light at 254 nm and then revealed using ethanolic solutions of phosphomolybdic acid (5%) or potassium permanganate (10%).

Chromatography purifications were performed using flash-chromatography GRACE pre-packed SiO₂ columns (15µm). Eluent composition is expressed in volume-to-volume ratio (v/v).

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) direct phase analyses were performed on a silica column Sunfire (L= 15 cm, D= 4,6 mm, 7µm) with a Waters 2695 device connected to a PDA 2996 detector. For the reverse phase analyses a Waters Xbridge OST C₁₈ column (2.5 µm, 4.6 mm x 50 mm) with a 1 mL/min flow was used on a Waters 2695 device connected to a PDA 996). For oligonucleotides analyses, reversed layer HPLC analyses were performed using a gradient from 95% of A to 85% of A in B (A: TEAA buffer 0.05 M, pH 7.0; B: CH₃CN).

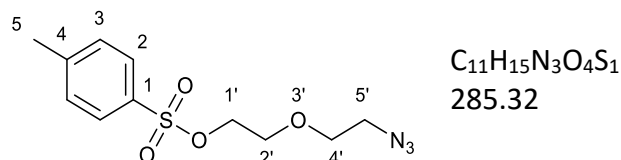
NMR spectra were recorded on Bruker Avance 300 spectrometers using deuterated solvents at 300 MHz for ¹H nuclei, 75 MHz for ¹³C nuclei. The chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from the tetramethylsilane (TMS) signal as reference. Multiplicity of signals is detailed as such: s: singlet, d: doublet, dd: doublet of doublets, ddd: doublet of doublets of doublets, t: triplet, td: triplet of doublets, tt: triplet of triplets, q: quadruplet, quint: quintuplet, s: sextuplet, h: heptuplet). Numeration on figures corresponds to NMR attribution and might differ from indicated compound name.

Mass spectrometry analyses were performed on a DSQ II ThermoFisher spectrometer for DCI-NH₃ low resolution and GCT Premier Waters spectrometer for DCI-CH₄ high resolution (HRMS). A Xevo G2 QTOF Waters spectrometer was used for electrospray (ESI) high resolution. Oligonucleotides analyses were performed by mass spectrometry in MALDI-TOF using a Waters Micro MX spectrometer. A saturated solution of 3-hydroxypicolinic acid (HPA) in H₂O/ACN (1:1, v/v) containing 10% ammonium citrate, was prepared and used as matrix. Both matrix and ODN solution were mixed in equimolar ratio (1 µL/ 1µL) before being deposited onto the plate and dried at room temperature (r. t.) and pressure.

Tripodes synthesis (Chapter II)

1. Azide-alkyl chains

5-azidopent-3-oxy-1-yl 4-methylbenzene-1-sulfonate (**1**)



Commercial diethylene glycol di(*p*-toluenesulfonate) (6.40 g, 15.4 mmol) was dissolved in acetone (50 mL). Sodium azide (1 g, 15.4 mmol) was dissolved in H₂O (10 mL) and added dropwise as slowly as possible to favor the mono-substitution. Once the addition was over, the resulting mixture was stirred for 16h at 75°C and at r.t. for additional 24h. Acetone was evaporated under reduced pressure, the remaining aqueous mixture was extracted into EA (2 x 20 mL). Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford the desired product **1** as a colorless oil (1.87 g, 43%) alongside remaining starting material (1.48 g, 23%) and 1-azido-2-(2-azidoethoxy)ethane (0.64 g, 26%). Data were in agreement with the literature (Qiao J. *et al. J Radioanal Nucl Chem* **2017**, 312, 263–276).

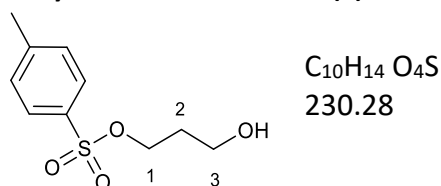
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.81 (d, 2H, ³J₂₋₃ = 8.2 Hz, H₂), 7.35 (d, 2H, ³J₃₋₂ = 8.4 Hz, H₃), 4.17 (t, 2H, ³J_{1'-2'} = 4.7 Hz, H_{1'}), 3.70 (t, 2H, ³J_{2'-3'} = 4.7 Hz, H_{2'}), 3.60 (t, 2H, ³J_{4'-5'} = 5.1 Hz, H_{4'}), 3.33 (t, 2H, ³J_{5'-4'} = 5.3 Hz, H_{5'}), 2.45 (s, 3H, H₅).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 145.1 (C₁), 139.6 (C₄), 130.1 (C₃), 128.2 (C₂), 70.4 (C_{4'}), 69.3 (C_{1'}), 68.9 (C_{2'}), 50.8 (C_{5'}), 21.9 (C₅).

MS (DCI-NH₃): 302.9 [M+NH₄⁺].

IR (ATR, cm⁻¹): 2120 (azide).

3-hydroxyprop-1-yl 4-methylbenzene-1-sulfonate (**2**)



p-Toluenesulfonylchloride (5 g, 26.2 mmol) was added to 1,3-propanediol (57 mL, 787 mmol) and the resulting mixture was stirred at 25°C for 30min. Et₃N (3.7 mL, 26.2 mmol) was then added dropwise and the resulting mixture was stirred for 5h. H₂O (200 mL) and DCM (200 mL) were added to the solution, layers were separated, and the aqueous layer was extracted again with DCM (100 mL). Combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under vacuum. The desired compound **2** was obtained as a clear oil (5.61 g, 93% yield), and used without any further purification as purity was confirmed by ¹H NMR analysis.

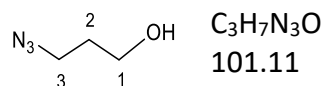
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.78 (d, 2H, ³J_{Ar-Ar} = 8.4 Hz, H_{Ar}), 7.35 (d, 2H, ³J_{Ar-Ar} = 8.4 Hz, H_{Ar}), 4.17 (t, 2H, ³J₁₋₂ = 6.2 Hz, H₁), 3.67 (m, 2H, H₃), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.87 (quint, 2H, ³J₂₋₁ = 6.1 Hz, H₂).

Experimental part

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 145.0 (C_{Ar}SO₂), 132.7 (C_{Ar}CH₃), 130.0 (C_{Ar}), 127.8 (C_{Ar}), 67.8 (C₁), 58.0 (C₃), 31.6 (C₂), 21.6 (CH₃).

MS (DCI-NH₃): 248.1 [M+NH₄⁺].

3-azidopropan-1-ol (**3**)



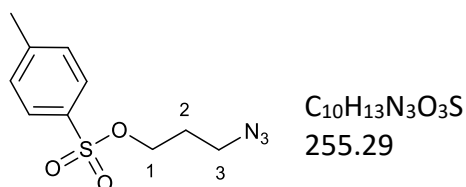
Compound **2** (5.5 g, 24.0 mmol) was suspended in water (15 mL) and NaN₃ (1.9 g, 29.0 mmol) was added portion wise. The reaction mixture was heated at 50°C and stirred overnight. The aqueous mixture was extracted with DCM (3x 20 mL) and the combined organic layers were dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired product **3** as a light-yellow oil (1.4 g, 58% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.71 (t, 2H, ³J₃₋₂ = 6.0 Hz, H₁), 3.43 (t, 2H, ³J₁₋₂ = 6.6 Hz, H₃), 1.87 (quint, 2H, ³J₂₋₁ = 6.6 Hz, H₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 59.3 (C₁), 48.2 (C₃), 31.4 (C₂).

MS (DCI-NH₃): 101.1.

3-azidoprop-1-yl 4-methylbenzene-1-sulfonate (**4**)



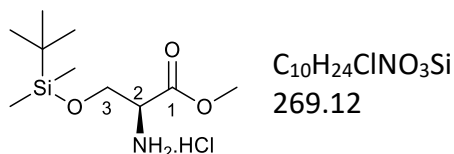
Compound **3** (1.3 g, 12.8 mmol) was dissolved in DCM (30 mL) before adding Et₃N (2.4 mL, 17.9 mmol) followed by *p*-toluenesulfonylchloride (TsCl, 2.43 g, 12.8 mmol). The resulting mixture was then stirred overnight at r. t. The organic solution was then washed with H₂O (3 x 30 mL) and with a saturated solution of NaCl (2 x 30 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure to give the desired compound **4** as a light-yellow sticky oil (2.49 g, 76% yield).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.73 (m, 2H, H_{Ar}), 7.31 (m, 2H, H_{Ar}), 4.05 (t, 2H, ³J₁₋₂ = 6.0 Hz, H₁), 3.31 (t, 2H, ³J₃₋₂ = 6.5 Hz, H₃), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.87 (quint, 2H, ³J = 6.3 Hz, H₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 145.1 (C_{Ar}SO₂), 132.6 (C_{Ar}CH₃), 130.0 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 67.2 (C₁), 47.3 (C₃), 28.4 (C₂), 21.6 (CH₃).

IR (ATR, cm⁻¹): 2100 (azide).

2. TripSer (compound 12)

3-*tert*-butyldimethylsilyloxy L-serine methylester hydrochloride (5)

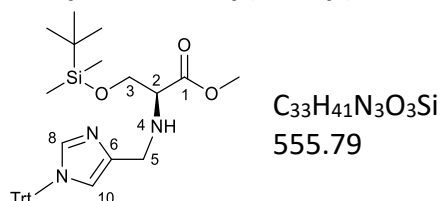
Protocol adapted from: A. Banerjee *et al.*, *Org. Lett.* **2017**, 19, 16, 4363-4366

L-Serine methyl ester hydrochloride (1 g, 6.4 mmol) and *t*-butyldimethylchlorosilane (2.0 g, 13.5 mmol) were dissolved in DCM (12 mL). The solution was cooled to 0°C using an ice bath before imidazole (1.53 g, 22.5 mmol) was added portion wise. The bath was removed and the mixture was stirred at r. t. for 48h under N₂ atmosphere. After disappearance of the starting material as indicated by TLC analyses, HCl 1M (10 mL) was added to the solution until the pH value reached pH = 5. The mixture was then extracted into DCM (3 x 10 mL) and combined organic layers were washed with a saturated solution of NaCl (10 mL), dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure to afford the desired product **5** with a quantitative yield (1.5 g). Compound **5** was used without any further purification. NMR data were in accordance with the literature.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.74 (m, 2H, H₃), 3.60 (s, 3H, OCH₃), 3.39 (t, 1H, ³J₂₋₃ = 9.0 Hz, ³J_{2-3'} = 3 Hz, H₂), 2.05 (bs, 2H, NH₂), 0.83 (s, 6H, Me-Si), 0.80 (s, 9H, *t*Bu-Si).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 174.3 (C₁), 65.1 (C₃), 56.3 (C₂), 51.8 (OMe), 25.68 (Me), 25.61 (Me), 25.59 (CMe₃), 18.1 (CMe₃), -5.6 (Me-Si), -5.8 (Me-Si).

MS (DCI/NH₃): 234.0 [M+H⁺].

3-*tert*-butyldimethylsilyloxy *N*-((1-tritylimidazol-4-yl)methyl) L-serine methylester (6)

Protocol adapted from: A. F. Abdel-Magid *et al.*, *Synlett*, **1994**, 01, 81-83

1-tritylimidazole-4-carbaldehyde (290 mg, 0.9 mmol) and compound **5** (200 mg, 0.9 mmol) were dissolved in dry DCE (6 mL) and Et₃N (143 μL, 1.0 mmol) was added dropwise. NaBH(OAc)₃ (273 mg, 1.3 mmol) was added to the mixture before stirring at 35°C, under a nitrogen atmosphere overnight. Additions of NaBH(OAc)₃ (182 mg, 0.9 mmol) were repeated after 12h and after 20h. The mixture was stirred for a total of 36h and then stopped by dilution of the reaction medium using DCM (5 mL). The mixture was then washed 3 times using a NaHCO₃ (3 x 20 mL) saturated solution. The organic layer was then washed twice with a saturated solution of NaCl, dried over MgSO₄ and concentrated under reduced pressure. Crude material was then purified by column chromatography on silica gel (DCM/EA, 5:5) to afford a yellow oil **6** (180 mg, 36%).

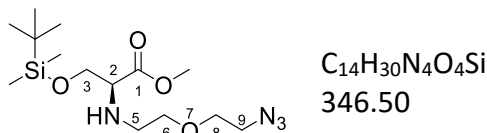
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.39 (d, 1H, ³J₈₋₁₀ = 3.0 Hz, H₈), 7.33-7.31 (m, 9H, Ar trityl), 7.16-7.13 (m, 6H, Ar trityl), 6.74 (d, 1H, ³J₁₀₋₈ = 3.0 Hz, H₁₀), 3.84 (m, 2H, H₃), 3.83-3.66 (m, 2H, H₅), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.48 (t, 1H, ³J₂₋₃ = 6.0 Hz, H₂), 2.62 (bs, 1H, NH), 0.86 (s, 9H, *t*Bu-Si), 0.02 (s, 6H, Me-Si).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.7 (C₁), 142.5 (C_{Ar} trityl), 139.7 (C₆), 138.8 (C₈), 129.8 (C_{Ar} trityl), 128.02 (C_{Ar} trityl), 128.00 (C_{Ar} trityl), 118.8 (C₁₀), 75.2 (C_q trityl), 64.5 (C₃), 62.5 (C₂), 51.7 (OMe), 45.8 (C₅), 25.8 (CMe₃), 18.2 (CMe₃), -5.4 (Me-Si), -5.5 (Me-Si).

MS (DCI-NH₃): 556.2 [M+H⁺].

IR (ATR, cm⁻¹): 2120 (azide).

3-tert-butyltrimethylsilyloxy N-(5-azidopent-3-oxo-1-yl) L-serine methylester (8)



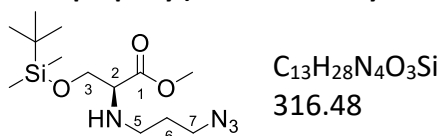
Compound **5** (200 mg, 0.9 mmol) dissolved in dry ACN (4 mL) was added Na₂CO₃ (136 mg, 1.3 mmol) and compound **1** (123 mg, 0.43 mmol). The resulting mixture was stirred at 60°C for 4 days, under a nitrogen atmosphere. The solution was then filtrated over Celite® in order to remove Na₂CO₃ residues, before being concentrated under reduced pressure. The recovered material was dissolved in DCM (15 mL) and extracted with H₂O (3 x 20mL) and then with a saturated solution of NaCl, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated. The crude material was then purified by column chromatography on silica gel (gradient starting from EP/EA, 90:10 to EA/MeOH 80:20) to afford as a yellow oil (111 mg, 75%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.86 (d, 2H, ³J₃₋₂ = 5.1 Hz, H₃), 3.73 (s, 3H, OCH₃), 3.66-3.60 (m, 4H, H₆ and H₈), 3.47 (t, ³J₂₋₃ = 4.9 Hz, 1H, H₂), 3.37 (dt, ³J₉₋₈ = 4.6 Hz, ²J_{9-9'} = 1.0 Hz, 1H, 2H₉), 2.98-2.90 (m, 1H, H₅), 2.79-2.72 (m, 1H, H_{5'}), 0.87 (s, 9H, tBu-Si), 0.03 (s, 3H, Me-Si), 0.04 (s, 3H, Me-Si).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.7 (C₁), 71.1, 69.9 (C₆, C₈), 64.4 (C₃), 63.4 (C₂), 51.9 (OMe), 50.8 (C₉), 47.5 (C₅), 25.9 (CMe₃), 18.3 (CMe₃), -5.4 (Me-Si), -5.5 (Me-Si).

MS (DCI-NH₃): 347.21 [M+H⁺].

3-tert-butyltrimethylsilyloxy N-(3-azidoprop-1-yl) L-serine methylester (9)



Compound **5** (500 mg, 2.1 mmol) was dissolved in dry ACN (8 mL) and Na₂CO₃ (340 mg, 3.2 mmol) was then added. The resulting mixture was stirred at 50°C for 1h30 before compound **4** (273 mg, 1.1 mmol) was added. The resulting solution was stirred at 60°C for 3 days, under a nitrogen atmosphere. The solution was then filtrated over Celite® and then concentrated under reduced pressure. The recovered material was dissolved in DCM (15 mL) and washed with H₂O (3 x 20 mL). Organic layer was then washed with a saturated solution of NaCl, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated. Crude material was then purified by column chromatography on silica gel (gradient starting from EP/EA 8:2 to EA 100%) to afford compound **9** as a yellow oil (145 mg, 43%).

Experimental part

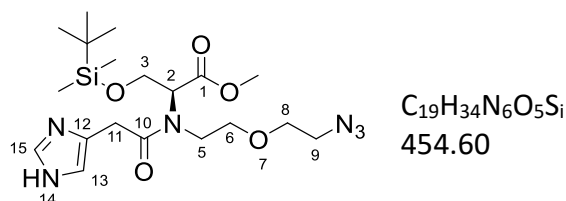
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.82 (A part of an ABX syst, ³J₃₋₂ = 4.7 Hz and ²J_{3-3'} = 9.8 Hz, 2H, H₃), and 3.79 (B part of an AB syst, ³J₃₋₂ = 4.7 Hz and ²J_{3-3'} = 9.8 Hz, 2H, H₃), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 3.46 (dt, ³J₅₋₆ = 6.7 Hz and ²J_{5-5'} = 1.5 Hz, 2H, H₅), 3.33 (X part of an ABX syst, 1H, ³J₂₋₃ = 4.7 Hz, H₂), 2.77 (dt, ³J₇₋₆ = 6.8 Hz and ²J_{7-7'} = 11.6 Hz, 1H, H₇), 2.57 (dt, ³J₇₋₆ = 6.9 Hz and ²J_{7-7'} = 11.6 Hz, 1H, H₇), 1.78 (bs, 1H, NH), 1.74 (quint, ³J₆₋₇ = 6.8 Hz, ³J₆₋₅ = 6.8 Hz and ²J_{6-6'} = 13.6 Hz, 2H, H₆), 0.85 (s, 9H, tBu-Si), 0.01 (s, 6H, Me-Si).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 205.3 (C₁), 63.8 (C₃), 62.3 (C₂), 50.6 (OMe), 48.6 (C₅), 44.3 (C₇), 29.7 (CMe₃), 28.7 (C₆), 24.8 (Me-Si).

MS (DCI-NH₃): 317.2 [M+H⁺].

IR (ATR, cm⁻¹): 2097 (azide).

methyl (*S*)-2-((*N*-5-azidopent-3-oxy-1-yl)-(1*H*-imidazol-4-yl)acetamido)-3-*tert*-butyldimethylsilyloxy propanoate (**11**)



Commercially available 4-imidazolyle acetic acid hydrochloride (39 mg, 0.2 mmol) was first suspended in dry DMF (250 mL) and DIPEA was added (115 mL, 0.6 mmol). The reaction mixture was stirred for 30min before adding HATU (115 mg, 0.3 mmol). The colour of the solution turned yellow then rapidly dark brown. The solution was stirred for 5 min before a solution of **8** (70 mg, 0.2 mmol) in dry ACN (1 mL) was added dropwise before stirring under an argon atmosphere for 36h and quenching by addition of saturated NaHCO₃ solution (15 mL). The aqueous phase was extracted into EA (2 x 15 mL). The combined organic layer was then washed with a 5% solution of LiCl (w/v) (15 mL) then with a saturated solution of NaCl, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was then purified by column chromatography on silica gel (gradient starting from EA to EA/MeOH, 10:0 to 8:2) to afford **11** as an oil (34 mg, 37%).

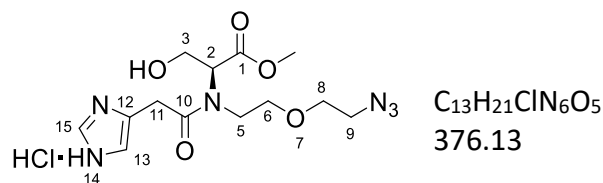
¹H NMR (300 MHz, MeOD), δ (ppm): 7.80 (s, 1H, H₁₅), 7.01 (s, 1H, H₁₃), 4.39 (t, 1H, ³J₂₋₃ = 6.2 Hz, H₂), 4.16 (d, 2H, ³J₃₋₂ = 6.2 Hz, H₃), 3.96 (m, 2H, H₅), 3.93 (A part of AB system, 1H, ²J_{11-11'} = 16.0 Hz, H₁₁), 3.83 (B part of AB system, 1H, ²J_{11-11'} = 16.0 Hz, H_{11'}), 3.76-3.60 (m, 5H, H₅, H₆, H₈), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 3.40 (m, 2H, H₉), 0.89 (s, 9H, tBu-Si), 0.07 (s, 3H, Me-Si), 0.05 (s, 3H, Me-Si).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD), δ (ppm): 173.2 (C₁₀), 171.3 (C₁), 136.4 (C₁₅), 131.8 (C₁₂), 118.6 (C₁₃), 71.4 (C₈), 71.1 (C₆), 64.2 (C₂), 62.6 (C₃), 52.6 (OMe), 52.1 (C₉), 51.3 (C₅), 33.4 (C₁₁), 26.3 (CMe₃), 19.2 (CMe₃), -5.28 (Me-Si), -5.30 (Me-Si).

HRMS (ESI⁺): calcd 455.2438 for C₁₉H₃₅N₆O₅Si; found 455.2436.

Experimental part

methyl (S)-2-((N-5-azidopent-3-oxo-1-yl)-(1H-imidazol-4-yl)acetamido)-3-hydroxypropanoate hydrochloride (**12**)



To a solution of **11** (34 mg, 0.08 mmol) in dry MeOH (750 μ L) was added HCl (21 μ L, 4M in dioxane). The reaction mixture was stirred for 30min and then co-evaporated twice with MeOH (1 mL). Compound **12** (32 mg, quantitative) was obtained as an oil and was used for the Click reactions without any further purification.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, MeOD), δ (ppm): 8.82 (d, 1H, $^4J_{15-13} = 1.3$ Hz, H₁₅), 7.39 (d, 1H, $^4J_{13-15} = 1.4$ Hz, H₁₃), 4.30 (dd, 1H, $^3J_{2-3} = 4.5$ Hz, $^3J_{2-3} = 8.3$ Hz, H₂), 4.14 (AB system, 2H, $^2J = 3.4$ Hz, H₁₁), 4.13-4.01 (m, 2H, H₃), 3.95-3.88 (m, 1H, H₅), 3.78 (t, 2H, $^3J_{6-5} = 4.6$ Hz, H₆), 3.71-3.66 (m, 4H, OMe, H₅ and H₈), 3.44 (m, 2H, H₉).

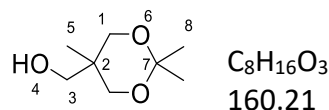
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, MeOD), δ (ppm): 171.4 (C₁), 171.1 (C₁₀), 135.0 (C₁₅), 129.5 (C₁₂), 118.9 (C₁₃), 71.3 (C₈), 70.7 (C₆), 64.7 (C₂), 60.8 (C₃), 52.7 (OMe), 52.1 (C₉), 51.5 (C₅), 30.7 (C₁₁).

HRMS (ESI⁺): calcd 341.1573 for C₁₃H₂₁N₆O₅; found 341.1574.

IR (ATR, cm⁻¹): 2114 (azide), 1739 (C=O_{ester}), 1630 (C=O_{amide}).

3. TripHis (compound 21)

5-hydroxymethyl-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxane (13)



Protocol adapted from: A. J. Brissenden, A. J. *et al. Polym.Sci.* **2020**, *58*, 2697–2707

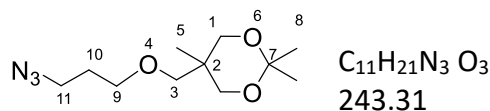
Commercial 1,1,1-tris(hydroxymethyl)ethane (6 g, 50 mmol) was dissolved in acetone (50 mL) before adding of 2,2-dimethoxypropane (6.4 mL, 52 mmol) and *p*-toluenesulfonic acid (120 mg, 13.0 μ mol). The resulting mixture was stirred at r. t. for 6h. Reaction medium was then neutralized by addition of solid K_2CO_3 until bubbling stopped. Remaining salts were then removed by filtration and the resulting filtrate was then concentrated under reduced pressure. The resulting clear oil was then placed at 15°C for 1h. The precipitated impurities were then removed by filtration over Celite[®] and rinsed with EA (2 x 25mL). The product **13** was obtained as a colorless oil after evaporation of EA (7.4 g, 92% yield) and did not require any further purification.

¹H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 3.51-3.37 (m, 6H, H_1 and H_3), 1.26 and 1.21 (2 s, 6H, H_8), 0.66 (s, 3H, H_6).

¹³C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 97.7 (C_7), 66.0 (C_1), 64.9 (C_3), 34.5 (C_2), 26.7 and 20.3 (C_8), 17.4 (C_5).

MS (DCI/ CH_4): 161.1 [$M+H^+$].

5-(5-azidopent-2-oxy-1-yl)-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxane (14)



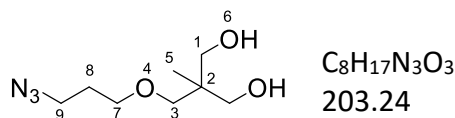
Compound **13** (1.5 g, 9.4 mmol) was dissolved in DMF (10 mL) and the mixture was cooled to 0°C using an ice bath before addition of grinded KOH (1.05 g, 18.7 mmol) and stirring for 30min. After the dropwise addition of **4** (4.8 g, 18.8 mmol) to the resulting solution, the ice bath was then removed. The solution was allowed to warm up to r. t. before stirring at 35°C for 24h. DMF was then evaporated and the obtained residue was dissolved in EA (30 mL) and washed 3 times with water (3 x 20 mL). Organic layer was finally dried over $MgSO_4$, filtrated and concentrated under reduced pressure to give desired compound **14** (820 mg, containing approx. 20% of residual starting material, 64% corrected yield). Crude material was engaged in the next step without any further purification.

¹H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 3.66-3.31 (m, 10H, H_1 , H_3 , H_9 and H_{11}), 1.80 (quint, 2H, $^3J = 6.3$ Hz, $^3J = 6.4$ Hz, H_{10}), 1.39 and 1.35 (2 s, 6H, H_8), 0.82 (s, 3H, H_5).

¹³C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 97.9 (C_7), 73.7 (C_3), 68.0 (C_9), 66.5 and 66.3 (C_1), 48.6 (C_{11}), 34.4 (C_2), 29.1 (C_{10}), 26.6 and 20.9 (C_8), 18.2 (C_5).

MS (DCI/ CH_4): 244.2 [$M+H^+$].

IR (ATR, cm^{-1}): 2096 (azide).

2-(5-azidopent-2-oxo-1-yl)-2-méthylpropan-1,3-diol (15)

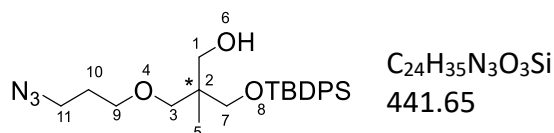
Compound **14** (820 mg, 3.3 mmol) was dissolved in THF (5 mL) before adding HCl 1M (aqueous solution, 10 mL). The resulting mixture was stirred at r. t. over night. The reaction was then neutralized with $NaHCO_3$ (10 mL). The obtained solution was then extracted with EA (3x 15mL). Combined organic layers were washed with a saturated solution of NaCl, dried over $MgSO_4$, filtrated and concentrated under reduced pressure to give desired product **15** as a clear oil (502 mg, 75%) and was used in the next step without any further purification.

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 3.62-3.46 (m, 4H, H_1), 3.47 (t, 2H, $^3J = 6.0$ Hz, H_7), 3.36 (s, 2H, H_3), 3.34 (t, 2H, $^3J = 6.7$ Hz, H_9), 2.44 (bs, 2H, OH), 1.80 (quint, 2H, $^3J = 6.5$ Hz, $^3J = 6.5$ Hz, H_8), 0.79 (s, 3H, H_5).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 76.0 (C_3), 68.4 (C_7), 67.5 (C_1), 48.5 (C_9), 40.8 (C_2), 29.0 (C_8), 17.1 (C_5).

MS (DCI/ CH_4): 204.2 [$M+H^+$].

IR (ATR, cm^{-1}): 2098 (azide).

2-(5-azidopent-2-oxo-1-yl)-2-methyl-2-((tert-butyl)diphenylsilyl)oxymethyl)propan-1-ol (16)

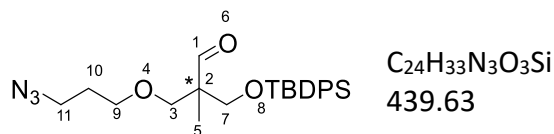
To a solution of **15** (150 mg, 0.7 mmol) in THF (2 mL), cooled with a dry ice bath to $-78^\circ C$ was added dropwise *n*-BuLi (1.6 M in hexane, 0.5 mL, 0.7 mmol), followed by the dropwise addition of TBDPSCI (190 μ L, 0.7 mmol). The resulting mixture was then stirred at $-78^\circ C$ for 15min. The dry ice bath was then removed and the mixture was warmed up to r. t. before being stirred at $25^\circ C$ for 30min. Finally, the solution was heated under reflux for 3h. The crude material was obtained by concentration under reduced pressure. The residue was then dissolved in DCM (20 mL) and filtered over Celite[®] to remove suspended salts. Compound **16** (250 mg, 76% yield) was obtained as a clear oil after column chromatography on silica gel (DCM/EA, 4:6).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 7.78-7.38 (m, 10H, H_{Ar} TBDPS), 3.60 (m, 10H, H_1 , H_3 , H_7 , H_9 , H_{11}), 1.84 (m, 2H, H_{10}), 1.16 (s, 3H, H_5), 1.15 (s, 9H, *t*Bu).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 135.7 (C_{Ar}), 135.2 (C_{Ar}), 130.3 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 75.3 (C_3), 69.0 (C_1), 68.3 (C_9), 67.7 (C_7), 48.5 (C_{11}), 45.9 (C_2), 29.1 (C_{10}), 26.9 (C_{tBu}), 19.3 (C_q *t*Bu), 19.3 (C_5).

MS (DCI/ CH_4): 442.3 [$M+H^+$].

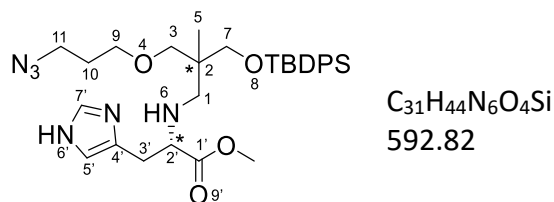
IR (ATR, cm^{-1}): 2097 (azide).

2-(5-azidopent-2-oxo-1-yl)-2-methyl-2-((tert-butyldiphenylsilyl)oxymethyl)propanal (17)

To an oxalyl chloride (418 μL , 4.9 mmol) solution in DCM (9 mL) cooled at -65°C using a dry ice bath was added dropwise a solution of DMSO (723 μL , 10.2 mmol) in DCM (9 mL). The resulting mixture was stirred at -65°C for 15 min before the dropwise addition of **16** (1.7 g, 3.9 mmol) in DCM (9 mL). The mixture was then stirred for 45 min at -65°C . Et_3N (1.8 mL, 12.9 mmol) was finally added dropwise and the solution was allowed to warm up to r. t. The solution was then washed 3 times with water (3 x 10 mL) and the organic layer was dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure. Crude aldehyde **17** (1.27 g, 74% yield) was used without any further purification.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 9.66 (s, 1H, H_1), 7.75-7.37 (m, 10H, H_{Ar} TBDPS), 3.77 (m, 2H, H_7), 3.59 (m, 2H, H_3), 3.48 (t, 2H, $^3J_{9-10} = 5.9$ Hz, H_9), 3.29 (t, 2H, $^3J_{11-10} = 6.8$ Hz, H_{11}), 1.81 (quint, 2H, $^3J = 6.7$ Hz, H_{10}), 1.08 (s, 3H, H_5), 1.06 (s, 9H, tBu).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 205.0 (C_1), 135.7 (C_{Ar}), 134.9 (C_{Ar}), 130.0 (C_{Ar}), 127.9 (C_{Ar}), 71.7 (C_3), 68.3 (C_9), 65.0 (C_7), 48.5 (C_{11}), 45.9 (C_2), 29.2 (C_{10}), 27.0 (CMe_3), 19.5 (CMe_3), 14.8 (C_5).

N-(2-(5-azidopent-2-oxo-1-yl)-2-((tert-butyldiphenylsilyl)oxymethyl)-2-methyl)prop-1-yl) L-histidine methyl ester (18)

Histidine methylester hydrochloride (1.0 g, 4.1 mmol) was dissolved in MeOH (20 mL) before addition of NaOH (0.06 g, 1.5 mmol) and stirred for 10 min at r. t. MgSO_4 (819 mg, 6.8 mmol) was added to the solution followed by **17** (1.2 g, 2.7 mmol). The reaction was stirred for 20 min before addition of NaBH_3CN (0.34 g, 5.5 mmol). The obtained mixture was then stirred at r. t. for 6h. The reaction medium was then filtrated over Celite[®] to remove salts and concentrated under reduced pressure. The obtained residue was dissolved in EA and washed 3 times with NaHCO_3 saturated aqueous solution (3 x 100 mL). The organic layer was then dried over MgSO_4 , filtered and concentrated under reduced pressure to give 1.1 g of crude material. Desired compound **18** (700 mg) was obtained with a 44% yield after column chromatography purification on silica gel using a gradient from DCM/EA (80/20) to EA/MeOH (80/20). **18** was obtained as a 1:1 mixture of 2 diastereoisomers **18a** et **18b**.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.67-7.62 (m, 4H, H_{Ar} TBDPS), 7.44-7.32 (m, 7H, H_{Ar} TBDPS and H_7), 6.79 (bd, 2H, $^4J = 1.9$ Hz, $\text{H}_{5'}$ and N_6H), 3.65 (s, 3H, H_{OCH_3}), 3.67-3.27 (m, 9H, H_3 , H_7 , H_9 , H_{11} and $\text{H}_{2'}$), 2.95 (ddd, 1H, $^4J = 1.7$ Hz, $^3J_{3'-2'} = 4.9$ Hz, $^2J_{3'-3''} = 15.0$ Hz, $\text{H}_{3'}$), 2.80 (ddd, 1H, $^4J_{3''-\text{N}_6\text{H}} = 2.2$ Hz, $^3J_{3'-2'} = 7.8$ Hz, $^2J_{3'-3''} = 15.0$ Hz, $\text{H}_{3''}$), 2.65 (part A of an AB system, 1H, $^2J_{1-1'} = 11.6$ Hz, H_{1a}), 2.60 (part A of an AB system, 1H, $^2J_{1-1'} = 11.6$ Hz, H_{1b}), 2.40 (part B of an AB system, 1H, $^2J_{1-1'} = 11.6$ Hz, H_{1b}), 2.38 (part B of an AB

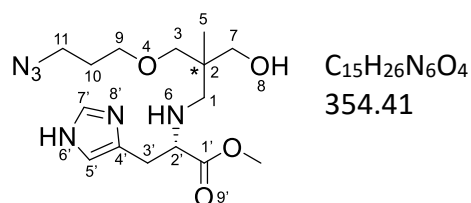
Experimental part

system, 1H, $^2J_{1'-1} = 11.6$ Hz, H_{1a}), 1.76 (dq, 2H, $^3J_{10-9} = 2.2$ Hz, $^3J_{11-10} = 6.2$ Hz, H₁₀), 1.04 (s, 9H, tBu-Si), 0.91 (s, 3H, H₅).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 174.7 (C_{1'}), 135.7 (CH_{Ar}), 135.6 (CH_{Ar}), 134.5 (C₇), 133.6 (C_{q-Ar}), 133.5 (C_{q-Ar}), 131.3 (C_{4'a}), 131.1 (C_{4'b}), 127.8 (CH_{Ar}), 120.9 (C_{5'a}), 120.8 (C_{5'b}), 74.7 (C_{3a}), 74.5 (C_{3b}), 68.1 (C₉), 67.7 (C_{7a}), 67.2 (C_{7b}), 62.41 (C_{2'a}), 62.36 (C_{2'b}), 53.0 (C_{1a}), 52.9 (C_{1b}), 51.92 (C_{OMe}a), 51.90 (C_{OMe}b), 48.6 (C₁₁), 41.1 (C₂), 29.4 (C_{3'a}), 29.3 (C_{3'b}), 29.19 (C_{10a}), 29.17 (C_{10b}), 27.0 (CMe₃), 19.47 (CMe₃), 19.44 (CMe₃), 18.8 (C_{5a}), 18.6 (C_{5b}).

MS (ESI⁺): calcd 593.3272 for C₃₁H₄₅N₆O₄Si; found 593.3272.

N-(2-(5-azidopent-2-oxo-1-yl)-2-(hydroxymethyl)-2-methylprop-1-yl) L-histidine methyl ester (**19**)

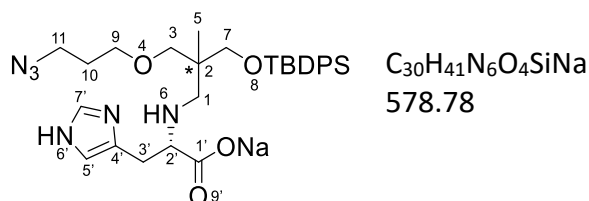


Compound **18** (50 mg, 0.08 mmol) was dissolved in THF before the dropwise addition of TBAF in THF (1M solution, 84 μL, 0.08 mmol). The reaction was stirred at r. t. for 2h. The reaction mixture was then diluted with water, extracted with DCM (3 x 15mL) and the combined organic layers dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. Crude material was then purified by column chromatography on silica gel using a gradient from EA 100% to EA/MeOH 80:20, to give as a light-yellow oil as the desired compound **19** (28 mg, 98% yield), obtained a 1:1 mixture of 2 diastereoisomers **19_a** et **19_b**.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.47 (m, 2H, H_{7'}), 6.77 (bs, 2H, H_{5'}), 5.16 (bs, 4H, N₆H and O₈H), 3.70 (s, 3H, OMe), 3.69 (s, 3H, OMe), 3.59 (part A of an AB system, 1H, $^2J = 10.8$ Hz, H_{7a}), 3.58 (part A of an AB system, 1H, $^2J = 10.8$ Hz, H_{7b}), 3.51 (m, 2H, H₂), 3.49 (part B of an AB system, 1H, $^2J = 10.8$ Hz, H_{7a}), 3.48-3.30 (m, 4H, H_{9'}, H_{11'}), 3.44 (part B of an AB system, 1H, $^2J = 10.8$ Hz, H_{7b}), 3.37 (part A of an AB system, 1H, $^2J = 8.8$ Hz, H_{3b}), 3.29 (part B of an AB system, 1H, $^2J = 8.8$ Hz, H_{3b}), 3.28 (part A of an AB system, 1H, $^2J = 8.8$ Hz, H_{3a}), 3.20 (part B of an AB system, 1H, $^2J = 8.8$ Hz, H_{3a}), 3.03 (m, 1H, H_{3'a}), 2.98 (m, 1H, H_{3'b}), 2.82 (part A of an AB system, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, H_{1b}), 2.82 (part B of an AB system, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, H_{1b}), 2.69 (part A of an AB system, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, H_{1a}), 2.40 (part B of an AB system, 1H, $^2J = 11.5$ Hz, H_{1a}), 1.79 (m, 4H, H₁₀), 0.83 (s, 3H, H_{5a}), 0.77 (s, 3H, H_{5b}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm) = 174.67 (C_{1'}), 174.66 (C_{1'}), 135.29 (C₇), 135.26 (C₇), 133.5 (C_{4'b}), 132.9 (C_{4'a}), 118.7 (C_{5'}), 118.0 (C_{5'}), 76.9 (C_{3a}), 76.0 (C_{3b}), 69.1 (C_{7b}), 68.9 (C_{7a}), 68.4 (C₉), 68.3 (C₉), 62.2 (C_{2'b}), 61.9 (C_{2'a}), 54.4 (C_{1b}), 53.4 (C_{1a}), 52.24 (OMe), 52.17 (OMe), 48.68 (C₁₁), 48.64 (C₁₁), 39.7 (C₂), 39.8 (C_{2a}), 39.7 (C_{2a}), 30.1 (C_{3'}), 29.7 (C_{3'}), 29.24 (C₁₀), 29.17 (C₁₀), 19.6 (C_{5a}), 18.6 (C_{5b}).

MS (DCI/CH₄): 355.21 [M+H⁺].

N-(2-(5-azidopent-2-oxo-1-yl)-2-((tert-butyldiphenylsilyl)oxymethyl)-2-methyl)prop-1-yl) L-histidine (20)

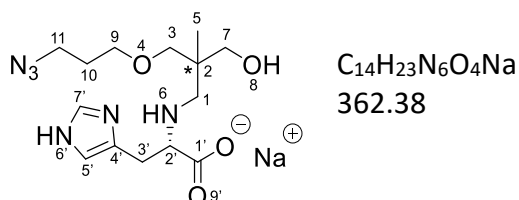
Compound **19** (200 mg, 0.3 mmol) was dissolved in a mixture of MeOH (15mL) and H₂O (3.6 mL) before the addition of LiOH·H₂O (29 mg, 0.7 mmol). The resulting solution was stirred overnight at r. t. Dowex[®] Na⁺ was then added slowly until the value of pH reached pH = 7. The mixture was then filtered and was concentrated under reduced pressure. The crude material is purified by precipitation of by-products in ether and engaged in the next step. **20** was obtained a 1:1 mixture of 2 diastereoisomers **20_a** et **20_b**.

¹H NMR (300 MHz, MeOD), δ (ppm): 7.69-7.38 (m, 13H, H_{7'}, H_{Ar}-TBDPS), 7.00 (d, 1H, ⁴J = 0.9 Hz, H_{5'}), 6.97 (d, 1H, ⁴J = 0.9 Hz, H_{5'}), 3.80 (part A of an AB system, 1H, ²J = 10.1 Hz, H_{7b}), 3.70-3.63 (m, 2H, H_{2'}), 3.68 (part A of an AB system, 1H, ²J = 8.8 Hz, H_{3a}), 3.67 (part B of an AB system, 1H, ²J = 10.1 Hz, H_{7b}), 3.63 (part A of an AB system, 1H, ²J = 10.1 Hz, H_{7a}), 3.61 (part A of an AB system, 1H, ²J = 9.0 Hz, H_{3b}), 3.57-3.46 (m, 4H, H₉), 3.54 (part B of an AB system, 1H, ²J = 10.1 Hz, H_{7a}), 3.47 (part B of an AB system, 1H, ²J = 9.0 Hz, H_{3b}), 3.38-3.28 (m, 4H, H₁₁), 3.36 (part B of an AB system, 1H, ²J = 8.8 Hz, H_{3a}), 3.27-3.05 (m, 4H, H_{3'}), 3.22 (part A of an AB system, 1H, ²J_{1-1'} = 12.4 Hz, H_{1a}), 3.12 (m, 2H, H_{1b}), 3.02 (part B of an AB system, 1H, ²J = 12.4 Hz, H_{1a}), 1.76 (m, 4H, H₁₀), 1.10 (s, 3H, H_{5a}), 1.07 (s, 9H, tBu-Si), 1.06 (s, 3H, H_{5b}).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD), δ (ppm): 172.6 (C_{1'}), 172.5 (C_{1'}), 137.03 (CH_{Ar}), 136.98 (CH_{Ar}), 136.5 (C_{7'}), 136.2 (C_{7'}), 134.3 (C_{4'}), 134.26 (C_{4'}), 134.12 (C_{q-Ar}), 134.11 (C_{q-Ar}), 131.32 (CH_{Ar}), 131.31 (CH_{Ar}), 129.10 (CH_{Ar}), 129.07 (CH_{Ar}), 116.2 (C_{5'}), 115.9 (C_{5'}), 76.7 (C_{3a}), 76.2 (C_{3b}), 70.0 (C₉), 69.9 (C₉), 69.0 (C_{7a}), 68.0 (C_{7b}), 65.53 (C_{2'}), 65.47 (C_{2'}), 54.9 (C_{1a}), 54.7 (C_{1b}), 49.8 (C₁₁), 41.15 (C₂), 41.13 (C₂), 30.0 (C₁₀), 29.3 (C_{3'}), 27.6 (CMe₃), 27.5 (C_{3'}), 20.32 (CMe₃), 20.28 (CMe₃), 18.8 (C_{5b}), 18.4 (C_{5a}).

MS (ESI⁺): calcd 579.3115 for C₃₀H₄₂N₆O₄Si; found 579.3117.

IR (ATR, cm⁻¹): 2096 (azide).

sodium N-(2-(5-azidopent-2-oxo-1-yl)-2-(hydroxymethyl)-2-methyl)prop-1-yl) L-histidine acetate salt (21)

Compound **20** (100 mg, 0.2 mmol) was dissolved in MeOH (5mL), TBAF (supported on silica, loading 1.5 mmol/g, 246 mg, 0.3 mmol) was then added and the resulting mixture is stirred at r. t. for 2h. The suspension was then filtered and concentrated under reduced pressure. The desired product **21** was obtained after precipitation in Et₂O and filtration over Dowex[®] Na⁺ resin as a yellow oil (25 mg, 43%). **21** was obtained a 1:1 mixture of 2 diastereoisomers **21_a** et **21_b**.

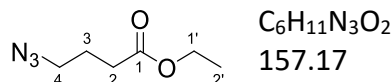
¹H NMR (300 MHz, MeOD), δ (ppm): 7.65 (s, 1H, H₇), 6.98 (s, 1H, H₅), 3.68 (m, 2H, H₂), 3.66 (part A of an AB system, 1H, ²J = 11.2 Hz, H_{7a}), 3.56 (part A of an AB system, 1H, ²J = 11.0 Hz, H_{7b}), 3.55 (part A of an AB system, 1H, ²J = 9.2 Hz, H₃), 3.53-3.50 (m, 4H, H₉), 3.49 (part B of an AB system, 1H, ²J = 11.2 Hz, H_{7a}), 3.47 (part B of an AB system, 1H, ²J = 11.2 Hz, H_{7b}), 3.46 (part A of an AB system, 1H, ²J = 9.1 Hz, H₃), 3.40 (part B of an AB system, 1H, ²J = 9.1 Hz, H₃), 3.40-3.35 (m, 4H, H₁₁), 3.37 (part B of an AB system, 1H, ²J = 9.2 Hz, H₃), 3.38-3.28 (m, 4H, H₁₁), 3.24-3.03 (m, 4H, H₃), 3.17 (part A of an AB system, 1H, ²J_{1-1'} = 12.8 Hz, H₁), 3.15-3.08 (m, 2H, H₁), 3.02 (part B of an AB system, 1H, ²J = 13.0 Hz, H₁), 1.80 (m, 4H, H₁₀), 1.04 (s, 3H, H_{5a}), 0.99 (s, 3H, H_{5b}).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD), δ (ppm): 173.3 (C_{1'}), 173.2 (C_{1'}), 136.8 (C₇), 136.7 (C₇), 136.0 (C_{4'}), 135.7 (C_{4'}), 117.0 (C₅), 116.8 (C₅), 76.7 (C_{3a}), 76.6 (C_{3b}), 69.8 (C₉), 68.0 (C_{7a}), 67.1 (C_{7b}), 65.4 (C₂), 55.0 (C_{1a}), 54.9 (C_{1b}), 49.8 (C₁₁), 40.4 (C₂), 40.4 (C₂), 30.00 (C₁₀), 29.98 (C₁₀), 28.2 (C_{3'}), 28.0 (C_{3'}), 18.8 (C_{5b}), 18.6 (C_{5a}).

IR (ATR, cm⁻¹): 2098 (azide).

Substrates synthesis (Chapter III and IV)

1. General Synthesis of azido carboxylic acids

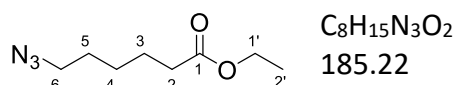
ethyl 4-azidobutanoate (**22**)

Ethyl-4-bromobutyrate (1.87 g, 9.6 mmol) was suspended into a mixture of MeOH/H₂O (28 mL, 1:1) before the addition of sodium azide (932 mg, 14.3 mmol). The resulting mixture was stirred for 60h at 75°C. After allowing the reaction mixture to cool down to r.t., MeOH was carefully evaporated. The aqueous layer was extracted into DCM (3 x 20 mL) and combined organic layers were dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford the desired product **22** as a colorless oil (1.4 g, 93% crude yield). The product **22** was used directly in the next step without any further purification.

Data were in agreement with the literature (A. Sallustrau *et al.*, *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 7890-7893).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 4.11 (q, 2H, ³J_{1'-2'} = 7.2 Hz, H_{1'}), 3.32 (t, 2H, ³J₄₋₃ = 6.7 Hz, H₄), 2.37 (t, 2H, ³J₂₋₃ = 7.3 Hz, H₂), 1.88 (q app, 2H, ³J = 6.9 Hz, H₃), 1.25 (t, 3H, ³J_{2'-1'} = 7.1 Hz, H_{2'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.3 (C₁), 61.2 (C_{2'}), 51.3 (C₄), 31.8 (C₂), 24.9 (C₃), 14.8 (C_{2'}).

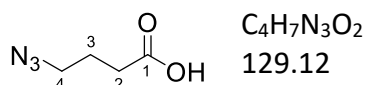
ethyl 6-azidohexanoate (**23**)

Ethyl-6-bromohexanoate (2.5 g, 11.2 mmol) was suspended into a mixture of MeOH/H₂O (28 mL, 1:1) before the addition of sodium azide (947 mg, 14.6 mmol). The resulting mixture was stirred for 36h at 75°C. After allowing the reaction mixture to cool down to r.t., MeOH was carefully evaporated. The aqueous layer was extracted into DCM (3 x 20 mL) and combined organic layers were dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure to afford the desired product as a colourless oil (2.07 g, quantitative crude yield). The desired product **23** was used directly in the next step without any further purification.

Data were in agreement with the literature (Q. Sun *et al.* *Chin Chem Lett*, **2021**, 32, 8, 2479-2483).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 4.10 (q, 2H, ³J_{1'-2'} = 7.1 Hz, H_{1'}), 3.25 (t, 2H, ³J₆₋₅ = 6.9 Hz, H₆), 2.29 (t, 2H, ³J₂₋₃ = 7.4 Hz, H₂), 1.68-1.54 (m, 4H, H₃, H₄), 1.44-1.33 (m, 2H, H₅), 1.23 (t, 3H, ³J_{2'-1'} = 7.2 Hz, H_{2'}).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.6 (C₁), 60.5 (C_{2'}), 51.4 (C₆), 34.3 (C₂), 28.7 (C₃), 26.4 (C₅), 24.6 (C₄), 14.4 (C_{2'}).

4-azidobutanoic acid (**24**)

Ester **22** (1.71 g, 10.8 mmol) was dissolved in a mixture of THF/H₂O (C=0.15M, 70 mL, 1:1) and LiOH monohydrate (1.82 g, 43.4 mmol) was added. The orange mixture was stirred at 40°C overnight to ensure the completion of the reaction. THF was removed under reduced pressure and HCl (C=0.1M in

Experimental part

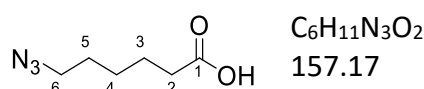
H₂O, ≈45mL) was added to the aqueous mixture until the pH of the solution reached pH = 2, as indicated by the color of the mixture turning from deep orange to light yellow. The aqueous layer was extracted into EA (3 x 25 mL). Combined organic phases were washed with a saturated solution of NaCl, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was then purified by column chromatography on silica gel (gradient starting from PE/EA, 8:2 to 5:5) to afford **24** as an oil (1.36 g, 97% for two steps).

Data were in agreement with the literature (C. DeForest *et al. Nature Chemistry*, **2011**, 3, 925-931).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.36 (t, 2H, ³J₄₋₃ = 6.7 Hz, H₄), 2.46 (t, 2H, ³J₂₋₃ = 7.2 Hz, H₂), 1.90 (qt, ³J = 6.9 Hz, 2H, H₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 178.6 (C₁), 50.7 (C₄), 31.0 (C₂), 24.2 (C₃).

6-azidoheptanoic acid (**25**)



Ester **23** (2.07 g, 11.2 mmol) was dissolved in a mixture of THF/H₂O (C=0.15M, 76 mL, 1:1) and LiOH monohydrate (1.88 g, 44.8 mmol) was added. The yellow mixture was stirred at r.t. overnight. As the NMR analysis indicated that the reaction did not go to completion, one equivalent of LiOH monohydrate (188 mg, 4.5 mmol) was added and the resulting mixture was stirred for another 15h. THF was removed under reduced pressure and HCl (C=0.1M in H₂O, ≈45mL) was added to the aqueous mixture until the pH of the solution reached pH = 2. The aqueous layer was extracted into EA (3 x 30 mL). Combined organic phases were washed with a saturated solution of NaCl, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was then purified by column chromatography on silica gel (gradient starting from PE/EA, 8:2 to 5:5) to afford **25** an oil (1.76 g, 99% for two steps).

Data were in agreement with the literature (J-M. Lee *et al. Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, 21, 3, 2010, 285-291).

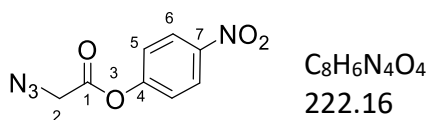
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3.26 (t, 2H, ³J = 6.8 Hz, H₆), 2.36 (t, 2H, ³J₂₋₃ = 7.4 Hz, H₂), 1.71-1.56 (m, 4H, H₃, H₄), 1.47-1.36 (m, 2H, H₅).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 179.8 (C₁), 51.4 (C₆), 34.0 (C₂), 28.7 (C₃), 26.4 (C₅), 24.4 (C₄).

2. General Synthesis of C₁ and C₃ *p*-nitro ester

p-Nitrophenol (1 eq.), azido-alkyl-carboxylic acid (1 eq.), DCC (1.4 eq.) and DMAP (0.2 eq.) were stirred together in anhydrous DCM (C= 1.2M) for 20h at r.t. under an argon atmosphere. After removal of all solids by filtration onto a Celite[®] pad, the EA filtrate was washed with a saturated solution of NaHCO₃ (10 mL) (only for **27**) or a saturated solution of NaCl (10 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was then purified by column chromatography on silica gel (isocratic gradient PE/EA, 8:2) to afford off-yellow solids.

4-nitrophenyl 2-azidoacetate (**26**) C₁-ester



Experimental part

26 (294 mg) was obtained in a 54% yield. NMR data matched previously reported data (Y. Wang *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 39, 13596–13599). Upon purification, hydrolysis occurred as *p*-nitrophenol was recovered although absent from the ^1H analysis of the crude reaction.

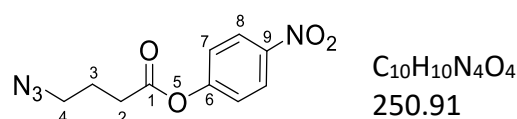
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.26 (d, 2H, $^3J_{6-5} = 9.2$ Hz, H_6), 7.33 (d, 2H, $^3J_{5-6} = 9.0$ Hz, H_5), 4.18 (s, 2H, H_2).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 166.2 (C_1), 154.7 (C_4), 145.9 (C_7), 125.6 (C_6), 122.3 (C_5), 50.6 (C_2).

HRMS (Cl^+): calculated for $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_4\text{O}_4$: 223.0467, found 223.0457.

IR (ATR, cm^{-1}): 2105 (azide).

4-nitrophenyl 4-azidobutanoate **27** C_3 -ester



27 (235 mg) was obtained in a 17% yield. Data were in agreement with the one reported in the literature (U. Hillaert *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 9, 1629-1632).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.26 (d, 2H, $^3J_{8-7} = 9.0$ Hz, H_8), 7.26 (d, 2H, $^3J_{7-8} = 9.0$ Hz, H_7), 3.44 (t, 2H, $^3J_{4-3} = 6.5$ Hz, H_4), 2.71 (t, 2H, $^3J_{2-3} = 7.2$ Hz, H_2), 1.88 (tt, 2H, $^3J_{3-4} = 6.5$ Hz, $^3J_{3-2} = 7.2$ Hz, H_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 170.6 (C_1), 155.4 (C_6), 142.9 (C_9), 125.5 (C_8), 122.6 (C_7), 50.6 (C_4), 31.5 (C_2), 24.2 (C_3).

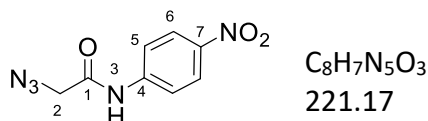
HRMS (Cl^+): calculated for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_4$: 251.0780, found 251.0772.

IR (ATR, cm^{-1}): 2101 (azide).

First attempt to obtain the 4-nitrophenyl 6-azidohexanoate was not conclusive and as click experiments on convertible oligonucleotides indicated that *p*-nitroester substrates were unstable during the purification process, no further attempt was performed.

3. General Synthesis of C₁-, C₃- and C₅ *p*-nitro amides **28**, **29** and **30**

2-azido-*N*-(4-nitrophenyl)acetamide (**28**) C₁-amide



Protocol adapted from: J. Richers *et al.*, *Org. Lett.* **2016**, 18, 24, 6472-6475.

2-Azido acetic acid (250 mg, 2.5 mmol) was dissolved in dry DCM (25 mL) under an argon atmosphere and the reaction mixture was cooled to 0°C before *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (636 mg, 3.3 mmol) was added, followed by *p*-nitroaniline (342 mg, 2.5 mmol) and DMAP (30 mg, 0.2 mmol). The colour of the reaction mixture turned black. The mixture was allowed to warm up to r.t. overnight and a saturated solution of NH₄Cl (15mL) was added. The two layers partitioned and the aqueous layer was extracted (3 x 15 mL). Combined organic layers were washed with a saturated solution of NaCl, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was then purified by column chromatography on silica gel (isocratic gradient PE/Et₂O, 1:1) to afford a yellowish solid **28** (130 mg, 24%).

NMR data matched the one reported in the literature (J-P. J. Bow *et al. Chem. Com.*, **2022**, 58, 54, 7546-7549).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.22 (d, 2H, ³J₆₋₅ = 9.2 Hz, H₆), 7.74 (d, 2H, ³J₅₋₆ = 9.2 Hz, H₅), 4.20 (s, 2H, H₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 165.1 (C₁), 144.3 (C₇), 142.6 (C₄), 125.3 (C₆), 119.4 (C₅), 53.1 (C₂).

HRMS (ESI): cald 220.0471 for C₈H₆N₅O₃; found 220.0473.

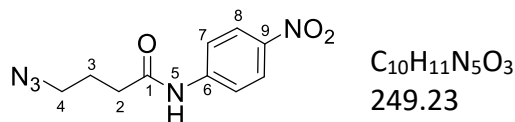
IR (ATR, cm⁻¹): 2120 (azide), 1506 (N-O stretch, asym), 1342 (N-O stretch, sym).

Synthesis of C₃- and C₅-*p*-nitrophenyl amide substrates **29** and **30** following a modified Vilsmeier-Haack procedure

Protocol adapted from: T. Vang *et al. J. Med. Chem.* **2011**, 54, 2, 562-571.

Azido-alkyl-carboxylic acid (1.3 eq.) was dissolved in dry DCM (C=0.5M) under an argon atmosphere. Oxalyl chloride (2 eq.) was added followed by one drop of DMF to catalyse the formation of the corresponding acyl chloride. The reaction mixture was stirred at r.t. for 3h. The reaction mixture was then transferred *via* a cannula to a suspension of *p*-nitroaniline (1eq.) and pyridine (1.7 eq.) in DCM/ACN (C=1M, 10:1). A precipitate formed immediately and the reaction mixture was stirred overnight. After filtration onto a Celite[®] pad to remove precipitated by-products, the EA filtrate was washed by H₂O (10 mL). The organic layer was dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The residue was then purified by column chromatography on silica gel (gradient starting from PE/Et₂O, 2:8 to PE/EA 2:8) to afford yellowish solids.

4-Azido-*N*-(4-nitrophenyl)butanamide C₃-amide (29)



NMR data for **C₃-amide 29** (30 mg, 7%) were in accordance with the literature (M. A. Ramirez *et al.* Tet. Lett., **2011**, 52, 13, 1466-1468).

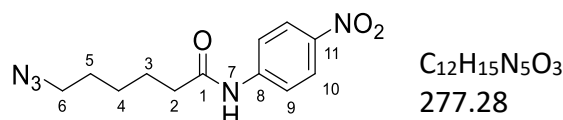
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.23 (d, 2H, ³J₈₋₇ = 9.3 Hz, H₈), 7.73 (d, 2H, ³J₇₋₈ = 9.3 Hz, H₇), 7.64 (bs, 1H, NH₅), 3.47 (t, 2H, ³J₄₋₃ = 6.4 Hz, H₄), 2.56 (t, 2H, ³J₂₋₃ = 7.1 Hz, H₂), 1.88 (tt, 2H, ³J₃₋₄ = 6.2 Hz, ³J₃₋₂ = 7.2 Hz, 2H, H₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 170.6 (C₁), 143.9 (C₉), 143.6 (C₆), 125.3 (C₈), 119.3 (C₇), 50.8 (C₄), 34.4 (C₂), 24.5 (C₃).

HRMS (ESI): calcd 248.0784 for C₁₀H₁₀N₅O₃; found 248.0790.

IR (ATR, cm⁻¹): 2100 (azide), 1505 (N-O stretch, asym), 1334 (N-O stretch, sym).

6-azido-*N*-(4-nitrophenyl)hexanamide C₅-amide (30)



C₅-amide 30 was obtained in a 75% yield (320 mg).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.18 (d, 2H, ³J₁₀₋₉ = 9.2 Hz, H₁₀), 7.69 (bd, 3H, ³J₉₋₁₀ = 9.3 Hz, H₉, NH₇), 3.27 (t, 2H, ³J₆₋₅ = 6.7 Hz, H₆), 2.42 (t, 2H, ³J₁₋₂ = 7.4 Hz, H₂), 1.74 (tt, 2H, ³J₃₋₄ = 7.4 Hz, ³J₃₋₂ = 7.8 Hz, H₃), 1.67-1.57 (m, 2H, H₅), 1.50-1.39 (m, 2H, H₄).

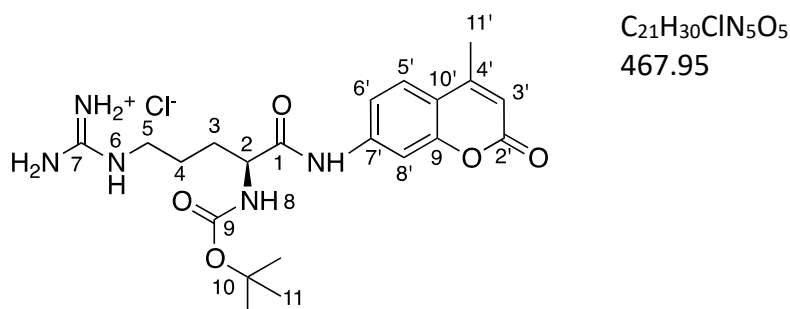
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 171.6 (C₁), 143.9 (C₈), 143.6 (C₁₁), 125.3 (C₁₀), 119.2 (C₉), 51.4 (C₆), 37.7 (C₂), 28.8 (C₅), 26.5 (C₄), 24.9 (C₃).

HRMS (ESI): calcd 276.1097 for C₁₂H₁₄N₅O₃; found 276.1101.

IR (ATR, cm⁻¹): 2079 (azide), 1509 (N-O stretch, asym), 1338 (N-O stretch, sym).

4. Synthesis of a coumarin argininamide derivative

***N*-tert-butylcarbamate L-arginine (*N*-(4-methyl-2-oxo-2*H*-benzopyran-7-yl)amide hydrochloride - Boc-Arg-AMC·HCl (**39**)**



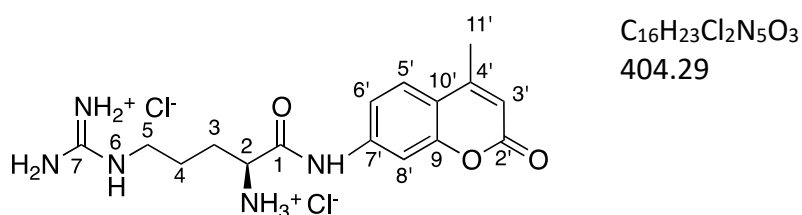
The procedure was adapted from: S. van Berkel *et al. Chem. Commun.*, **2009**, 4272-4274.

To a cold solution (-15°C) of Boc-protected arginine (200 mg, 0.7 mmol) and 7-amino-4-methylcoumarin (127 mg, 0.7 mmol) in pyridine (3 mL), phosphoryl chloride (0.75 ml, 0.8 mmol) was added dropwise. The color of the reaction mixture changed, going from yellow to orange. The mixture was stirred for 2h at -15°C and then allowed to warm to r. t. for an additional hour. The reaction mixture was quenched with H₂O (3 mL) and the solvents were evaporated under reduced pressure. The residue was dissolved in the minimum amount of solvents (3.5 mL, MeOH/H₂O, 6:1) and left at -25°C over 2 weeks. After filtration, **39** (100 mg, 29%) was obtained as a pink gummy precipitate. The NMR data were in agreement with the literature.

¹H NMR (300 MHz, MeOD), δ (ppm): 7.81 (d, 1H, ⁴J_{8'-6'} = 1.5 Hz, H_{8'}), 7.68 (d, 1H, ³J_{5'-6'} = 8.6 Hz, H_{5'}), 7.47 (bd, 1H, ³J_{6'-5'} = 8.4 Hz, H_{6'}), 6.22 (d, 1H, ⁴J_{3'-11'} = 1.0 Hz, H_{3'}), 4.25 (m, 1H, H₂), 2.68 (t, 2H, ³J₅₋₄ = 6.5 Hz, H₅), 2.44 (d, 3H, ⁴J_{11'-3'} = 1.1 Hz, H_{11'}), 1.95-1.65 (m, 4H, H₃, H₄), 1.45 (s, 9H, H₁₁).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ (ppm): 173.7 (C₁), 163.3 (C₂), 158.7 (C₇), 158.2 (C₉), 155.43, 155.37, (C₄, C₉), 143.4 (C₇), 126.8 (C_{5'}), 117.4 (C_{10'}), 117.3 (C_{6'}), 113.8 (C_{3'}), 108.2 (C_{8'}), 81.0 (C₁₀), 56.5 (C₂), 42.2 (C₅), 30.7 (C₃), 28.8 (C₁₁), 26.6 (C₄), 18.7 (C_{11'}).

L-arginine (*N*-(4-methyl-2-oxo-2*H*-benzopyran-7-yl)amide hydrochloride - H-Arg-AMC·2HCl (40**)**



To a suspension of Boc-Arg-AMC·HCl **39** (82 mg, 0.2 mmol) in dry Et₂O (3.5 mL), a solution of HCl dissolved in dioxane (4M, 0.438 ml) was added at 0°C. The suspension was sonicated then stirred for 1h. As the ¹H NMR analysis of the crude indicated that the reaction did not go to completion, a solution of HCl dissolved in dioxane (4M, 0.438 mL) was added again at 0°C and the resulting mixture was stirred overnight at r. t. Product **40** (71 mg, quantitative) was obtained as a white powder after the removal of all the volatiles under reduced pressure.

The NMR data were in accordance with the literature reports.

Experimental part

¹H NMR (300 MHz, MeOD), δ (ppm): 7.91 (bs, 1H, H_{8'}), 7.76 (d, 1H, ³J_{5'-6'} = 8.4 Hz, H_{5'}), 7.56 (bd, 1H, ³J_{6'-5'} = 8.4 Hz, H_{6'}), 6.27 (d, 1H, ⁴J_{3'-11'} = 1.1 Hz, H_{3'}), 4.18 (m, 1H, H₂), 3.29-3.24 (m, 2H, H₅), 2.46 (d, 3H, ⁴J_{11'-3'} = 1.2 Hz, H_{11'}), 2.15-1.94 (bs, 2H, H₃), 1.85-1.71 (bs, 2H, H₄).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD) δ (ppm): 168.9 (C₁), 163.1 (C_{2'}), 158.8 (C₇), 155.5 (C_{9'}), 155.3 (C_{4'}), 142.7 (C_{7'}), 127.1 (C_{5'}), 117.9 (C_{10'}), 117.3 (C_{6'}), 114.2 (C_{3'}), 108.4 (C_{8'}), 54.9 (C₂), 41.9 (C₅), 29.9 (C₃), 25.7 (C₄), 18.7 (C_{11'}).

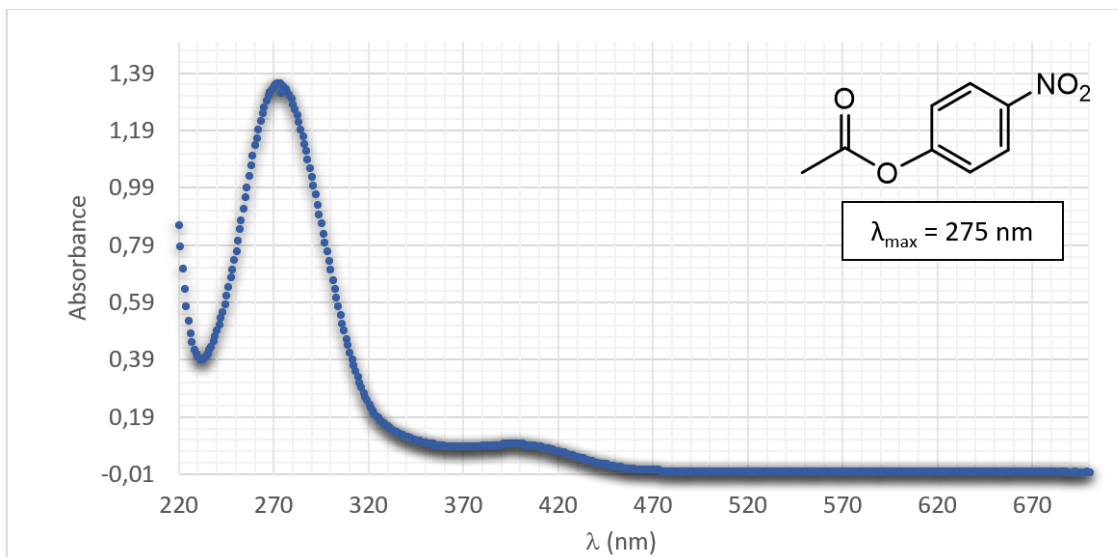
HRMS (ESI⁺): calcd 332.1723 for C₁₆H₂₂N₅O₃; found 322.1732.

Transesterification studies

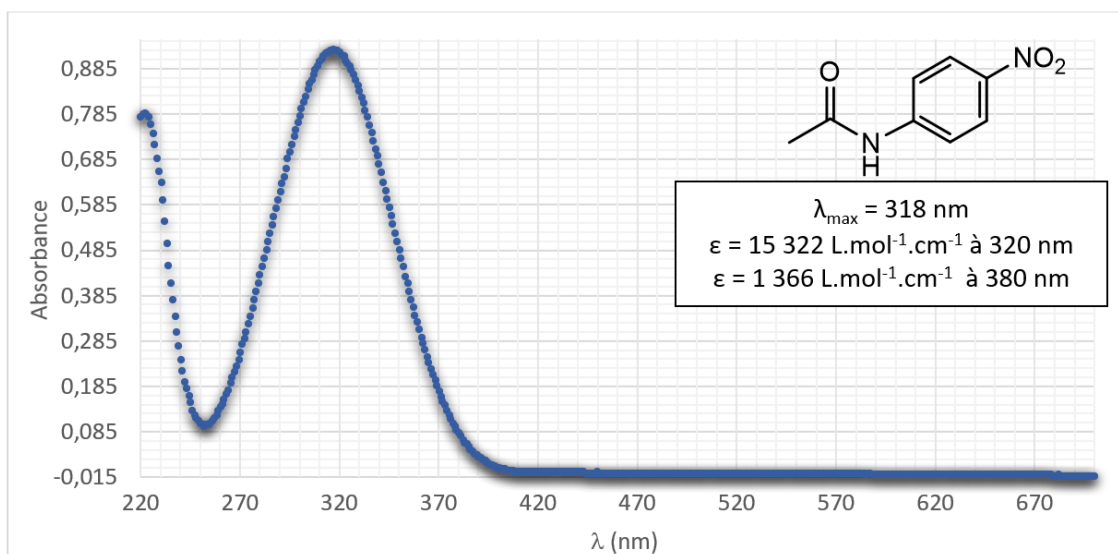
In order to evaluate catalytic properties in a transesterification model, vinyl acetate (1 eq., 290 μ L, 3.2 mmol) was placed with an organocatalyst (<1 mol%, 2.0 x 10⁻³ mmol) in MeOD (1,5 eq., 210 μ L, 5.2 mmol) in an NMR tube at 20°C. ¹H NMR analyses were performed at regular intervals. Integration of the methyl groups signals for acetaldehyde (at 1,3 ppm) and methyle acetate (at 2,03 ppm) were used to follow the evolution of vinyl acetate hydrolysis.

Analyses were performed respectively for 216h^a (9 days) or 408h^b (17 days) with the following organocatalysts: **TripHis-Prot 18^b**, **TripHis-Me 19^a**, **TripHis 21^a**,^a histaminol (2-(1H-imidazol-5-yl)ethan-1-ol)^b and imidazole^b.

UV Spectra of *p*-nitrophenol acetate and *p*-nitroaniline acetate



Graph 1. Absorbance spectrum of de *p*-nitrophenol acetate (0,2 mM) between 220 et 700 nm;
Buffer: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7



Graph 2. Absorbance spectrum of de *p*-nitroaniline acetate (0,06 mM) between 220 et 700 nm;
Buffer: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7

Oligonucleotides synthesis (Chapter III and IV)

All oligonucleotides were synthesised using following procedure and were analysed by HPLC and MALDI-TOF.

1. Automated synthesis

The suitably protected A, T, C and G phosphoramidites were purchased from Chemgenes and the convertible alkyne phosphoramidites were obtained following a procedure previously published within the team and used as a single diastereoisomer.

The automated oligonucleotides syntheses were performed on polystyrene support (0.2 mmol scale) on an ABI 394-8 oligonucleotides synthesizer using standard ABI program or on a K&A DNA synthesizer H-6 on CPG support (0.2 mmol scale). Both programs were performed following the phosphoramidite protocol.

The sequences were synthesized on solid-supported scaffold (polystyrene scaffold) at 0.2 nmol scale. Firstly, detritylation was performed using TCA (2.5% in DCM) for 3 x 6s. For the coupling step, 5-ethylthiotetrazole was used as an activator (0.3 M in anhydrous ACN), commercially available nucleoside phosphoramidites (0.1 mM in anhydrous ACN) were introduced with a 45s coupling time. Coupling conditions were identical for the alkyne phosphoramidite. The capping step (Cap A: Ac₂O/pyridine/THF 10:10:80; Cap B: 10% N-methylimidazole in THF) was performed for 25s. Oxidation steps were performed using I₂/pyridine/H₂O and each step lasted 14s. After syntheses were completed, cleavage and protective group removal were achieved with NH₄OH (33%) at 60°C for 45min.

Analyses of the obtained crude oligonucleotides were performed by RP-HPLC and MALDI-TOF as described in the beginning of the experimental part. For RP-HPLC, the gradient used starts with 95% to 85% of one eluant A in one eluant B (A: buffer TEAAc 0.05 M, pH 7.0; B: CH₃CN). Purification was performed, when necessary, by Ionic Chromatography on a DNA Pac PA 200, 4 x 250 mm. Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) eluants were used with the gradient reported in the following Table 1.

Table 1. IC gradient for purification of ODN; E1: Tris 25mM, pH=8; E2: E1 + NaCl 1,25M.

Time (min)	Flow (mL.min ⁻¹)	E1	E2
0	1.2	68	32
2	1.2	68	32
12	1.2	53.6	46.4
12.1	1.2	25	75
13.1	1.2	25	75
13.2	1.2	68	32
18	1.2	68	32

1.1. Wild-type references

All the obtained wild type ODNs are indexed in Table 2.

Table 2. Obtained *wt* oligonucleotides

ODN	Sequence	[M-H] ⁻ calc. (Da)	[M-H] ⁻ found (Da)	HPLC R _t (min)	n (nmol) ^{*,a}
α-wt	5'-GCG ACC TTT TTT AGT GTG TGC C-3'	6723.40	6726.50	7.40	200
β-wt	5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	5483.60	5486.30	6.61	200
γ	5'-TTT TTA GTG TGT GCC-3'	4580.00	4582.00	7.63	200
δ	5'-GGC ACA CAC TT-3'	3301.20	3301.70	6.43	200
ε	5'-GCG ACC TTT TTT-3'	3602.40	3602.70	7.52	200
ζ	5'-TA GGT CGC-3'	2425.60	2424.80	4.18	200
η	5'-CGC CAT GTT TTT AGT GTG TGC C-3'	6723.40	6725.10	7.77	200
θ	5'-GGC ACA CAC TTC ATG GCG-3'	5484.60	5486.60	7.17	200
ι	5'-GCG ACC TTT TTT GCG TGT GAT C-3'	6723.40	6726.10	7.88	200
κ	5'-GAT CAC ACG CTA GGT CGC-3'	5484.60	5486.90	6.48	200
λ	5'-GCG ACC TCT TTT TCA GTG TGT GCC-3'	7301.80	7521.70**	7.34	173
μ	5'-GGC ACA CAC TCTCAG GTC GC-3'	6063.00	6064.73	7.05	180
ν	5'-CGG CGA CCT TTT TTA GTG TGT GCC CG-3'	7960.20	8100.01**	7.91	175
ξ	5'-CGG GCA CAC ACT TAG GTC GCC G-3'	6721.40	6722.61	6.81	181
ο	5'-CGG CGA CCT CTT TTT CAG TGT GTG CCC G-3'	8538.50	8579.34	6.54	177
π	5'-CGG GCA CAC ACT CTC AGG TCG CCG-3'	7299.81	7301.01	7.49	200
1OLD	5'-GAT CGA AAC GTA GCG CCT TCG ATC-3'	7336.75	7342.98	7.05	200

* amount estimated by UV measurement at 260 nm;

**MALDI issues;

a: crude ODN.

1.2. Convertible Oligonucleotides (CvON)

The 5'-alkynyl-phosphoramidite **38** was incorporated within the sequences of interest at the positions marked T*. All the obtained CvONs are indexed in Table 3.

Table 3. Obtained Convertible Oligonucleotides (CvON)

ODN	Sequences	[M-H] ⁻ calc. (Da)	[M-H] ⁻ found (Da)	HPLC R _t (min)	n (nmol) ^{#,a}
α-10alk	5'-GCG ACC TTT T*TT AGT GTG TGC C-3'	6760.81	6763.50	9.20	200
α-8,12alk	5'-GCG ACC TT*T TTT* AGT GTG TGC C-3'	6801.40	6815.90**	10.29	200
α-8,10,12alk	5'-GCG ACC TT*T T*TT* AGT GTG TGC C-3'	6840.40	6845.06	11.81	200
β-11alk	5'-GGC ACA CAC TT*A GGT CGC-3'	5521.61	5522.88	6.66	200
λ-12alk	5'-GCG ACC TCT TT*T TCA GTG TGT GCC-3'	7341.36	7346.12	8.74	173
λ-9,13alk	5'-GCG ACC TCT* TTT T*CA GTG TGT GCC-3'	7381.93	7382.80	9.30	147
μ-11alk	5'-GGC ACA CAC TCT* CAG GTC GC-3'	6101.10	6104.15	7.41	165
ξ-13alk	5' CGG GCA CAC ACT T*AG GTC GCC G 3'	6761.40	6760.42	7.25	163
ν-12alk	5' -CGG CGA CCT TTT* TTA GTG TGT GCC CG-3'	8000.20	8000.40	8.41	187
π-14alk	5' CGG GCA CAC ACT CT*C AGG TCG CCG 3'	7339.80	7344.79	7.40	200
ο-13alk	5'-CGG CGA CCT CTT T*TT CAG TGT GTG CCC G-3'	8578.50	8581.64	8.46	200
1OLD-3alk	5'-GAT* CGA AAC GTA GCG CCT TCG ATC-3'	7374.79	7379.94	8.57	200
1OLD-11alk	5'-GAT CGA AAC GT*A GCG CCT TCG ATC-3'	7374.79	7381.20	8.66	200
1OLD-19alk	5'-GAT CGA AAC GTA GCG CCT T*CG ATC-3'	7374.79	7378.12	8.64	200
1OLD-23alk	5'-GAT CGA AAC GTA GCG CCT TCG AT*C-3'	7374.79	7380.40	8.57	200

T*: 5'-S-alkyne thymidine;

[#]: amount estimated by UV measurement at 260 nm;

**MALDI issues with calibration;

a: crude ODN.

2. Functionalized Oligonucleotides (FuON)

2.1. CuAAC protocol

All the reactions were performed by using the following protocol unless stated otherwise.

All solvents were degassed for 30min before use (H₂O, ACN or MeOH and TEAAc) using argon. To the alkyne-oligonucleotide (100 μL of a 100 nmol solution in ultra-pure water) was added the azide counterpart derivative (6 μL, 50 mM, in MeOH or ACN, 3 eq. per alkyne function). Freshly prepared aqueous solution of CuSO₄ (10 μL, 0.02 M, 2 eq./alkyne) and NaAsc (10 μL, 0.1 M, 10 eq/alkyne) and TEAAc buffer 0.05 M in a 4:1 ratio (up to 150 μL for the total aqueous layer) and organic solvent (up to 150 μL for the organic layer) were added to obtain a final volume of 300 μL. The tube containing the resulting mixture was placed in a block heater at 60°C, agitated at 1200 rpm for the specified amount of time. An EDTA solution (500 μL, saturated solution) and water (200 μL, to make up 1 mL) are added to the mixture and the resulting ODN solutions were desalted on Sephadex G-25 columns and concentrated. Residue was dissolved in water (1 nmol/μL) and analyzed by reversed-phase preparative

Experimental part

HPLC and MALDI-TOF as previously described. If necessary, the ONs were purified before use in assembly.

2.2. FuON conditions for CuAAC and analyses

The ODN obtained by Click chemistry and the conditions used to obtain them are presented in the two following tables. Table 4 presents the data concerning the **FuON** described in Chapter II.

Table 4. Click chemistry reactions from Chapter II

ODN	Azide	Reagents quantity*			Solvent & Duration	[M-H] ⁻ calc. (Da)	[M-H] ⁻ found (Da)	HPLC R _t (min)	n (nmol) [‡]
		CuSO ₄	NaAsc	Azide					
α-10alk	C₁-amide (28)	2	10	3	ACN-3h	6947.17	6958.30	9.05	71 ^a
	TripHis-Me (19)	2	10	3	ACN-3h	7114.78	7125.78	7.46	62 ^a
α-8,12alk	C₁-amide (28)	2	10	3	ACN-2h30	7240.77	7279.80	8.53	91 ^a
	TripSer-Me (12)	2	10	3	MeOH-30min	7479.09	7479.43	11.12	25 ^b
	TripSer-Me (12)	2	10	3	MeOH-1h	7479.09	7712.40**	7.92	35 ^b
α-8,10,12alk	TripSer-Me (12)	1,5	10	3	MeOH-30min	7857.48	7865.25	8.14	56 ^b
β-11alk	C₁-ester (26)	2	10	3	ACN-30min	X	X	X	X
	C₃-ester (27)	2	10	3	ACN-30min	X	X	X	X
	C₁-amide (28)	2	10	3	ACN-3h	5742.78	5745.20	8.69	60 ^a
	C₃-amide (29)	4	20	6	ACN-1h30	5770.83	5772.25	9.12	30 ^b
	C₅-amide (30)	4	20	6	ACN-1h30	5798.88	5798.24	10.73	28 ^b
	TripSer-Me (12)	2	10	3	MeOH-1h	5859.92	5858.30	6.19	23 ^b
	TripHis-Me (19)	2	10	3	ACN-3h	5876.01	5880.21	6.48	60 ^a

*: Number of equivalents of reagent by alkyne on the ODN;

‡: amount estimated by UV measurement at 260 nm;

** : MALDI issues with calibration;

a: crude ODN; b: isolated amount by IC.

The **FuON** described in Chapter II are presented in Table 5.

Table 5. Click chemistry reaction from Chapter III

ODN	Azide Im-N ₃	Reagents quantity			Solvent & Duration	[M-H] ⁻ calc. (Da)	[M-H] ⁻ found (Da)	HPLC R _t (min)	n (nmol) ^{±,a}
		CuSO ₄ [*]	NaAsc [*]	Azide [*]					
1OLD-3Im		2	10	3	ACN-1h	7511.93	7510.57	7.03	85
1OLD-11Im		2	10	3	ACN-3h	7511.93	7550.10	7.02	75
1OLD-19Im		2	10	3	ACN-1h	7511.93	7513.57	7.26	90
1OLD-23Im		2	10	3	ACN-1h	7511.93	7535.72	7.13	86

*: Number of equivalents of reagent by alkyne function on the ODN;
 ±: amount estimated by UV measurement at 260 nm;
 a: crude ODN.

3. Physicochemical studies

All measurements were performed in 1.0 cm path-length quartz micro cuvettes.

Molar extinction coefficients (ϵ) used were obtained using www.idtdna.com for the wild-type strands and considered the same for corresponding convertible and functionalized sequences (Table 6).

Table 6. Molar extinction coefficients

ODN	Sequence	ϵ (cm ⁻¹ .mol ⁻¹ .L)
α	5'-GCG ACC TTT TTT AGT GTG TGC C-3'	197 200
β	5'-GGC ACA CAC TTA GGT CGC-3'	169 500
γ	5'-TTT TTA GTG TGT GCC-3'	135 100
δ	5'-GGC ACA CAC TT-3'	102 400
ϵ	5'-GCG ACC TTT TTT-3'	103 200
ζ	5'-TA GGT CGC-3'	75 800
η	5'-CGC CAT GTT TTT AGT GTG TGC C-3'	197 700
θ	5'-GGC ACA CAC TTC ATG GCG-3'	168 200
ι	5'-GCG ACC TTT TTT GCG TGT GAT C-3'	196 400
κ	5'-GAT CAC ACG CTA GGT CGC-3'	170 900
λ	5'-GCG ACC TCT TTT TCA GTG TGT GCC-3'	183 300
μ	5'-GGC ACA CAC TCTCAG GTC GC-3'	211 000
ν	5'-CGG CGA CCT TTT TTA GTG TGT GCC CG-3'	203 900
ξ	5'-CGG GCA CAC ACT TAG GTC GCC G-3'	231 600
\omicron	5'-CGG CGA CCT CTT TTT CAG TGT GTG CCC G-3'	217 700
π	5'-CGG GCA CAC ACT CTC AGG TCG CCG-3'	245 400
1OLD	5'-GAT CGA AAC GTA GCG CCT TCG ATC-3'	230 200

3.1. Thermal denaturation studies

The strands were placed in equimolar ratio in a phosphate buffer (NaCl 200mM, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 10mM, EDTA 1mM pH=7) in a concentration allowing to obtain an optical density near 1. The concentrations of the ODNs were calculated by measuring the absorbance at 260 nm and at 90°C assuming unchanged molecular extinction coefficient for modified nucleotides. Samples were heated at 80°C and cooled to 15°C at a rate of 0.5°C/min as described in Table 7. Thermal denaturation studies parameters to ensure an optimal hybridization between strands and then warmed up to 80°C at the same rate. The last ramp (from 80°C to 20°C) allowed the system to cool down.

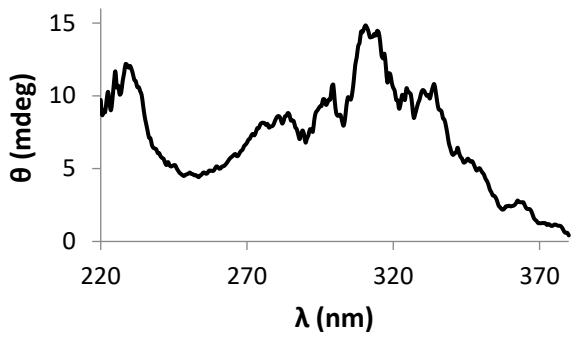
Table 7. Thermal denaturation studies parameters

Steps	Data collection interval (°C)	Rate (°C/min)	Start (°C)	End (°C)	Wait time
1	1.0	0.5	80	15	0.2
2	1.0	0.5	15	80	0.2
3	1.0	0.5	80	20	0.2

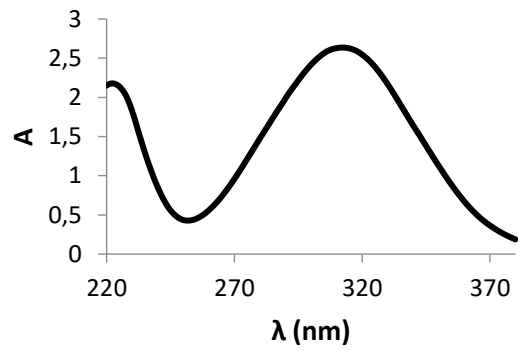
3.2. Circular dichroism studies

Spectra were recorded on a Jasco 5-815 CD spectrometer linked to a Jasco PTC-4235/15 Peltier with a UV quartz cell with a 1 cm path length. The analyses were performed at 20°C between 200 and 300 nm with a 1s stop every 0.1 nm and to record twice the data in order to obtain an average value allowing to by-pass the residual background noise. Before any analyses, the spectra of the substrate, of the **1OLD-wt** ODN in solution, and of the substrate in solution with the ODN was studied and are reported in §3.2.1 to 3.2.3.

3.2.1. ArgpNA DC and UV spectra

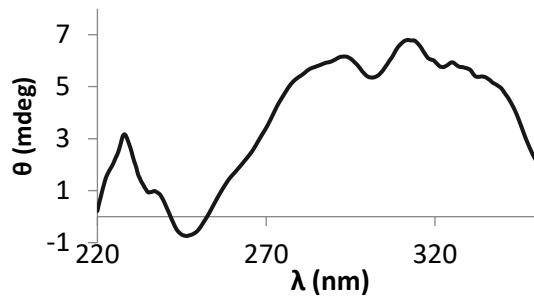


Graph 3. DC spectrum of ArgpNA

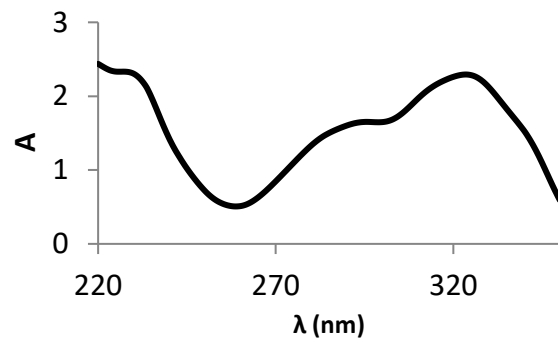


Graph 4. UV spectrum of ArgpNA

3.2.2. Arg-AMC (33) DC and UV spectra

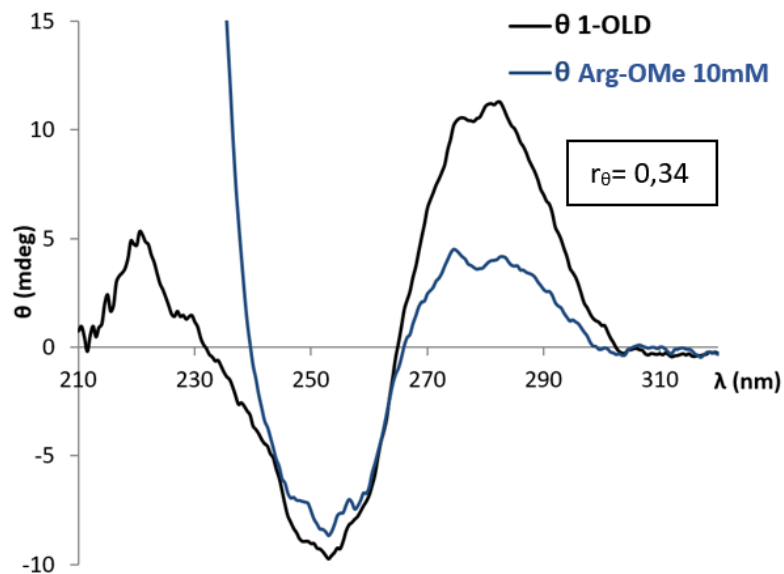


Graph 5. DC spectrum of Arg-AMC 40



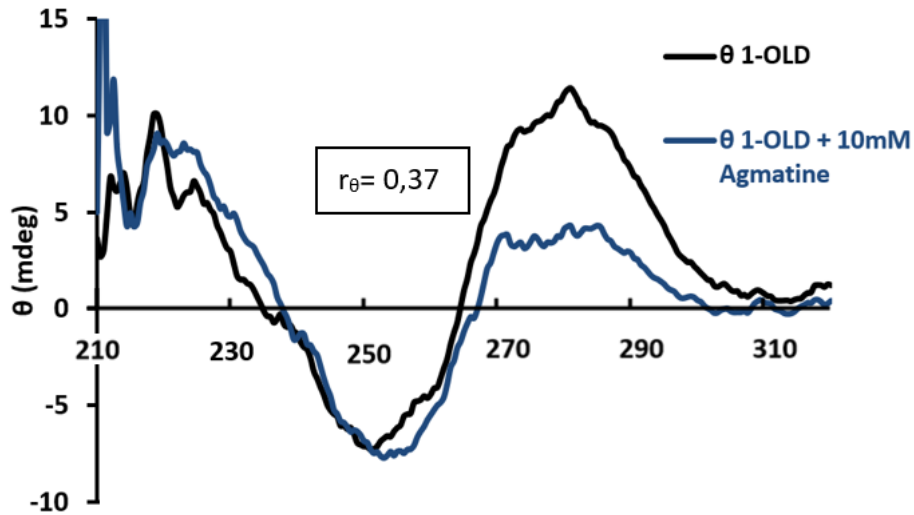
Graph 6. UV spectrum of Arg-AMC 40

3.2.3. DC signal for 1OLD after and before addition of substrates

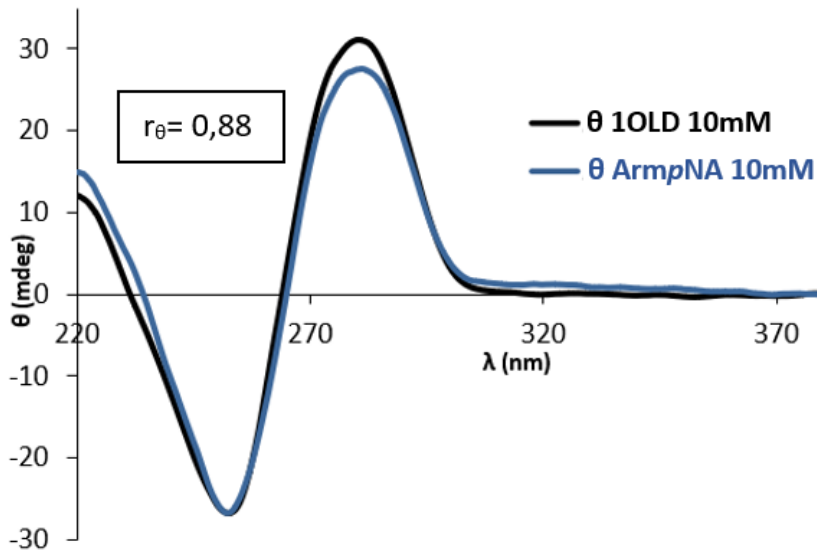


Graph 7. Variation of DC signal for **1OLD-wt** (5 μ M) at different concentration of Arg-OMe; Buffer: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7.

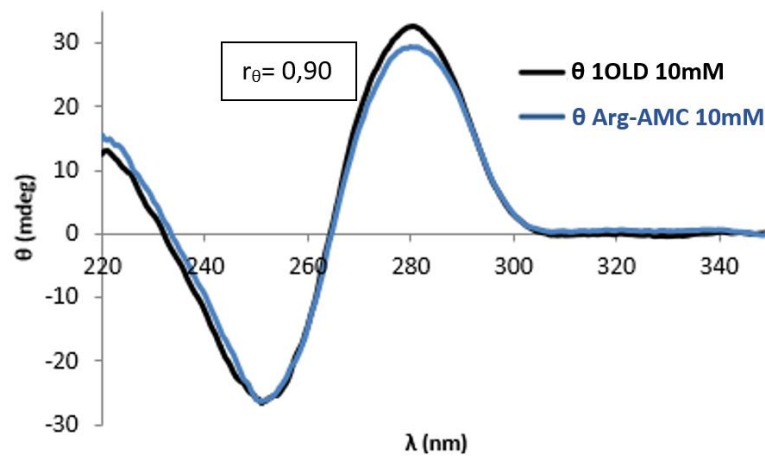
Experimental part



Graph 8. Variation of DC signal for **1OLD-wt** ($5 \mu\text{M}$) after addition of Agm; Buffer: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7.

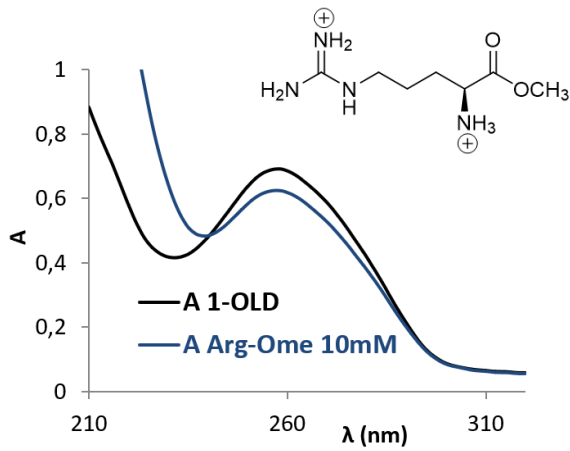


Graph 9. Variation of DC signal for **1OLD-wt** ($10 \mu\text{M}$) after addition of ArgpNA; Buffer: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7.

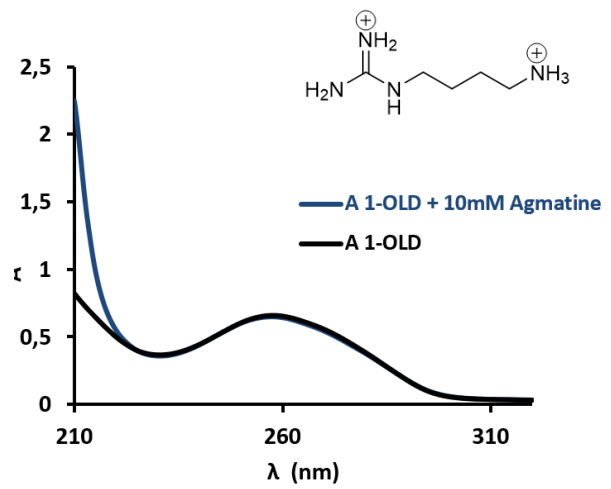


Graph 10. Variation of DC signal for **1OLD-wt** ($10 \mu\text{M}$) after addition of Arg-AMC; Buffer: $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 10 mM, NaCl 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH=7.

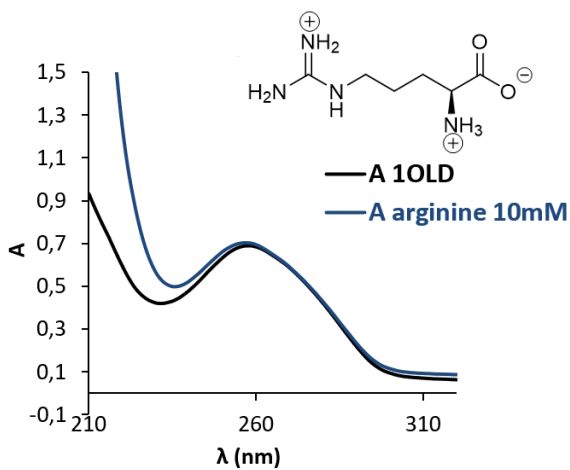
3.2.4. Control of 1OLD Absorbance after and before addition of substrate



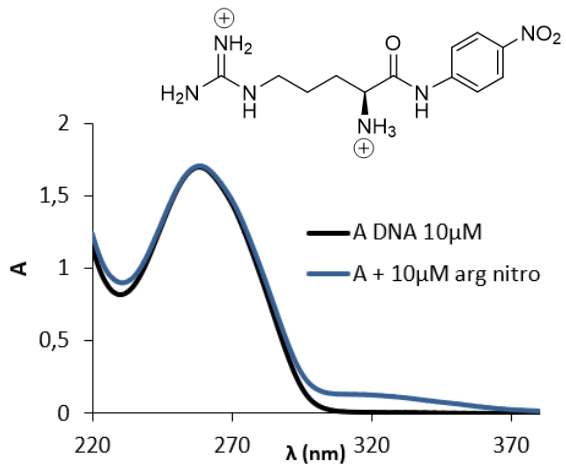
Graph 11. Superimposition of UV spectra from 1OLD analysis, with and without ArgOme



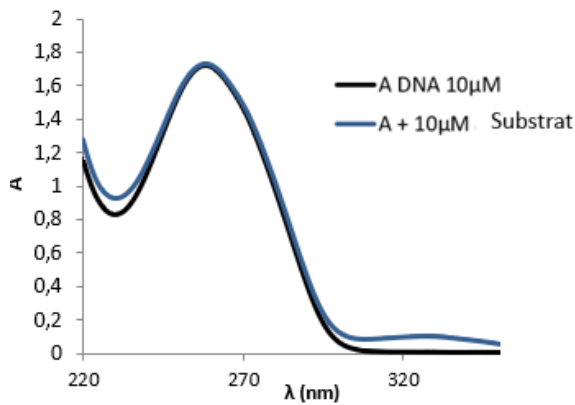
Graph 12. Superimposition of UV spectra from 1OLD analysis, with and without Agm



Graph 13. Superimposition of UV spectra from 1OLD analysis, with and without Arg



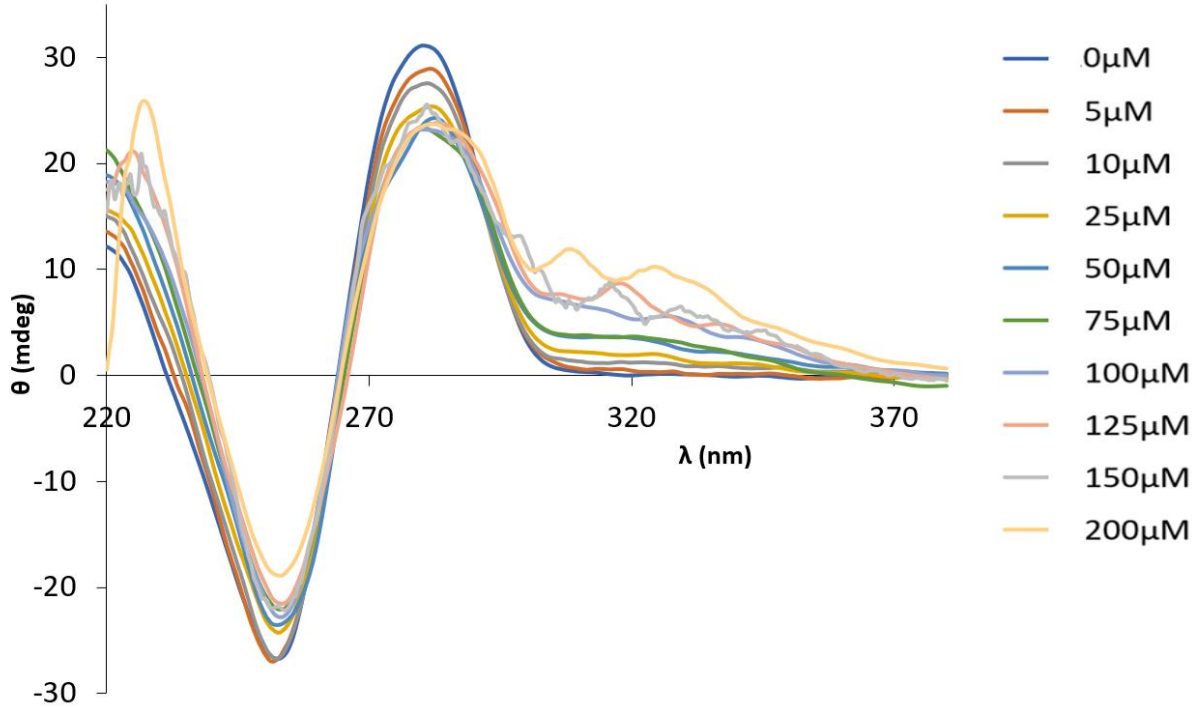
Graph 14. Superimposition of UV spectra from 1OLD analysis, with and without ArgpNA



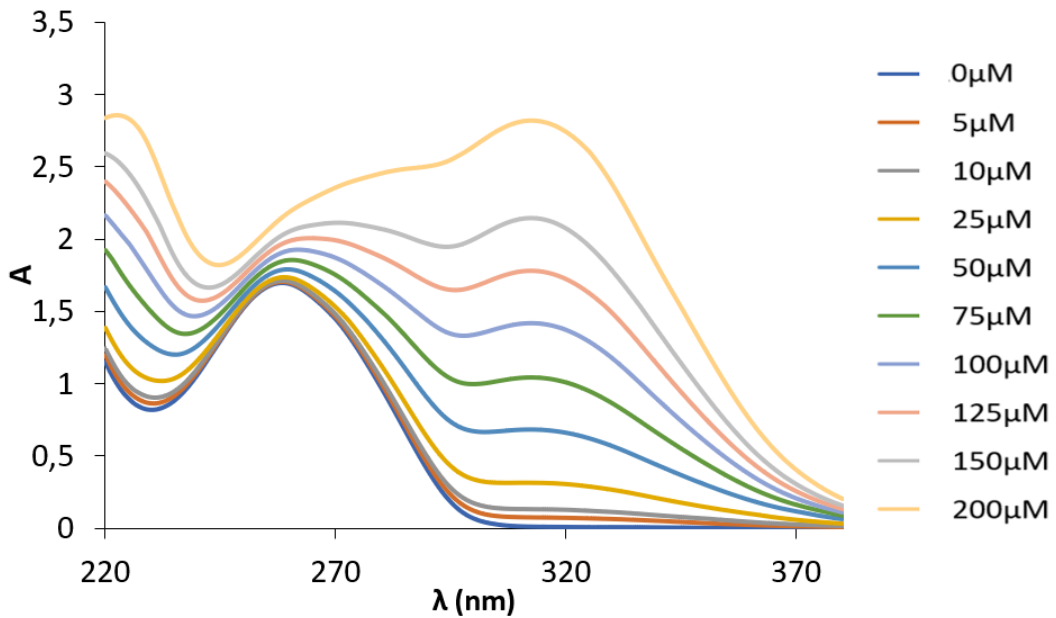
Graph 15. Superimposition of UV spectra from 1OLD analysis, with and without Arg-AMC

§3.2.2 and §3.2.3. present the data recorded during the study of **1OLD-wt** when in presence of different concentrations of substrates Arg-pNA and Arg-AMC.

3.2.4. CD analysis of 1OLD with Arg-pNA

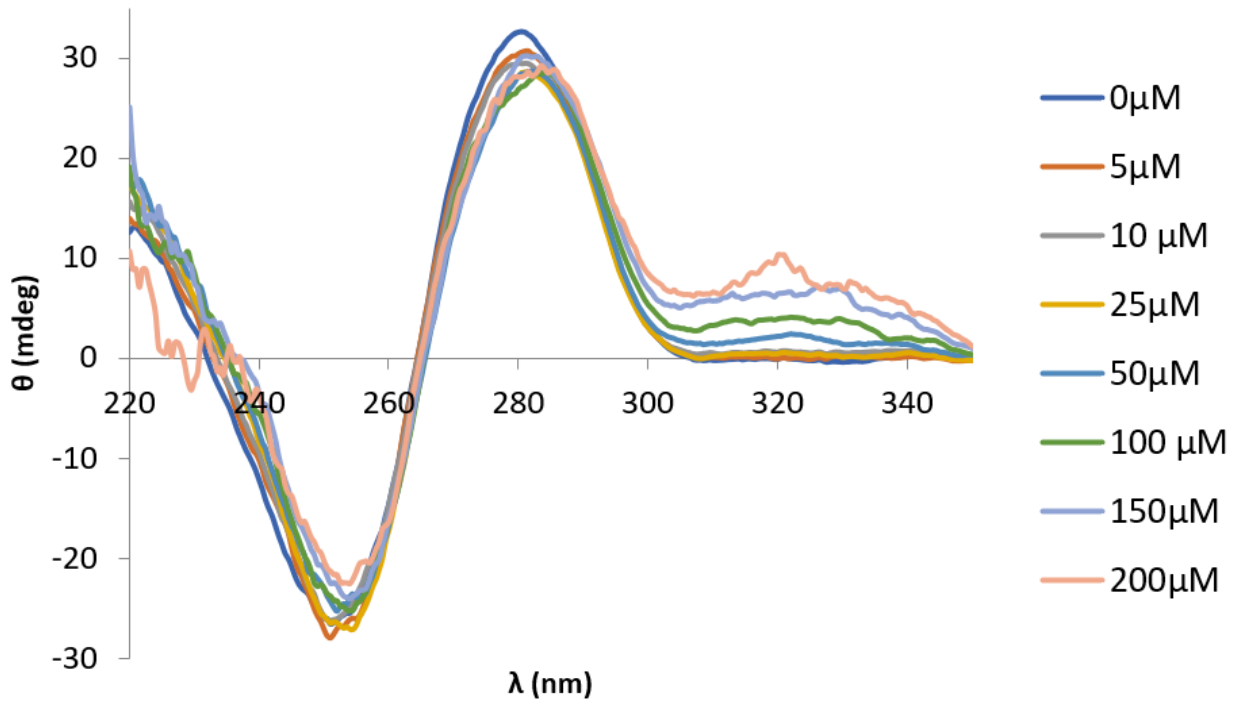


Graph 16. CD spectra study of **1OLD-wt** (10 μM) with different concentration of ArmpNA

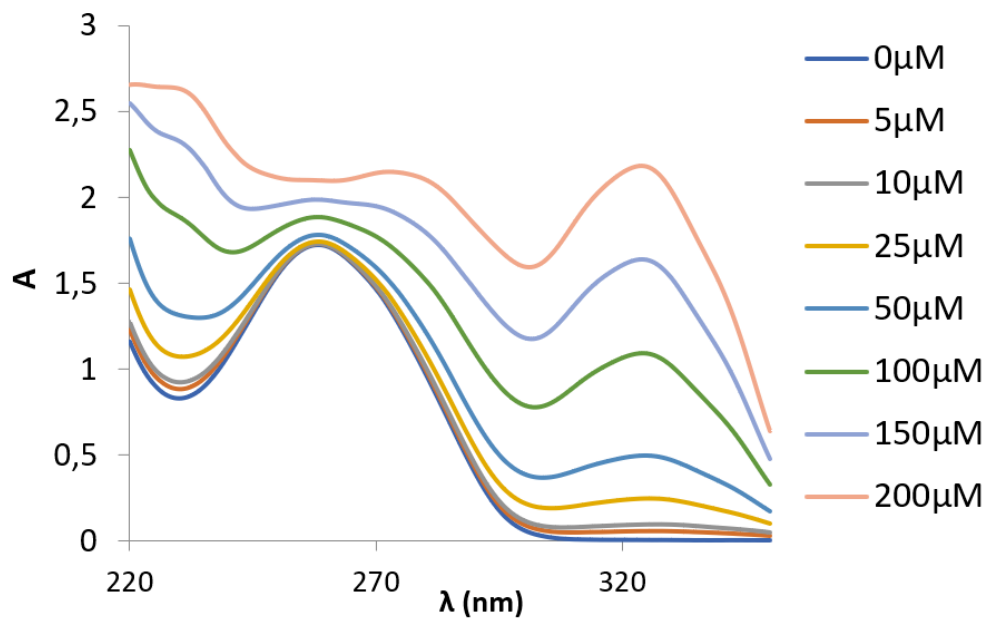


Graph 17. UV spectra study of **1OLD-wt** (10 μM) with different concentration of ArmpNA

3.2.5. CD analysis of 1OLD with Arg-AMC



Graph 18. CD spectra study of **1OLD-wt** (10 μM) with different concentration of Arg-AMC



Graph 19. UV spectra from titration of **1OLD-wt** (10 μM) with different concentration of Arg-AMC

Dans le cadre d'une approche biomimétique, ce projet vise à synthétiser des oligonucléotides fonctionnalisés (**FuONs**) comme mimes de protéases à sérine. Ces enzymes ubiquitaires sont responsables de l'hydrolyse de la liaison amide des protéines grâce à une triade catalytique coopérative impliquant les groupements organiques des chaînes latérales des acides aminés sérine, histidine et aspartate, soit respectivement les fonctions alcool, imidazole et carboxylate.

Pour cela, il a été nécessaire d'étendre le répertoire fonctionnel restreint de l'ADN afin de catalyser des réactions-types d'hydrolyse de substrats activés présentant une fonction ester ou amide. Ainsi, deux organocatalyseurs différents, porteurs d'un bras azoture, ont été synthétisés de façon à regrouper les trois fonctions organiques d'intérêt alcool, imidazole et carboxylate sur un squelette sérine ou dérivant du tri(hydroxy)méthyl-éthane. Nommés tripodes, ils ont chacun été introduits (jusqu'à trois fois) par chimie click type CuAAC sur des oligonucléotides convertibles obtenus par incorporation spécifique de 5'-alcényl-phosphoramidites lors de la synthèse supportée. Les séquences de ces oligonucléotides fonctionnalisés ont été pertinemment choisies pour constituer des bibliothèques de catalyseurs ADN présentant une topologie modulable par les structures secondaires de l'ADN. En effet, afin de s'affranchir de l'absence de poche de reconnaissance, une approche covalente reposant sur des structures "bulge" a été mise en œuvre pour augmenter artificiellement la concentration effective en présentant, face à un **FuON**-tripode(s), un **FuON** porteur d'un substrat amide chromogénique. Les capacités de structuration et d'hydrolyse de ces bulges ont ensuite été évaluées par différentes méthodes physico-chimiques.

Enfin, les travaux décrits portent également sur une approche aptazyme pour tirer profit des propriétés de reconnaissance d'une séquence aptamère connue vis à vis d'un substrat cible. Ainsi, après avoir synthétisé différents aptamères modifiés à des positions clés par un organocatalyseur, les propriétés de structuration induite de ces **FuONs** autour de leur substrat amide chromogénique ont été étudiées par dichroïsme circulaire et leurs propriétés catalytiques évaluées.

English version

This project aims to synthesize functionalized oligonucleotides (**FuON**) as serine proteases mimics. Those ubiquitous enzymes are in charge of the hydrolysis of the amide bonds in proteins thanks to the cooperative catalytic triad through alcohol, imidazole and carboxylate functions of the side chains of, respectively, serine, histidine and aspartate amino acids.

It was however necessary to expand the limited functional repertoire of DNA in order to catalyze the hydrolysis of activated ester or amide substrates. Two different organocatalysts, each bearing an azide linker, were synthesized in order to introduce the three organic groups alcohol, imidazole and carboxylate as one tripod based either on a serine or tri(hydroxy)methylethane scaffold. Each tripod was then introduced (up to three times) using CuAAC click chemistry onto convertible oligonucleotides obtained from the controlled incorporation of 5'-alkynyl phosphoramidites during the supported synthesis. **FuON** sequences were designed to fold into various DNA secondary structures when combined. In order to by-pass the lack of a binding pocket, a covalent approach was envisaged to increase the effective concentration, using a bulge structure to bring in close proximity both the **FuON**-tripod(s) and the **FuON** bearing a chromogenic amide substrate. Both structuration and hydrolytic properties were evaluated by means of physico-chemical studies. Finally, starting from a known aptamer sequence selected to recognize an amide substrate, an organocatalyst was introduced at key positions within said sequence and the resulting induced fit of newly **FuONs** was studied by circular dichroism and the catalytic properties for this aptazyme strategy evaluated.